

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto de la sustitución parcial y total de la harina y aceite de
pescado con harinas de microalgas, en juveniles de *Totoaba
macdonaldi***

Tesis

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

Presenta:

Eliasid Ranferi Nogueta Torres

Ensenada, Baja California, México

2019

Tesis defendida por
Eliasid Ranferi Nogueta Torres
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director de tesis

Miembros del comité
Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Dr. Ernesto García Mendoza

Dr. Armando García Ortega



Dra. Fabiola Lafarga De La Cruz
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Eliasid Ranferi Nogueta Torres©2019

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

Resumen de la tesis que presenta **Eliasid Ranferi Nogueta Torres** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Efecto de la sustitución parcial y total de la harina y aceite de pescado con harinas de microalgas, en juveniles de *Totoaba macdonaldi*

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Director de tesis

Se evaluaron harinas de microalgas para reemplazar harina de pescado (HP) y aceite de pescado (AP) en la formulación de dietas para juveniles *Totoaba macdonaldi*, usando como principal fuente proteica harina de *Arthrospira* sp. y como fuente lipídica harina de *Schizochytrium* sp. Las dietas se formularon para contener un 51% de proteína y un 13% de lípidos. Se fabricaron 5 dietas con características similares, pero utilizando ambas microalgas para reemplazar la HP y el AP en niveles de 0% (FM100), 25% (FM75), 50% (FM50), 75% (FM25) y 100 % (FM0). Se llevó a cabo un experimento de alimentación de peces en un sistema de recirculación de agua de mar con 18 tanques de 275 L con 12 juveniles (10 ± 1 g) en cada uno y se mantuvieron a una temperatura constante de 25 °C. Los tratamientos fueron asignados a los tanques de manera aleatoria y fueron evaluados por triplicado. Los peces se alimentaron a saciedad aparente dos veces al día durante 12 semanas. Como variables de respuesta se utilizaron la tasa de crecimiento de los peces, su composición proximal corporal, la retención de nutrientes, supervivencia, la digestibilidad aparente y la actividad enzimática del intestino y ciegos pilóricos. La inclusión de las harinas de microalgas en las dietas resultó en una reducción en el crecimiento de los peces, el cual fue mayor en las dietas con menor contenido de HP y AP. Esta tendencia también se vio reflejada en la utilización del alimento. En comparación, el aumento en peso, el coeficiente de crecimiento térmico, el consumo de alimento, el valor productivo de los lípidos y la tasa de eficiencia proteica fueron significativamente mayores en el tratamiento FM100. Sin embargo, el valor productivo de la proteína no fue significativamente diferente entre los tratamientos FM100, FM75 y FM50, mientras que la tasa de conversión alimenticia fue estadísticamente más alta en FM0. El porcentaje de digestibilidad aparente de las dietas fue menor a medida que se sustituía la HP y el AP siendo las dietas FM25 y FM0 las menos digeribles. El patrón fue similar en la digestibilidad de lípidos. Sin embargo, en el caso de la digestibilidad de la proteína no se presentaron diferencias significativas entre las dietas FM100, FM75, FM50 y FM25. Los datos de actividad enzimática muestran una mayor actividad de la tripsina en el intestino comparada con los ciegos pilóricos. De manera general se observó un aumento significativo en la actividad de esta enzima en los peces alimentados con microalgas. En contraste, la actividad de las lipasas fue significativamente mayor en los ciegos pilóricos y fue disminuyendo al aumentar el contenido de microalgas en las dietas. La dieta FM100 produjo el mayor contenido de EPA ácidos grasos monoinsaturados en el filete, mientras que el contenido de ácidos grasos saturados DHA, polinsaturados n-6 fue mayor en el filete de peces alimentados con microalgas. En conclusión, los tratamientos con 25% y 50% de sustitución de HP y AP utilizando *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp. obtuvieron un buen crecimiento. Así mismo se observó una buena digestibilidad de las proteínas en las dietas que contenían hasta un 50% de sustitución de HP y AP. Adicionalmente, se observó una buena TCA similar a la dieta control en los tratamientos FM75 y FM50, y se logró una alta concentración de DHA en el tejido de los peces alimentados con las dietas experimentales que contenían microalgas, algo muy deseable para el consumo humano. Por otro lado, en el presente estudio se logró identificar algunas desventajas del uso de *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp. como

sustitutos de HP y AP en la elaboración de alimento para juveniles de *T. Macdonaldi* y se proponen algunas soluciones. Problemas como un desequilibrio en la concentración de ácidos grasos y alteraciones físicas en las características de las dietas que pueden ser corregidas. Esto da la pauta para realizar investigaciones futuras evaluando los factores antes mencionados para obtener mejores resultados, ya que es necesario lograr un desarrollo sustentable de la acuicultura por medio de la búsqueda de ingredientes alternativos que puedan disminuir o eliminar el uso de la HP y el AP.

Palabras clave: Harina de pescado, Aceite de pescado, *Schizochytrium* sp., *Arthrospira* sp. *Totoaba macdonaldi*, digestibilidad, actividad enzimática.

Abstract of the thesis presented by **Eliasid Ranferi Noguera Torres** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Effect of partial and total substitution of fish meal and oil with microalgae meals, in juveniles of
Totoaba macdonaldi

Abstract approved by:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Thesis director

Microalgae meals were evaluated as replacements for fish meal (FM) and fish oil (FO) in the formulation of diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles using *Arthrospira* sp. as the main protein source and *Schizochytrium* sp. as a lipid source. The diets were formulated to contain 51% protein and 13% lipid. The diets were manufactured with similar characteristics, but using increasing quantities of a mixture of both microalgae to replace HP and AP at levels of 0% (FM100), 25% (FM75), 50% (FM50), 75% (FM25) and 100% (FM0). A fish feeding experiment was performed using a seawater recirculation system composed of 15-175 L tanks stocked with 12 juveniles (10 ± 1 g) each and kept at a constant temperature of 25 °C. Each dietary treatment was assigned to the tanks randomly and was evaluated in triplicate. Fish were fed to apparent satiation twice a day for 12 weeks. As response variables, growth rate, proximal body composition, nutrient retention, survival, diet digestibility and digestive enzyme activity of the intestine and pyloric caeca were used. The inclusion of microalgae meal in diets resulted in a reduction in fish growth, with the lowest weight gain in fish fed diets with the lowest HP and AP content. This trend was also reflected in feed utilization. Moreover, the increase in weight, thermal growth coefficient, feed consumption, lipid productive value and protein efficiency rate were significantly higher in the FM100 treatment. However, protein productive value was not significantly different among the FM100, FM75, and FM50 treatments, while the feed conversion rate was significantly higher in fish fed the FM0 diet. The apparent digestibility of the diets decreased as HP and AP content of the diets was reduced, with FM25 and FM0 diets resulting in the least digestible diets. Similar patterns were observed for lipid digestibility of the diet. However, protein digestibility of the diets was not significantly different among the FM100, FM75, FM50 and FM25 treatments. Trypsin activity was significantly higher in the intestine compared to the pyloric caeca. In general, a significant increase in the activity of this enzyme was observed in fish fed with diets containing microalgae. In contrast, the activity of lipases was significantly higher in the pyloric caeca and decreased as the content of microalgae in diets increased. The FM100 diet produced the highest EPA content and monounsaturated fatty acids in the fish fillet, while the content of saturated, DHA and polyunsaturated n-6 fatty acids was higher in the fillet of fish fed with microalgae diets. In conclusion, treatments with 25% and 50% HP and AP replacement using *Arthrospira* sp. and *Schizochytrium* sp. supported good growth. Moreover, a good digestibility of the proteins was observed in the diets that had up to 50% substitution of HP and AP. Additionally, a good FCR similar to the control diet was observed in the FM75 and FM50 treatments, and a high concentration of DHA was achieved in the tissue of the fish fed with the experimental diets containing microalgae, a very desirable characteristic for human consumption. On the other hand, in the present study it was possible to identify some disadvantages of using *Arthrospira* sp. and *Schizochytrium* sp. as substitutes for HP and AP in the formulation of feeds for *T. macdonaldi* juvenile and some solutions are proposed. For example, problems such as an imbalance in the concentration of fatty acids and physical alterations in the characteristics of diets can be corrected. This paves the way for future research evaluating the aforementioned factors to obtain better results since it is necessary to achieve sustainable development of aquaculture through the search for alternative ingredients that can decrease or eliminate the use of FM and FO in carnivorous fish.

Keywords: Fish meal, Fish oil, *Schizochytrium* sp., *Arthrospira* sp., *Totoaba macdonaldi*, digestibility.

Dedicatoria

Únicamente a mis padres, los quiero y gracias por todo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido a través de la beca de manutención para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en especial al Departamento de Acuicultura, por darme la oportunidad de realizar mi posgrado en sus instalaciones.

Al Instituto de Acuicultura del estado de Sonora y al personal técnico del Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora, por la donación de huevos de *Totoaba macdonaldi*.

Al Dr. Juan Pablo Lazo, por el apoyo, los consejos y por compartir su conocimiento conmigo. Gracias Doc.

Al Dr. Armando García Ortega por aportar las dietas que se utilizaron en este experimento, por su apoyo y sus aportaciones.

A la Dra. Pilar Sánchez Saavedra y Al Dr. Ernesto García Mendoza por aceptar ser parte de mi comité de tesis y ayudar a mejorar este trabajo.

A los investigadores del departamento de acuicultura, en especial al Dr. Benjamín Barón Sevilla, gracias por permitirme integrar en las primeras etapas del cultivo de los peces, facilitarme los organismos y por su apoyo.

A mis compañeros de generación, Melina, Leo, Pato, la Yira, Rocío y en especial a mis dos perros fieles.

A los mis amigos del laboratorio de nutrición acuícola, al Dr. Pablo Fuentes y al estudiante de Posdoctorado y miembro del SNI Jorge Madrid, al señor Abelardo y Adriana por su ayuda, buenas charlas y agradables momentos.

A los del laboratorio de ecosfisiología, Candy, al Atondo, Luis, Eloy, Lidia y Cristina por las horas y horas y horas de esparcimiento y despeje.

“En tiempos donde nadie escucha a nadie,
En tiempos donde todos contra todos,
En tiempos egoístas y mezquinos,
En tiempos donde siempre estamos solos...” Se cruzaron en mí camino.



Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	viii
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	4
2.1 <i>Totoaba macdonaldi</i>	4
2.2 Proteínas y lípidos como nutrientes en los organismos acuáticos.....	5
2.3 Microalgas en la acuicultura.....	6
2.4 <i>Arthrospira</i> sp.....	9
2.5 <i>Schizochytrium</i> sp.....	9
2.6 <i>Haematococcus</i> sp.....	10
2.7 Sistema digestivo en peces.....	10
2.8 Digestión en peces.....	11
Capítulo 3. Justificación	13
Capítulo 4. Hipótesis	14
Capítulo 5. Objetivos	15
5.1 Objetivo particular.....	15
5.2 Objetivo específico.....	15
Capítulo 6. Metodología	16
6.1 Formulación y elaboración de dietas.....	16
6.2 Condiciones de cultivo de los peces.....	16
6.3 Toma de muestras.....	18
6.4 Crecimiento.....	18
6.5 Supervivencia	19
6.6 Tasa de conversión alimenticia (TCA)	19

6.7 Tasa de eficiencia proteica (TEP)	20
6.8 Valor productivo de la proteína (VPP) y valor productivo de los lípidos (VPL).....	20
6.9 Digestibilidad aparente (%).....	21
6.10 Actividad enzimática.....	22
6.10.1 Preparación del extracto enzimático.....	22
6.10.2 Tripsina.....	22
6.10.3 Lipasas dependientes de las sales biliares.....	23
6.10.4 Amilasas.....	23
6.11 Análisis de composición proximal.....	24
6.12 Composición de aminoácidos.....	24
6.13 Composición de ácidos grasos.....	24
6.14 Análisis estadísticos.....	25
Capítulo 7. Resultados	27
7.1 Análisis químico proximal, composición de aminoácidos y perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales.....	27
7.1.1 Análisis proximal.....	27
7.1.2 Aminoácidos.....	27
7.1.3 Ácidos grasos.....	28
7.2 Parámetros de crecimiento, y utilización del alimento.....	31
7.3 Digestibilidad aparente.....	34
7.4 Actividad enzimática.....	36
7.5 Análisis proximal de los peces.....	37
7.6 Perfil de ácidos grasos del músculo.....	38
Capítulo 8. Discusión	42
Capítulo 9. Conclusiones	51
Capítulo 10. Recomendaciones	52
Literatura citada	53

Lista de figuras

Pág.

- Figura 1.** Coloración de las dietas utilizadas en el experimento. De izquierda a derecha esta la dieta control, dieta con 0% (FM100), 25% (FM75), 50% (FM50), 75% (FM75) y 100% (FM0) de harinas de *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp..... 31
- Figura 2.** Incremento en peso (g) \pm desviación estándar de los juveniles de *T. macdonaldi*, registrado semanalmente durante el experimento. Los datos se compararon con una prueba de ANOVA de una vía ($P < 0.05$), $n = 15$. Las letras indican las agrupaciones de los tratamientos realizadas por medio de un análisis post hoc de Fisher ($P < 0.05$).; $a > b > c$ FM100 = 100% de HP y AP, FM75 = 75% de HP y AP, FM50 = 50% de HP y AP, FM25 = 25% de HP y AP, FM0 = 0% de HP y AP y ALG = 0% de HP, AP + *Haematococcus*..... 32
- Figura 3.** Porcentaje de digestibilidad aparente de las dietas en peso seco (A), proteína (B) y lípidos (C). Los datos se compararon con una prueba de ANOVA de una vía ($P < 0.05$), $n = 15$. Las letras indican las agrupaciones realizadas por medio de un análisis post hoc de Tukey ($P < 0.05$), la misma letra indica que no existen diferencias significativas: $a > b > c$. FM100 = 100% de HP y AP, FM75 = 75% de HP y AP, FM50 = 50% de HP y AP, FM25 = 25% de HP y AP, FM0 = 0% de HP y AP y ALG = 0% de HP, AP + *Haematococcus*..... 35
- Figura 4.** Actividad enzimática digestiva de tripsina ($U\ mg^{-1}$ de órgano), lipasa y amilasas ($U\ g^{-1}$ de órgano). Los datos se compararon con una prueba de ANOVA de una vía ($P < 0.05$), $n = 15$. Las letras indican las agrupaciones realizadas por medio de un análisis post hoc de Tukey ($P < 0.05$), la misma letra indica que no existen diferencias significativas: $a > b$. FM100 = 100% de HP y AP, FM75 = 75% de HP y AP, FM50 = 50% de HP y AP, FM25 = 25% de HP y AP, FM0 = 0% de HP y AP y ALG = 0% de HP, AP + *Haematococcus*..... 37

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1.	Uso de microalgas como sustituto de harina y aceite de pescado en dietas de peces marinos.....	8
Tabla 2.	Ingredientes (g kg ⁻¹) de las dietas experimentales para juveniles de <i>T. macdonaldi</i>	17
Tabla 3.	Análisis proximal (% en peso seco) y perfil de aminoácidos (g kg ⁻¹) de las dietas experimentales	28
Tabla 4.	Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales (% total de ácidos grasos identificados)	30
Tabla 5.	Desempeño de juveniles de <i>T. macdonaldi</i> alimentadas con las distintas dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de HP y AP por un periodo de 9 semanas	34
Tabla 6.	Composición proximal (% en peso húmedo) de los juveniles de <i>T. macdonaldi</i> alimentados con las distintas dietas experimentales	38
Tabla 7.	Perfil de ácidos grasos del músculo de juveniles de <i>T. macdonaldi</i> alimentadas con las distintas dietas experimentales (% total de ácidos grasos identificados)	41

Capítulo 1 Introducción

En la actualidad, uno de los mayores desafíos de la humanidad es garantizar la seguridad alimentaria de una creciente población mundial, la cual se estima que llegará a más de 9,000 millones de personas para el año 2050. En este contexto la pesca y la acuicultura juegan un papel importante en la aportación de alimento, donde se ha reportado que para el año 2014 el consumo mundial *per capita* de pescado, llegó a los 19.7 kg y suministro un 20% del aporte de proteína animal *per capita* a nivel mundial (FAO, 2016).

Este aumento en la aportación de alimento por parte de estas dos actividades es atribuido principalmente a la acuicultura, que ha tenido una tendencia al crecimiento, pasando de 10% del aporte de pescado y mariscos para consumo humano en 1985, a un aporte de más del 50% en el año 2016, mientras que la producción derivada de la pesca se ha mantenido constante en los últimos 20 años (i.e., 90 millones de toneladas). La producción total de peces, moluscos, crustáceos, otros animales acuáticos, plantas acuáticas y algas (excluyendo a los mamíferos) en el año 2016, producidos por la acuicultura fue de 110.1 millones de toneladas (FAO, 2018).

Sin embargo, uno de los principales problemas de la acuicultura, especialmente en el cultivo de organismos que requieren alimentos balanceados, son los elevados costos de este componente, el cual puede representar hasta el 60% del costo de la producción (Bhujel, 2002). El elevado costo del alimento para peces marinos se debe principalmente a la materia prima utilizada como base para su elaboración, la harina de pescado (HP) y el aceite de pescado (AP) (Arijo, 2015; Tacon y Metian, 2008). Las capturas de pelágicos menores (principales organismos utilizados para su elaboración) han descendido desde el año 2005, mientras que la demanda de la harina y aceite de pescado han ido en aumento, dando como consecuencia un alza en los precios de ambos productos (FAO, 2014). El uso de la harina y el aceite de pescado en la acuicultura han generado una gran controversia debido a la sobreexplotación de las pesquerías dedicadas a la generación de harina y aceite de pescado, haciendo insostenible una acuicultura basada en estos ingredientes. Un punto adicional importante a considerar es la utilización de este recurso pesquero para alimentar a otros peces, en vez de ser promovido directamente para el consumo humano (Fischer y Navarro, 2017).

El motivo por el cual la harina y aceite de pescado son el producto más utilizado para la elaboración de dietas para la acuicultura marina es porque estos productos proporcionan una proteína con alta

digestibilidad y en las cantidades y proporciones adecuadas de aminoácidos y ácidos grasos esenciales requeridos por la mayoría de los peces carnívoros (Cruz-Suárez *et al.*, 2000) que se producen en acuicultura en especial ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAS), en especial el ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (NRC, 2011; Welling, 2017).

Una posible solución al alto precio y baja sustentabilidad en la utilización de HP y AP como ingredientes, es la búsqueda de ingredientes alternos para la elaboración de alimento para la acuicultura. Entre estas alternativas se encuentran las harinas de origen animal como subproductos de avícolas, harinas de plumas o viseras, entre otros (Piñeros-Roldan *et al.*, 2014). También varias fuentes de origen vegetal son utilizadas para la elaboración de alimento para uso acuícola, como las leguminosas, la harina de algodón, canola y la soya son algunas de las más comunes, al igual que las semillas de plantas oleaginosas como son las semillas de sésamo o girasol (González *et al.*, 2013). Sin embargo, es necesario considerar el nivel de inclusión de las harinas de origen vegetal, ya que la mayoría de estas fuentes proteicas contienen altos niveles de carbohidratos, factores antinutricionales y por lo general son deficientes en algunos aminoácidos esenciales, especialmente en lisina y metionina (NRC, 2011; FAO, 1993). Una alternativa adicional son algunas especies de microalgas como *Anabaena* sp., *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. o *Arthrospira* sp., que debido a su alto contenido y calidad de sus proteínas (Becker, 2007) se perfilan como un buen sustituto de la harina de pescado.

Por otro lado, la sustitución del aceite de pescado por productos de origen animal como la grasa de cerdo, res o aves y en mayor medida aceites vegetales tales como aceite de palma, soya, canola, girasol cacahuate o maíz, también tiene aspectos negativos importantes a tomar en consideración (Turchini *et al.*, 2009). Reemplazar el AP en la formulación de las dietas modifica su composición de ácidos grasos, lo cual puede alterar procesos de digestión, absorción, procesos metabólicos y composición de los tejidos en el pez (Torstensen y Tocher, 2010). Además de estas alteraciones, se ha comprobado que la composición de ácidos grasos presente en la dieta tiene una relación estrecha con la salud de los organismos, afectaciones en el sistema inmunológico, así como alteraciones en la respuesta del cortisol a situaciones estresantes y las afectaciones en los intestinos e hígado han sido algunas de las consecuencias negativas reportadas en la sustitución de AP en dietas para peces (Montero e Izquierdo, 2011). Las deficiencias en ácidos grasos como el docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y el araquidónico (AA) están ampliamente relacionados con estas afectaciones (Tocher, 2003; Sargent *et al.*, 2002; Brown, 1994; Ernst *et al.*, 2016) y si bien, la mayoría de las fuentes lipídicas alternativas de origen animal y vegetal carecen de este tipo de

ácidos grasos, existen microalgas que lo pueden suplir al AP en la elaboración de dietas por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA's), *Crypthecodinium* sp., *Schizochytrium* sp. son una excelente fuente de DHA, *Nannochloropsis* sp., *Phaeodactylum* sp. y *Nitzschia* sp. son especies altas en EPA y la microalga *Porphyridium* sp. es rica en AA (Brennan y Owende, 2010).

Sin embargo, es necesario realizar más estudios pues estas alteraciones pueden ser influenciadas por otros factores como como el nivel de sustitución o la fuente lipídica utilizada. Así mismo, la respuesta también puede variar entre especies de peces, las relaciones de ácidos grasos presente en las dietas o incluso el contenido y tipo de los demás nutrientes presentes en la dieta (Montero e Izquierdo, 2011). Por esto, es de gran interés determinar los niveles de sustitución de HP y AP por las fuentes alternativas apropiadas para las distintas especies de peces destinadas a la acuicultura, para lo cual es indispensable realizar aún más estudios con este propósito.

Capítulo 2 Antecedentes

2.1 *Totoaba macdonaldi*

T. macdonaldi, es un pez marino perteneciente a la familia Sciaenidae y la única especie del género *Totoaba*. Es una especie endémica del Golfo de California, México, presenta un cuerpo alargado y ligeramente comprimido, boca grande con la mandíbula inferior ligeramente proyectada, escamas grandes y gruesas y presenta una coloración gris plateada. Es una especie longeva, pudiendo llegar a los 25 años de edad y a un tamaño promedio de 1.30 m siendo las hembras las que alcanzan mayor talla y peso en un periodo de tiempo más corto (Arvizu y Chávez, 1972; Román, 1994; Rosales y Ramírez, 1987).

Desde 1934 se tiene registro de su pesca poco regulada, con capturas de 719 toneladas para ese año. En 1942 se reportó la mayor captura con 2261 toneladas, a partir de ese punto, la pesca de la totoaba fue decayendo, tanto así, que tan solo en 1974 se registró una captura de solo 59 toneladas (Rosales y Ramírez, 1987). Actualmente esta especie se encuentra catalogada por la NOM-ECOL-059-2001 como una especie endémica en peligro de extinción y con estatus de peligro crítico en la UICN. La acuicultura ha jugado un papel importante en su proceso de conservación, durante los años de 2014 y 2015 las unidades de producción de totoabas destinaron alrededor de 80 mil crías por año al repoblamiento de la especie en las aguas del Golfo de California, México (IAES, 2015).

A pesar de los intentos de proteger esta especie, las medidas de protección han sido insuficientes debido a que la pesca ilegal e incidental siguen impactando directamente las poblaciones naturales de *T. macdonaldi* (Pedrín-Osuna *et al.*, 2001). Actualmente, el interés por la extracción de este recurso es por el alto valor que tiene su vejiga natatoria en el mercado asiático, el cual llega a tener un valor de hasta por 60 mil dólares el kg (SEMARNAT, 2017), mientras que en México el precio por kg de totoaba de cultivo tiene un precio de \$790 pesos. Sumado a su demanda en el mercado, debido principalmente al interés del mercado asiático por su vejiga natatoria, esta especie presenta un crecimiento rápido, llegando a los 2.5 kg en un año con tasas de conversión alimenticia de 2.5 y un crecimiento promedio de 7.5 gramos por día en condiciones de cultivo, lo que la hace un pez con alto potencial acuícola para México (Minjarez-Osorio *et al.*, 2014; Juárez *et al.*, 2016).

2.2 Proteínas y lípidos como nutrientes en organismos acuáticos

Las proteínas son las sustancias orgánicas más abundantes en las células, la variedad de estos compuestos es muy basta, cada una está especializada en una función biológica distinta. La base estructural de las proteínas son los aminoácidos, unidos mediante enlaces covalentes llamados peptídicos. Los aminoácidos están formados por un grupo carboxilo y un grupo amino unido a un carbono, los aminoácidos difieren entre sí por las cadenas laterales, llamados grupo R (Lehninger, 1985). A partir de estos compuestos, los organismos pueden sintetizar productos de importancia biológica como enzimas, anticuerpos, hormonas o tejidos (Webster y Thompson, 2015). Una composición balanceada de aminoácidos en la elaboración de dietas es un factor primordial para asegurar la salud de los peces y un crecimiento apropiado. En la elaboración de alimento para peces sustituyendo la HP, aminoácidos como la lisina y la metionina son comúnmente los que presentan niveles limitados, en comparación con las cantidades requeridas por los peces y se les conoce como aminoácidos limitantes (Gatlin III, 2000).

Al igual que las proteínas, los lípidos son uno de los componentes orgánicos principales en los seres vivos (Tocher, 2003). Los lípidos se caracterizan por ser solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua, su clasificación ha sido difícil debido a la diversidad de sus estructuras. Una de estas clasificaciones está fundada en su capacidad para producir jabones y generar sales de ácidos grasos a través de una reacción de hidrolisis alcalina (saponificables) y los que no contienen ácidos grasos en su estructura son incapaces de producir jabones, por lo tanto, son insaponificables (Teijón *et al.*, 2009). Los ácidos grasos poseen una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo terminal, la nomenclatura de los ácidos grasos se basa en la longitud de la cadena y el número y posición de los dobles enlaces (Lehninger, 1985). De acuerdo a su grado de insaturación (cantidad de dobles enlaces) los ácidos grasos se pueden clasificar en: 1) saturados (sin dobles enlaces), 2) insaturados (con dobles enlaces en su estructura). Los ácidos grasos insaturados a su vez se clasifican por la cantidad de dobles enlaces, los monoinsaturados poseen 1 doble enlace y los poliinsaturados (con más de 1 doble enlace), si estos presentan de 20 a 24 carbonos son denominados como ácidos grasos de cadena larga o LC-PUFAs, por sus siglas en inglés. Dentro los LC-PUFAs las familias de los n-3 y n-6 (nombrados así por la posición de su primer doble enlace contando desde el grupo metilo), un ejemplo de estos son el EPA, DHA y AA (FAO, 2008).

Los ácidos grasos también pueden ser clasificados como esenciales y no esenciales, los ácidos grasos esenciales son aquellos que los organismos requieren para su normal funcionamiento y no pueden ser

sintetizados por ellos mismos, por lo tanto, deben ser obtenidos de manera endógena a través de la alimentación. (Aires *et al.*, 2005). La evidencia sugiere que ningún vertebrado puede sintetizar los ácidos grasos alfa-linolénico (18:3 n-6) y linoleico (18:2 n-6), los cuales son precursores de LC-PUFAs omega-3 como el DHA y el EPA y omegas-6 como el ARA (Aires *et al.*, 2005; NRC, 2011). La mayoría de los peces carecen de las desaturasas (enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos), para la producción de DHA, EPA y ARA (NRC, 2011).

Los LC-PUFAs de la serie n-3, están relacionados con la formación de membranas celulares. Anteriormente se creía que la abundancia de estos ácidos grasos en las membranas celulares tenía que ver con un proceso relacionado con organismos poiquilotermos, los cuales tienen que adaptar la composición lipídica de las membranas celulares para mantener la fluidez de la misma. Estudios recientes indican que la abundancia de estos ácidos grasos, en especial el C22:6 n-3 (DHA) y C20:5 n-3 (EPA), está relacionado con su conformación, la cual es compacta y achatada lo que ayuda a realizar cambios conformacionales rápidamente, estos cambios son importantes en procesos visuales y neuromusculares (Sargent *et al.*, 2002; Brown, 1994; Ernst *et al.*, 2016). En la serie n-6 el C20:4 (ácido araquidónico) es el más importante pues es el principal precursor de eicosanoides (FAO, 2008; Tocher, 2003)

Los ácidos grasos contenidos en la dieta para peces marinos cumplen tres funciones esenciales: 1) son la fuente preferida de energía, en especial los saturados y monoinsaturados, pues al ser en su mayoría carnívoros, tienen una capacidad limitada para digerir y utilizar la energía proveniente de carbohidratos; 2) son importantes en el mantenimiento y funciones de las membranas celulares y desarrollo de tejido neural (poliinsaturados); (3) algunos se han relacionados directamente con la formación de compuestos relacionados con una amplia variedad de acciones metabólicas como la respuesta inmune, reproducción, respuesta inflamatoria o coagulación sanguínea, estos activos son llamados eicosanoides (Tocher, 2003; Tocher y Glencross, 2015).

2.3 Microalgas en la acuicultura

Tradicionalmente las microalgas son utilizadas principalmente en el cultivo de moluscos bivalvos, etapas tempranas de peneidos y en el cultivo de peces para producir el zooplancton que es alimento durante el desarrollo larvario. Así mismo, las microalgas son cultivadas junto con los organismos (agua verde) como

una alternativa para controlar el crecimiento de *Vibrio* y son también utilizadas para el enriquecer de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) a rotíferos y *Artemia* (los cuales son deficiente en este tipo de ácidos grasos), estos organismos a su vez funcionan como alimento vivo en esta etapa de crecimiento de los peces (Lazo, 2000; Cañavete, 2011; Müller-Feuga, 2000; Defoirdt *et al.*, 2007).

En los últimos años las microalgas se han explorado como una alternativa para el reemplazo de la harina y aceite de pescado, debido a que existen especies con alto contenido proteico y de LC-PUFAs (Rendón-Castrillón *et al.*, 2013). Algunas ventajas que tienen este tipo de organismos es que actualmente existe la tecnología para producir biomasa en grandes cantidades, además de que es posible, bajo condiciones controladas, manipular la composición química de los productos dando como resultado un mayor contenido proteico o lipídico. Dentro de las microalgas, las especies que presentan un alto potencial para uso en dietas para peces son *Arthrospira* o *Schizochytrium* (Spolaore *et al.*, 2006).

Se han realizado distintos estudios con la finalidad de sustituir la harina y el aceite de pescado con fuentes de microalgas en alimentos de peces marinos. Dichos estudios se han realizado en varias especies de peces con resultados muy variados. A continuación, se muestran los resultados de algunos estudios realizados con este propósito (Tabla 1).

Tabla 1: Uso de microalgas como sustituto de harina y aceite de pescado en dietas de peces marinos.

Autores	Especie	Algas utilizadas	Niveles de sustitución	Resultados
Patterson y Gatlin, 2013	<i>Sciaenops ocellatus</i> con un peso inicial de 1.9, 5.2 y 13 g, se hicieron 3 de 7 u 8 semanas.	<i>Navicula</i> sp. <i>Chlorella</i> y <i>Nannochloropsis salina</i>	5 y 10% de proteína con <i>Navicula</i> sp., 5,10, 20 y 25% con <i>Chlorella</i> sp. y 5, 7.5, 10 y 15% con <i>N. salina</i> .	Reemplazo del 10% de proteína en la dieta, con un crecimiento similar al obtenido con la dieta control.
Kissinger et al., 2016	<i>Seriola rivoliana</i> con un peso inicial de 2.5 ± 0.1 g, experimento de 9 semanas.	<i>Haematococcus pluvialis</i> y <i>Schizochytrium limacinum</i>	Reemplazo de HP con 25, 60 y 80% con las harinas de soya, calamar y algas.	Hasta un 80% de reemplazo de HP por proteína de soya, calamar y harina de algas (suplementado con metionina, lisina y taurina).
Vizcaíno et al., 2014	<i>Sparus aurata</i> con un peso inicial de 8 g, experimento de 45 días.	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Reemplazo de la HP del 12, 20, 25 y 39% por la microalga <i>S. almeriensis</i> .	Un reemplazo del 20% no afectó el crecimiento, utilización de los nutrientes y mejoró la actividad enzimática.
Qiao et al., 2014	<i>Paralichthys olivaceus</i> con un peso inicial de 16.5 ± 0.91 g, experimento de 8 semanas	<i>Schizochytrium</i> sp. Y <i>Nannochloropsis</i> sp.	Sustitución del AP por 50 y 100% de las microalgas.	Sustitución total de lípidos.
Tibaldi et al., 2015	<i>Dicentrarchus labrax</i> peso inicial 142 ± 0.5 g, experimento de 121 días.	<i>Isochysis</i> sp.	Sustitución de HP con 10 y 20% y AP con 18 y 36%.	Sustitución del 20% de proteína y 36% de lípidos de pescado con las microalgas.
García-Ortega et al., 2016	<i>Epinephelus lanceolatus</i> peso inicial 45.9 ± 7.1 g, experimento de 12 semanas.	<i>S. limacinum</i>	Sustitución de la HP por 20, 40 y 80% además del 100% del AP con <i>S. limacinum</i> en las dietas con 60 y 20 % de HP	Sustitución del 40% de HP por soya y algas, además de una sustitución total del aceite de pescado (AP) con una mayor concentración de LC-PUFAs en el filete
Haas et al., 2016	<i>Dicentrarchus labrax</i> con un peso inicial de 12.8 ± 1.7 g, experimento de 8 semanas.	<i>Pavlova viridis</i> y <i>Nannochloropsis</i>	Sustitución del 50 y 100% de AP en dietas que contenían 40% de AP y 60% de aceites vegetales.	Sustitución del 40% del AP por la microalga <i>Pavlova viridis</i> .
Perez-Velázquez, 2018	Morone chrysops × <i>M. saxatilis</i> peso inicial de 10.6 ± 0.2 g, experimento de 2 semanas.	<i>S. limacinum</i> y <i>Arthrospira</i> sp.	10, 20,30, 40 y 50% de reemplazo HP y AP	50% de reemplazo de harina y aceite de pescado, con la posibilidad de que sea mayor.
Li et al., 2014	<i>Pseudosciaena crocea</i> con un peso inicial de 5.57 ± 0.01 g, experimento de 66 días.	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Adición del 0.28, 0.56 y 1.12% de Harina de <i>H. pluvialis</i> .	0.56 % de harina de <i>H. pluvialis</i> aumentó la respuesta inmune y el peso final de los peces

2.4 *Arthrospira* sp.

Arthrospira es una cianobacteria filamentosa, compuesta de varias células cilíndricas agrupadas helicoidalmente. Las células individuales tienen un diámetro entre las 6-12 μm , con un gran número de vesículas de gas. Su composición proximal varía de acuerdo a las condiciones de cultivo, pero en general tiene altos niveles de proteína (60-71%) y con bajo contenido de lípidos (6-7%), lo que la hace una alternativa factible para la sustitución de harina de pescado (Belay, 2013; Sen y Pal, 2015). Posee también una gran cantidad de vitaminas (A, B-12 y del complejo B) y pigmentos naturales, como carotenoides y clorofila, pero el más abundante es la ficocianina, puede llegar a representar el 20% del peso del alga (Henrikson, 1994).

Las propiedades que se le han atribuido a esta cianobacteria en la medicina tradicional para humanos, van desde incrementar los niveles de energía, reducir el estrés premenstrual, antidiabético e hipotensor, fortaleces el sistema inmunológico, incrementar el rendimiento de los atletas, reducción de peso, mejora el apetito y como antioxidante, por mencionar algunos (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Fonnegra y Jiménez, 2007). La forma más habitual de encontrar esta microalga en el mercado es como suplemento alimenticio en forma de encapsulados y polvo, también son adicionadas a bebidas y alimentos (Roberts *et al.*, 2003).

2.5 *Schizochytrium* sp.

Schizochytrium sp. es un protista marino, perteneciente a la familia *Thraustochytriaceae* dentro del orden *Thraustochytrida* el cual se han convertido en los últimos años en una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) y en el año 2017 fue publicada la autorización en el Diario Oficial de la Unión Europea para su comercialización y utilización. Su uso es principalmente en aceites como suplemento de DHA y en algunos tratamientos médicos. En la naturaleza está ampliamente distribuida en el medio marino, siendo una fuente importante de este tipo de ácidos grasos para toda la cadena trófica (Desvillettes y Bec, 2009; Leyland *et al.*, 2017).

Una de las características más importantes de la *Schizochytrium* sp. y por lo que ha tomado gran importancia en la industria alimenticia, es su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-

3, es importante mencionar que si bien es rica en DHA (C22:6 n-3), llegando a tener hasta un 43% de los ácidos grasos, las concentraciones de EPA (C20:5 n-3) no llegan a pasar el 1% (Luying-Zhu *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2015, Sarker *et al.*, 2016 y IAFFD, 2019). La capacidad de acumular grandes cantidades de LC-PUFAs y en especial de DHA lo han hecho una de los géneros más empleados como sustituto de aceite de pescado en alimentos acuícolas. Sin embargo, la concentración de ácidos grasos saturados en *Schizochytrium* sp. puede ser de hasta un 53.8% (siendo C16:0 el más abundante), mientras que el aceite de pescado tiene alrededor de un 30.6% (Luying-Zhu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2015; Sarker *et al.*, 2016; IAFFD, 2019).

2.6 *Haematococcus* sp.

Es una microalga verde de gran interés comercial debido a que bajo condiciones de estrés (limitación de nutrientes o exposición a irradiaciones altas) produce el pigmento astaxantina, un carotenoide de alto valor comercial (Clarkson *et al.*, 2000). En la acuicultura este compuesto es utilizado principalmente para dar una coloración atractiva al producto final, como en el caso de los salmones (Rendón-Castrillón *et al.*, 2013). Además, de que se han reportado efectos positivos sobre la respuesta inmune en la corvina amarilla (Li *et al.*, 2014). Aunque las investigaciones enfocadas a la sustitución de HP y AP con esta microalga son escasas, puede llegar a tener un 48% de proteína y hasta un 15% de lípidos (Christaki *et al.*, 2011), haciéndola una buena opción como sustituto de estos ingredientes.

2.7 Sistema digestivo en peces

El tracto digestivo en los peces suele variar morfológicamente entre especies, importantes adaptaciones estructurales han sido descritas en las distintas especies estudiadas, ocasionadas básicamente a la gran variedad de hábitos alimenticios y tipo de alimentos que consumen estos organismos (Sánchez *et al.*, 2003). El propósito de estas adaptaciones es el aprovechamiento óptimo de los nutrientes que constituye su dieta, así, por ejemplo, una característica importante para distinguir si un pez tiene hábitos alimenticios carnívoros o herbívoros es la longitud del tubo digestivo, siendo esta mucho más corto en peces cuya dieta es principalmente de origen animal (Roberts y Rodger, 2012; Ray y Ringo, 2014).

El tracto digestivo de los peces puede ser clasificado en 4 regiones: a) cavidad bucofaríngea y su función digestiva se limita a la selección y obtención del alimento (en los peces teleósteos la masticación y pre digestión generalmente está limitada a ciertas especies de herbívoros altamente especializados), b) digestivo anterior compuesto por el esófago, estómago y el píloro, c) digestivo medio, compuesto por los ciegos pilóricos y el intestino, por ultimo d) el digestivo posterior compuesto por el recto. Dentro de esta clasificación el proceso químico de digestión comienza en el estómago. Esta digestión continua en el intestino donde también se da el proceso de absorción de los nutrientes (Roberts y Rodger, 2012; Sanz, 2009).

2.8 Digestión en peces

La digestión química y enzimática en los peces ocurre en el estómago y el intestino. El proceso de digestión que ocurre en el estómago esta mediado por células especializadas, llamadas células parietales, que lo recubren y promueven un ambiente ácido (secretando ácido clorhídrico), dando inicio a la digestión, el HCl, además de desnaturalizar las proteínas convierte el pepsinógeno (zimógeno) en pepsina (enzima activa) (Bakke *et al.*, 2011). Una vez ocurrida la digestión ácida, el alimento pasa al intestino donde el proceso pasa a ser alcalino. El aumento en el pH en el intestino se debe principalmente a la secreción de iones bicarbonato, los cuales neutralizan el pH del jugo gástrico y del alimento proveniente del estómago y es donde se da la mayor actividad de digestión química y enzimática además de la absorción del alimento una vez digerido (Cortés *et al.*, 2008; Deguara *et al.*, 2003; Olsen y Ringo, 1997).

La actividad digestiva que ocurre en el intestino se debe en gran parte a las diferentes enzimas que proceden tanto de la pared intestinal y el páncreas. Las enzimas secretadas por el páncreas pueden ser de 3 tipos: proteasas, lipasas y amilasas. Entre las proteasas destaca la actividad de la tripsina, la cual se segrega en forma de tripsinógeno y es activada por una enteroquinasa en el intestino. Esta enzima hidroliza proteínas y péptidos de gran tamaño reduciendo su tamaño para su posterior absorción, además está encargada de activar los zimógenos de otras proteasas como la quimiotripsina, elastasas y carboxipeptidasas (Sanz, 2009).

Las lipasas se encargan de la hidrolisis de los lípidos y son producidas y segregadas por el páncreas. Entre ellas se encuentran la lipasa pancreática, fosfolipasa A2 y carboxilo éster lipasa que son las que principalmente se producen. En peces marinos la lipasa dominante es el carboxilo éster lipasa, la cual es

dependiente de sales biliares (Kutovic *et al.*, 2009). Las sales biliares son producidas en la vesícula biliar y además de activar las enzimas, ayuda con la emulsificación de los lípidos y la formación de micelas, la cuales facilitan la digestión de los lípidos (Bakke *et al.*, 2011). Las amilasas son las enzimas encargadas de la digestión de los carbohidratos convirtiéndolos en moléculas más pequeñas (monosacáridos). Estas enzimas provienen principalmente del páncreas y aunque la actividad de estas enzimas varía mucho entre especies, generalmente se encuentra en menor medida en peces carnívoros en comparación con peces herbívoros u omnívoros (Sanz, 2009; Bakke *et al.*, 2011).

Capítulo 3 Justificación

Totoaba macdonaldi, por los altos precios que alcanza su carne en el mercado nacional y el precio aun mayor de vejiga natatoria en el mercado asiático, es considerada como una especie con un alto valor económico. Por otro lado, es una especie sujeta a protección, debido a la pesca indiscriminada que sufrió de 1942-1972 por lo que es indispensable recuperar las poblaciones naturales de esta especie, en estos aspectos, la acuicultura ha jugado un papel importante, pues gran parte de su producción se ha destinado a recuperar este recurso. Ambos aspectos, tanto económicos como ambientales, perfilan a la totoaba como una especie con un alto potencial acuícola para México.

Sin embargo, el uso de harina y aceite de pescado como fuente principal de proteína y lípido en la elaboración de alimentos para la acuicultura, trae consigo varios cuestionamientos a la sustentabilidad y altos costos en la producción de alimento para la acuicultura, en especial de la acuicultura de peces marinos, en estos puntos radica la importancia de buscar alternativas para sustituir la harina y aceite de pescado, las harinas de microalgas parecen ser una alternativa viable, pues eventualmente su producción será más barata y sostenible comparado con la harina y aceite de pescado. El presente estudio pretende explorar la posibilidad de una sustitución total de lípidos y proteína de aceite de pescado por harinas de microalgas.

Capítulo 4 Hipótesis

La sustitución del 100% de harina y aceite de pescado usando harinas de microalga de *Schizochytrium* sp., *Haematococcus* sp. y *Arthrospira* sp. en la dieta de juveniles de *Totoaba macdonaldi* no afecta negativamente el crecimiento, la supervivencia, la utilización del alimento y la composición del músculo.

Capítulo 5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la sustitución parcial y total de la harina y aceite de pescado por harina de *Schizochytrium* sp., *Haematococcus* sp. y *Arthrospira* sp. en la dieta de juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

5.2 Objetivos específicos

Evaluar el crecimiento, utilización del alimento, la supervivencia, tasa de conversión alimenticia (TCA), tasa de eficiencia proteica (TEP), valor productivo de la proteína (VPP) y el valor productivo de los lípidos (VPL) en juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con distintos niveles de sustitución de harina y aceite de pescado (0, 25, 50, 75 y 100%) por harinas de microalgas.

Evaluar la digestibilidad de las dietas con distintos niveles de sustitución de harina y aceite pescado (0, 25, 50, 75 y 100%) por harinas de microalgas en juveniles de *T. macdonaldi* alimentados

Evaluar la actividad de las enzimas digestivas tripsina y lipasa en el intestino y ciegos pilóricos de juveniles de juveniles *T. macdonaldi* alimentados con dietas con distintos niveles de sustitución de harina y aceite pescado (0, 25, 50, 75 y 100%) con harinas de microalgas, así como la composición de ácidos grasos del músculo.

Capítulo 6 Metodología

6.1 Formulación y elaboración de dietas

Se formularon 6 dietas isoproteicas (51%) e isolipídicas (13%) de acuerdo a los requerimientos de la especie (Rueda-López *et al.*, 2011). El diseño experimental consistió en sustituir el 0% (FM100), 25% (FM75), 50% (FM50), 75% (FM25) y 100% (FM0) tanto de harina de pescado (HP) como de aceite de pescado (AP), utilizando como fuente principal de proteína la harina de la cianobacteria *Arthrospira* sp. (Spirulina feed grade, Earthrise Nutritional, Irvine CA, USA) y como fuente principal de lípidos la harina de la microalga *Schizochytrium* sp. (SP1 Alltech Inc., USA). La dieta 100% HP y AP fue utilizada como la dieta control. Se suplementaron las dietas con lisina y metionina, con la finalidad de satisfacer el requerimiento estimado de estos aminoácidos, 19.3 y 15.9 g kg⁻¹, respectivamente (Madrid *et al.*, 2019).

Con la intención de formular unas dietas más parecidas a las comerciales, se utilizó harina de soya y concentrado de proteína de soya (SPC, por sus siglas en inglés), manteniéndose en cantidades constantes, 165.6 y 100 g kg⁻¹ respectivamente. Adicionalmente se realizó una sexta dieta sustituyendo todas las fuentes proteicas y lipídicas (i.e., el 100% la HP y AP, pero también la harina y concentrado de soya) con las fuentes anteriormente mencionadas, pero adicionando la microalga *Haematococcus* sp. (ALG), por esta razón la dieta ALG no se incluyó en los análisis estadísticos. Las dietas fueron elaboradas en la Universidad de Hawái en Hilo usando un mezclador de 19 L (Avantco, MX20, USA), se granularon en forma de espagueti con un molino de alimento (Mod. 781, LEM Products Inc., EE.UU.) equipado con una matriz de 4.5 mm, y secados a 60 °C durante 20 h, posteriormente se almacenaron a 6 °C en bolsas selladas y enviadas a CICESE en Ensenada B.C. México, donde se almacenaron a 4 °C hasta y durante el experimento.

6.2 Condiciones de cultivo de los peces

Los huevos de totoaba fueron donados por el Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), México y trasladados al CICESE por tierra. Una vez eclosionados, las larvas se mantuvieron en incubadoras de 2600 L donde se alimentaron siguiendo el protocolo propuesto por Mata *et al.* (2010). A las larvas se les suministro alimento vivo, desde el día 2 después de la eclosión hasta el día 17 se utilizaron 5 rotíferos (*Brachionus plicatilis*) ml⁻¹, del día 18 al 23 se hizo el cambio gradual de rotíferos

a *Artemia*, pasando de una relación rotífero: *Artemia* 4:1, 3:2, 3:3, 1:4 y 5 organismo ml⁻¹. Los rotíferos fueron enriquecidos con pasta de microalgas dos veces al día con una concentración 0.5 ml por cada millón de organismos, mientras que las *Artemias* fueron enriquecidas con proteínas, vitaminas y ácidos grasos con pasta de microalgas ORI-GREEN (SKRETTING) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del día 24 después de la eclosión, se inició la transición de alimento vivo por alimento formulado, el cual se hizo gradualmente pasando de 5 a 0 *Artemias* ml⁻¹ en un periodo de 5 días y se alimentaron a saciedad aparente con dietas formuladas de la marca Othoime, para larvas de peces marinos, formuladas en Japón (62% proteína y 9% lípidos).

Tabla 2. Ingredientes (g kg⁻¹) de las dietas experimentales para juveniles de *T. macdonaldi*.

Ingrediente	FM100	FM75	FM50	FM25	FM0	ALG
Harina de pescado	600	450	300	150	0	0
Aceite de pescado	79.27	59.46	39.64	19.82	0	0
Harina de soya	165.6	165.6	165.6	165.6	165.6	0
SPC	100	100	100	100	100	0
<i>Arthrospira</i>	0	118.62	237.4	356.18	474.96	591.6
<i>Schizochytrium</i>	0	42.41	84.82	127.24	169.66	167.54
<i>Haematococcus</i>	0	0	0	0	0	174.86
Dextrina		8.92	17.84	25.66	27.48	0
Alginato	20	13	6	0	0	0
Mix vitaminas	20	20	20	20	20	20
Mix minerales	10	10	10	10	10	10
Lisina	0	4.4	8.8	13.2	17.5	22
Metionina	0	1.8	3.5	5.2	7	6
Taurina	5.12	5.8	6.4	7.1	7.8	8
Total	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

-SPC: concentrado de proteína de soya

Posteriormente los juveniles fueron trasladados a un tanque de 9 000 L acoplado a un sistema de recirculación y alimentados 3 veces al día con alimento para peces marinos marca Skretting-Europa (55% proteína y 15% lípidos) y con un tamaño de 152mm. Una vez que los organismos alcanzaron una talla de

10 ± 1 g, 216 peces fueron trasladados a un sistema de recirculación compuesto por 18 tanques de 275 L, un biofiltro cabeza de burbuja (patente 5232586), un calentador Titan (HP-2) y una bomba de agua de 1 HP (BCEN200), el sistema se mantuvo en condiciones constantes de temperatura (25°C), OD (6 mg L^{-1}), salinidad (33.5 UPS), amonio (1 mg L^{-1}) y un fotoperiodo luz: oscuridad 12:12 horas, los parámetros fueron monitoreados cada tercer día para el caso del amonio, usando un kit API (Mars Fishcare North América, Inc. USA) para amonio total, y las condiciones de temperatura y salinidad se midieron diariamente con un multiparámetro YSI Pro 2030. En cada tanque fueron colocados aleatoriamente 12 organismos y cada tratamiento contó con 3 réplicas. Los organismos se alimentaron a saciedad aparente 3 veces al día y el bioensayo tuvo una duración de 63 días.

6.3 Toma de muestras

Las biometrías se hicieron cada 7 días, pesando y midiendo individualmente todos los peces en los 18 tanques sin sacrificar alguno. Al final del experimento se sacrificaron por sobredosis de metanosulfonato de tricaina (MS-222). Para la composición química proximal de los juveniles de totoaba se tomaron muestras de músculo y peces enteros.

Para la obtención del extracto enzimático se utilizaron 4 organismos, los cuales fueron sacrificados 4 horas después de la primera alimentación, fueron diseccionados haciendo un corte desde el ano hasta los arcos branquiales, con la finalidad de dejar expuestos los órganos para identificar el intestino y los ciegos pilóricos. Una vez retirados los órganos se almacenaron a -20°C para su posterior procesamiento. Para el caso de las muestras que se utilizaron para el análisis químico proximal los peces enteros se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

6.4 Crecimiento

Para estimar el crecimiento de los organismos se registró individualmente el peso (g) de todos los peces en los tanques, con una balanza digital (AND SK-5001WP).

El coeficiente térmico de crecimiento (CTC) se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$CTC = \left[\frac{(\text{peso final}^{1/3} - \text{peso inicial}^{1/3})}{\sum(TxD)^3} \right] \quad (1)$$

Dónde:

T= temperatura en °C

D= número de días del experimento

6.5 Supervivencia

Cada día se verificó si existen organismos muertos, al final del experimento la supervivencia fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Supervivencia} = \frac{N_f}{N_i} \times 100 \quad (2)$$

Dónde:

Nf= número final de organismos

Ni= número inicial de organismos

6.6 Tasa de conversión alimenticia (TCA)

Como la forma de alimentación fue a saciedad aparente, se asumió que todo el alimento suministrado es consumido. Con base en esos datos se calculó la tasa de conversión alimenticia (TSA) mediante la siguiente fórmula:

$$TCA = \frac{\text{alimento consumido (g)}}{\text{ganancia en peso (g)}} \quad (3)$$

6.7 Tasa de eficiencia Proteica (TEP)

La comparación entre el peso ganado de los organismos y la proteína consumida se estimó mediante la tasa de eficiencia proteica (TEP) con la siguiente fórmula:

$$TEP = \frac{Pg}{Psp} \quad (4)$$

Dónde:

Pg= peso ganado por los organismos

Psp = peso de la proteína en el alimento consumido

6.8 Valor productivo de la proteína (VPP) y Valor productivo de los lípidos (VPL)

La relación entre la ganancia de nutrientes (lípidos y proteínas) del cuerpo y nutrientes ingeridos se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$VPP = \frac{(\text{peso corporal final} * \text{proteína corporal final}) - (\text{peso corporal inicial} * \text{proteína corporal inicial})}{\text{alimento consumido} * \text{porcentaje de proteína en el alimento}} \quad (5)$$

$$VPL = \frac{(\text{peso corporal final} * \text{lípido corporal final}) - (\text{peso corporal inicial} * \text{lípido corporal inicial})}{\text{alimento consumido} * \text{porcentaje de lípidos en el alimento}} \quad (6)$$

6.9 Digestibilidad aparente (%)

Durante el experimento las heces de los peces fueron recolectadas antes de haber transcurrido 1.5 h de haber sido producidas, para evitar procesos de lixiviación, y reducir así errores potenciales en la estimación de dicho parámetro, esto se realizó limpiando los tanques antes de la alimentación y revisándolos cada 15 minutos después de la alimentación. La colecta se realizó utilizando una varilla de vidrio como sifón, las muestras se secaron durante 24 h a una temperatura de 50 °C y almacenadas hasta su análisis.

Para el cálculo de la digestibilidad aparente se utilizó el método de cenizas insolubles en ácido descrito por Tejada. (1992) y modificado por Montañón-Vargas *et al.* (2002). El procedimiento consiste en hervir las cenizas (0.2 g) en 10 ml de ácido clorhídrico (HCl) en vasos de precipitado de 50 ml, cubriéndolos con un vidrio de reloj para evitar la evaporación. Cinco minutos después la solución se filtró con un papel filtro de 110 mm de apertura (previamente pesado) con agua destilada. El papel filtro se secó en una mufla (Lindergerg/Blue M, modelo BF51842PBFMC-1) durante 1 hora a 100 °C. Al finalizar el procedimiento el papel filtro se pesó para determinar el porcentaje de cenizas insolubles en HCL mediante la siguiente fórmula:

$$CIA (\%) = \frac{\text{peso de ceniza insoluble (g)}}{\text{peso de la materia seca (g)}} \times 100 \quad (7)$$

Una vez obtenido el CIA (%) tanto de las dietas como de las heces se utilizó la siguiente fórmula para calcular el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA):

$$CDA = \left[100 - \left(\frac{CIA(\%) \text{ en dieta}}{CIA(\%) \text{ en heces}} \right) \right] \times 100 \quad (8)$$

Para el caso del coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína y de lípidos se utilizó la fórmula propuesta por Cho y Kaushik (1990):

$$CDA(P \text{ y } L) = \left(1 - \frac{F}{D} X \frac{Dcr}{Fcr}\right) x 100 \quad (9)$$

Donde:

F= % del nutriente en las heces.

D= % nutriente en la dieta.

Dcr= % de ceniza insoluble en las heces.

Fcr= % de ceniza insoluble en la dieta.

6.10 Actividad enzimática

6.10.1 Preparación del extracto enzimático

Para la preparación de las muestras se utilizó el procedimiento descrito por Contreras. (2016). Los intestinos y ciegos pilóricos de los peces se descongelaron, pesaron y fueron colocados en un tubo falcón, previamente enfriado, para ser homogeneizados con un POLYTRON (PT-1200), en 12 ml agua destilada a 4 °C. Una vez homogeneizado el extracto, se centrifugó a 16000 g durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se almaceno a -80 °C. Cabe mencionar que durante el proceso se mantuvieron las muestras a una temperatura de 4 °C. La actividad enzimática se reportó en unidades enzimáticas por g (lipasas y amilasas) y mg (tripsina) de órgano utilizado, esto con la finalidad de eliminar el efecto de la diferencia en peso de los intestinos y ciegos pilóricos en los distintos tratamientos.

6.10.2 Tripsina

La actividad de la tripsina se determinó mediante el método propuesto por Erlanger *et al.* (1961) en el cual se utilizó un buffer TRIS a una concentración de 50 mM con 20 mM CaCl₂ y como sustrato BAPNA (N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride, Sigma B-4875) 1 mM en 500 μ L de DMSO, las lecturas

se llevaron a cabo en un Varioskan Flash Thermo Scientific. Se utilizaron 250 μL como volumen final en la reacción, 25 μL de extracto enzimático y 175 μL de buffer+ sustrato (1:7), primero se agregó la enzima y el buffer+sustrato (dando inicio a la reacción), se incubó 30 min a 37 °C y posteriormente se agregó 50 μL de ácido acético al 30% (para detener la reacción), se dejó reposar 10 min y se leyó a una absorbancia de 410 nm. Como blanco de lectura se utilizó el sustrato con agua destilada y como control positivo enzima comercial de páncreas de cerdo (SIGMA T0303) 1 mg ml⁻¹.

6.10.3 Lipasas dependientes de sales biliares

La actividad de las lipasas dependiente de sales biliares fue estimada mediante el método propuesto por Gjellesvik *et al.* (1992). Se usó buffer TRIS-HCL a 0.15 mM con taurocolato de sodio a 15 mM y como sustrato, Nitrofenil miristrato a 0.56 M disuelto en 500 μL de DMSO. Para la estimación se utilizaron 200 μL de buffer+sustrato y 25 μL del homogeneizado enzimático, las condiciones de la reacción fue una incubación de 30 min a una temperatura de 30 °C a un pH de 8.5, haciendo lecturas cada minuto a una absorbancia de 405 nm en un espectrofotómetro Varioskan Flash Thermo Scientific. Como blanco de lecturas se utilizó el sustrato con agua destilada y como control positivo enzima comercial de páncreas de cerdo (SIGMA T-3126) 1mg ml⁻¹.

6.10.4 Amilasas

Para obtener la actividad de la amilasa en los intestinos y ciegos pilóricos de los juveniles de totoaba, se siguió el método descrito en Worthington Biochemical Corporation. (1993). Se utilizó almidón (Sigma, S9765) al 1% como sustrato, mezclado con un buffer de fosfato de sodio al 0.02 M, cloruro de sodio 0.006 M con un pH de 6.9 y se usó ácido dinitrosalicílico al 2% como colorante. A 0.5 ml del homogeneizado enzimático se le agregaron 0.5 ml de solución de almidón y se dejó incubar durante 3 minutos a 25 °C, posteriormente se agregó 1ml del colorante y se dejaron incubar en un baño de agua a 100 °C durante 5 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y finalmente se agregaron 10ml de agua destilada. Las muestras se leyeron a 540 nm. Se construyó una curva estándar de maltosa para calcular los micromoles de maltosa liberados en las muestras. La fórmula utilizada es la siguiente:

$$U \text{ mg}^{-1} = \left(\frac{\text{micromoles de maltosa liberados}}{\text{miligramos de enzima en la mezcla de reacción (3 min)}} \right)$$

6.11 Análisis de composición proximal

Los análisis de composición proximal se hicieron para diferentes tipos de muestras analizadas en este experimento (dietas, heces, músculos y peces completos). Para cuantificar la proteína cruda, se utilizó el método de micro-Kjeldah. (AOAC Official Method 2001.1), para lípidos totales se utilizó el método de Soxhlet. (1879). La humedad se determinó mediante la diferencia de peso entre la muestra húmeda y la muestra seca a una temperatura de 60 °C durante 24 horas. El contenido de cenizas se obtuvo incinerando las muestras a 550 °C durante 8 h (De la Mora y Lozoya, 2014).

6.12 Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de las dietas se evaluó con el método propuesto por Schuster *et al.* (1988), iniciando con la hidrólisis que se realizó con ácido clorhídrico 6 M. Se pesaron 0.5 g de muestra y se añadieron 4 ml de HCL, posteriormente se mantuvieron a 105 °C durante 24 h, el hidrolizado se agregó 1 ml de ABA y se diluyó en 25 ml de H₂O grado HPLC, la muestra se limpió utilizando filtros de Econofilter Agilent de 0.45 µm. Por último, las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC, de la marca Agilent 1260 y una columna de la misma marca, modelo ZORBAX Eclipse AAA Rapid Resolution de 4.1x150 mm.

6.13 Composición de ácidos grasos

La cuantificación y caracterización de ácidos grasos se realizó para las dietas como para las muestras de músculo de los juveniles de totoaba expuestos a los diferentes tratamientos. El método de extracción de lípidos que se utilizó fue el propuesto por Folch *et al.* (1956), mientras que la saponificación y metilación se llevó a cabo mediante el método descrito por Metcalfe y Schmitz. (1961).

- **Extracción:** consistió en poner las muestras secas con la mezcla de extracción en relación 1:4 en viales ámbar y dejar en reposo durante 12 h a 4 °C. En lugar de utilizar cloroformo: metanol (1:1) como mezcla de extracción, se utilizó diclorometano: metanol (2:1) según lo descrito por Cequier *et al.* (2008). Una vez transcurrido el tiempo de reposo, el contenido de los viales se homogenizó con un vortex y centrifugó a 3000 rpm/10 min/4 °C, se eliminó la fase superior (acuosa). Este último paso se realizó 3 veces con 1 ml de la solución de extracción. Posteriormente, se agregó 1 ml de agua y 10 µL de HCL (0.6 N) y se centrifugó a 3000 rpm/10 min/4 °C. Se eliminó la fase acuosa y la fase orgánica (contiene los lípidos) se evaporó bajo una atmosfera de N₂ y se almacenó a 4 °C.
- **Saponificación:** Se adicionaron a cada vial 100 µL de una solución metanólica al 90% (con KOH a 3 N) y se dejaron a baño maría 30 min/60 °C, se adicionó 300 µL de agua y centrifugaron a 3000 rpm/2 min/4 °C, se eliminó la fase superior y se agregó 300 µL de agua, 10 µL de HCL 6 N y 200 µL de hexano se centrifugaron a 3000 rpm/2 min/4 °C. Finalmente se extrajo y se conservó la fase superior, la cual contenía los ácidos grasos no saponificables. Este último paso se repitió 2 veces.
- **Metilación:** Para el último paso se agregó 500 µL de trifloruro de boro (14%) disuelto en metanol y se calentó en una mufla durante 15 min a 60 °C. Posteriormente se agregaron 200 µL de agua y 300 µL de hexano, se centrifugó a 2000 rpm/5 min/4 °C, se extrajo la fase superior que contenía los ácidos grasos metilados, se secó y conservó en una atmosfera de N₂ hasta su utilización.

Para estimar el tipo y cantidad de ácidos grasos presentes en las muestras se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 7890A GC System con una columna Agilent JyW GC de 30 metros de longitud a un flujo de 3 ml/min. La rampa inicial de temperatura inicial fue de 120 °C con aumentos de 9 °C/ min hasta llegar a 190 °C, la segunda rampa fue de los 190 °C a 230 °C aumentando 3 °C/min y por último se mantuvo a 230 °C por 4 minutos.

6.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía para comprar los parámetros de crecimiento, utilización del alimento y cada una de las variables de la composición química evaluada en el experimento. En caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó una prueba *a posteriori* de rangos de Tukey. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los

residuales se corroboraron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Para todos los análisis realizados se utilizó un nivel de significancia de $P < 0.05$. Para realizar los análisis estadísticos se usó el software Minitab®18.

Capítulo 7 Resultados

7.1 Análisis químico proximal, composición de aminoácidos y perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales.

7.1.1 Análisis proximal

Una vez elaboradas las dietas se realizó un análisis químico proximal, perfil de aminoácidos y el perfil de ácidos grasos de cada una de ellas (Tablas 3 y 4). El contenido de proteína en las dietas se mantuvo relativamente constante en todas las dietas con un promedio de $51.1 \pm 0.4\%$. La concentración de lípidos en las dietas disminuyó progresivamente conforme se reemplazó la harina y aceite de pescado en la dieta, pasando de una concentración de $16.1 \pm 0.0\%$ en el tratamiento FM100 a $11.3 \pm 0.5\%$ en la dieta FM0. De manera similar los valores estimados de ceniza disminuyeron conforme se reemplazó la HP, la dieta FM100 resultó con el porcentaje más alto con un valor de $15.1 \pm 0.4\%$, seguido de FM75, FM50, FM25, hasta la dieta FM0 con un $6.8 \pm 0.3\%$. Los resultados obtenidos de la estimación de ELN indican que la cantidad de ELN incrementó conforme aumentó la cantidad de harinas de microalgas, pasando de un 14.4% en la dieta FM100 hasta un 24.9% en la dieta FM0, con excepción de las dietas FM50 y FM25 las cuales tienen valores similares de 20% y 19.9% , respectivamente (Tabla 3).

7.1.2 Amino ácidos

El perfil de aminoácidos de las dietas usadas en este experimento nos indica que a pesar de que la cantidad de metionina y lisina varío entre los ingredientes, se logró mantener los niveles de estos aminoácidos en las cantidades óptimas de 19.3 g kg^{-1} para la lisina y 15 g kg^{-1} para el caso de la metionina.

Tabla 3. Análisis proximal (% en peso seco) y perfil de aminoácidos (g kg^{-1}) de las dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado (HP) y aceite de pescado (AP).

Dietas experimentales							
	FM100	FM75	FM50	FM25	FM 0	ALG	
Humedad	3.7±0.0	4.4±0.0	3.7±0.0	7.3±0.0	5.5±0.0	4.7±0.1	
Proteína	50.7±1.7	50.7±1.9	51.2±1.6	51.7± 1.9	51.3±0.3	49.7±0.9	
Lípidos	16.1±0.4	15.7±0.0	14.4±0.2	12.4±0.3	11.3±0.5	10.4±0.3	
Ceniza	15.1±0.4	13.2±0.4	10.7±0.5	8.7±0.2	6.8±0.3	7.7±0.3	
ELN	14.4	16	20	19.9	25.1	27.5	
Composición de aminoácidos (g kg^{-1})							
	FM100	FM75	FM50	FM25	FM0	ALG	Estimado
Esenciales							
Lisina	24.0±1.0	25.5±0.8	24.7±1.5	22.7±0.3	21.8±2.2	20.9±1.2	19.3
Metionina	20.3±0.8	20.6±0.8	19.6±1.2	17.9±0.3	16.4±1.2	15.3±1.1	15.0
Arginina	4.9±2.1	4.2±0.7	4.9±0.8	2.6±0.2	5.4±0.0	4.1±0.1	17.7
Leucina	12.9±0.4	13.4±0.6	12.8±0.7	11.5±0.2	10.7±1.1	10.0±0.5	16.9
Isoleucina	7.4±0.3	8.3±0.4	8.4±0.6	7.8±0.0	7.7±0.8	7.4±0.3	9.4
Histidina	33.8±0.8	33.4±1.1	38.1±2.0	41.5±1.2	49.2±5.5	48.7±0.3	5.3
Treonina	76.8±2.7	85.6±2.5	85.8±5.0	81.4±1.2	82.1±5.2	77.3±3.1	10.5
Fenilalanina	7.6±0.7	7.8±0.7	6.5±0.5	6±0.1	5.8±0.2	4.8±0.5	9.0
Valina	1.4±0.1	1.4±0.1	1.6±0.2	1.7±0.1	2.1±0.3	2.0±0.0	11.0
No esenciales							
Alanina	2.6±0.2	3.2±0.1	2.8±0.2	2.5±0.0	2.4±0.3	2.3±0.6	
Tirosina	5.1±0.1	5.2±0.3	5.1±0.2	4.7±0.2	5.2±0.4	4.9±0.1	
Cisteína	2.9±0.2	2.9±0.2	3.3±0.5	3.6±0.2	4.4±0.6	4.1±0.0	
Prolina	7.3±0.8	8.9±0.4	8.1±0.8	6.8±0.2	6.2±1.1	6.3±0.4	
Aspartato	20.0±0.6	22.5±0.8	22.6±1.3	21.5±0.4	21.2±1.9	20.6±0.9	
Glutamato	33.1±1.0	40.2±1.3	41.1±2.6	39.2±0.6	39.2±3.7	38.3±2.0	
Serina	4.3±0.1	5.0±0.0	4.9±0.4	4.5±0.1	5.3±0.6	4.9±1.2	
Glicina	4.5±0.1	4.6±0.1	4.5±0.2	4.1±0.1	4.4±0.0	4.1±0.5	

- Los valores representan medias \pm desviaciones estándar de muestras por triplicado.

- ELN: extracto libre de nitrógeno

- La columna "Estimado" indica la necesidad estimada en g kg^{-1} de aminoácidos esenciales para juveniles de *T. macdonaldi* (Madrid *et al.*, 2018).

- FM100= 100% de HP y AP, FM75= 75% de HP y AP, FM50= 50% de HP y AP, FM25= 25% de HP y AP, FM0= 0% de HP y AP y ALG = 0% de HP, AP + *Haematococcus*.

7.1.3 Ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos de las dietas se presenta en la tabla 4. Dentro del grupo de los ácidos grasos saturados, el que se encuentra en mayor proporción es el C16:0 y aumenta gradualmente al ir sustituyendo

el AP con la harina de microalgas. Caso contrario al C16:0, la concentración de los ácidos grasos C14:0 y C18:0 disminuyen al ir sustituyendo el AP en las dietas. En su totalidad los ácidos grasos saturados se encuentran en mayor concentración en las dietas con un mayor contenido de harina de microalgas.

El contenido total de ácidos grasos monoinsaturados disminuye al reducir el contenido de AP en las dietas, pasando de un $24.9 \pm 0.2\%$ en la dieta FM100 a un $11.2 \pm 0.2\%$ en la FM0, esta tendencia se observa principalmente en los ácidos grasos C16:1 y C18:1n-9, los cuales se encuentran en mayor proporción. Los ácidos grasos totales poliinsaturados de la serie n-6 aumentaron considerablemente y progresivamente en las dietas con un mayor contenido de harinas de microalgas, pasando de un $2.9 \pm 0.3\%$ en la dieta FM100 a un $20.6 \pm 1.1\%$ en la dieta FM0. Dentro de los poliinsaturados de la serie n-6, los más abundantes fueron C18:2n-6 y C18:3n-6, ambos aumentaron gradualmente su concentración al sustituir el AP por las harinas de microalgas, donde el C18:2n-6 paso de $4.6 \pm 0.2\%$ en la dieta FM100 a $7.5 \pm 0.1\%$ en la FM75, $8.2 \pm 0.1\%$ en la FM50, $9.8 \pm 0.1\%$ en la FM25 y $8.2 \pm 0.5\%$ en la FM0. Por su parte el C18:3n-6 fue de $1.3 \pm 0\%$ en la dieta FM100 a $3.5 \pm 0.1\%$ en la FM75, $5.4 \pm 0\%$ en la FM50, $7.9 \pm 0.1\%$ en la FM25 y $6.4 \pm 0.5\%$ en la FM0. Otro ácido graso importante de esta serie es el C20:4n-6 (ARA), el cual no presentó una tendencia clara en las dietas, con valores que oscilaron entre 1.7% y 0% .

Los ácidos grasos más abundantes de la serie n-3 fueron los C20:5 n-3 (EPA) y C22:6 n-3 (DHA). Para el caso del C20:5 n-3, el porcentaje se redujo al disminuir la cantidad de AP en las dietas, en contraste el C22:6 n-3 incremento conforme se incluyeron las harinas de microalgas. La suma de ambos representa casi la totalidad de ácidos grasos de esta serie. El total de la suma de los serie n-3 no presentaron una tendencia clara, pero se encontraron en menor porcentaje en la dieta FM50 con $19.2 \pm 0.1\%$, mientras que la dieta control obtuvo el porcentaje mayor, con $28.5 \pm 0.6\%$.

Por último, la relación de los ácidos grasos n-3/n-6 resultó ser mayor en la dieta control con un valor de 3.6 ± 0 , seguido de la dieta FM75 (1.9 ± 0), las dietas FM50 y FM25 en de 1.3 ± 0 y la FM0 presentó un valor de 1.4 ± 0 . Por otro lado, la relación DHA/EPA aumenta al disminuir la cantidad de HP y AP pasando de un 0.9 ± 0 en FM100 hasta un 71.1 ± 5.5 en FM0. La relación del EPA/ARA no presenta alguna tendencia y los valores son muy variables siendo FM50 el mayor con 70.9 ± 0.8 , seguido de FM75 (20.4 ± 0.2), FM100 (7.5 ± 0.6), FM25 (6.2 ± 0.1) y FM0 (1.3 ± 0.4).

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado (HP) y aceite de pescado (AP) (% total de ácidos grasos identificados).

Ácido graso	Dietas experimentales (composición de ácidos grasos)					
	FM100	FM75	FM50	FM25	FM 0	ALG
Saturados						
C14:0	5.6±0.0	4.9±0.0	4.5±0.0	3.3±0.1	3.1±0.0	3.0±0.0
C16:0	23.7±0.7	29.4±1.1	36.7±0.4	33.6±1.7	45.9±1.8	47.1±1.1
C17:0	0.5±0.0	1.0±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	0.3±0.1
C18:0	5.9±0.5	4.3±0.0	3.4±0.0	2.0±0.0	1.5±0.0	1.2±0.0
C20:0	0.2±0.0	0.6±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
C23:0	0.5±0.0	0.8±0.0	1.2±0.0	2.6±0.1	4.1±0.1	3.6±0.0
C24:0	1.5±0.0	1.1±0.0	0.7±0.0	0.5±0.0	ND	ND
SUMA	38.8±1.2	43.2±1.0	48.9±0.4	43.8±1.7	56.5±1.8	57.1±1.2
Monoinsaturados						
C16:1	10.0±0.1	9.7±0.2	7.7±0.1	6.1±0.1	3.4±0.1	4.3±0.11
C17:1	1.1±0.0	0.9±0.0	0.7±0.0	0.5±0.0	0.0±0.0	0.1±0.01
C18:1n9	12.5±0.2	10.9±0.3	8.1±0.1	5.6±0.2	1.0±0.0	0.8±0.07
C20:1n9	0.7±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	ND	ND	ND
SUMA	24.7±0.2	22.1±0.6	17.1±0.3	13.0±0.3	4.6±0.2	5.5±0.3
Polinsaturados n-6						
C18:2n6	4.6±0.2	7.5±0.1	8.2±0.1	9.8±0.1	8.2±0.5	8.1±0.3
C18:3n6	1.3±0.0	3.5±0.1	5.4±0.0	7.9±0.1	6.4±0.5	7.6±0.2
C20:3n6	ND	0.0±0.2	0.9±0.0	0.1±0.1	0.7±0.0	0.6±0.0
C20:4n6 (ARA)	1.7±0.0	0.5±0.0	0.0±0.0	0.8±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
SUMA	7.8±0.3	11.8±0.2	14.7±0.0	18.8±0.3	15.6±1.1	16.6±0.6
Polinsaturados n-3						
C18:3n3	1.6±0.0	0.2±0.0	0.9±0.0	0.8±0.0	ND	0.3±0.02
C20:3n3	0.7±0.0	0.3±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	ND	ND
C20:5n3 (EPA)	13.1±0.3	9.9±0.4	6.5±0.0	5.0±0.0	0.3±0.0	0.3±0
C22:6n3 (DHA)	13.0±0.3	12.2±0.2	11.2±0.1	17.9±1.0	22.8±0.4	20.0±0.7
SUMA	28.5±0.6	22.8±0.7	19.2±0.1	24.2±1.1	23.1±0.4	20.6±0.3
n3/n6	3.6±0	1.9±0	1.3±0	1.3±0	1.4±0	1.2±0
DHA/EPA	0.9±0	1.2±0	1.7±0	3.4±0	71.1±5.5	67.7±4.9
EPA/ARA	7.5±0.6	20.4±.24	70.9±0.8	6.2±0.1	1.3±0.4	1.4±0

- Los valores representan medias ± desviaciones estándar de muestras por triplicado.

- ND: no detectado

- FM100= 100% de HP y AP, FM75= 75% de HP y AP, FM50= 50% de HP y AP, FM25= 25% de HP y AP, FM0= 0% de HP y AP y ALG = 0% de HP, AP + *Haematococcus*.

La coloración de las dietas fue claramente alterada por la inclusión de las harinas *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp., y en la figura 1 se puede observar el cambio de coloración. La dieta control presentó un color café, mientras que las dietas con microalgas se tornaron verdes, la intensidad del color verde de las dietas aumentó al elevar el nivel de inclusión de las harinas de microalgas.

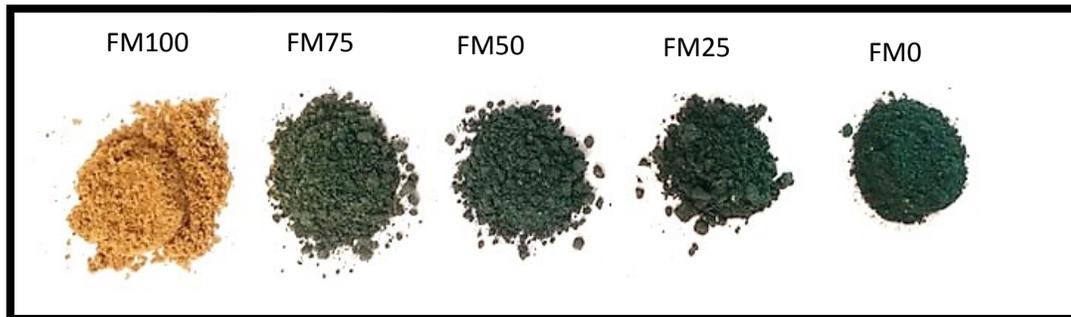


Figura 1. Coloración de las dietas utilizadas en el experimento. De izquierda a derecha está la dieta control, dieta con 0% (FM100) 25% (FM75), 50% (FM50), 75% (FM25) y 100% (FM0) de harinas de *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp.

7.2 Parámetros de crecimiento y utilización del alimento.

En la figura 2 se presenta el incremento en peso a través del tiempo de los organismos alimentados con las dietas experimentales y se observa un bajo incremento en peso directamente proporcional al nivel de reemplazo de la HP y AP con respecto al uso de las harinas de microalgas. Para el caso del tratamiento FM100 los peces tuvieron una ganancia promedio de 67.5 ± 4.6 g, con ganancia en peso significativamente superior ($P < 0.05$) respecto a los otros tratamientos, seguidos de los tratamientos FM75 y FM50, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí y con un incremento en peso promedio de 51.4 ± 6.9 g y 47.8 ± 9.3 g, respectivamente. Los tratamientos FM25 y FM0 no presentaron diferencias significativas entre sí ($P > 0.05$), con una ganancia en peso promedio de 17.1 ± 4 g y 12.1 ± 1 g, respectivamente ($P < 0.05$). Por último, el tratamiento adicional (ALG) fue el que presentó el menor incremento en peso con 1.4 ± 0.6 g en 9 semanas ($P < 0.05$) (Tabla 5).

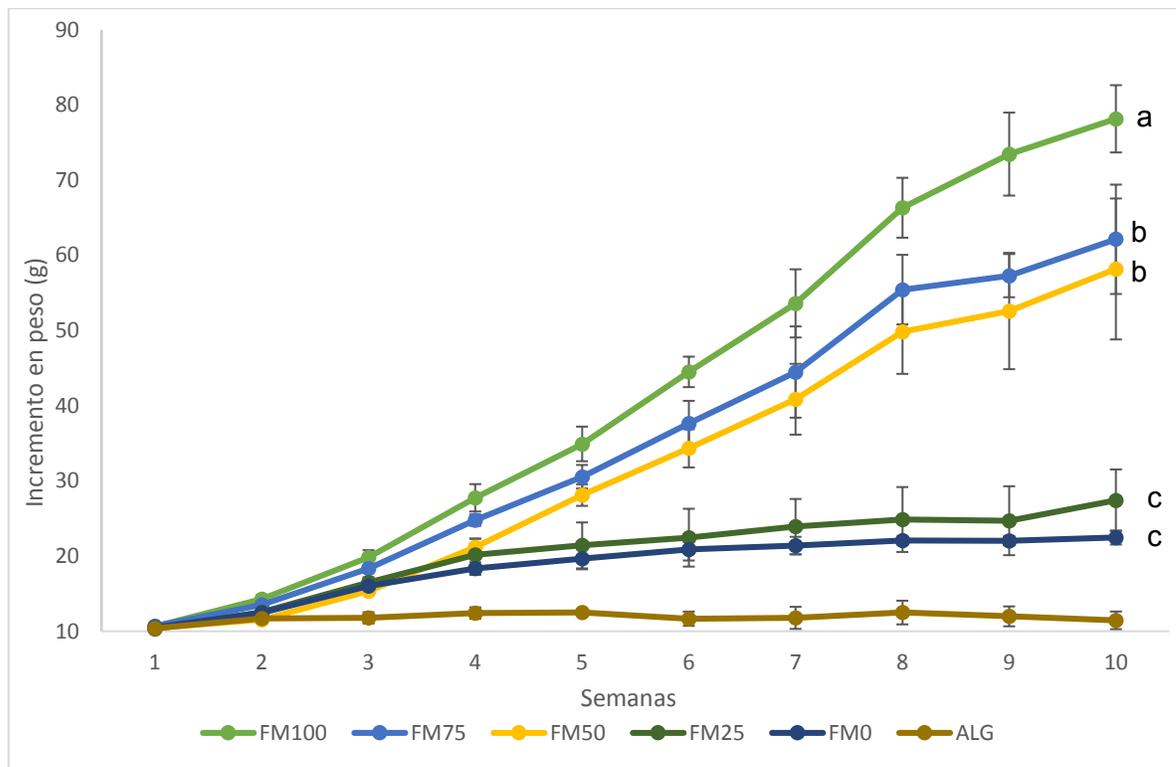


Figura 2. Incremento en peso (g) \pm desviación estándar de los juveniles de *T. macdonaldi*, registrado semanalmente durante el experimento. Los datos se compararon con una prueba de ANOVA de una vía ($P < 0.05$), $n = 15$. Las letras indican las agrupaciones de los tratamientos realizadas por medio de un análisis *post hoc* de Fisher ($P < 0.05$).; $a > b > c$ FM100 = 100% de HP y AP, FM75 = 75% de HP y AP, FM50 = 50% de HP y AP, FM25 = 25% de HP y AP, FM0 = 0% de HP y AP y ALG = 0% de HP, AP + *Haematococcus*.

En la tabla 5 se presentan los datos de crecimiento y utilización del alimento. Los peces alimentados con la dieta FM100 presentaron un peso promedio final (PF), coeficiente térmico de crecimiento (CTC) e incremento en peso relativo (IPR) significativamente mayor ($P < 0.05$) respecto a lo obtenido con los peces alimentados con las dietas que incluían harinas de microalgas, con valores de 78.2 ± 4.5 g, 1.3 ± 0.0 y $636 \pm 60\%$, respectivamente. El incremento de la inclusión de harinas de microalgas en la dieta disminuyó gradualmente los parámetros de crecimiento hasta llegar a valores de 22.5 ± 1 g de PF, 0.4 ± 0 de CTC y IPR de 114 ± 10 en los peces alimentados con la dieta FM0.

Referente al consumo de alimento, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los peces alimentados con las dietas FM100, FM75 y FM50 con valores medios de 53.7 ± 2.4 , 50.0 ± 2.1 y 46.2 ± 3.59 g pez^{-1} , respectivamente. Los peces alimentados con las dietas FM25 consumieron en promedio 32.39 ± 4.2 g pez^{-1} mientras que los alimentados con el alimento FM0 el consumo fue de 29.2 ± 1.5 g pez^{-1} , sin presentar

diferencias significativas entre ambos tratamientos ($P>0.05$). Las tasas de conversión alimenticia (TCA) en los peces alimentados con las dietas FM100, FM75 y FM50 resultaron sin diferencias significativas ($P>0.05$) entre ellas, con valores de 0.8 ± 0 para FM100 y de 1 ± 0.1 para FM75 y FM50. En los peces alimentados con las dietas FM25, la TCA es de 1.9 ± 0.2 , y para los de la FM0 el valor de TCA fue de 2.5 ± 0.1 .

La tasa de eficiencia proteica (TEP), el valor productivo de la proteína (VPP) y el valor productivo de lípidos (VPL), presentaron diferencias altamente significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos. Los valores de TEP de los organismos alimentados con la dieta FM100 resultaron con una eficiencia significativamente mayor ($P<0.05$), seguida por los peces alimentados con las dietas FM75 y FM50 con valores de 1.96 ± 0.1 y 1.29 ± 0.2 respectivamente, el TEP de los peces alimentados con las dietas FM25 (1 ± 0.1) y FM0 (0.8 ± 0) no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$), pero los valores fueron menores a los obtenidos en los demás tratamientos. En cuanto a los valores de VPP, los peces alimentados con las dietas FM100, FM75 y FM50 no presentan diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$), al igual que las dietas FM25 y FM0 ($P>0.05$). Por último, el VPL disminuyó significativamente ($P<0.05$) conforme aumentó el reemplazo del AP con las harinas de microalgas, donde los valores más alto fueron para el tratamiento FM100 (1.4 ± 0) seguida de FM75 (0.8 ± 0.1), mientras que para FM50 se calculó un valor de 0.5 ± 0.1 . En cuanto a los tratamientos FM25 y FM0, no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$) con valores de 0 (Tabla 5).

En cuanto al índice de condición de Fulton y el índice hepatosomático, los tratamientos no presentan diferencias significativas ($P>0.05$) entre ellos. Caso contrario ocurrió con el índice visceral, el cual fue significativamente mayor ($P<0.05$) en los peces alimentados con la dieta FM0, mientras que los demás tratamientos (FM100, FM75, FM50 y FM25) no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$). Cabe mencionar que el tratamiento adicional (ALG) fue el menos eficiente en todas las variables respuesta cuantificadas para el presente el experimento.

Tabla 5. Desempeño de juveniles de *T. macdonaldi* alimentadas con las distintas dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado (HP) y aceite de pescado (AP) experimentales por un periodo de 9 semanas.

Variables respuesta	Dietas experimentales					
	FM100	FM75	FM50	FM25	FM0	ALG
PF(g)	78.2±4.5 ^a	62.1±7.3 ^b	58.2±9.4 ^b	27.4±4.1 ^c	22.5±10 ^c	11.4±1.2
PG(g)	67.5±4.6 ^a	51.4±6.9 ^b	47.8±9.3 ^b	17.1±4 ^c	12±1 ^c	1.4±0.6
IPR (%)	636±60 ^a	480±50 ^b	457±88 ^b	166±30 ^c	114±10 ^c	13±6
CTC	1.3±0.0 ^a	1.1±0.0 ^{ab}	1.0±0.1 ^b	0.5±0.0 ^c	0.4±0.0 ^c	0.0±0.0
TCA	0.8±0.0 ^c	1±0.1 ^c	1±0.1 ^c	1.9±0.2 ^b	2.5±0.1 ^a	14.6±4.4
AC (g pez ⁻¹)	53.7±2.4 ^a	50±2.1 ^a	46.2±3.5 ^a	32.3±4.2 ^b	29.2±1.5 ^b	19.2±1.9
TEP	2.4±0.0 ^a	1.9±0.1 ^b	1.2±0.2 ^b	1.0±0.1 ^c	0.8±0.0 ^c	0.1±0.0
VPP	1.5±0.0 ^a	1.4±0.1 ^a	1.4±0.1 ^a	0.8±0.0 ^b	0.6±0.0 ^b	0.0±0.0
VPL	1.4±0.0 ^a	0.8±0.1 ^b	0.5±0.1 ^c	0.0±0.0 ^d	0.0±0.0 ^d	-0.3±0.0
Supervivencia	100	100	97.2±4.5	91.7±8.3	100	94.5±4.8
Índices						
K	1.0±0.0	1.1±0.0	1.1±0.0	1.0±0.0	0.9±0.0	0.8±0.0
IV*	6.8±1.4 ^b	7.9±0.4 ^b	6.8±0.9 ^b	8.1±0.5 ^b	10.2±1.3 ^a	8.7±1.0
IH	1.4±0.1	1.4±0.1	1.6±0.2	1.6±0.2	1.3±0.2	1.4±0.2

- Los valores representan medias ± desviaciones estándar de muestras por triplicado.

- Los valores de la composición química se compararon con una prueba de ANOVA de una vía ($P < 0.05$), $n=15$.

- Las letras indican las agrupaciones realizadas por medio de un análisis *post hoc* de Tukey ($P < 0.05$), la misma letra indica que no existen diferencias significativas; $a > b > c > d$

- PF: Peso Final, PG: Peso Ganado, IPR: Incremento en Peso Relativo, CCT: Coeficiente de Crecimiento Térmico, TCA: Tasa Conversión Alimenticia, AC: Alimento Consumido, TEP: Tasa Eficiencia Proteica, VPP: Valor productivo de la Proteína y VPL: Valor productivo de lípidos, K: Factor de condición de Fulton, IV: Índice Visceral y IH: Índice hepatosomático.

- FM100= 100% de HP y AP, FM75= 75% de HP y AP, FM50= 50% de HP y AP, FM25= 25% de HP y AP, FM0= 0% de HP y AP y ALG = 0% de HP, AP + *Haematococcus*.

7.3 Digestibilidad aparente

Los valores de digestibilidad aparente de las dietas en peso seco, resultaron con diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). La digestibilidad más alta fue en el tratamiento FM100, que presentó una digestibilidad promedio del $78.7 \pm 5.5\%$, sin tener diferencias significativas con la digestibilidad de la dieta FM75, pero con un promedio menor ($74.6 \pm 1.2\%$). El porcentaje de digestibilidad de las dietas disminuyó conforme se reemplazó la HP y AP con las harinas de microalgas. Por ejemplo, la dieta FM50 con 50% de HP y AP presentó una digestibilidad del $65 \pm 4.3\%$, la FM25 un 54.3 ± 4.5 y la FM0 un $54.7 \pm 4\%$ sin diferencias

significativas entre ellas, pero si la dieta FM50. La dieta ALG resultó el valor más bajo de digestibilidad con un promedio de $47.8 \pm 3.3\%$ (con Figura 3).

La digestibilidad de la proteína fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los tratamientos FM100 ($94.3 \pm 1\%$), FM75 ($85.2 \pm 7.1\%$), FM50 ($90 \pm 3.7\%$) y FM25 ($87.5 \pm 3\%$) en comparación con la digestibilidad de la proteína obtenida en el tratamiento FM0 ($73.9 \pm 3.1\%$) (Figura 2. De igual manera, la digestibilidad aparente de los lípidos fue mayor ($P < 0.05$) en la dieta FM100 con un $99.5 \pm 0.3\%$, seguido por las dietas FM75 y FM50 con un $90 \pm 4.1\%$ y $83.4 \pm 1.6\%$ respectivamente. Los porcentajes de digestibilidad de los lípidos disminuyen significativamente ($P < 0.05$) cuando se reemplaza más del 50% de la HP y AP como se observó en los tratamientos FM25 ($37.7 \pm 6.3\%$) y FM0 ($42.4 \pm 2.5\%$) (Figura 3).

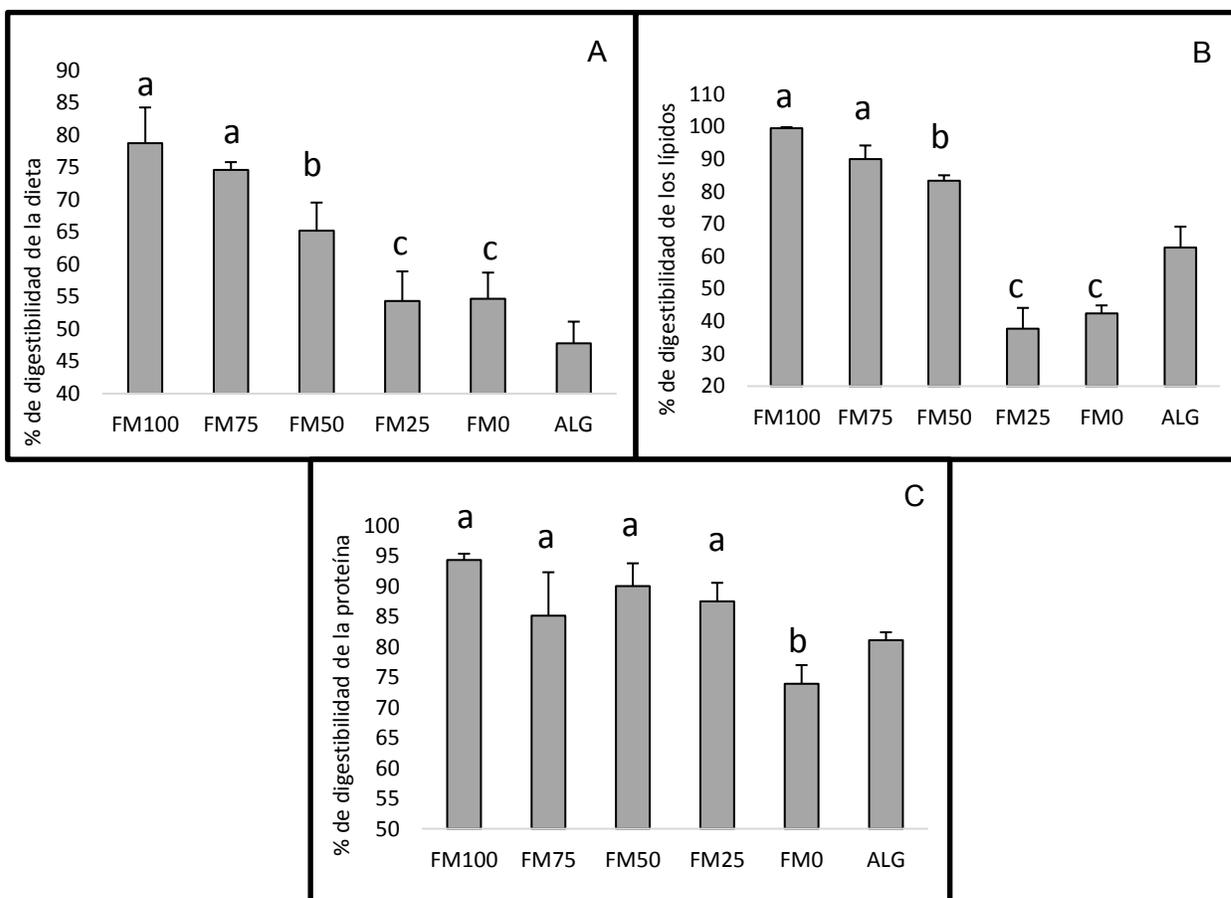


Figura 3. Porcentaje de digestibilidad aparente de las dietas en peso seco (A), proteína (B) y lípidos (C). Los datos se compararon con una prueba de ANOVA de una vía ($P < 0.05$), $n=15$. Las letras indican las agrupaciones realizadas por medio de un análisis *post hoc* de Tukey ($P < 0.05$), la misma letra indica que no existen diferencias significativas: $a > b > c$. FM100= 100% de HP y AP, FM75= 75% de HP y AP, FM50= 50% de HP y AP, FM25= 25% de HP y AP, FM0= 0% de HP y AP y ALG= 0% de HP, AP + *Haematococcus*.

7.4 Actividad enzimática

La actividad de la tripsina en los intestinos aumentó significativamente ($P < 0.05$) conforme aumentó la cantidad de microalgas en las dietas. Por ejemplo, la actividad de la tripsina en peces alimentados con las dietas FM50, FM25 y FM0 resultaron con la actividad más alta con valores de 206.5 ± 53.3 , 210.4 ± 36.2 y 236.3 ± 11.1 U mg^{-1} de muestra, respectivamente. En el caso de los ciegos pilóricos los peces alimentados con la dieta FM100 presentaron un valor significativamente mayor (83.8 ± 32.1 U mg^{-1} de muestra) que los alimentados con la dieta FM75 (29 ± 20.6 U mg^{-1} de muestra) y FM50. Así mismo, a partir del tratamiento FM75 se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la actividad de la tripsina hasta llegar a 96.7 ± 2.31 U mg^{-1} en el tratamiento FM0.

La mayor actividad de las lipasas se registró en los ciegos pilóricos. El tratamiento FM100 presentó la actividad más alta con 293.5 U g^{-1} , sin presentar diferencias significativas con FM75 ($P > 0.05$). Sin embargo, la actividad en las lipasas descendió a 214.8 U g^{-1} en FM50 y 199.9 U g^{-1} en FM25 y, por último, la actividad enzimática en FM0 fue significativamente ($P < 0.05$) más baja con 141.5 U g^{-1} . La actividad de las lipasas en el intestino fue muy similar entre los tratamientos con un valor promedio de 40.1 U g^{-1} , y no presentó diferencias significativas entre ningún tratamiento ($P > 0.05$).

La actividad de la amilasa fue similar en los intestinos y en los ciegos pilóricos y la actividad más alta se relacionó con la presencia de microalgas en las dietas. En los intestinos la actividad de la amilasa fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los tratamientos FM75, FM50, FM25 y FM0 con valores de 48.4 ± 6.3 , 55.5 ± 7.9 , 49.9 ± 7.3 y 52.2 ± 3.1 U g^{-1} respectivamente, mientras que el valor más bajo lo presentó la dieta control con 33.9 ± 3.2 U g^{-1} . En el caso de los ciegos pilóricos se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) y la mayor actividad se presentó en los tratamientos FM0 (64.5 ± 2.1 U g^{-1}) y FM25 (69.5 ± 2.2 U g^{-1}), seguido de los tratamientos FM75 (51.7 ± 2.2 U g^{-1}) y FM50 (51.6 ± 6.5 U g^{-1}) y finalmente, el tratamiento control presentó la menor actividad de amilasas en ciegos pilóricos con 33.7 ± 1 U g^{-1} .

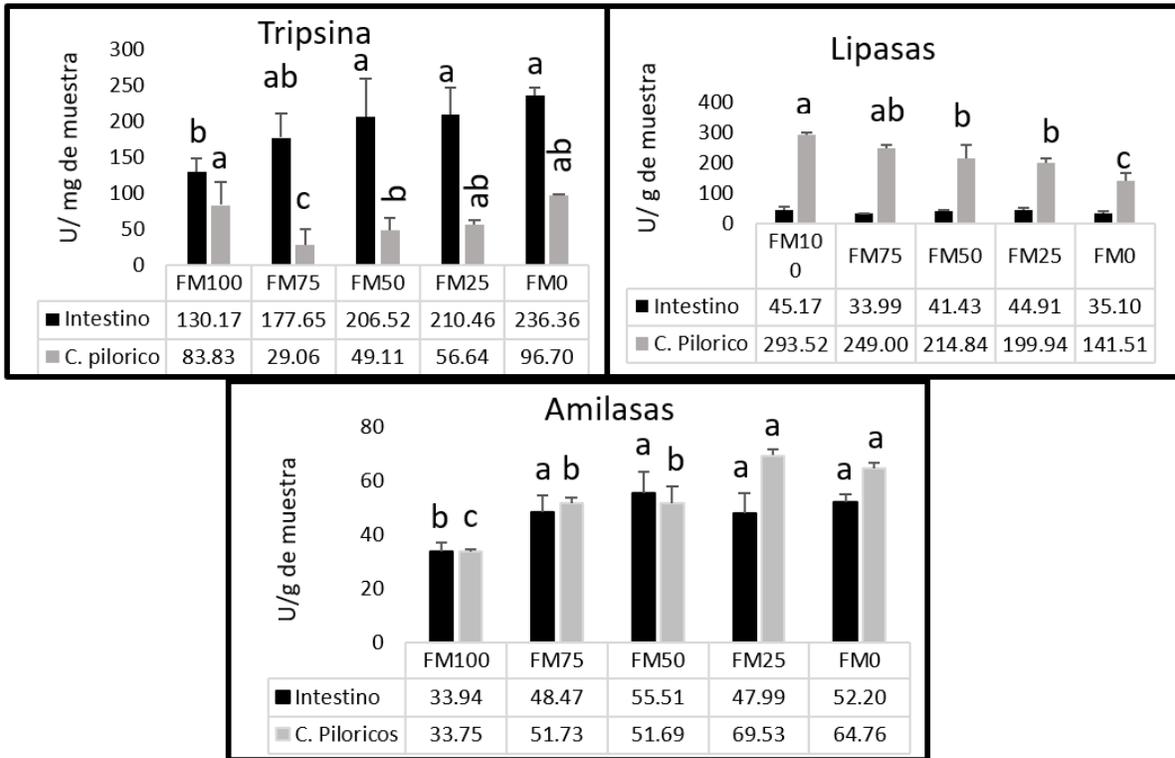


Figura 4. Actividad enzimática digestiva de tripsina ($U\ mg^{-1}$ de órgano), lipasa y amilasas ($U\ g^{-1}$ de órgano). Los datos se compararon con una prueba de ANOVA de una vía ($P < 0.05$), $n = 15$. Las letras indican las agrupaciones realizadas por medio de un análisis *post hoc* de Tukey ($P < 0.05$), la misma letra indica que no existen diferencias significativas: $a > b$. FM100= 100% de HP y AP, FM75= 75% de HP y AP, FM50= 50% de HP y AP, FM25= 25% de HP y AP, FM0= 0% de HP y AP y ALG= 0% de HP, AP + *Haematococcus*.

7.5 Análisis proximal de los peces

En cuanto al análisis químico proximal de los peces se encontraron diferencias significativas entre los distintos componentes para los organismos alimentados con las diferentes dietas experimentales. Por ejemplo, el porcentaje de proteína cuantificado en los peces del tratamiento FM100 (13.2 ± 0.2) presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con los tratamientos FM50 (15.2 ± 0.2), FM25 (15.1 ± 0.5) y FM0 (18.0 ± 1.1) pero no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) con los peces del tratamiento FM75 (13.6 ± 0.2). Por otro lado, de manera general el porcentaje de lípidos, disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en los tratamientos con mayor sustitución de HP y AP, el mayor porcentaje lo presentó la dieta control (2.6 ± 0.2), seguido de los peces del tratamiento FM75 (2.6 ± 0.1), seguidos de FM50 (2.7 ± 0.1) y por último los tratamientos FM25 y FM0 presentaron los valores más bajos, con $1.7 \pm 0.0\%$ y $1.0 \pm 0.0\%$ respectivamente.

El porcentaje de cenizas estimado en los distintos tratamientos, no presentó diferencias significativas ($P>0.05$). El ELN generalmente disminuyó al incrementar la cantidad de microalgas en las dietas, pasando de 6.6% en el tratamiento control a 1.9% en el tratamiento FM0 (Tabla 6).

Tabla 6. Composición proximal (% en peso húmedo) de los juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con las distintas dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado (HP) y aceite de pescado (AP).

Dietas experimentales							
	Inicial	FM100	FM75	FM50	FM25	FM0	ALG
Humedad	76.7	76.1±1.2	76.7±0.6	76.9±0.7	78.9±0.2	78.3±1.7	80.7±0.3
Proteína	13.2±0.2	13.2±0.2 ^d	13.6±0.2 ^{cd}	15.2±0.2 ^{bc}	15.1±0.5 ^{ab}	18.0±1.1 ^a	17.3±0.3
Lípidos	2.6±0.2	2.6±0.1 ^b	3.9±0.1 ^a	2.7±0.1 ^c	1.7±0.1 ^d	1.0±0.0 ^d	1.0±0.1
Ceniza	0.9±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.7±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0
ELN	6.6	7.3	5	4.4	3.6	1.9	0.1

- Los valores representan medias ± desviaciones estándar de muestras por triplicado.

- Los valores de la composición química se compararon con una prueba de ANOVA de una vía ($P<0.05$), $n=15$.

- Las letras indican las agrupaciones realizadas por medio de un análisis *post hoc* de Tukey ($P<0.05$), en donde en donde, la misma letra indica que no existen diferencias significativas: a>b.

- ELN: extracto libre de nitrógeno.

- FM100= 100% de HP y AP, FM75= 75% de HP y AP, FM50= 50% de HP y AP, FM25= 25% de HP y AP, FM0= 0% de HP y AP y ALG= 0% de HP, AP + *Haematococcus*.

7.6 Perfil de ácidos grasos del músculo

El perfil del total de ácidos grasos (AG) saturados presente en el músculo de juveniles de totoaba alimentados con las dietas experimentales no resultó con diferencias significativas ($P>0.05$) entre tratamientos y fue muy parecida al perfil de ácidos grasos de los peces al inicio del experimento. Los peces alimentados con la dieta ALG presentaron los valores más bajos de estos AG. Los ácidos grasos monoinsaturados presentes en mayor proporción en el músculo de los peces fueron el C18:1 n-9 y el C16:1. La concentración del C18:1 n-9 aumentó con respecto a la muestra inicial en el caso de los tratamientos FM100 (15±0%, FM75 (12.9±1.1%) y FM50 (12.7±2.4%), pero no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$). Los tratamientos FM25 y FM0 resultaron con concentraciones menores que la inicial y no presentaron diferencias significativas entre ambos ($P>0.05$).

Caso contrario, el ácido graso C16:1 presentó un menor porcentaje en comparación con la muestra inicial de peces ($6.3 \pm 0.3\%$). Los tratamientos FM100 ($4.7 \pm 0.4\%$), FM75 ($4.4 \pm 0.8\%$) y FM50 ($4.3 \pm 0.8\%$) no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos, mientras que FM25 ($2.4 \pm 0.1\%$) y FM0 ($1.5 \pm 0.2\%$) fueron los tratamientos con los valores significativamente más bajos ($P < 0.05$). El total de ácidos grasos monoinsaturados presentes en el músculo de los peces alimentados con las dietas experimentales disminuyó significativamente ($P < 0.05$) conforme se incrementó el nivel de harinas de microalgas en la dieta, siendo los peces del tratamiento FM100 ($21 \pm 1.5\%$) los que presentaron el nivel más alto, seguido por FM75 ($19.5 \pm 0.6\%$) y FM50 (16.2%) y finalmente, los tratamientos FM25 y FM0 fueron los que mostraron los niveles más bajos con un $12.6 \pm 0.3\%$ y $10.8 \pm 0.4\%$, respectivamente.

El porcentaje de C20:4 n-6 (ARA) en el músculo de los peces no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos FM100 ($3.1 \pm 0.1\%$), FM50 ($2.6 \pm 0.2\%$), FM25 ($2.7 \pm 0.2\%$) y FM0 ($2.9 \pm 0.1\%$), pero sí con el tratamiento FM75 ($2.6 \pm 0.0\%$) ($P < 0.05$). El mayor porcentaje de los ácidos grasos totales de la serie n-6 se encontró en el músculo de los peces alimentados con la dieta FM0 ($16 \pm 0.2\%$) y disminuyó significativamente ($P < 0.05$) conforme aumentó el nivel de inclusión de harina y aceite de pescado en las dietas. Los ácidos grasos poliinsaturados totales de la serie n-6 alcanzaron concentraciones significativamente mayores ($P < 0.05$) en los peces alimentados con la dieta con 0% de HP y AP ($17 \pm 0.2\%$), seguido del tratamiento FM25 con $14.5 \pm 0.2\%$, mientras que entre los tratamientos FM100, FM75 y FM50 no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) con valores de $11.8 \pm 0.1\%$, $12.3 \pm 0.5\%$ y $12.6 \pm 0.2\%$, respectivamente.

El porcentaje del total de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 en el tratamiento control fue de $34.1 \pm 0.7\%$ y no fue significativamente diferente de los tratamientos FM75 (35.6 ± 1.2), FM50 (25.5 ± 3.7) y FM0 (36.1 ± 1.2) ($P > 0.05$), pero sí fue significativamente diferente ($P < 0.05$) con el tratamiento FM25 (37.6 ± 0.2). La mayor concentración de este tipo de ácidos grasos en el músculo de los juveniles de totoaba, está dada por el C22:6n3 (DHA), el cual está en un porcentaje significativamente mayor ($P < 0.05$) en los tratamientos FM0 (32.9 ± 0.1) y FM25 (32.3 ± 0.5), mientras que FM100 (22.1 ± 2.5), FM75 (25.9 ± 2.5) y FM50 (25.5 ± 3.7) presentaron valores significativamente más bajos ($P < 0.05$). En el caso del C20:5n3 (EPA), los porcentajes disminuyen conforme se disminuye el AP, resultando en concentraciones significativamente más altas ($P < 0.05$) en los tratamientos FM100 (11.4 ± 1.6), FM75 (8.7 ± 1.1), y FM50 (8.9 ± 2.1), mientras que las concentraciones en los tratamientos FM25 (4.6 ± 0.3) y FM0 (2.6 ± 0.1) resultaron significativamente menores ($P < 0.05$). Por último, las relaciones de los ácidos grasos n-3/n-6, DHA/EPA y EPA/ARA no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos FM100, FM75 y FM50. En cuanto a la relación n-3/n-6 en el tratamiento FM100 la relación fue de 2.9 ± 0.5 , en FM75 de 2.9 ± 0 y en FM50 de

2.5±0 y no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$), mientras que los tratamientos FM25 y FM0 tuvieron una relación significativamente más baja ($P<0.05$) en comparación con los demás tratamientos, con 2.5±0 y 2.3±0 respectivamente. La relación DHA/EPA fue menor en las dietas FM100 (2±0.5), FM75 (3±0.7) y FM50 (3±1) en comparación con las dietas FM25 y FM0, las cuales presentaron valores respectivos de 7±0.5 y 12.3±0.4. La relación de EPA/ARA fue significativamente mayor ($P<0.05$) en los tratamientos FM100 (3.5±0.3), FM75 (3.3±0.4) y FM50 (3.3±0.5), mientras que los tratamientos FM25 fue de 1.6±0 y en FM0 de 0.8±0, siendo significativamente menores ($P<0.05$).

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos del músculo de juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con las distintas dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado (HP) y aceite de pescado (AP) (% total de ácidos grasos identificados).

	Tratamientos						
	Inicial	FM100	FM75	FM50	FM25	FM0	ALG
Saturados							
C14:0	2.4±0.2	1.3±0.1 ^a	1.2±0.2 ^a	1.2±0.3 ^a	0.1±0.0 ^b	0.1±0.0 ^b	0.1±0.1
C16:0	19.7±0.1	20.9±1.3	20.6±0.0	20.6±0.7	20.5±0.6	20.7±0.9	21.5±1.0
C17:0	0.7±0.0	0.6±0.0 ^b	0.6±0.0 ^{ab}	0.7±0.0 ^{ab}	0.8±0.0 ^a	0.8±0.0 ^a	0.9±0.1
C18:0	7±0.1	6.5±0.2 ^{cb}	5.7±0.1 ^c	6.1±0.2 ^{bc}	6.6±0.3 ^b	7.9±0.5 ^a	0.7±0.0
C20:0	0.8±0.0	0.6±0.0 ^c	0.5±0.0 ^{cb}	0.6±0.0 ^c	0.4±0.0 ^{ab}	0.4±0.0 ^a	0.5±0.0
C23:0	0.5±0.0	0.4±0.3 ^c	2.7±0.7 ^{bc}	2.1±1.8 ^c	5±0.1 ^{ab}	5.7±0.0 ^a	5.8±0.0
C24:0	1.1±0.0	1.9±0.2 ^a	1.4±0.1 ^{ab}	1.5±0.4 ^{ab}	0.9±0.0 ^{bc}	0.7±0.0 ^c	0.7±0.0
SUMA	33±0.3	33±0.9 ^b	33.5±0.1 ^b	33.5±1.5 ^b	35.1±0.4 ^{ab}	37.1±1.3 ^a	31.0±1.0
Monoinsaturados							
C16:1	6.3±0.3	4.7±0.4 ^a	4.4±0.8 ^a	4.3±0.8 ^a	2.4±0.1 ^b	1.5±0.2 ^b	1.9±0.1
C17:1	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	ND
C18:1n9	10.9±0.0	15.2±1.2 ^a	12.9±1.1 ^{ab}	12.7±2.4 ^{ab}	9.2±0.2 ^{bc}	8.2±0.6 ^c	10.2±0.3
SUMA	18.3±0.5	21±1.5 ^a	19.5±0.6 ^{ab}	16.6±1.3 ^b	12.6±0.3 ^c	10.6±0.4 ^c	12.7±0.1
Polinsaturados n-6							
C18:2n6	12.1±0.1	8.3±0.5 ^b	8.5±0.3 ^b	8.3±0.8 ^b	9.2±0.1 ^a	9.7±0.0 ^a	11.0±0.1
C18:3n6	0.1±0.0	0.2±0.0 ^c	0.9±0.3 ^b	1.3±0.2 ^b	2.0±0.1 ^a	2.4±0.2 ^a	3.2±0.2
C20:3n6	0±0.0	0.2±0.0 ^c	0.2±0.0 ^c	0.2±0.0 ^c	0.4±0.0 ^b	0.8±0.0 ^a	1.3±0.2
C20:4n6 (ARA)	3.6±0.1	3.1±0.1 ^a	2.6±0.0 ^b	2.6±0.2 ^{ab}	2.7±0.2 ^{ab}	2.9±0.1 ^{ab}	4.2±0.5
SUMA	16.0±0.2	11.8±0.1 ^c	12.3±0.5 ^c	12.6±0.2 ^c	14.5±0.2 ^b	16.0±0.2 ^a	19.8±0.5
Polinsaturados n3							
C18:3n3	0.6±0.0	0.5±0.1 ^a	0.5±0.0 ^a	0.5±0.0 ^a	0.3±0.0 ^{ab}	0.3±0.0 ^b	0.2±0.0
C20:3n3	0.8±0.0	0.4±0.0 ^a	0.3±0.0 ^a	0.3±0.0 ^a	0.2±0.0 ^b	0.2±0.0 ^b	0.2±0.0
C20:5n3 (EPA)	10.9±0.0	11.4±1.6 ^a	8.7±1.1 ^a	8.9±2.1 ^a	4.6±0.3 ^b	2.6±0.1 ^b	2.9±0.2
C22:6n3 (DHA)	20.2±0.6	22.1±2.5 ^c	25.9±2.5 ^c	25.5±3.7 ^{bc}	32.3±0.5 ^{ab}	32.9±0.1 ^a	32.8±0.8
SUMA	32.5±0.6	34.1±0.7 ^b	35.6±1.2 ^{ab}	35.4±1.5 ^{ab}	37.6±0.2 ^a	36.1±1.2 ^{ab}	36.3±1.1
n3/n6	2.2±0	2.9±0.5 ^a	2.9±0 ^{ab}	2.8±0.1 ^a	2.5±0 ^{bc}	2.3±0 ^c	1.8±0
DHA/EPA	1.8±0	2±0.5 ^c	3±0.7 ^c	3±1 ^c	7±0.5 ^b	12.3±0.4 ^a	11.7±0.1
EPA/ARA	2.9±1	3.5±0.3 ^a	3.3±0.4 ^a	3.3±0.5 ^a	1.6±0 ^b	0.8±0 ^b	8.1±0.1

- Los valores representan medias ± desviaciones estándar de muestras por triplicado.

- Los valores del contenido de ácidos grasos se compararon con una prueba de ANOVA de una vía (P<0.05), n=15.

- Las letras indican las agrupaciones realizadas por medio de un análisis *post hoc* de Tukey (P<0.05), la misma letra indica que no existen diferencias significativas; a>b>c.

- FM100= 100% de HP y AP, FM75= 75% de HP y AP, FM50= 50% de HP y AP, FM25= 25% de HP y AP, FM0= 0% de HP y AP y ALG= 0% de HP, AP + *Haematococcus*.

Capítulo 8 Discusión

La caracterización y evaluación de ingredientes para sustituir a la harina de pescado (HP) y aceite de pescado (AP) es una de las grandes prioridades de la acuicultura. Encontrar sustitutos que reduzcan la presión sobre el uso de estos recursos marinos finitos, y sin comprometer el crecimiento de los peces es indispensable para el futuro sustentable de esta actividad. Este es el primer estudio en evaluar el efecto de sustitución parcial y total de la HP y AP con harinas de microalgas en juveniles de *T. macdonaldi*, utilizando como principal fuente proteica a *Arthrospira* sp. y como fuente lipídica a *Schizochytrium* sp. para la elaboración de las dietas.

En contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio, Qiao *et al.* (2014), no encontraron diferencias significativas en el peso ganado al sustituir el 100% del AP por harinas de *Schizochytrium* sp. y *Nannochloropsis* sp. en juveniles (peso inicial de 16.5 ± 0.91 g) de lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) y reportan una tasa de conversión alimenticia menor en peces alimentados con 50% de estas microalgas y 25% de aceite de soya y pescado después de 8 semanas de alimentación. Por su parte, Ksissinger *et al.* (2016) lograron reemplazar hasta un 80% de la HP y el AP en *Seriola rivoliana* (2.5 ± 0.1 g de peso inicial) con harina de calamar, soya y microalgas como *Haematococcus pluvialis* y *Schizochytrium limacium* alimentados durante 9 semanas. En juveniles de esturión (*Acipenser baeri*) con un peso inicial de 92.1 ± 3.6 g, se registró una mayor ganancia en peso, tasa de conversión alimenticia, tasa de eficiencia proteica y coeficiente de crecimiento térmico cuando lo peces fueron alimentados por 12 semanas con dietas que tenían hasta un 60% de reemplazo de HP con *Spirulina* sp. (Palmegiano *et al.*, 2005). Por su parte, García-Ortega *et al.* (2016) reportaron en juveniles del mero gigante (*Epinephelus lanceolatus*) con un peso inicial de 45.9 ± 7.1 g, una sustitución exitosa del 40% de HP y AP por soya y *S. limacium* alimentados durante 12 semanas, sin afectar el crecimiento y la utilización del alimento, y concluyen que *S. limacium* puede utilizarse como fuente principal de lípidos para esta especie.

Sin embargo, aunque en algunos estudios se logró sustituir HP y AP con microalgas, es relevante considerar las cantidades en g kg⁻¹ de microalgas utilizadas en cada uno de estos experimentos, ya que son menores a las utilizadas en el presente estudio. Por ejemplo, en el caso del estudio con lenguado japonés (Qiao *et al.*, 2014) la cantidad de microalgas utilizadas en el tratamiento con 0% de AP y 100% microalgas fue de 227.1 g kg⁻¹ pero solo 91.1 g kg⁻¹ fueron de *Schizochytrium* sp. y el resto *Nannochloropsis* sp. Por su parte, en el estudio de Ksissinger *et al.* (2016) se utilizó una dieta con 80% de reemplazo de HP con 68.3 g kg⁻¹ de harinas de microalgas de las cuales 50 g kg⁻¹ eran de *S. limacium* y el resto de los ingredientes era

concentrado de proteína de soya (SPC), calamar y *Haematococcus pluvialis*. En el mero gigante (*Epinephelus lanceolatus*), las dietas utilizadas con un 40% de HP y 40% AP de reemplazo no presentaron diferencias con respecto al control, pero esta dieta solo contenía 154.1 g kg⁻¹ de alga *S. limacinum*, y se utilizaron además SPC, harina de soya, aceite de canola y calamar (García-Ortega *et al.*, 2016). El uso de varios ingredientes en estos experimentos pudo ayudar a lograr un mejor balance de los nutrientes disponibles en las dietas con respecto al requerimiento de la especie de interés, permitiendo alcanzar los valores sustitución de HP y AP mencionados. En contraste, en las formulaciones de las dietas utilizadas en este trabajo se utilizó únicamente *Schizochytrium* sp. como principal sustituto de AP y *Arthrospira* sp. como principal sustituto de la HP, lo que pudo causar un desequilibrio nutricional en la composición de ácidos grasos y aminoácidos con respecto al requerimiento de la totoaba. Esto refuerza la idea de que ningún ingrediente por sí solo, es capaz de sustituir por completo la HP o el AP (UICN, 2007).

En otros estudios realizados en el tambor rojo (*Sciaenops ocellatus*) y en el híbrido de lobina rayada (*Morone chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂), se logró un reemplazo del 50% de HP y 50% de AP con *Arthrospira* sp. como principal fuente proteica y *Schizochytrium* sp. como principal fuente de lípidos, sin afectar el crecimiento e índices de utilización del alimento Pérez-Velazquez *et al.* (2018, 2019). Sin embargo, es importante resaltar que, en estos últimos estudios, la cantidad de soya en las dietas para reemplazar 50% de HP y 50% de AP era baja, conteniendo solo 137 g kg⁻¹, mientras que, en los tratamientos experimentales en este trabajo, la cantidad de harina de soya y de SPC era 265.6 g kg⁻¹. La diferencia en la cantidad de soya utilizada en las dietas en este trabajo probablemente influyó en los bajos índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento, pues si bien el SPC puede ser una buena fuente proteica para la elaboración de dietas en peces marinos, la harina de soya puede contener factores antinutricionales, incluso producir enteritis en juveniles de *T. macdonaldi* en niveles de inclusión mayor al 22% que limitan los niveles de inclusión de esta fuente proteica (Fuentes-Quesada *et al.*, 2018; Dersjant-Li, 2002). Es importante hacer notar que *S. ocellatus* al igual que *T. macdonaldi*, pertenece a la familia *Sciaenidae*, por lo que se esperaban resultados similares.

En cuanto a los índices somáticos calculados en este experimento, tanto el IH como el factor de condición de Fulton (K), no se encontraron diferencias significativas entre los organismos alimentados con las dietas experimentales y el control. Por otra parte, el IV resultó más alto en los peces alimentados con la dieta FMO (10.2±0.2) en comparación con los demás tratamientos. Se ha reportado en varios estudios que la diferencia en el consumo de las diferentes dietas puede afectar varios de los índices de respuesta. Lunger *et al.* (2006), menciona que los parámetros de eficiencia de crecimiento, utilización del alimento, índices somáticos y de condición, son modificados por la palatabilidad del alimento, aun cuando este, no presente

algún tipo de deficiencia nutricional. Es probable que la baja palatabilidad, por lo menos en las dietas con mayor inclusión de harinas de microalgas (FM25 y FM0), tuvo como consecuencia la reducción en el consumo del alimento en estos tratamientos, ocasionando la disminución en índices como el CTC, PG y de IP, en los juveniles de *T. macdonaldi*. Así mismo, Olvera-Novoa *et al.* (1998) reportan una reducción en la ingesta del alimento en *Oreochromis mossambicus*, utilizando *Arthrospira maxima* como ingrediente de sustitución de la HP, donde el tratamiento control con 100% de HP obtuvo un buen consumo de la dieta (89.2 mg día⁻¹), sin embargo las dietas que contenían 40% o más de *A. maxima*, la ingesta se redujo a 58.2 mg día⁻¹ hasta llegar a un consumo de 18.0 g día⁻¹ en la dieta con 100% de *A. maxima*. Esto coincide con los datos obtenidos en el presente estudio, pues los tratamientos FM75 y FM50 no presentaron diferencias con FM100 en el consumo del alimento y este disminuyó a partir de la dieta FM25. Es decir, el consumo de alimento disminuyó en las dietas con contenían un nivel de inclusión mayor al 50% de la harina de *A. maxima*, esto posiblemente por el color verde intesto y la consistencia dura que otorga este ingrediente a las dietas (Olvera-Novoa *et al.*, 1998).

Poco se menciona en la literatura sobre la influencia de *A. maxima* como sustituto de la HP en la palatabilidad en las dietas para peces, sin embargo, en el trascurso del experimento se observó que los peces alimentados con dietas que contenían harinas de microalgas, regurgitaban (expulsaban) los pellets. A pesar de que en el presente estudio no se utilizó algún método preciso para medir la dureza o la porosidad y densidad del alimento, era evidente que las dietas con una mayor cantidad de microalgas presentaban una consistencia más densa, menos porosa y dura, lo cual pudo dificultar su ingesta y masticado como lo menciona Olvera-Novoa *et al.* (1998). Además de la consistencia, el color de las dietas que contenían microalgas, era muy diferente en comparación con la dieta de 100% de HP y AP. Las dietas experimentales tenían un color verde intenso, el cual se atribuye a la inclusión de *A. maxima*. Estos factores han sido identificados como limitantes para la incorporación de microalgas en grandes cantidades en la formulación de alimentos a escala comercial (Becker, 2007). Estos factores físicos, son importantes y se deberían tomar en cuenta, ya que están directamente relacionados con la ingesta y palatabilidad del alimento, por lo que es recomendable, que en estudios posteriores en los que se pretenda reemplazar la HP o AP por microalgas, se realicen pruebas específicas para evaluar parámetros como de palatabilidad, dureza y color (Hoyos *et al.*, 2017).

A pesar de las diferencias en el crecimiento de los peces alimentados con las dietas experimentales y el control, en índices como la TCA, VPP, las dietas FM75 y FM50 no presentaron diferencias significativas con respecto al tratamiento control (FM100). Sin embargo, los valores del VPL de las dietas FM75 (0.8±0.1), FM50 (0.5±0.1), FM25 (0.0±0.0) y FM0 (0.0±0.0), son significativamente menores al tratamiento control

FM100 (1.4 ± 0.0). Estos resultados sugieren que *Schizochytrium* sp., como fuente de lípidos y ácidos grasos para sustituir al AP, tiene una influencia negativa directa sobre el crecimiento de los peces alimentados con las dietas experimentales. Una de las posibles razones para explicar este menor VPL puede estar relacionado con la baja digestibilidad de los lípidos observada en las dietas que contenían mayor cantidad de *Schizochytrium* (FM25 y FM0). Así mismo, no se encontraron diferencias significativas en el CDA de la materia seca entre las dietas FM100 y FM75, resultandos en los valores de CDA altos, seguidas de la dieta FM50 y finalmente los más bajos para las dietas FM25 y FM0. Se han propuesto varios factores que pueden afectar la digestibilidad del alimento y que podrían explicar la reducción progresiva de la digestibilidad de las dietas al incrementar el nivel de inclusión de harina de microalgas en las dietas experimentales, tales como la composición de la pared celular de las microalgas, la presencia de inhibidores enzimáticos o simplemente la estructura química de sus compuestos, como la celulosa que compone su pared celular (Hasan *et al.*, 2017; Li-Kun *et al.*, 2005; Becker, 2007; Kousoulaki *et al.*, 2015).

Sin embargo, en experimentos multifactoriales es difícil determinar con precisión que factor, nutriente o ingrediente es el que está influenciando las variables de respuesta como el crecimiento y rendimiento de los peces (García-Ortega *et al.*, 2015). En el presente estudio, los resultados de CDA de la proteína nos indican que no existen diferencias estadísticas entre la dieta control y las dietas experimentales hasta una sustitución del 75% de HP y AP. La espirulina es altamente digerible, pues una de sus características es que su pared celular está formada principalmente por mucopolímeros, polisacáridos y carece de celulosa, dando como resultado una pared celular delgada. Estos compuestos y el grosor de su pared celular facilitan la digestión de las células y por lo general, es considerada como un ingrediente con buena digestibilidad, por lo que podríamos asumir que la digestibilidad de la fuente proteica no fue un factor determinante en los resultados observados (Sánchez *et al.*, 2002; Ramírez-Moreno y Olvera Ramírez, 2006; Montellano, 2013).

La actividad de la tripsina aumentó significativamente en el intestino de los totoabas alimentadas con las dietas que contenían microalgas. Adel *et al.* (2016) reportaron un aumento en la actividad de las proteasas en el intestino de juveniles de 32.1 ± 0.3 g en esturión (*Huso huso*), alimentados durante 8 semanas, con 10% de *A. platensis*. Incluso reportan que aun cuando esta microalga es utilizada como sustituto total de la HP, esta tendencia continua. En el langostino malayo (*Macrobrachium rosenbergii*) la actividad de las proteasas aumentó significativamente en las dietas en las que se utilizó de 100% de sustitución de HP con *A. platensis* (Radhakrishnan *et al.*, 2016). En contraste, ese mismo estudio se reportó una disminución progresiva de la actividad de la lipasa en los tratamientos con forme aumentó la inclusión de *A. platensis*.

En el presente estudio, se observó una mayor actividad de las lipasas en los ciegos pilóricos comparado con el intestino, en los tratamientos FM100 (293.5 U g⁻¹) y FM75 (249 U g⁻¹), seguidos por FM50 y FM25, y por último el tratamiento con una menor actividad fue el FM0 con 141.5 U g⁻¹. Es clara la influencia de la inclusión de microalgas en la dieta sobre la actividad de las lipasas. Sin embargo, con los parámetros de respuesta evaluados en el presente estudio es difícil discernir una causa exacta. Li-Kun *et al.* (2005) reportaron que el glucolípido H-b2 y la ficocianina en la *A. platensis* presentan una actividad inhibitoria sobre las lipasas pancreáticas. *Arthrospira* es una de las cianobacterias con una concentración mayor de ficobiliproteínas, grupo de proteínas al que pertenecen la ficocianina (Cabranes *et al.*, 2000). Esto podría explicar la baja actividad enzimática observada, sin embargo, el mecanismo de inhibición no es claro. Los glicolípidos son otro tipo de compuestos presentes en la membrana celular de las microalgas como la *Arthrospira* sp. (Chamorro-Cevallos, 2014), y pueden afectar la actividad de las lipasas, especialmente la fracción del monogalactosildiacilglicerol (MGDG). Estos compuestos poseen una actividad inhibitoria de la actividad de la lipasa pancreática, la cual es dosis-dependiente, lo que sugiere que a mayor concentración de este compuesto la actividad de la lipasa será menor (Ferreira *et al.*, 2013; Hudson *et al.*, 1974; Sato y Murata, 1981; Nichols *et al.*, 1965).

Varios trabajos han demostrado que *Schizochytrium* sp., es un sustituto adecuado del aceite de pescado en la formulación de dietas para peces marinos (Eryalcin *et al.*, 2012; Ganuza *et al.*, 2008; Garcia-Ortega *et al.*, 2015; Kousoulaki *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2007; Pérez-Velázquez *et al.*, 2018, 2019; Quiao *et al.*, 2014). Una ventaja es que las mismas células de esta microalga funcionan como una bio-cápsula y protegen a los ácidos grasos, principalmente los poliinsaturados de agentes oxidantes (Ganuza *et al.*, 2008). Sin embargo, se deben tomar en cuenta algunas consideraciones al utilizar *Schizochytrium* sp., ya que tienen una baja concentración de EPA y ácidos grasos monoinsaturados, además de ser ricos en ácidos grasos saturados, por lo que se sugiere que, en futuros experimentos, se realice un balance de los ácidos grasos en particular los LC-PUFAs.

Los carbohidratos son otro compuesto importante en la formulación de estas dietas y aunque como ya se mencionó anteriormente, peces carnívoros como la totoaba, no tienen un requerimiento esencial por este nutriente y además carecen o tienen una baja capacidad de digerir estos compuestos (Tocher, 2003; Tocher y Glencross, 2015). Sin embargo, el contenido de ELN presente en las dietas en las cuales se sustituyó la HP y AP, aumento conforme se elevaron los niveles de inclusión de las microalgas (tabla 3). Aunque la capacidad de digerir CH en peces marinos es baja, en el presente estudio la actividad de la amilasa aumento, tanto en el intestino como en los ciegos pilóricos, conforme aumento el ELN en las dietas indicando una respuesta positiva y directa a este nutriente. En este sentido, el contenido de ELN en las

dietas con microalgas pudiera estar funcionando como un prebiótico, el cual ayudaría al crecimiento de la flora bacteriana de los peces (Cerezuela, 2012), dentro de la cual existen bacterias productoras de amilasas como lo son *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Brochothrix* sp. o *B. thermosphacta*, aisladas de peces carnívoros como el salmón y bacalao del Atlántico. (Askarian *et al.*, 2012).

En cuanto a la composición de ácidos grasos, estudios anteriores han demostrado que la composición de ácidos grasos que posee *Schizochytrium* sp., se ve directamente reflejada en el perfil de ácidos grasos de las dietas, y esta a su vez, influye de manera directa en la composición de ácidos grasos del tejido de los peces (Bell *et al.*, 2001). Esta misma tendencia fue observada en el presente trabajo, donde el perfil de ácidos grasos del músculo de los peces resultó con una composición de ácidos grasos directamente proporcional a de las dietas que consumían. Por ejemplo, se vio un incremento proporcional en los ácidos grasos saturados en el músculo de los peces alimentados con microalgas y que son una fuente potencial de energía para el organismo (Sargent *et al.*, 2002). Los ácidos grasos monoinsaturados claramente resultaron en valores bajos tanto en las dietas con microalgas, como en el la composición del músculo, especialmente el C16:1 (ácido palmitoleico) y C18:1 n-9 (ácido oleico). Estas deficiencias en monoinsaturados, junto con la baja digestibilidad de los lípidos observada, sugiere una influencia directa en el crecimiento de los peces, pues al no tener suficiente sustrato para la beta-oxidación provenientes de los lípidos, pudo haber utilizado la proteína como fuente energética, reduciendo la formación de nuevo tejido muscular (Schulz *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se observó una marcada acumulación de DHA en el músculo de los peces alimentados con las dietas ricas en microalgas. Debido a que este ácido graso tiene un requerimiento esencial y es acumulado preferencialmente en las membranas celulares de los peces para su buen funcionamiento (Sargent *et al.*, 1999). Por otro lado, la concentración del EPA en el musculo disminuyó en los tratamientos FM25 y FM0, coincidiendo con la baja concentración de este ácido graso en las dietas. Esta baja concentración de EPA y alto contenido de DHA, causó un aumento en relación DHA: EPA que por lo general es apropiada. Sin embargo, García-Ortega *et al.*, (2016) encontraron un menor crecimiento en los peces alimentados con dietas que contenían una alta relación DHA/EPA que iba de 6.5 a 18.6. Valores mucho mayores con respecto a la dieta control que tenía una relación de 1. Sin embargo, el bajo crecimiento en los tratamientos con altas relaciones fue atribuido a una deficiencia en aminoácidos más que a una relación DHA/EPA inadecuada. Esto podría haber ocurrido en el presente experimento, pues a pesar de que se cumplieron con los requisitos nutricionales de lisina y metionina de 19.3 g kg^{-1} y 15 g kg^{-1} , respectivamente, otros aminoácidos esenciales como la arginina, valina y leucina no alcanzaron la cantidad recomendada para la *T. macdonaldi* (Madrid *et al.*, 2019).

Otra relación importante entre ciertos LC-PUFAs a tomar en cuenta es la de EPA/AA. En el presente estudio, la concentración de ARA (24:6 n-6) en el músculo de los peces alimentados con la dieta control, no presentó diferencias con los tratamientos FM50, FM25 y FM0. Sin embargo, la concentración de ARA en el músculo en el tratamiento FM75 fue menor a la dieta control, pero sin diferencias con los demás tratamientos. Los valores similares de ARA y la disminución en EPA presentes en la dieta, modificaron la relación EPA: ARA en el músculo de los peces; donde se observaron valores más altos en los peces alimentados con las dietas FM100 (2 ± 0.5), FM75 (3 ± 0.7) y FM50 (3 ± 1) y esta relación disminuyó en los tratamientos FM25 y FM0. Es difícil llegar a una conclusión adecuada para recomendar una relación óptima, pues el valor óptimo es específico de cada especie, y, además, está relacionado directamente con la etapa de desarrollo del organismo (Sargent *et al.*, 1999). Sin embargo, podemos sugerir que las relaciones presentes en FM100 (2 ± 0.5), FM75 (3 ± 0.7) y FM50 (3 ± 1) se relacionaron con un mejor crecimiento.

Aunque los resultados obtenidos en el presente experimento con respecto al crecimiento no fueron los esperados, uno no debería descartar el uso de *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp. como fuentes potenciales para sustituir la HP y AP en la elaboración de dietas para *T. macdonaldi*. Es importante detectar y resaltar las desventajas que estos ingredientes poseen para proponer medidas que correctivas. Es difícil atribuir afectaciones por parte de un ingrediente en este tipo de experimentos factoriales, pero fue evidente la baja tasa de consumo de alimento en los tratamientos FM25 y FM0, probablemente originada por una baja palatabilidad a causa de la dureza, color o el sabor otorgados por las microalgas a las dietas. Hoy en día existen ciertas alternativas para minimizar el efecto de estos factores en la elaboración de dietas con ingredientes alternativos, tales como procesos de gelificación, extrusión o el uso de atractantes, que permiten reducir la mala palatabilidad y aumentar la atractabilidad de los alimentos balanceados (Becker, 2007; Jaime-Ceballos *et al.*, 2007).

Otros problemas que se identificaron, fue la baja digestibilidad de los lípidos, baja concentración de ácidos grasos monoinsaturados y un bajo contenido en EPA. En cuanto a la digestibilidad, logramos observar una baja en la actividad enzimática de las lipasas dependientes de sales biliares, pero no podemos asegurar el mecanismo por el cual fue inhibida su producción o actividad, sin embargo, estos inconvenientes pueden ser solucionados por procesos de emulsificación, enriquecimiento las dietas con ácidos grasos libres o ser complementados con ingredientes ricos en ácidos grasos monoinsaturados, como el aceite de oliva, aguacate o cacahuete (Becker, 2007; Socarrás y Bolet, 2010).

Aunque en este trabajo el uso de *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp. no fueron ingredientes adecuados para sustituir totalmente la HP y AP en juveniles de *T. macdonaldi*, se observó que la digestibilidad de la proteína, utilizando como fuente principal de sustitución de HP a *Arthrospira* sp., no presentó diferencias con la dieta control hasta el nivel de sustitución del 75%, además, de que promovió la actividad enzimática de la tripsina en el intestino, por lo que sugiere continuar haciendo más experimentos con esta microalga como sustituto de la HP. Por otra parte, los peces alimentados con las dietas experimentales con microalgas, acumularon DHA en el músculo, lo cual toma relevancia debido a la importancia de este ácido graso para el consumo humano, el cual es considerado muy importante nutriente para la salud humana (Turchini *et al.*, 2009 y Lenihan-Geels *et al.*, 2013).

Otro punto importante a tomar en cuenta, es la sustentabilidad de usar microalgas como sustituto de HP y AP para la formulación y elaboración de alimentos en la acuicultura, lo que hace surgir la pregunta ¿es económicamente viable la utilización de microalgas para el reemplazo de HP y AP?. Beal *et al.* (2018) publicaron un documento en el cual describen un método para reducir en un 30% de la captura mundial destinada a la producción de HP y AP, en dicho artículo toman en cuenta la viabilidad técnica, económica y ecológica para la producción de harina y aceite utilizando como fuente a las microalgas. En el estudio se adapta un modelo de producción utilizado en Hawái y que fue ponderado a Tailandia, los resultados indican que, con tan solo 11,100 hectáreas (el 1.5% de las hectáreas utilizadas para la producción de aceite de palma en ese país) bastarían para reemplazar la producción total actual de harina de pescado de Tailandia (cuarto mayor productor mundial) además indican que sería una actividad 10 veces más rentable, generando \$5.5 millones de dólares anuales, aunado a esto, se liberaría una gran presión a las poblaciones naturales de peces pelágicos destinados a la producción de HP y AP.

En conclusión, se logró un buen crecimiento en las dietas con 25% y 50% de sustitución de HP y AP utilizando *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp. Así mismo se observó una buena digestibilidad de las proteínas en las dietas que contenían hasta un 50% de sustitución de HP y AP. Adicionalmente, se observó una buena TCA similar a la dieta control en los tratamientos FM75 y FM50, y se logró una alta concentración de DHA en el tejido de los peces alimentados con las dietas experimentales que contenían microalgas algo muy deseable para el consumo humano. Por otro lado, en el presente estudio se logró identificar algunas desventajas del uso de *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp. como sustitutos de HP y AP en la elaboración de alimento para juveniles de *T. macdonaldi* y se proponen algunas soluciones. Problemas como un desequilibrio en la concentración de ácidos grasos y alteraciones físicas en las características de las dietas que pueden ser corregidas. Esto da la pauta para realizar investigaciones futuras evaluando los factores antes mencionados para obtener mejores resultados, ya que es necesario

lograr un desarrollo sustentable de la acuicultura por medio de la búsqueda de ingredientes alternativos que puedan disminuir o eliminar el uso de la HP y el AP.

Capítulo 9 Conclusiones

- El crecimiento de los peces alimentados con dietas con alto contenido de harinas de *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp., fue menor en comparación con la dieta control (sin harinas de microalgas). El crecimiento fue indirectamente proporcional a la cantidad de microalgas en la dieta, es decir, a mayor cantidad de microalgas, menor fue el peso ganado de los organismos.
- El principal factor al que atribuimos la falta de crecimiento es la baja ingesta del alimento en las dietas con mayor contenido de microalgas. Se sugiere que es consecuencia de las características físico-químicas de las dietas como la dureza, color o el sabor que reducen la palatabilidad de la dieta para la *T. macdonaldi*.
- La digestibilidad aparente de la proteína en general fue buena, no existiendo diferencias significativas en comparación con la dieta control en las dietas de hasta un 75 % de reemplazo de HP y AP. Caso contrario ocurrió con la digestibilidad aparente de los lípidos ya que las dietas que tenían una mayor cantidad de harinas de microalgas presentaron una menor digestibilidad aparente en este nutriente.
- La actividad de las proteasas obtenidas en los intestinos y ciegos pilóricos confirman la buena digestibilidad de la proteína en las dietas. Incluso se detectó un incremento en la actividad de la tripsina en el intestino en los peces alimentados con microalgas
- La directa relación del nivel de inclusión de *Schizochytrium* y la actividad de la lipasa confirma la baja digestibilidad de los lípidos en las dietas con esta microalga.
- Fue evidente la influencia de las dietas en la composición de ácidos grasos del músculo de los juveniles de *T. macdonaldi*. Se detectó un aumento en los niveles de ácidos grasos saturados, polinsaturados n-6 y n-3, en especial C22:6 -n3 en el músculo de los peces alimentados con dietas que contenían microalgas ricas en estos AG. Sin embargo, la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados fue baja, así como la acumulación del ácido graso C20:5 n-3.
- Debido al diseño experimental usado es difícil identificar si fue un solo ingrediente, los dos o una interacción entre ambos la causa principal de la reducción en la ganancia en peso de los juveniles de *T. macdonaldi*. Sin embargo, esto no quiere decir que estos ingredientes no sean una alternativa viable para la sustitución de la HP y AP, y es necesaria más investigación para poder determinar los niveles óptimos de reemplazo, así como para resolver los inconvenientes que presentan estas microalgas.

Capítulo 10 Recomendaciones

- Realizar un experimento con diseño factorial que permita evaluar el efecto individual y las interacciones de las harinas de *Arthrospira* sp. y *Schizochytrium* sp. sobre el rendimiento y digestibilidad aparente en juveniles de *T. macdonaldi*.
- Conocer la composición proximal, perfil de ácidos grasos y aminoácidos de cada ingrediente antes de realizar las dietas, esto con la finalidad de diseñar dietas que cumplan con los requerimientos óptimos de la especie de pez con la que desee trabajar.
- No descartar el uso de las dietas con 50% y 75% de harinas de microalgas como una posible opción para la elaboración de dietas para juveniles de *T. macdonaldi*, mejorar el balance de nutrientes y aspectos físicos de las dietas, podría mejorar los resultados obtenidos.
- Realizar pruebas de las características físicas de las dietas, como dureza, color y consistencia, lo cual permitiría evaluar la influencia de estos factores sobre su palatabilidad.
- Realizar evaluaciones de la composición proximal del hígado, así como el análisis de la estructura tisular mediante técnicas histológicas, con el propósito de evaluar la posible influencia de la baja digestibilidad de los lípidos y las reservas energéticas en dicho órgano.

Literatura citada

- Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M., Dawood, O.M. 2016. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish y Shellfish Immunology*. (56) 436-444.
- Aires, D., Capdevila, N., Segundo, M.J. 2005. Ácidos grasos esenciales. Su influencia en las diferentes etapas de la vida. *Ámbito farmacéutico, Divulgación Sanitaria*. 24 (4) 96-102.
- Association of Official Analytical Chemists. (1990). Official Methods of Analysis: Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement (15). Association of Official Analytical Chemists. Recuperado 2018 de: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>
- Askarian, F., Zhou, Z., Olsen, R.E., Sperstad, S., Ringø, E. 2012. Culturable autochthonous bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*. 326(329) 1–8.
- Askarian, F., Sperstad, S., Merrifield, D.L., Ray, A.K., Ringø, E. 2012. The effect of different feeding regimes on enzyme activity of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) gut microbiota. *Aquaculture Research*. 44(5) 841-846.
- Arijo, S.A. 2015. Una actividad muy alejada de la sostenibilidad: la acuicultura. *El ecologista*. (43). Recuperado 2018 de: <https://www.ecologistasenaccion.org/14724/la-acuicultura-2/>.
- Arvizu, J., Chavez, H. 1972. Sinopsis sobre la biología de la Totoaba, *Cynoscion macdonaldi* (ilbet, 1890). *FAO Fisheries*. 70(37). Recuperado 2018 de: <https://www.inapesca.gob.mx/portal/Publicaciones/Series/1970s-Sinopsis/S1-Arvizu-y-Chavez-1972-Sinopsis-sobre-la-biologia-de-la-Totoaba.pdf?download>.
- Banskota, H.A., Steevensz, J.A., Stefanova, R., Sperker, S. Melanson, R., Osborne, A.J., O'Leary, J.B., Melanson, E.J. 2016. Pancreatic lipase inhibitory activity of monogalactosyldiacylglycerols isolated from the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*. 28 (1) 169-175.
- Beal, M.C., Gerber, N.L., Thongrod, S., Phromkunthong, Kiron, V., Granados, J., Archibald, I. Greene, H.C., Huntley M.E. 2018. Marine microalgae comercial production improves sustainability of global fisheries and aquaculture. *Scientific Reports*. (8) 1-8.
- Becker, E.W. 2007. Micro-algaeas a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25(2) 207-210.
- Belay, A. 2013. Biology and industrial production of *Arthrospira* (Spirulina). En: Richmond, A. y Hu, Q. *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology*. USA. Wiley Blackwell. 339-368.
- Bell, G.J., McEvoy, J., Tocher, R.D., McGhee, F., Campbell, J.P., Sargent, R.J. 2001. Replacemet of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid composition and hepatocyte fatty acid metabolism. 131 (5) 1535-1543.

- Bhujel, R.C. 2002. Manejo alimentario para Tilapia. Panorama Acuícola. 7(4). Recuperado 2018 de: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/especies/_archivos//000008-Tilapia/071201_Manejo%20Alimentario%20para%20Tilapia%20-%20Nutricion%20y%20bajo%20costo.php.
- Bracco, U. 1994. Effect of triglyceride structure on fat absorption. Nestec Research Centre. (60) 1002s-1009s.
- Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. Removable and Sustainable Energy Reviews. (14) 557-577.
- Cabranes, C.Y., Lagomasino, R.J., Lagomasino, C. J.2000. Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la C-ficocianina-620 obtenida a partir de la *Spirulina platensis*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 31(3) 199-205.
- Cañavete, J.P. 2011. Funciones de las microalgas en acuicultura. En: Bourgoungnon, N., Bedoux, G. y Stiger, V. Las algas como recurso. Valorización. Aplicaciones industriales y tendencias. Centro Tecnológico del Mar. México. 193-205.
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, A., Ravelo, R., Zarate, R. 2008 Dichloromethane as solvent for lipid extraction, lipid classes and fatty assessment from samples of different nature. Journal Agriculture and Food Chemistry. (56) 4297-4303.
- Cerezuela C.R. Nuevos probióticos y prebióticos para dorada (*Sparus urata l.*). Recuperado 2019 en: <http://hdl.handle.net/10201/28784>
- Chamorro-Cevallos, G. 2014. Actividad farmacológica y toxicológica de *Spirulina*, un producto natural. Revista de la Facultad de Ciencias de Química Farmacéutica. 21(1) S32.
- Cho, C.Y., Kaushik, S.J. 1990. Nutrition energetics in fish: Energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). World Review of Nutrition and Dietetics. (61) 32-172.
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., Bonos, E. 2011. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. International Journal of Food Sciences and Nutrition (62) 794–799.
- Clarkson, N., Jones, K.O., Young A.J. 2000. Modelling of a Continuous algal production system using intelligent methods. En: Algae and their biotechnological potential. Springer-Science+Business Media, B.V. Hong Kong. 93-106.
- Cortés, E., Papastamatiou, Y.P., Carlson, J.K., Ferry-Graham, L., Wetherbee, B.M. 2008. An overview of the feeding ecology and physiology of elasmobranch fishes. En: Feeding and digestive function of fishes. Science Publishers. 393-444.
- Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, Nieto-López, M. M. Tapía-Salazar. 2000. Revisión sobre calidad de harinas y aceites de pescado para la nutrición del camarón. 298-326 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

- De la Mora López, M.L., Lozoya, S.C. 2014. Manual de prácticas de bromatología. Primera edición, Mc Graw Hill. México DF. Recuperado 2018 de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*. 25(10) 472-478.
- Deguara, S., Jaucey, K., Agius, C. 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology*. (62) 1033-1043.
- Dersjant-Li, Y. 2002. The use of soy proein in aquafeeds. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Desvilettes, C., Bec, A. 2009. Formation and transfer of fatty acids in aquatic microbial food webs: role of heterotrophic protists. Springer. En: Arts, M.T., Brett, M.T. y Kainz M.J. *Lipids in Aquatic ecosystem*. New York. 25-65.
- Diario oficial de la Unión Europea. Reglamento de ejecución (UE) 2017/2470 por el que se establece por el que se establece la lista de la Unión de nuevos alimentos, de conformidad con el Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a los nuevos alimentos.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, E. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95(2) 271-278
- Ernst, R., Ejsing, C.S., Antony, B. 2016. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids. *Journal of Molecular Biology*. 428 (24) 4776-4791.
- Eryalcin, M.K., Roo, J., Saleh, R., Atalah, E., Benítez, T. Betancor, M., Hernandez-Cruz, M., Izquierdo M. 2012. Fish oil replacement by different microalgal products in microdiets for early weaning of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*. 44 (5) 819-828.
- FAO. 1993. Antimetabolitos y toxinas en alimentos. En: *Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos*. Recuperado 2018 de: <http://www.fao.org/3/AB489S/AB489S00.htm>
- FAO. 2008. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: consulta de expertos. Ginebra. Recuperado 2018 de: <http://www.fao.org/3/i1953s/i1953s.pdf>
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y acuicultura. Recuperado 2018 de: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Recuperado 2018 de: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Recuperado 2018 de: <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
- Ferreira, P.S., Souza-Soares, L., Vieira, C. J. 2013. Revisão: microalgas: ua fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. *Revista de Ciências Agrarias*. 36(3).275-287.

- Fischer, E., Navarro, L. 2017. Part I: Feed alternatives: the trouble with fishmeal. Intrafish. Recuperado 2018 de: <https://www.intrafish.com/aquaculture/1210793/part-i-feed-alternatives-the-trouble-with-fishmeal>
- Folch, J., Lees, M., Sloane, G.H. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* (226) 497.
- Fonnegra, R.G., Jiménez, S.R. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. (31).
- Fuentes-Quesada, J.P., Viana, M.T., Rombenso A.N., Guerrero-Renteria, Y., Normura-Solís, M.N. Gomez-Calle, V., Lazo, J.P., Mata-Sotres, M. 2018. Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture*. 495(1) 78-89.
- García-Ortega, A., Kissinger K.R., Trushenski, J.T. 2016. Evaluation of fish meal and fish oil replacement by soybean protein and algal meal from *Schizochytrium limacinum* in diets for giant grouper *Epinephelus lanceolatus*. *Aquaculture*. (452) 1-8.
- Garnuza, E., Benítez-Santana, E.A., Vega-Orellana, O., Ganga, R., Izquierdo, M.S. 2008. *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture*. 277 (1-2) 109-116.
- Gatlin III M. D. 2000. Nutrición de reproductores y juveniles de peces marinos. pp 73-82 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez- Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Gjellesvik, D.R., Lobardo, D., Walther, B.T. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. (1124) 123-134.
- González, S.R., Romero, C.O., Valdivié, N.M., Ponce-Palafox, J.T. 2013. *Revista Bio Ciencias*. 2(4) 240-251.
- Guía para el Desarrollo sostenible de la acuicultura mediterránea. Interacciones entre la acuicultura y el medio ambiente. UICN, Gland, Suiza y Málaga, España. (6) 47.
- Haas, S., Bauer, J.L., Adakli, A., Meyer, S., Lippemeir, S., Schawarz, K., Sculz, C. 2016. Marine microalgae *Pacloca viridis* and *Nannochloropsis* sp. As n-3 PUFA source in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labraz* L.). *Journal of Applied Phycology*. 28 (2) 1011-1021.
- Hasan, M.M., Ahmed, S., Anis, M. 2017. Algae as nutrition, medicine and cosmetic: the forgotten history, present status and future trends. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(6) 1934-1959.
- Henrikson, R. 1994. Microalga *Spirulina*, superalimento del futuro. Urano. Barcelona, España. 48-57
- Hoyos, J.L., Villada, H.S., Fernández, A., Ortega-Toro, R. 2017. Parámetros de calidad y metodologías para determinar las propiedades físicas de alimentos extruidos para peces. *Información Tecnológica*. 28(5) 101-114.
- Hudson, J.F., Karis, G.I. 1974. The lipids of the alga *Spirulina*. *Journal Science Food Agriculture* (25) 759-763.

- IAES. 2015. Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora. Recuperado en 2018 de: <https://www.iaes.gob.mx/index.php?pag=vi-result-prel-liberacion>
- IAFFD. International Aquaculture Feed Formulation Database. Recuperado 2018 de: <http://www.iaffd.com/>
- Jaime-Ceballos, B., Civera, R.C., Villarreal, H., Galindo, J.L., Pérez-Jar, L. 2007. Use of *Spirulina platensis* meal as feed attractant in diets for shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Hidrobiológica*. 17(2) 113-117.
- Juarez, L.M., Konietzko, P.A., Schwarz M.H. 2016. Totoaba aquaculture and conservation: hope for an endangered fish form Mexico's Sea of Cortez. *World Aquaculture*. 47(4), 30-38
- Kissinger, K.R., García-Ortega, A., Trushenski, J.T. 2016. Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture*. (452) 37-44.
- Kousoulaki, K., Tone-Kari, K.O., Krasnov, A., Seilo, J.T., Morkore, T., Sweetman, J. 2015. Metabolism health and filet nutritional quality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing n-3-rich microalgae. *Journal of Nutritional Science*. 4(24) 1-13.
- Kurtovic, I., Marshall, S., Zhao, X., Simpson, B.K. 2009. Lipases from mammals and fishes. *Reviews in Fisheries Science*. 17(1) 18-40.
- Lazo, J.P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Mexico. 300-312.
- Lehninger, A.L. 1985. *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular*. Omega, S.A. Barcelona. 97-120.
- Lenihan-Geels, G., Bishop, K.S., Ferguson, L.R. 2013. Alternative source of omega-3 fats: Can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients*. 5(4) 1301-1315.
- Leyland, B., Leu, S., Boussiba, S. 2017. Are Thraustochytrids algae? *Fungal Biology*. 121 (10) 835-840.
- Li, M., Wu, W., Zhou, P., Xie, F., Zhou, Q., Mai, K. 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*. (434) 227-232.
- Li-Kun, H., Dong-Xia, L., Xiang, I., Xiao-Jie, G., Kondo, Y. Suzuki, I., Okuda, H. 2005. Isolation of pancreatic lipase activity-inhibitory component of *Spirulina platensis* and it reduce postprandial triacylglycerolemia. *Yakugaku Zasshi*. 126(1) 43-49.
- Liu, J., Caballero, M.J., Izquierdo, M., El-Sayed Ali, T., Hernandez-Cruz, Valencia, A., Fernández-Palacios, H. 202. Necessity of dietary lecithin and eicosapentanoic acid for growth, survival, stress resistance and lipoprotein formation in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fisheries Science*. (68) 1165-1172.
- Lovern, J.A. 1936. *Fat metabolism in fishes*. Torry Research Station, Aberdeen, of the Department of Scientific and Industrial Research. 2024-2026.

- Lunger, A.N., Craig, S.R., McLean, E. 2006. Replacement of fish meal in cobia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein. *Aquaculture*. (257) 393-399.
- Luying, Z., Zhang, X., Ji, L., Song, X., Kuang, C. 2007. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochemistry*. 42(2) 210-214.
- Madrid, J., Pohlenz, C., Viana, M.T., Lazo, J.P. 2018. Dietary lysine requirement for juvenile, *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*. 500(1) 92-98.
- Mata Sostres, J.A. 2010. Evaluación del éxito en el destete en larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldo*) y jurel cola amarilla (*Seriola lalandi dorsalis*) utilizando el crecimiento, supervivencia y/o tasas de ingestión. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 29-31.
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Armour Industrial Chemical*. 33(3) 363.
- Miller, R.M., Nichols, D.P., Carter, G.C. 2007. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. oil in Atlantic salmon par (*Salmo salar*) diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 148(2) 382-392.
- Minjarez-Osorio, M.C., González, M.L., Perez-Velazquez, M.P. 2014. Totoaba: Endangered fish species has aquaculture potential in México. *Global aquaculture advocate*. 44-46.
- Montaño-Vargas, J., Shimada, A., Vásquez, C., Viana, M.T. 2002. Methods of measuring feed digestibility in the Green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture*. 213 (1-4) 339-346.
- Montero, D., Izquiero, D. 2010. Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish oil. In *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*. CRC Press Taylor y Francis Group. Boca Raton. 439-487.
- Müller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*. (12) 527-534.
- Nichols, B.W, Harris, R.V., James, A.T. 1965. The lipid metabolism of blue-green algae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 20 (3) 256-262.
- NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Recuperado 2018 de: <https://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/NOM-059-ECOL-2001.pdf>
- NRC. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp Board on Agriculture and Natural Resources Division on Earth and Life Studies. National Research Council. Washington, D.C.
- Olsen, R.C., Ringo, E. 1997. Lipid digestibility in fish: a review. *Recent Research Developments in Lipid Research*. (1) 199-264.
- Olvera-Novoa, M.A., Domínguez-Cen, L.J., Olvera-Castillo, L. 1998. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* a fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research*. (29) 709-715.

- Palmegiano, G.B., Agradi, E., Forneris, G., Gai, F., Gasco, L., Rigamonti, E., Sicuro, B., Zoccarato, I. 2005. Spirulina as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture Research*. 36(2) 188-195.
- Park, J.H., Upadhaya, S.D., Kim, I.H. 2015. Effect of Dietary Marine Microalgae (*Schizochytrium*) Powder on Egg Production, Blood Lipid Profiles, Egg Quality, and Fatty Acid Composition of Egg Yolk in Layers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 28(3) 391-397.
- Patterson, D., Gatlin, D.M. 2013. Evaluation of whole and lipid-extracted algae meals in the diets of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. (416-417) 92-98.
- Pedrin-Osuna, O.; Córdova-Murueta, J.H., Delgado-Marchena M. 2001. Crecimiento y mortalidad de la totoaba, *Totoaba macdonaldi*, del alto golfo de California. INP. SAGARPA. México. Ciencia Pesquera No. 15.
- Perez-Velazquez, M., Gatlin III, D., González-Félix, L.M., García-Ortega, A., Cruz, C.R., Juárez-Gómez, M.L., Chen, K. Effects of fishmeal and fish oil replacements by algal meals on biological performance and fatty acid profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂). *Aquaculture*. (507) 83-90.
- Perez-Velazquez, M., Gatlin III, D.M., González-Felix, M.L., García-Ortega, A. 2018. Partial replacement of fishmeal and fish oil by algal meals in diets of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*. (487) 41-50.
- Piñeros, A.J., Gutiérrez-Espinosa, M.C., Castro-Guerrero, S.R. 2014. Sustitución total de la harina de pescado por subproductos avícolas suplementados con aminoácidos en dietas para juveniles de *Piractus brachypomus*, Cuvier 1818. *Orinoquia*. 18(2) 13-14.
- Qiao, H., Wang, H., Song, Z., Ma, J., Li, B., Liu, X., Zhang, S., Wang, J., Zhang, L. 2014. Effects of dietary fish oil replacement by microalgae raw material on growth performance, body composition and fatty acid profile of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*. 20 (6) 646-653.
- Radhakrishnan, S., Belal, H. I., Seenivasan, C., Muralisankar, T., Saravana, B.P. 2016. Impact of fishmeal replacement with *Arthrospira platensis* on growth performance, body composition and digestive enzyme activities of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Reports*. (3) 35-44.
- Rahimullah M. 1944. A comparative study of the morphology, histology and probable functions of the pyloric caeca in Indian fishes, together with a discussion on their homology. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*. 21(1) 1-37.
- Ramirez-Moreno, L., Olvera-Ramírez, R. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*. 31(9) 656- 663.
- Ray, A.K., Ringo, E. 2014. The gastrointestinal tract on fish. En: Merrifield y Ringo, E. *Aquaculture Nutrition*. Gut health, probiotics and prebiotics. USA. Wiley Blackwell. 1-10.
- Rendón-Castrillón, L., Ramírez, C.M., Vélez-Salazar, Y. 2013. Microalgas para la industria alimenticia. Universidad Pontificia Bolivariana. Colombia.

- Roberts, A. J., O'Brien, E., Subak-Sharpe, G. 2003. Nutracéuticos: suplementos nutricionales, vitaminas, minerales, oligoelementos y alimentos curativos. Robin Book. Barcelona. 260.
- Roberts, R.J., Rodger, H.D.2012. The anatomy and physiology of Teleost. En: Roberts, R.J. Fish pathology. USA. Wiley-Blackwell. 17-61
- Román, R.M.J. 1994. Edad y crecimiento de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert en el Alto Golfo de California. M.S. tesis, Centro de Investigaciones Científica y Educación Superior de Ensenada.
- Rosales, F. J., Ramírez, E. G. Estado actual del conocimiento sobre la Totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), Gilbert 1890. Secretaria de Pesca. México. 9-19.
- Rueda-López, S., Lazo, J.P., Correa G.R., Viana M.T. 2011. Efect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. Aquaculture 319 (3-4). 385-390.
- Sánchez, N., Bu, M., León, N., Pérez-Saad, H. 2002. Fundamentos de una posible acción beneficiosa de la *Spirulina platensis* en las neuropatías periféricas. Revista Cubana Plant Medicine. 7(3) 144-145.
- Sánchez, R.M., Galvis, G., Victoriano, P. F. 2003. Relación entre características del tracto digestivo y los hábitos alimentarios de pees del Rio Yucao, sistema del Rio Meta (Colombia). Gayana 67(1) 75-86.
- Sanz, F. (2009). La nutrición y alimentación en piscicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid. 18-37.
- Sargent, J.R., Tocher, D.G., Bell, J.G. 2002. The lipids. en: Halver, J.E. y Hardy, R.W. Fish Nutrition. Academic Press. USA. 182-246.
- Sarker, P.K., Gamble, M.M., Kelson, S., Kapuscinski, A.R. 2015. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. Aquaculture Nutrition. 22(1) 109-119.
- Sato, N., Murata, N. 1981. Studies on the temperature shift-induced Desaturation of Fatty Acids in monogalactosyl diacylglycerol in the blue-green alga (Cyanobacterium), *Anabaena variabilis*. Plant and Cell Physiology. 22(6) 1043-1050.
- Schulzs, C., Huber, M., Rennert, B. 2008. Effects of varying dietary protein to lipid ratios on growth performance and body composition of juvenile pike perch (*Sander lucioperca*). Aquaculture Nutrition. 14 (2) 166-173.
- Schuster, R. 1988. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. Journal Of Chromatography. 431(2) 271-284.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.2017. Recuperado 2018 de: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/si-protégemos-a-la-totoaba-salvamos-a-la-vaquita-marina>.
- Sen, S.R y Pal, R. 2015. Microalgae in aquaculture: a review with special references to nutritional value and fish dietetics. Proceedings of the Zoological Society. 68(1) 1-8.

- Socarrás, S.M., Bolet, A.M. 2010. Alimentación saludable y nutrición en las enfermedades cardiovasculares. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 29(3). 353-363.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101 (2) 87-96.
- Sprague, M., Walton, J., Campbell, P.J., Strachan, F., Dick, J.R. y Bell, J.G. 2015. Replacement of fish oil with a DHA-rich algal meal derived from *Schizochytrium* sp. on the fatty acid and persistent organic pollutant levels in diets and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) post-smolts. *Food Chemistry*. (185) 413-421.
- Tacon, A.J., Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*. 285 (1-4) 146-158.
- The IUCN red list of threatened species. Recuperado 2018 de <http://www.iucnredlist.org/details/22003/0>
- Tibaldi, E., Chini, G.Z., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici M.R., Poli, B.M. 2015. Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*. (440) 60-68.
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*. 11(2) 107-184.
- Tocher, G.R., Glencross, B.D. 2015. Lipids and fatty acids. In: Lee, C., Lim C., Gatlin III, D. y Webster, C. *Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*, First Edition. John Wiley & Sons. 47-94.
- Torstensen, B. E., D. R. Tocher. 2010. The effects of fish oil replacement on lipid metabolism of fish. En: *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*. CRC Press Taylor y Francis Group. Boca Raton. 405–437.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Wing-Keong, N. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Review in Aquaculture*. 1(1) 10-57. Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Wing-Keong, N. 2009. *Reviews in Aquaculture*. (1) 10-57.
- Vizcaino, A.J., López, G., Sáez, M.I., Jiménez J.A., Barrios, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez J., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C., Alarcón F.J. 2014. Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*. (431) 34-43.
- Welling, D. 2017. Part II: Feed alternatives- How low should go with marine ingredients? *Intrafish*. Recuperado en 2018 de: <https://www.intrafish.com/aquaculture/1213127/part-ii-feed-alternatives-how-low-should-we-go-with-marine-ingredients>