

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



---

**Maestría en Ciencias en Acuicultura**

---

**Efecto del pH en el alimento formulado sobre el desempeño  
biológico, actividad enzimática y digestibilidad *in vitro* de  
juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens***

Tesis

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

Presenta:

**Jazmine Gutierrez Castañeda**

Ensenada, Baja California, México  
2020

Tesis defendida por  
**Jazmine Gutierrez Castañeda**  
y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz**  
CoDirectora de tesis

---

**Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**  
CoDirector de tesis

Miembros del comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera



---

**Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz**  
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Jazmine Gutierrez Castañeda © 2020*

*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 **Jazmine Gutierrez Castañeda** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Efecto del pH en el alimento formulado sobre el desempeño biológico, actividad enzimática y digestibilidad *in vitro* de juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens***

Resumen aprobado por:

---

**Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz**  
**CoDirectora de tesis**

---

**Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**  
**CoDirector de tesis**

El abulón azul *Haliotis fulgens* es una especie endémica de la Península de Baja California de importancia pesquera y con potencial acuícola; sin embargo, como ocurre en muchas especies herbívoras, un factor limitante para su cultivo es la disponibilidad y calidad del alga fresca durante todo el año utilizada para su alimentación. Existen estudios relacionados con la formulación de dietas que evidencian un mayor crecimiento; siendo un factor clave su estabilidad en el agua. Al respecto, existe evidencia de que la formulación y elaboración de dietas con pH ácido favorece su estabilidad, permitiendo un mayor aprovechamiento y una disminución en los costos de producción. Sin embargo, aún se desconoce el efecto del pH de la dieta en el desempeño biológico, actividad enzimática, digestibilidad *in vitro* y efecto en la microbiota del tracto digestivo en abulón. Por ello, este estudio evaluó el efecto de alimentar juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens* (peso inicial;  $2.17 \pm 0.04$  g; longitud inicial;  $2.61 \pm 0.08$  cm) con una dieta formulada ABKELP® isoproteica (15.52%) e isolipídica (1.51%) con tres niveles de pH (5, 7, 8) y un control con *Macrocystis pyrifera* durante 5.5 meses. Al finalizar el bioensayo, el crecimiento y la supervivencia resultó similar entre tratamientos. La estabilidad de la dieta tendió a aumentar con la disminución del pH y fue significativamente mayor en la dieta con pH 5 respecto a la dieta pH 8. La composición proximal del músculo del abulón mostró diferencias significativas en la composición lipídica, donde los organismos alimentados con la dieta control resultaron con menor porcentaje de lípidos en músculo ( $0.12 \pm 0.01$  %). En cuanto a la composición en músculo de proteína, carbohidratos, humedad y ceniza no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Asimismo, la actividad de las enzimas digestivas (proteasas alcalinas, tripsina, leucina aminopeptidasa y quimiotripsina) resultó significativamente menor en los organismos alimentados con la dieta control respecto al resto de los tratamientos. Además, el mayor porcentaje de digestibilidad *in vitro* se observó con los extractos enzimáticos de los organismos alimentados con la dieta formulada a un pH 5 y el control (grado de hidrólisis = 8 %). El conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT) del tracto digestivo del abulón fue similar entre tratamientos; y el conteo de bacterias tipo *Vibrio* (BTV) resultó significativamente mayor en tracto digestivo de los juveniles de abulón alimentados con la dieta con pH 7. La caracterización morfológica de las BHT aisladas mostró que todas eran Gram negativas y, en su mayoría, presentaron forma de cocobacilos. En conclusión, la dieta formulada ABKELP® con pH 5 presentó mayor estabilidad en el agua (81.12 %), y los juveniles alimentados con ella obtuvieron un crecimiento ligeramente mayor y una mejor digestibilidad *in vitro*, lo que a largo plazo puede resultar en un menor tiempo de cultivo debido a una mayor eficiencia en el uso de esta dieta.

**Palabras clave:** Abulón azul, *Haliotis fulgens*, alimento formulado, pH en dietas, estabilidad en el agua.

Abstract of the thesis presented by **Jazmine Gutierrez Castañeda** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Effect of pH in the formulated food on the biological performance, enzymatic activity and *in vitro* digestibility of juvenile blue abalone *Haliotis fulgens***

Abstract approved by:

---

**Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz**  
Thesis CoDirector

---

**Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**  
Thesis CoDirector

The green abalone *Haliotis fulgens* is an endemic species from the Baja California Peninsula with economic importance in the fishing industry and high potential for aquaculture. However, as with many herbivorous species a limiting factor for its successful farming is the availability and the quality of the fresh kelp throughout the year used for feeding. There are recent studies related to the development of formulated diets that result in better growth but have problems associated with their stability in water. There is evidence that the formulation and elaboration of diets with an acid pH, helps with water stability, increased feeding and a reduction in production costs. Although acid pH increases diet stability it is unknown to date what effects the lower pH of the diet has in terms of the biological performance, enzymatic activity, *in vitro* digestibility and the effect on gut microbiota in the abalone. Thus the present study was designed to assess the effect of dietary pH on the biological performance of the green abalone (initial weight:  $2.17 \pm 0.04$  g; initial length:  $2.61 \pm 0.08$  cm). Three isoproteic (15.52%) and isolipidic (1.51%) based on a commercial diet, ABKELP®, with three pH levels (5,7 and 8) were formulated. A fourth treatment using fresh algae *Macrocystis pyrifera* was used as a control. Abalone were fed the diets in triplicate for a period of 5.5 months. At the end of the bioessay, growth and survival were not significantly different among dietary treatments. Diet water stability tended to increase with decreasing pH, and was significantly higher for the pH 5 diet compared to the pH 8 diet. The proximal composition of the abalone muscle resulted in significant differences in terms of the lipid composition, where the organisms fed with the control diet had lower lipid content ( $0.12 \pm 0.01$  %). Muscle protein, carbohydrates, moisture and ash were not significant differences among treatments. Additionally, the activity of the digestive enzymes (alkaline protease, trypsin, leucine aminopeptidase and chymotrypsin) were significantly lower in the abalone fed with the control diet compared to the rest of the treatments. Interestingly, the highest percentage of *in vitro* protein digestibility was observed using digestive enzymes extracts from abalone fed with the pH 5 diet or the control diet (i.e., degree of hydrolysis: 8%). Total heterotrophic bacteria (THB) counts of the digestive tract of the abalone were not significantly different among treatments. *Vibrio* counts resulted in significantly higher numbers in the digestive tract of the juvenile abalones fed with the pH 7 diet. The morphotypic characterization of the isolated (THB) showed that all of them were Gram negative bacteria and, in the majority of the cases, showed a coccobacillus form. In conclusion, the formulated diet ABKELP® with pH of 5 resulted in higher stability in water (81.12 %) and the juvenile abalones fed with it had a slightly higher growth and a better digestibility *in vitro*, which in the long term can result in less time of farming due to a higher efficiency with the use of this diet.

**Keywords:** Green abalone, *Haliotis fulgens*, formulated diets, pH of the diet, water stability

## Dedicatoria

---

Esta tesis está dedicada a todas y cada una de las personas que estuvieron acompañándome durante este proceso de tanto aprendizaje y crecimiento.

A mis maestros, quien a lo largo de toda mi formación académica han contribuido y fomentado mi inquietud por seguir adquiriendo conocimientos día con día.

A mis padres de quien siempre he tenido un apoyo incondicional en todas y cada una de las etapas de mi vida.

A mi hermana Alexia y mi hermano Ricardo, por estar presentes en mi vida y saber que cuento con ustedes.

A los tres serranitos (Nacho, Wens y Diego) por ser mis compañeros incondicionales, mi familia.

A mi fiel compañera y mejor amiga, Goncha. Quien comenzó conmigo este proyecto y partió poco antes de concluirlo.

## Agradecimientos

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en especial al departamento de Acuicultura y el personal que labora. Los cuales, me brindaron la oportunidad y creyeron en mi capacidad de realizar un posgrado.

A mis directores de tesis la Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz por brindarme un espacio en su equipo de trabajo, por creer en mi para este proyecto y brindarme todas las facilidades para realizarlo. Gracias por estar al pendiente y no soltarme en los momentos de dificultad. Al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera gracias por el apoyo, el entusiasmo, el compartir sus ideas para resolver incógnitas y por brindarme un espacio en su laboratorio y todas las facilidades para trabajar en él.

A mis sinodales, la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez y el Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera gracias por sus aportaciones, su disposición y asesoría para la realización de este trabajo.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y el Dr. Benjamín Barón Sevilla, gracias por su accesibilidad para el uso de material y equipo de laboratorio. Gracias por sus comentarios, observaciones y las pláticas entre pasillos. Fue un placer tenerlos como maestros durante mi posgrado.

A todo el personal técnico del departamento quienes siempre estuvieron en la disposición de ayudarme, explicarme y enseñarme.

Al M. en C. Abelardo Campos técnico del laboratorio de nutrición acuícola en el departamento de Acuicultura. Primeramente, gracias por tu amistad y paciencia para capacitarme en todas y cada una de las metodologías utilizadas en mi proyecto. Mil gracias por apoyarme y ayudarme a buscar soluciones a las dificultades que se nos presentaron durante toda la tesis, pero en especial durante la digestibilidad *in vitro*. Eres un gran amigo y gran persona, gracias por todo.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del laboratorio de biología y patología del departamento por ayudarme en el cultivo de bacterias. Al Dr. Samuel Sánchez Serrano quien me apoyo en el procesamiento histológico de organismos y me brindo asesoría sobre el cultivo de bacterias.

A los técnicos del departamento Jesús Mariscal Medina y Francisco Mar Morineau Escalante. Gracias por ayudarme en la instalación de mi sistema, asesoría, mantenimiento de los organismos y la amistad que me brindaron durante mi estancia en el departamento. A la M. en C. Carmen Vargas gracias por facilitarme material de trabajo y por ser tan cordial.

Gracias a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por facilitarnos el acceso a sus instalaciones. En especial al laboratorio de nutrición acuícola en la Facultad de Ciencias Marinas y a todo el personal que

labora. Al Doctor Barreto, Samantha y en especial al Dr. Mario Galaviz. Mil gracias por abrirnos las puertas de su laboratorio y por todas las facilidades que nos brindaron.

Gracias a la Cooperativa Progreso de Producción Pesquera S.C. de R.L. quien nos proporcionó a los juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens* para realizar el experimento, gracias por confiarme el cuidado de sus organismos. También quiero agradecer a la empresa productora de alimentos Algas Marinas S.A. de C.V. quien nos elaboró y proporciono las dietas utilizadas. Gracias a todo su personal quien me abrió las puertas para trabajar con ellos durante la evaluación de la composición proximal del alimento.

A mis compañeros y amigos del posgrado Adriana, Sandra, Itzel, Jeaneth y Enrique gracias por todos los momentos, platicas y recuerdos que compartimos juntos. Les deseo mucho éxito en sus proyectos de vida. Por último, quiero agradecer a todo el personal administrativo que labora en CICESE, en especial a Dalila, gracias por el apoyo y tu accesibilidad ante cualquier trámite. Gracias a los guardias de seguridad y personal de limpieza que siempre tienen la mejor actitud. En especial a Don Mario Rene Reynoso, quien cuida a nuestros sistemas en la noche y está al pendiente de que todo funcione correctamente.

## Tabla de contenido

---

Resumen español.....	ii
Resumen inglés .....	ii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos .....	v
<b>Tabla de contenido .....</b>	<b>vii</b>
Lista de figuras .....	x
Lista de tablas .....	xiii
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Biología del abulón .....	1
1.2 Cultivo de abulón en la región .....	2
1.3 Alimento formulado.....	3
1.4 Requerimientos nutricionales.....	5
1.4.1 Proteínas .....	5
1.4.2 Carbohidratos .....	7
1.4.3 Lípidos .....	7
1.4.4 Vitaminas y minerales.....	8
1.5 Tracto digestivo y digestión en el abulón .....	8
1.6 Enzimas digestivas .....	10
1.7 Bacterias asociadas al tracto digestivo .....	11
1.8 Digestibilidad y métodos de medición.....	12
<b>Capítulo 2. Justificación, hipótesis y objetivos.....</b>	<b>14</b>
2.1 Justificación.....	14
2.2 Hipótesis .....	15
2.3 Objetivos .....	15
2.3.1 Objetivo general.....	15
2.3.2 Objetivos específicos .....	15
<b>Capítulo 3. Materiales y métodos.....</b>	<b>16</b>
3.1 Obtención de los juveniles de abulón azul <i>Haliotis fulgens</i> .....	16
3.2 Obtención del alimento .....	16
3.3 Estabilidad del alimento.....	17

3.4	Diseño experimental .....	17
3.5	Variables fisicoquímicas .....	18
3.6	Rutina de alimentación .....	19
3.7	Muestreo.....	19
3.8	Índices de desempeño biológico.....	20
3.8.1	Supervivencia .....	20
3.8.2	Crecimiento (mm) y peso ganado (g).....	20
3.8.3	Tasa de crecimiento en longitud ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) y peso ( $\text{mg día}^{-1}$ ) .....	20
3.8.4	Porcentaje de peso ganado (%) .....	21
3.8.5	Tasa de crecimiento específica ( $\% \text{ día}^{-1}$ ) .....	21
3.9	Análisis proximal .....	21
3.9.1	Toma de muestras .....	21
3.9.2	Análisis proximales.....	22
3.10	Actividad enzimática .....	24
3.10.1	Toma de muestras .....	24
3.10.2	Análisis enzimático.....	24
3.10.3	Tripsina.....	25
3.10.4	Leucina aminopeptidasa .....	25
3.10.5	Proteinasa alcalina total.....	25
3.10.6	Quimiotripsina .....	26
3.10.7	Lipasa .....	26
3.10.8	Amilasa.....	26
3.10.9	Proteínas solubles .....	27
3.11	Digestibilidad <i>in vitro</i> .....	27
3.11.1	Toma de muestra .....	27
3.11.2	Grado de hidrólisis de la proteína cruda.....	27
3.12	Cultivo de bacterias .....	28
3.12.1	Toma de muestras .....	28
3.12.2	Análisis Bacteriológico .....	29
3.13	Análisis estadístico .....	30
<b>Capítulo 4. Resultados</b>	.....	<b>31</b>
4.1	Parámetros evaluados .....	31
4.2	Índices de desempeño biológico.....	32

4.3 Análisis proximal .....	33
4.3.1 Composición proximal de las dietas.....	33
4.3.2. Composición proximal del alga .....	33
4.3.3. Composición proximal del músculo del abulón .....	34
4.4 Actividad enzimática .....	35
4.4.1 Proteasas alcalinas totales .....	35
4.4.2 Tripsina.....	35
4.4.3 Leucina aminopeptidasa .....	37
4.4.4 Quimiotripsina .....	37
4.4.5 Amilasa.....	38
4.4.6 Lipasa .....	39
4.5 Cultivo bacteriológico .....	39
4.5.1 Conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT).....	39
4.5.2 Conteo de bacterias tipo Vibrio (BTV) .....	40
4.5.3 Caracterización morfológica de bacterias .....	40
4.6 Digestibilidad <i>in vitro</i> .....	43
4.6.1 Digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas .....	43
<b>Capítulo 5. Discusión .....</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 6. Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>Capítulo 7. Recomendaciones.....</b>	<b>58</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>59</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>65</b>

## Lista de figuras

---

- Figura 1.** Anatomía general de un haliótido (tomado y modificado de Darling, D., 2016)..... **9**
- Figura 2.** Diagrama esquemático del tracto digestivo del abulón *Haliotis rufescens* enfocado desde la superficie dorsal (tomado y modificado de MC Lean, 1970)..... **10**
- Figura 3.** Sistema de recirculación utilizado en este experimento para el cultivo de juveniles de abulón azul *H. fulgens* (tomado y modificado de García-Concha, 2016)..... **18**
- Figura 4.** Diluciones empleadas y siembra en el medio de cultivo..... **29**
- Figura 5.** Actividad enzimática de proteasas alcalinas totales ( $U\ g^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar..... **36**
- Figura 6.** Actividad enzimática de tripsina ( $U\ g^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5, 7 y 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar ..... **36**
- Figura 7.** Actividad enzimática de Leucina aminopeptidasa ( $U\ g^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar..... **37**
- Figura 8.** Actividad enzimática de quimiotripsina ( $U\ g^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar..... **38**

- Figura 9.** Actividad enzimática de amilasa ( $U\ g^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar..... 38
- Figura 10.** Actividad enzimática de lipasa ( $U\ g^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar..... 39
- Figura 11.** Conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT) y bacterias tipo *Vibrio* (BTV) en el tracto digestivo del abulón azul *H. fulgens* alimentados con tres dietas formuladas con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* durante 5.5 meses. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar..... 40
- Figura 12.** Bacterias heterótrofas aisladas del medio de cultivo TSA inoculadas del tracto digestivo de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distintos niveles de pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera*. A) bacterias tipo cocobacilos B) bacterias tipo filamentosa..... 42
- Figura 13.** Digestibilidad proteica *in vitro*, expresada como grado de hidrólisis (GH%) de los tratamientos probados utilizando los extractos enzimáticos de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con tres dietas formuladas con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* durante 5.5 meses. El tiempo de reacción fue de 60 minutos. Las barras indican la media y su desviación estándar ( $n=2$ ). \* representa los tratamientos con  $n=1$ ..... 43
- Figura 14.** Colecta mensual del alga *Macrocystis pyrifera* destinada para el análisis químico proximal..... 65
- Figura 15.** Crecimiento ganado al final del periodo experimental de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera*. Los datos representan la media más su desviación estándar..... 66
- Figura 16.** Peso ganado al final del periodo experimental de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera*. Los datos representan la media más su desviación estándar..... 67

**Figura 17.** Valores promedio de la longitud de la concha durante el periodo experimental de juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera*. Los datos representan la media más su desviación estándar..... **68**

**Figura 18.** Valores promedio del peso durante el periodo experimental de juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera*. Los datos representan la media más su desviación estándar..... **69**

## Lista de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Parámetros físico-químicos promedio evaluados durante el periodo experimental de 5.5 meses. Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE).....	<b>31</b>
<b>Tabla 2.</b> Desempeño biológico de juveniles de abulón azul <i>H. fulgens</i> alimentados con tres dietas formuladas ABKELP® con distintos niveles de pH (5, 7, 8) y una dieta control con <i>M. pyrifera</i> durante 5.5 meses. Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE).....	<b>32</b>
<b>Tabla 3.</b> Composición proximal de las dietas experimentales de distinto pH (5, 7, 8). Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE). Los valores se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía P (< 0.05). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante un análisis <i>post hoc</i> de Tukey <i>p</i> (< 0.05).....	<b>33</b>
<b>Tabla 4.</b> Composición proximal (% en peso húmedo) del alga <i>Macrocystis pyrifera</i> utilizada como dieta control durante el periodo experimental de 5.5 meses. Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE). Los valores se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía <i>p</i> (<0.05). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante un análisis <i>post hoc</i> de Tukey <i>p</i> (< 0.05).....	<b>34</b>
<b>Tabla 5.</b> Composición proximal inicial y final (% en peso húmedo) del músculo de abulón azul <i>H. fulgens</i> alimentado con tres dietas con distinto nivel de pH (5, 7, 8) y una dieta control con <i>M. pyrifera</i> . Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE). Los valores se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía <i>p</i> (< 0.05). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante un análisis <i>post hoc</i> de Tukey <i>p</i> (< 0.05).....	<b>35</b>
<b>Tabla 6.</b> Caracterización morfológica de las bacterias del tracto digestivo de los juveniles de abulón azul <i>H. fulgens</i> alimentados con una dieta formulada a distinto pH (5, 6 y 8) y una dieta control con <i>M. pyrifera</i> cultivables en el medio TSA.....	<b>41</b>
<b>Tabla 7.</b> Comparación de la longitud de la concha y el peso de los juveniles de abulón azul <i>H. fulgens</i> alimentados con la dieta pH 5 y la dieta control con <i>M. pyrifera</i> mediante una prueba de T.....	<b>70</b>
<b>Tabla 8.</b> Tasas de crecimiento de <i>Haliotis fulgens</i> alimentado con distintas dietas.....	<b>71</b>

## Capítulo 1. Introducción

---

### 1.1 Biología del abulón

El abulón es un molusco gasterópodo que pertenece al género *Haliotis sp.* (Leighton, 2000). Una de las características que distingue al género es la presencia de un pie muscular prominente que le permite adherencia y desplazamiento en el sustrato. Además, posee una concha ovalada en forma de oreja que contiene una serie de orificios cercanos a la curvatura de esta, utilizados en procesos de respiración, excreción y expulsión de gametos, misma que a su vez resguarda los órganos blandos (Heasman y Savva, 2007). La coloración y textura de la concha permite diferenciar las distintas especies que conforman el género. Habitan en las zonas costeras de aguas templadas y tropicales de los océanos Pacífico, Atlántico e Índico (Geiger y Owen, 2012). Esto, en relación a los bosques de macroalgas de los cuales se alimenta en su estadio juvenil y adulto. Por lo tanto, es considerado un organismo herbívoro. Viana (2000) menciona que la tasa de crecimiento es alta en relación a su alimentación por lo que se deduce que también se alimenta de los organismos epifitos presentes en el alga. Es un molusco dioico, es decir, presenta sexos separados (hembra y macho). Dicha diferenciación sexual puede ser observada una vez que el desarrollo gonadal ha iniciado a través de la coloración de la gónada localizada alrededor de la glándula digestiva (Heasman y Savva, 2007 y Leighton, 2008). Los machos presentan tonalidades que van desde amarillo intenso al blanco cremoso; mientras que las hembras presentan tonalidades oscuras que van desde el gris al verde olivo esto, en relación a la especie (Leighton, 2008).

Durante el periodo de reproducción los gametos son expulsados mediante contracciones musculares a la columna de agua donde son fecundados. La larva de los haliótidos forma parte del zooplancton de 4-6 días dependiendo la especie y las condiciones ambientales (Geiger y Owen, 2012). Esta larva cuenta con una capacidad limitada de dispersión y movilidad (Vega- García, 2016). Tras un proceso de metamorfosis la larva se asienta en el sustrato, momento en el cual comienza la exploración y reconocimiento del fondo marino, lo que se traduce en el inicio de su vida béntica. Las postlarvas, juveniles y adultos presentan hábitos de alimentación y desplazamiento nocturnos. La profundidad de su hábitat varía acorde a la especie, localizadas en profundidades que van desde los 13 hasta los 50 metros (Leighton, 2000).

Actualmente, se han descrito cerca de 100 especies del género de las cuales tan solo aproximadamente 20 tienen importancia comercial (Jarayabhand y Paphavasit, 1996; Iba, 2008). Específicamente en la costa occidental del Pacífico se distribuyen ocho especies de las cuales siete se localizan en México: Abulón rayado (*Haliotis assimilis*; Dall, 1878), chino (*Haliotis sorenseni*; Linnaeus, 1758), negro (*Haliotis*

*cracherodii*; Leach, 1814), amarillo (*Haliotis corrugata*; Wood, 1828), pinto (*Haliotis kamtschatkana*; Jonas, 1845), rojo (*Haliotis rufescens*; Swainson, 1822) y azul (*Haliotis fulgens*; Philippi, 1845).

## 1.2 Cultivo de abulón en la región

El abulón es un recurso pesquero de importancia económica en México el cual, ha presentado una importante disminución en sus poblaciones naturales durante los últimos años debido a diversos factores como lo son la sobrepesca y la degradación de su medio ambiente (Vega - García, 2016). Su importancia en la región radica en su exportación principalmente al mercado asiático y estadounidense siendo de las especies con mayor demanda en el mercado. El sabor de su carne es altamente apreciado por dichos países lo que le confiere un alto valor. El abulón, es un recurso del cual se aprovecha la concha para actividades de orfebrería y su pie muscular para consumo humano, así como también se realiza la producción de perlas e inclusive en algunos casos se aprovechan las vísceras para producción de harina (Viana *et al.*, 1996; Searcy- Bernal *et al.*, 2010).

Específicamente el abulón azul *Haliotis fulgens* es una de las especies que destaca en México, debido a su explotación comercial. En la actualidad, esta especie sustenta aproximadamente un 80% de la pesca junto con el abulón amarillo *H. corrugata* en menor proporción (< 20 %). Produciendo cerca de 400 toneladas al año colectadas en los estados de Baja California y Baja California Sur (DOF, 2017). De acuerdo a las cifras proporcionadas por el Diario Oficial de la Federación (2017) Baja California produjo el 36.9 % del abulón colectado mientras que en Baja California Sur se produjo el 63.1 % de la producción anual. *H. fulgens* cuenta con una distribución que abarca desde Punta Concepción (E.U.A.) hasta Bahía Magdalena en Baja California Sur (México). Llega a medir hasta 25 cm de longitud y se localiza desde el intermareal bajo, hasta los 18 metros de profundidad.

En cuanto a la producción en cautiverio del abulón azul, la biotecnología aún se encuentra poco desarrollada en comparación con el cultivo de abulón rojo en la región (DOF, 2017). La mayor parte de la producción en tierra se utiliza para sembrar postlarvas o semilla en el medio natural. De acuerdo con Searcy- Bernal y colaboradores (Searcy *et al.*, 2010) en los años 2007 y 2008 alrededor de 130 millones de larvas y 350 mil semillas (< 1.5 cm) de abulón azul y amarillo fueron liberados al mar por seis cooperativas que operan en la región y dos de ellas comenzaron bioensayos de crecimiento.

En el año 2014, la Sociedad Cooperativa Progreso de Producción Pesquera S.C. de R.L. ubicada en la Bocana (B.C.S.) inauguró la primera unidad de producción de abulón azul *H. fulgens* a nivel comercial. Utilizando la tecnología de cultivo japonesa y algunos desarrollos tecnológicos empleados en Chile. Dicha unidad, tiene como propósito su estabilización financiera y una producción promedio de 12 toneladas anuales a partir de 2021 (Domingo Aguilar, Comunicación personal, septiembre 2020).

Sin embargo, aún existen algunas limitantes en el cultivo del abulón azul, entre ellas: 1) las altas mortalidades durante las primeras etapas de vida, 2), las bajas e irregulares tasas de crecimiento, 3) una biotecnología poco desarrollada y 4) la carencia de una nutrición y alimentación que satisfaga sus requerimientos en las distintas etapas, entre otras. Esto último en relación a las metodologías de alimentación empleadas en el cultivo, es decir la alimentación con algas frescas (Iba, 2008). Motivo por el cual, en la actualidad han sido empleadas distintas dietas formuladas en los diferentes estadios de vida del abulón con el fin de aumentar las tasas de crecimiento y supervivencia en cautiverio (Uki *et al.*, 1985; Britz, 1996; Shipton y Britz, 2001; Bautista- Teruel *et al.*, 2003).

### **1.3 Alimento formulado**

La pesca y la acuicultura juegan un papel importante en la seguridad alimentaria de la población mundial. La producción pesquera se ha mantenido constante durante los últimos 20 años. Sin embargo, en 2018 alcanzó el nivel más alto de producción con un total de 96.4 millones de toneladas lo que equivale a cerca del 54 % de la producción total de mariscos mientras que la acuicultura alcanzo una producción cercana al 46 % esto, sin contemplar las plantas acuáticas producidas mismas que al ser tomadas en cuenta superan el 50% de la producción mundial (FAO, 2020). Uno de los principales retos a los que se ha enfrentado la acuicultura es la producción de dietas balanceadas que cumplan con el requerimiento nutricional de la especie cultivada. Mismos que a su vez deben de ser económicamente rentables, en algunos casos los costos de producción de alimentar llegan a ser hasta del 60% de los costos totales (FAO, 2020). Esto derivado de la materia prima utilizada para su elaboración.

Particularmente en el cultivo de abulón, distintos grupos de investigadores a nivel mundial se han dado a la tarea de desarrollar dietas formuladas que suplementen o replacen el uso de algas frescas en el cultivo, siendo Japón el pionero en la producción de dietas formuladas a inicios de los 1980's (Fleming *et al.*, 1996). Esto, con el propósito de no depender del suministro de alga fresca el cual, se ve alterado por

las condiciones ambientales y la calidad nutricional del alga fluctúa de acuerdo a dichas condiciones. Además, una dieta formulada proporciona un mayor contenido de nutrientes que los presentes en el alga. Específicamente en México, las granjas que se dedican a la producción de abulón basan su alimentación principalmente en la macroalga *Macrocystis pyrifera*. Sin embargo, la abundancia y perfil bioquímico de esta alga cambia conforme las condiciones ambientales (Cruz-Suárez *et al.*, 2000). Por lo tanto, las dietas formuladas tienen como principal propósito estabilizar y garantizar la producción del abulón bajo condiciones de cultivo.

Existen diversos estudios que demuestran que proporcionar una dieta formulada genera mayores tasas de crecimiento que el proporcionar alga fresca (Iba, 2008). Por mencionar algunos: Viana y colaboradores (1993) evaluaron dos dietas formuladas con harina de pescado y caseína en juveniles de abulón azul *H. fulgens* en comparación con el alga fresca *M. pyrifera* demostrando que ambas dietas formuladas proveen un crecimiento mayor. Esto, también se ha registrado en *H. discus* y *H. sieboldii* (Nie *et al.*, 1986; Hahn, 1989) atribuyendo estos resultados a un mayor contenido de proteína en la dieta y la calidad constante de la misma.

En la formulación de un alimento es necesaria la evaluación de la calidad nutricional, rentabilidad, capacidad de promover el crecimiento y disponibilidad para los organismos en cuestión. Sin embargo, además de eso es importante tener en cuenta características químicas y físicas del alimento que conlleven a su aceptación por parte del organismo (Fleming *et al.*, 1996). Con características químicas se hace referencia a que se cumplan con los requerimientos de macro y micronutrientes dentro de su alimentación indispensables para el desarrollo óptimo. Mientras que las características físicas hacen referencia a la dureza, durabilidad, velocidad de hundimiento, porosidad, resistencia al estrés mecánico, textura, palatabilidad, tamaño y estabilidad del alimento. Este conjunto de características es necesario para crear una dieta económicamente rentable y biológicamente funcional (Hoyos *et al.*, 2017). En el caso de dietas formuladas para organismos acuáticos es importante que los nutrientes solubles permanezcan dentro de la dieta. En el caso específico del abulón, es importante tomar en cuenta la estabilidad debido a la posible lixiviación de los nutrientes. El término lixiviación se refiere a la pérdida de materia seca y lavado de micronutrientes después de la exposición del alimento al agua en un determinado periodo de tiempo. Lo que ocasiona una pérdida de nutrientes y una degradación progresiva de la calidad del agua. Generalmente, se utilizan ligantes en las dietas los cuales, pueden ser alginatos o almidones, estas formulaciones son patentadas por quien las produce debido a que la estabilidad del alimento es uno de los factores de mayor importancia (Viana, 2000).

Con el propósito de mantener la estabilidad de la dieta en el agua se han realizado distintos estudios. Por ejemplo, Gorfine (1991) observó que al aumentar la cantidad de aglutinante (del 2 al 8% de agar) en la dieta del abulón *Haliotis rubra* aumentó la estabilidad en el agua de la dieta sin embargo, disminuyó la ingesta del mismo. Resultados similares fueron reportados por Uki y colaboradores (1985) al adicionar alginato de sodio (30 al 50%) en dietas para abulón. Por otro lado, se han realizado experimentos como el de Rivero y Viana (1996) donde evaluaron una dieta formulada con distintos valores de pH (4, 5, 6, 7 y 8) en juveniles de *H. fulgens*. Demostrando que el pH de la dieta formulada tiene influencia en el consumo y la estabilidad del mismo en el agua. Sin embargo, se necesita mayor información respecto al tema dado que se desconoce los efectos que esto pudiera tener sobre la fisiología digestiva del organismo. También, existen trabajos donde se evalúa el uso de ensilados de las harinas en la dieta, demostrando que existe una mejora en la estabilidad de la dieta en el agua (Viana *et al.*, 1996; Viana *et al.*, 1999).

## **1.4 Requerimientos nutricionales**

El abulón es un organismo herbívoro que se alimenta en los mantos de macroalgas, algas a la deriva y pastos marinos en su hábitat natural. Sin embargo, se cree que para alcanzar tasas de crecimiento mayores consume a los organismos epifitos presentes en el alga. Lo que vuelve aún más complicado determinar el requerimiento nutricional de la especie (Mai *et al.*, 1995; Viana, 2002). Por tal motivo, se han realizado distintos estudios para determinar el requerimiento específico de proteína, lípidos y carbohidratos. Esto, con el fin de poder proporcionar un alimento óptimo para el cultivo de cada especie en cautiverio. En la actualidad las dietas formuladas generalmente proveen un alto contenido de proteínas que varía entre el 20 y 50 % de proteína cruda, un 30 y 60 % carbohidratos, un bajo contenido de fibra (0 a 3 %) y lípidos (3 a 5.3 %). Dicha variación en los porcentajes se encuentra relacionada a la especie, estadio de vida y sexo (Fleming *et al.*, 1996).

### **1.4.1 Proteínas**

La proteína es el ingrediente de mayor costo e importancia en la dieta, dado que proporciona el crecimiento en el tejido suave. La respuesta al nivel proteico depende de la digestibilidad, equilibrio de aminoácidos, disponibilidad y la energía suministrada (Fleming *et al.*, 1996). Dentro de los aminoácidos

esenciales para el abulón se han identificado la treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptófano, lisina, histidina y arginina. Reportando altos niveles de este último en el tejido blando del abulón por lo tanto, es indispensable incluirlo en la dieta (Viana, 2000). En cuanto al contenido proteico es vital la calidad de la proteína y no la cantidad. Dado que como muchos animales el abulón, no puede sintetizar diez de los aminoácidos esenciales para el ensamble de proteínas y es importante suministrarlos en su dieta.

En cuanto al porcentaje de inclusión se han realizado distintos trabajos como el de Ogino y Kato (1964) con abulón *H. discus* donde emplearon distintos porcentajes de harina de pescado (15-44 %). Los resultados mostraron una relación lineal entre el porcentaje de proteína cruda y el crecimiento del abulón. Por otro lado, Stone y colaboradores en 2013 evaluaron el efecto del porcentaje de inclusión de proteína (27, 30, 33 y 36 %) y su relación con la temperatura de cultivo (14, 18 y 22 °C) en abulón *H. laevigata* de uno y dos años. Los resultados mostraron que la tasa de crecimiento fue significativamente afectada por la temperatura de cultivo, más no por el nivel de proteína proporcionado en la dieta, dado que la variación en la cantidad proteica se vio compensada con un mayor consumo de alimento.

Las proteínas proporcionadas generalmente provienen de fuentes como la harina de pescado, harina de soya o caseína las cuales se ha demostrado generan altas tasas de crecimiento (Uki *et al.*, 1985; Hahn, 1989; Gorfine, 1991; Fleming *et al.*, 1996). También, se han probado otras fuentes de proteínas en la elaboración de las dietas con el objetivo de disminuir costos de producción.

Viana y colaboradores (1996) realizaron una dieta formulada a base de vísceras de abulón y caseína demostrando que genera tasas de crecimiento mayores ( $101 \mu\text{m día}^{-1}$ ) a los obtenidos con el alga fresca *M. pyrifera* ( $25 \mu\text{m día}^{-1}$ ) en juveniles de *H. fulgens* de 1.3 cm. Sin embargo, dicha dieta se vio afectada por la estabilidad en el agua y la lixiviación de los nutrientes. También, Nava Guerrero y colaboradores (2004) intentaron sustituir la harina del alga *Macrocystis pyrifera* por mosto de uva en dietas formuladas para abulón azul *H. fulgens*, registrando como adecuado una sustitución del 16% sin comprometer el desempeño biológico del organismo. También, se han realizado inclusiones de *Spirulina* spp. (10 %) cultivada en aguas residuales como suplemento, así como ensilados de pescado y viseras de abulón generando tasas de crecimiento de hasta 20 % más en comparación con alga fresca (Britz, 1996; Viana *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2020).

### 1.4.2 Carbohidratos

Constituyen una fuente primaria de energía para el abulón esto, en relación a su alimentación herbívora. Dentro de las fuentes de carbohidratos en las dietas formuladas se localizan las harinas de trigo, soya, maíz y subproductos de almidón donde este último, cuenta con un papel doble como nutriente para el organismo y como ligante para disminuir la lixiviación y aumentar la estabilidad en el agua. Normalmente el abulón en su dieta natural consume entre el 40 y 60 % de carbohidratos (Fleming *et al.*, 1996). Lee (2004) demostró que el abulón *H. discus hannai* utiliza de manera más eficiente los carbohidratos que los lípidos como fuente de energía. Lo cual, se encuentra relacionado con los hábitos alimenticios del organismo y las enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo, proponiendo un rango de 10 al 25 % de inclusión en la dieta sin comprometer la tasa de crecimiento. La inclusión de carbohidratos en las dietas formuladas es importante dado el suministro de energía proporcionado y de esta manera, obtener un mayor aprovechamiento de la proteína. El porcentaje de inclusión es alto dado que se conoce que el abulón posee enzimas que hidrolizan carbohidratos complejos. Sin embargo, es importante conocer el efecto que este pueda generar al incluirlo en la dieta, considerando que Uki y colaboradores (1985) mencionan que conforme se incrementa la cantidad de celulosa en la dieta (0-20 %) existe una disminución en el crecimiento del abulón *H. discus hannai*. Cabe mencionar que, la celulosa aunque es un tipo especial de carbohidrato, comúnmente considerado como fibra, ya que muchos organismos no lo pueden digerir (Lehninger, 1983).

### 1.4.3 Lípidos

Los lípidos son un nutriente que no representa un aporte significativo de energía. Estudios han revelado que un aporte mayor al 5 % puede resultar en un retardo del crecimiento (Fleming *et al.*, 1996). Estos en muchos casos se incorporan a la dieta por medio de los aceites. En algunos casos pudieran no añadirse ya que la harina de pescado aporta el bajo porcentaje que se requiere. Dentro de la dieta es importante la inclusión de aceites ricos en los ácidos grasos PUFA y HUFA n-3 y n-6 ya que son importantes en procesos de reproducción y desarrollo larval (Durazo- Beltrán *et al.*, 2004).

Durazo-Beltrán (2014) evaluó dietas formuladas con diferentes fuentes de aceites (oliva, linaza, maíz y pescado) y porcentajes de lípidos (1.5, 3 y 5 %) utilizando como control una dieta sin adición de lípidos en juveniles de abulón azul *H. fulgens* con una longitud inicial de 5.9 mm y 24.2 mg de peso. Los resultados

indicaron que no existe una relación significativa entre el porcentaje y fuente lipídica respecto al crecimiento y composición de ácidos grasos en el tejido muscular del abulón.

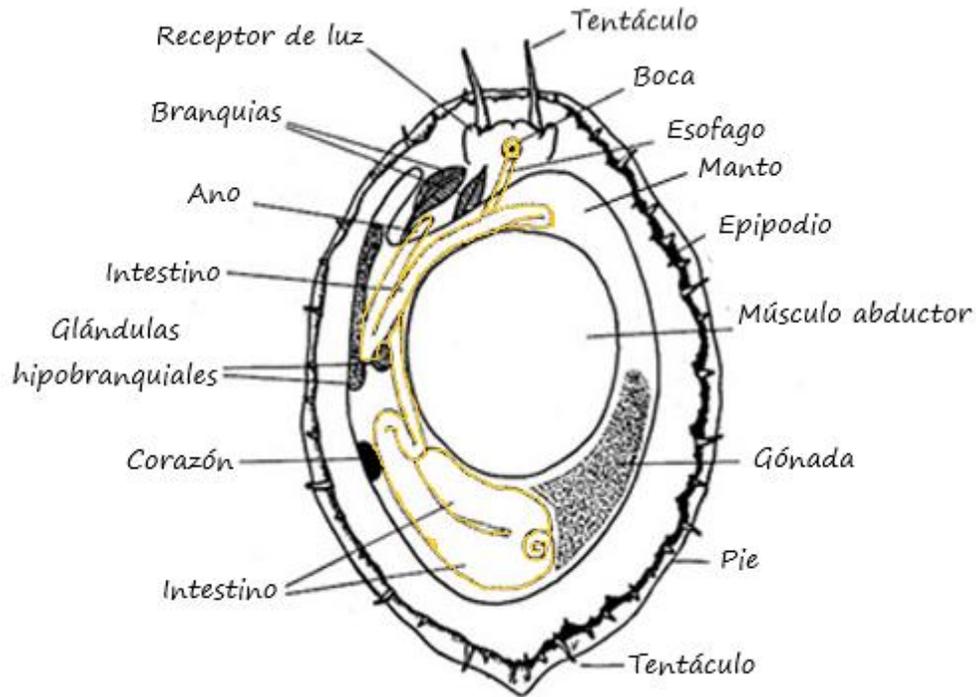
#### **1.4.4 Vitaminas y minerales**

En cuanto al requerimiento en abulón son muy pocos los estudios llevados a cabo, la mayoría se basan en el requerimiento de los peces marinos (Venter *et al.*, 2018). En algunos casos, cuando se proporciona una harina a base de algas, éstas, proporcionan los minerales necesarios para el organismo. En cuanto al porcentaje de adición se propone un 4 % de inclusión, esto con relación a la estabilidad de la dieta dentro del agua (Uki y Watanabe, 1992). Hoy en día, se conoce que al incluir el 0.5 % de calcio y 0.7 % de fósforo en la dieta formulada se pueden obtener tasas de crecimiento mayores en el abulón *H. discuss hannai* y *H. laevigata* (Coote *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2001).

### **1.5 Tracto digestivo y digestión en el abulón**

El tracto digestivo se encuentra constituido por distintos órganos que ayudan al aprovechamiento del alimento consumido. Este, se localiza de lado izquierdo del cuerpo contenido entre el prominente pie y la concha del abulón, formando parte de la masa visceral (Figura 1).

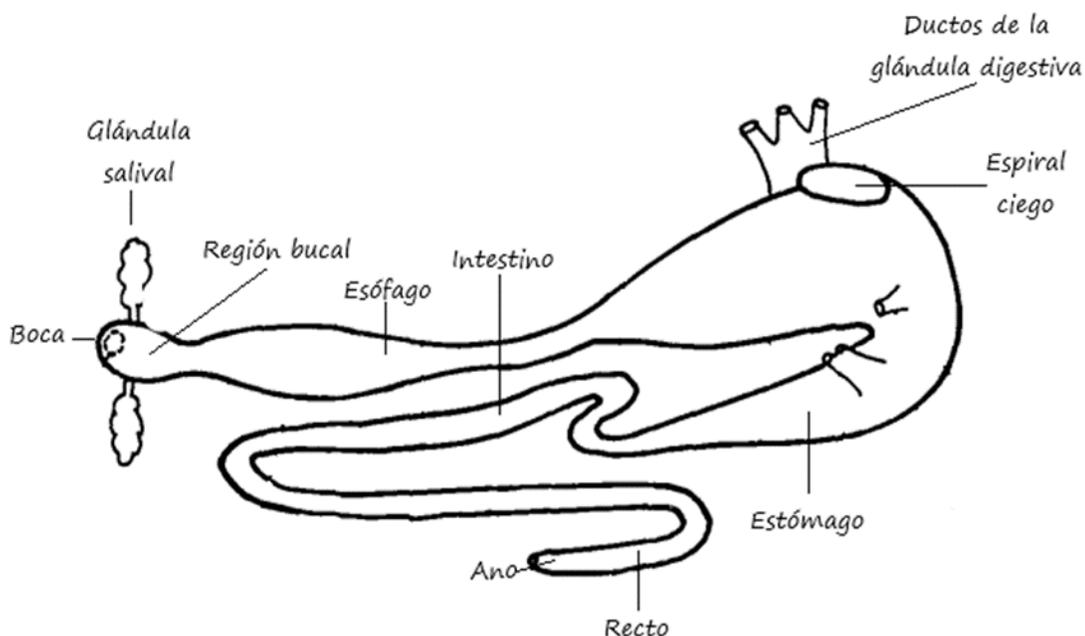
Los componentes del sistema digestivo son: la boca compuesta por unos labios anchos que recubren una cutícula gruesa la cual, resguarda dos estructuras que forman una mandíbula donde se localiza la rádula, órgano raspador que permite introducir el alimento en pequeñas porciones cubiertas de mucus. Este material ingerido pasa a través de las aberturas de las glándulas salivales, estructuras largas y ramificadas que se encuentran cercanas a la región bucal. El esófago es un surco por el que pasan los alimentos por medio de corrientes ciliares, generalmente se divide en tres regiones (anterior, medio y posterior) en este proceso el alimento es empaquetado en fluidos digestivos. McLean (1970) demostró mediante estudios *in vitro* que el esófago es permeable a pequeños materiales orgánicos siendo una región importante en la absorción de los nutrientes.



**Figura 1.** Anatomía general de un haliótido (tomado y modificado de Darling, D., 2016).

A partir de ahí el alimento se conduce hacia una cámara de espiral donde llega el alimento triturado junto con líquido digestivo para posteriormente redirigirse al estómago, es pequeño, localizado por debajo del esófago y separado por un pliegue donde se conecta con los conductos de la glándula digestiva. El hepatopáncreas o glándula digestiva es un órgano donde se producen un gran número de enzimas digestivas. Además, se encuentra estrechamente asociada con el intestino ya que tiene funciones de almacenamiento de energía, transformación metabólica, síntesis de enzimas, participa en el proceso de gametogénesis, entre otras funciones (Venter *et al.*, 2018).

Posterior al estómago se localiza el intestino, lugar donde se lleva a cabo la absorción de los nutrientes. Por último, como parte final del tracto digestivo se localizan el recto y el ano localizados cerca a la cavidad del manto.



**Figura 2.** Diagrama esquemático del tracto digestivo del abulón *Haliotis rufescens* enfocado desde la superficie dorsal (tomado y modificado de MC Lean, 1970).

## 1.6 Enzimas digestivas

La actividad de enzimas digestivas en animales se cree que es adaptativa y que se encuentra relacionada con los componentes del alimento. Una gran cantidad de enzimas digestivas han sido identificadas en el tracto digestivo del abulón. Registrando actividad de enzimas tales como lipasas, proteasas, glucósido hidrolasas por ejemplo celulasa, laminarasa, alginasa y carragenasa encargadas de hidrolizar los nutrientes ingeridos (Picos-García, 1998). Mclean (1970) reporta actividad de proteasas, amilasas y lipasas en el líquido digestivo de *Haliotis rufescens*.

Específicamente la actividad de las proteasas en el tracto digestivo es clave fundamental en la digestibilidad y asimilación de las proteínas presentes en la dieta. Cho y colaboradores (1983) registraron actividad de proteasas en el tracto digestivo de *H. discus hannai* registrando una mayor actividad en un ambiente ligeramente ácido (pH 3.2). Por otra parte, Serviere-Zaragoza y colaboradores (1997) determinaron las enzimas hidrolizantes de proteínas en el tracto digestivo del abulón rojo *H. rufescens* encontrando actividad de tripsina y quimiotripsina a lo largo del intestino y recto a pH alcalino. Mientras que, en el estómago y el hepatopáncreas se encontró actividad de varias proteasas desconocidas. También, se han encontrado enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar carbohidratos complejos como

los alginatos y la celulosa, entre otros presentes en las algas y que se relacionan con los hábitos de alimentación herbívora del abulón (Fleming *et al.*, 1996). La actividad de celulasas ha sido registrada en distintas especies de haliótidos, observándose que el tipo de celulasa y su nivel de actividad varía entre especies (Fleming *et al.*, 1996). Clark y Jowett (1978) mencionan que el abulón *H. iris* que se alimenta en gran parte por algas rojas, presenta una gama de enzimas que degradan polisacáridos distintos del de las algas pardas.

## 1.7 Bacterias asociadas al tracto digestivo

Hoy en día se conoce que las bacterias presentes en el tracto digestivo juegan un papel importante en la alimentación (Fleming *et al.*, 1996). Las cuales, pueden ser poblaciones residentes o transitorias. El tracto digestivo ofrece un hábitat favorable para las poblaciones bacterianas, estas realizan actividades como la fermentación de algunas moléculas orgánicas complejas las cuales, pueden beneficiar al huésped contribuyendo de manera positiva en la nutrición. Estas pueden hidrolizar polisacáridos, agarosa, carragenina y alginatos ingredientes presentes en su dieta natural (Fleming *et al.*, 1996). En conclusión, el abulón posee una gran diversidad de hidrolasas que degradan distintos tipos de polisacáridos mismos que pueden diferir considerablemente respecto a la dieta suministrada y que pueden pertenecer a las poblaciones de bacterias presentes en el tracto.

Sin embargo, estos estudios no han distinguido el origen específico de estas enzimas dado que se conoce que el abulón posee bacterias simbióticas en su tracto digestivo que de igual manera que en otros herbívoros ayuda en la degradación de nutrientes. Existen trabajos que han tratado de identificar las bacterias viables en el intestino del abulón. Erasmus y colaboradores (1997) descubrieron que el abulón *H. midae* contiene cepas en sus intestinos que son capaces de hidrolizar polisacáridos complejos presentes en las algas, lo que sugiere que la microbiota tiene un efecto significativo en la digestión.

Además, estas bacterias se cree que también se encuentran relacionadas con la nutrición del abulón proporcionando nutrientes que no se encuentran en las dietas. Gran parte de las bacterias pueden desarrollarse en las superficies de los alimentos proporcionados, en el artículo de Fleming y colaboradores (1996) mencionan que se observaron tasas de crecimiento mayores con un alimento que permaneció durante más días en los tanques de cultivo, sospechando de un crecimiento bacteriano que de alguna manera mejoró la calidad nutricional o palatabilidad de la dieta.

## 1.8 Digestibilidad y métodos de medición

La digestión se conoce como el proceso mecánico, químico y enzimático que sufre el alimento ingerido para ser aprovechado. Estos procesos incluyen la ingesta, rompimiento y liberación de nutrientes presentes en el alimento para posteriormente ser absorbidos por el organismo. La participación de enzimas digestivas es crucial en este proceso ya que llevan a cabo el rompimiento del macronutriente en sus unidades básicas para posteriormente ser absorbidos por el organismo. La digestibilidad es la forma de medir el aprovechamiento de un nutriente la cual, puede ser determinada mediante métodos *in vivo* e *in vitro*. Estos métodos, en la mayoría de los casos se centran en la digestibilidad de la fuente proteica, ya que es uno de los nutrientes de mayor importancia en la dieta dado que participa en funciones reguladoras, de reconstrucción, transporte de sustancias, etc. (Picos-García, 1998).

La digestibilidad *in vivo* es comúnmente utilizada en ensayos de alimentación la cual, se determina mediante la diferencia entre el nutriente ingerido y la cantidad de nutriente excretado. Sin embargo, la utilización de dichas técnicas requiere de mayor tiempo y costo. Además, el resultado puede verse modificado por factores ambientales y metodológicos (Lazo *et al.*, 1998). Una de las mayores desventajas que presenta esta metodología es la recolección total del material fecal y determinar con exactitud la cantidad de alimento ingerido lo cual, se vuelve más complicado de realizar en organismos acuáticos debido a la presencia del agua que lixivia los nutrientes y las heces fecales. En el caso del abulón la naturaleza de las heces vuelve muy complicado este tipo de análisis dado que tiene una consistencia particulada y puede presentarse en suspensión como parte de los sólidos suspendidos en el sistema. Por el contrario, las técnicas de digestibilidad *in vitro* proporcionan una alternativa rápida, reproducible y rentable; estas metodologías *in vitro* permiten la simulación de las condiciones fisiológicas del organismo que existen durante la digestión (Gabner, 1985).

La digestibilidad *in vitro* es generalmente evaluada por medio del pH-Drop y el pH-stat. El primero se basa en cuantificar la reducción del pH a causa de la liberación de hidrógeno (H) durante la ruptura de los enlaces peptídicos, una de las limitantes de este procedimiento es que el ácido producido puede bajar el pH a niveles fuera de los óptimos de la enzima proteolítica. Por otro lado, el pH-stat se basa en cuantificar la cantidad de hidróxido de sodio (NaOH) requerido para mantener el pH óptimo de la enzima proteolítica durante la digestión. Dentro de las limitantes de la digestibilidad *in vitro* se encuentra la evaluación únicamente de enzimas a pH alcalino las cuales, pueden ser extraídas de la especie de interés o de enzimas purificadas provenientes de mamíferos y de uso comercial. Estas técnicas cuantifican el grado de hidrólisis de las proteínas en presencia de las enzimas agregadas, estimando así la biodisponibilidad de la fuente

proteica (Alarcón *et al.*, 1999). Shipton y Britz (2002) evaluaron la digestibilidad *in vitro* por medio de pH-stat de 34 distintas fuentes proteicas en el abulón *H. midae* utilizando un coctel multienzimático. Determinando que la técnica *in vitro* puede utilizarse para predecir de manera confiable la digestibilidad de la fuente proteica en cuestión.

## Capítulo 2. Justificación, hipótesis y objetivos

---

### 2.1 Justificación

Uno de los puntos críticos para el desarrollo del cultivo de abulón azul *Haliotis fulgens* en la región consiste en satisfacer los requerimientos nutricionales de la especie para optimizar su crecimiento, tanto en sus primeras etapas de vida (postlarva) como en su estadio adulto. A partir de la etapa juvenil (aparición del primer poro respiratorio), la macroalga parda *Macrocystis pyrifera* es una de las más comúnmente utilizadas para la alimentación en cautiverio en la Península de Baja California. Sin embargo, el perfil bioquímico de *M. pyrifera* varía estacionalmente en respuesta a las condiciones ambientales, y su contenido proteico es relativamente bajo (< 10 %). Por lo tanto, la disponibilidad del recurso *M. pyrifera* depende de las condiciones oceanográficas para acceder a él. Lo que, en ocasiones, puede limitar la cantidad disponible para cubrir la biomasa diaria necesaria para los cultivos. Lo que ocasiona que uno de los costos más altos para producir abulones sea el asociado a los costos de su alimentación. Debido a esto, en la actualidad la mayoría de las granjas abuloneras buscan alternativas como el uso de dietas formuladas para maximizar las tasas de crecimiento de las distintas especies cultivadas. En general, los diversos estudios al respecto demuestran que se pueden obtener mayores tasas de crecimiento al utilizar dietas formuladas en comparación con el uso de alimento fresco, dado que estos pueden proveer una cantidad y calidad constante de micro y macronutrientes. Sin embargo, uno de los aspectos críticos a resolver aún en las dietas formuladas es su estabilidad en el agua para evitar la pérdida de nutrientes por lixiviación tanto en sistemas abiertos como de recirculación (donde, además, puede comprometerse la calidad del agua). En este sentido, se sabe que el cocinar los ensilajes y mantenerlos a un pH bajo permite posteriormente obtener una mayor estabilidad (baja lixiviación) y lento deterioro de la dieta en el agua. Sin embargo, existe poca investigación respecto a ello. Por lo que, en este estudio se planteó evaluar el efecto del uso del alimento formulado ABKELP® con tres distintos niveles de pH (5, 7, 8) en el crecimiento, supervivencia, actividad enzimática, composición proximal del músculo, digestibilidad *in vitro* y crecimiento bacteriano presente en el tracto digestivo de juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens*.

## 2.2 Hipótesis

- La dieta formulada *ABKELP*<sup>®</sup> a pH 5 tendrá una mayor estabilidad (menor lixiviación) sin modificar significativamente el crecimiento y supervivencia del abulón azul *Haliotis fulgens* en sistemas de recirculación.
- La composición proximal del músculo, actividad enzimática, digestibilidad *in vitro* y el crecimiento de bacterias heterótrofas y tipo *Vibrio* presentes en el tracto digestivo de los juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens* no se verá afectada negativamente al disminuir el pH de la dieta.

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la dieta formulada *ABKELP*<sup>®</sup> con tres distintos niveles de pH (5, 7, 8) sobre el crecimiento, supervivencia, composición proximal del músculo, actividad enzimática, digestibilidad *in vitro* y crecimiento bacteriano presente en el tracto digestivo de juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens*.

### 2.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de estabilidad de la dieta formulada *ABKELP*<sup>®</sup> con distintos niveles de pH (5, 7, 8).
- Evaluar el efecto de la dieta formulada *ABKELP*<sup>®</sup> con distintos niveles de pH (5, 7, 8) sobre el crecimiento, supervivencia y actividad enzimática digestiva en juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens*.
- Cuantificar la digestibilidad *in vitro* de la proteína cruda contenida en el alimento formulado (*ABKELP*<sup>®</sup>) con distintos niveles de pH (5, 7, 8).
- Comparar la cantidad de bacterias heterótrofas y tipo *Vibrio* cultivables presentes en el tracto digestivo de juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens* alimentados con una dieta formulada (*ABKELP*<sup>®</sup>) con distintos niveles de pH (5, 7, 8) y caracterizarlas fenotípicamente.

## Capítulo 3. Materiales y métodos

---

### 3.1 Obtención de los juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens*

Un total de 2000 juveniles de abulón azul *H. fulgens* con un peso promedio de  $2.17 \pm 0.04$  g y longitud de  $2.61 \pm 0.08$  cm fueron proporcionados por la Sociedad Cooperativa Progreso de Producción Pesquera S.C. de R.L. ubicada en La Bocana, Baja California Sur. Estos se trasladaron vía terrestre a las instalaciones del Departamento de Acuicultura en CICESE. Transportados en hieleras con esponjas húmedas, gel ice y oxígeno a saturación con una temperatura promedio de  $16 \pm 1$  °C.

Una vez que los abulones llegaron a las instalaciones, se colocaron en tanques de recirculación de 200 L y fueron gradualmente aclimatados a  $19 \pm 0.5$  °C (aumentando 1 °C por hora) donde se mantuvieron en observación dos semanas previas al experimento. Durante este periodo se alimentaron con el alga *Macrocystis pyrifera*. Esto, con el propósito de igualar la condición nutricional de los organismos.

### 3.2 Obtención del alimento

La empresa Algas Marinas S.A. de C.V., ubicada en la ciudad de Ensenada, Baja California, elaboró y nos proporcionó tres dietas de alimento formulado *ABKELP*® las cuales, eran isoproteicas (15.52 %) e isolipídicas (1.51 %) con tres distintos niveles de pH (5, 7, 8). El pH de la dieta fue modulado mediante la adición de ácido cítrico de grado alimenticio. Las dietas fueron formuladas a base de proteína animal (harina de pescado) y vegetal (harina de macroalgas, harina soya, harina de maíz y harina de trigo). Actualmente, la formulación se encuentra cerrada y patentada. Una de las distintivas del alimento formulado *ABKELP*® fue la presentación la cual, simulaba una fronda de macroalga, de forma plana y alargada con un grosor menor a 0.5 mm, un largo de aproximadamente 15 cm, un ancho de 5 cm y un peso aproximado de 15 g por lámina.

En cuanto a la macroalga *M. pyrifera* utilizada como tratamiento control fue proporcionada por pescadores locales que la colectaban en la región aledaña a las costas de Ensenada. Durante el periodo experimental se tomaron muestras de la macroalga proporcionada la cual, fue secada y refrigerada a -20 °C hasta su posterior análisis proximal.

### 3.3 Estabilidad del alimento

Previo al experimento se realizó la prueba de estabilidad en el alimento esto, para determinar el porcentaje de pérdida de materia seca durante su exposición al agua en un tiempo periodo de determinado de acuerdo con la metodología de Clausen (1988). Las condiciones experimentales fueron simuladas dentro de los 12 tanques de 200 L con un flujo de agua de  $1.6 \text{ L min}^{-1}$  y una temperatura de  $18 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . La dieta fue colocada al azar dentro de los tanques de cultivo y retirada después de 12 h de exposición para su posterior secado en estufa (OV47355, Thermolyne, E.U.A.) hasta llegar a un peso constante. El porcentaje de estabilidad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Estabilidad}(\%) = \frac{(PSDE) * (100)}{PSD} \quad (1)$$

En donde:

**PSDE**= Peso seco de la dieta después de su exposición al agua (12 h)

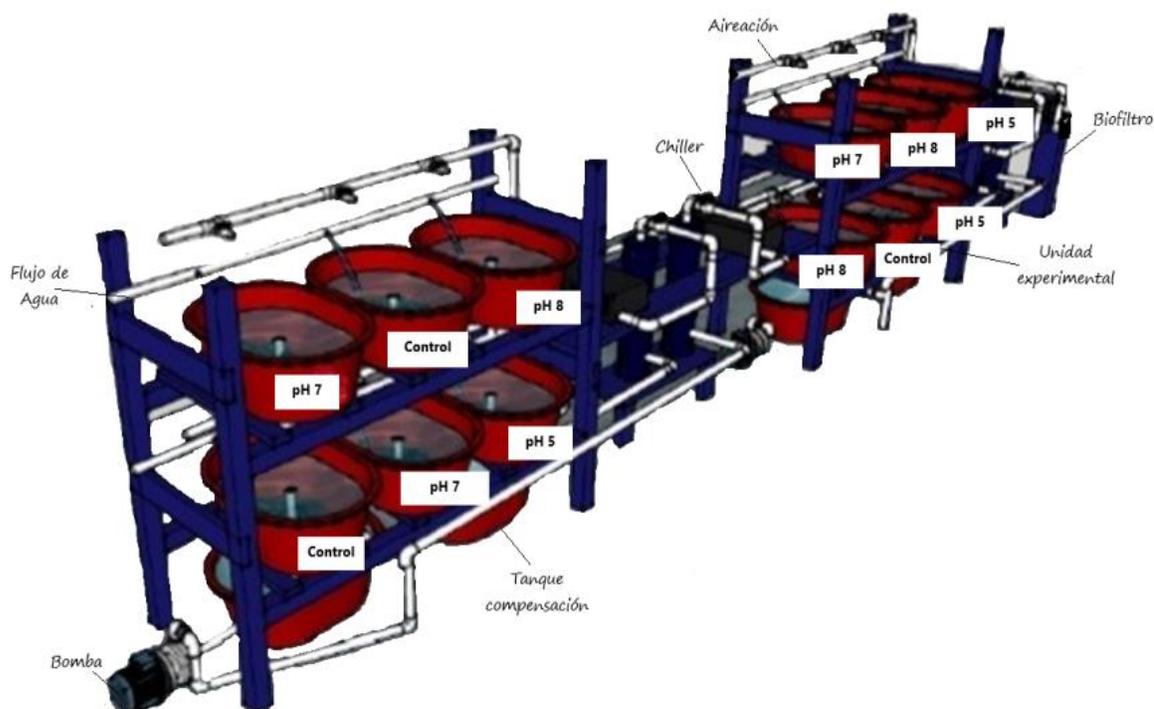
**PSD**= Peso seco de la dieta

### 3.4 Diseño experimental

Posterior a su acondicionamiento los organismos fueron sometidos a un periodo de inanición de tres días con el propósito de limpiar el tracto digestivo para la colecta inicial de las muestras y posteriormente dar inicio al período experimental. Se utilizaron un total de 12 tanques con forma ovalada de aproximadamente 200 L de capacidad, divididos en cuatro sistemas de recirculación en los que se distribuyeron aleatoriamente los tratamientos (Figura 3). Dentro de cada tanque se colocaron al azar 150 juveniles por tanque para evaluar los tres tratamientos: pH 5, pH 7, pH 8 y un control con la macroalga *M. pyrifera*. Los abulones fueron alimentados a saciedad durante un periodo total de 5.5 meses. Cada sistema de recirculación estaba compuesto por 3 tanques de plástico con aproximadamente 150 L de agua de mar, que contaban con un tubo en la parte interna central del tanque que mantenía el nivel del agua y drenaba el exceso hacía un tanque de compensación colocado bajo el sistema. El cual, se conecta directamente a una bomba magnética MD12 de 180 GPH que recirculaba el agua hacía el biofiltro mecánico y

posteriormente a un enfriador Delta Star DS-9 de 20/35 GPM que mantenía una temperatura promedio de  $18 \pm 1$  °C antes de regresar nuevamente a los tanques de cultivo con un flujo de agua de  $1.6 \text{ L min}^{-1}$ . Adicionalmente, se colocaron en cada tanque tubos de PVC que sirvieron como refugio para los juveniles de abulón durante el día.

Los retrolavados del biofiltro fueron realizados diariamente, así como la limpieza de los tanques mediante el sifoneo manual retirando las heces y el exceso de alimento. Reponiendo aproximadamente 30% del volumen total del agua del sistema. Se manejó un fotoperiodo natural en su mayor parte de invierno de 10 horas luz y 14 oscuridad en los años 2019-2020 ( $31^\circ 52 \text{ N}$ ,  $116^\circ 37 \text{ O}$ ). El soplador que suministraba la aireación y el agua utilizada en los tanques provenía del sistema de abastecimiento del Departamento de Acuicultura en CICESE el cual, antes de llegar a los sistemas de cultivo era filtrado a  $5 \mu\text{m}$ .



**Figura 3.** Sistema de recirculación utilizado en este experimento para el cultivo de juveniles de abulón azul *H. fulgens* (tomado y modificado de García-Concha, 2016).

### 3.5 Variables fisicoquímicas

Para evaluar la calidad del agua del cultivo durante el experimento, diariamente fueron medidos los parámetros físico-químicos de: temperatura (°C), porcentaje de oxígeno (%), oxígeno disuelto (mg/L), salinidad (ppt) y potencial de hidrógeno (pH) con ayuda de un equipo multiparámetro (Pro-2030, YSI,

E.U.A.). Además, se adicionó un HOBO® pendant® MX2202 (medición de temperatura y luz) a cada tanque para evaluar individualmente la temperatura (°C) e irradiancia (lum/ft<sup>2</sup>) dentro del mismo, así como un Mini dot (miniDOT logger, PME, E.U.A) que registraba la concentración de oxígeno (mg/L) por minuto dentro de cada sistema. Por otra parte, el nitrógeno amoniacal total (NAT), nitratos (NO<sub>3</sub>) y nitritos (NO<sub>2</sub>) fueron medidos dos veces por semana utilizando un kit colorimétrico marca API® (Mars Fishcare North America, Inc. USA).

### 3.6 Rutina de alimentación

La dieta formulada con distintos niveles de pH (5, 7, 8) fue suministrada a los juveniles de manera *ad libitum* esto, con el fin de proporcionar una mayor disponibilidad de alimento a los organismos, cada lámina contaba con un peso aproximado de 15 g. Por otra parte, la macroalga *M. pyrifera* utilizada como dieta control se proporcionó equivalente entre el 10% del peso húmedo (Leighton, 2000) de los juveniles, y se sustituía en cada tanque entre los 5 y 7 días por macroalga nueva.

El alimento fue proporcionado una vez al día durante la tarde. Esto, de acuerdo a los hábitos nocturnos de la especie. El exceso de alimento formulado se retiró diariamente mediante sifoneo en un periodo de tiempo no mayor a 15 horas de exposición al agua.

### 3.7 Muestreo

Durante el periodo de acondicionamiento, se realizó una biometría inicial de los organismos, estos fueron medidos y pesados. Mientras que, durante el periodo de experimentación se realizaron biometrías mensuales con la finalidad de contar con un registro y poder observar el efecto de la dieta proporcionada respecto al tiempo transcurrido del cultivo (5.5 meses). Para ello, los abulones fueron extraídos de su respectivo tanque de cultivo y colocados en una charola con agua proveniente del mismo tanque. Después, se retiraba el exceso de agua del organismo, y una vez secos, se tomaba registro de la longitud (cm) y ancho (cm) con ayuda de un vernier (Z136115, Scienceware) y el peso total (g) con una balanza (BABOL-100G, Rhino, México). Después de registrar los datos, los organismos eran regresados a su respectivo tanque de cultivo.

### 3.8 Índices de desempeño biológico

Las variables de desempeño biológico calculadas fueron: crecimiento y peso ganado durante el periodo experimental, la tasa de crecimiento en longitud ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) y peso ( $\text{mg día}^{-1}$ ), y supervivencia. A continuación, se describen las formulas usadas para cada una de ellas:

#### 3.8.1 Supervivencia

El porcentaje de supervivencia mensual se calculó considerando el número inicial de abulones por tanque (150 abulones) tomado como el 100 % y se relacionó con el número total de abulones sobrevivientes al finalizar cada mes del periodo experimental. De acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Supervivencia (\%)}: \frac{\text{Número mensual de juveniles sobrevivientes}}{\text{Número inicial de juveniles}} \times 100 \quad (2)$$

#### 3.8.2 Crecimiento (mm) y peso ganado (g)

Se calculó restando la longitud final del periodo evaluado de la longitud con que inicio el periodo experimental. De acuerdo con la ecuación:

$$\text{Crecimiento (mm)}: \text{Longitud final} - \text{Longitud inicial} \quad (3)$$

Se calculó restando al peso ganado final el peso al inicio del periodo experimental. De acuerdo con la ecuación:

$$\text{Crecimiento (g)}: \text{Peso final} - \text{Peso inicial} \quad (4)$$

#### 3.8.3 Tasa de crecimiento en longitud ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) y peso ( $\text{mg día}^{-1}$ )

La tasa de crecimiento en términos de la longitud de la concha, se calculó restándole a la longitud final el valor de la longitud inicial y dicho valor se dividió entre los días de cultivo. Tal como se observa en la ecuación:

$$\text{Tasa de crecimiento } (\mu\text{m día}^{-1}): \frac{\text{Longitud final} - \text{Longitud inicial}}{\text{Tiempo de cultivo}} \quad (5)$$

Mientras que la tasa de crecimiento en términos de peso, se calculó restando el peso final el peso inicial y dicho valor se dividió entre los días de cultivo. Tal como se observa en la ecuación:

$$\text{Tasa de crecimiento } (\text{mg día}^{-1}): \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Tiempo de cultivo}} \quad (6)$$

### 3.8.4 Porcentaje de peso ganado (%)

El porcentaje de peso ganado se calcula restando al peso final el peso inicial y se divide entre el peso inicial del organismo, tal como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Peso ganado } (\%): \frac{\text{Peso final}(g) - \text{Peso inicial}(g)}{\text{Peso inicial}(g)} \times 100 \quad (7)$$

### 3.8.5 Tasa de crecimiento específica (% día<sup>-1</sup>)

La tasa de crecimiento específica se calculó mediante el logaritmo natural del peso final menos el logaritmo natural del peso inicial entre el tiempo, tal como se muestra en la ecuación:

$$\text{Tasa de crecimiento específica (TCE): } 100X \frac{\ln \text{Peso final}(g) - \ln \text{Peso inicial}(g)}{\text{Tiempo}} \quad (8)$$

## 3.9 Análisis proximal

### 3.9.1 Toma de muestras

#### *Dietas experimentales y control*

La composición de la dieta formulada con distinto nivel de pH (5, 7, 8) se evaluó previo al experimento, cuando estas fueron formuladas y elaboradas. Mientras que, la composición proximal del alga fresca *M. pyrifera* utilizada durante el experimento se realizó mensualmente, a partir de una muestra equitativa de un gramo de alga seca y molida colectada semanalmente (Figura 14).

### ***Músculo del abulón***

La composición proximal del músculo del abulón fue evaluada al inicio (tiempo cero) y final del experimento (5.5 meses) tras ser alimentado con la dieta formulada *ABKELP*<sup>®</sup> con tres distintos niveles de pH (5, 7, 8) y el tratamiento control alimentado con la macroalga *M. pyrifera*. Los abulones fueron tomados aleatoriamente, se retiró el exceso de agua y fueron colocados a una temperatura de -20 °C durante 30 min., hasta no presentar signos de vida. Posteriormente, se procedió al desconche del abulón, se retiraron las vísceras (tracto digestivo) y se colectó y enjuagó con agua destilada el músculo (pie completo), el cual fue etiquetado en bolsas por tratamiento y colocado a -80 °C para su posterior análisis.

### **3.9.2 Análisis proximales**

Los análisis proximales se llevaron a cabo mediante las siguientes metodologías:

#### ***Proteína cruda***

Para cuantificar la proteína cruda de la muestra se utilizó el método de micro-Kjeldahl (AOAC Oficial Method 2005). El cual consiste en tomar 50 mg de la muestra y colocarla en tubos de digestión junto con 40 mg de CuSO<sub>4</sub> y 2 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que actúan como catalizadores y 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para después llevarlos a digestión hasta observar una solución cristalina, misma que fue colectada para posteriormente añadir agua destilada hasta llevar a una solución aforada de 25 mL. De dicha muestra se tomó un volumen de 5 mL y se lleva a destilación. El producto de dicha destilación se recibió en un vaso de precipitado que contenía una solución de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 3 % junto con el indicador Shiro Toshiro. Dicho producto se tituló con HCl 0.05 N y así determinar el gasto de HCl que ayudaría a estimar el porcentaje de Nitrógeno en la muestra mediante la siguiente formula:

$$\text{Nitrógeno(\%)}: \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 1.4 \times 5}{g} \quad (9)$$

Donde:

**V1:** Mililitros de HCl gastados en la titulación de la muestra

**V0:** Mililitros de HCl gastados en la titulación del blanco

**g:** Peso de la muestra en gramos

**N:** normalidad de HCl

El porcentaje de la proteína cruda fue calculado en relación al porcentaje de Nitrógeno total multiplicado por el factor 6.25.

### **Lípidos**

Para determinar lípidos totales se utilizó el método de Soxhlet (1989). Se utilizó un 1 g de muestra el cual, fue colocado en un papel filtro Whatman No.1 dentro de un cartucho, agregando 40 mL de éter de petróleo en un vaso de precipitado para ser introducido a extracción durante 4 h. Después de desecar y eliminar todo el éter de petróleo de la muestra se cuantifico la cantidad de lípido mediante la diferencia de peso en el vaso. Utilizando la siguiente formula:

$$\text{Extracto lipídico (\%)}: \frac{\text{Peso vaso con grasa} - \text{Peso vaso inicial}}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100 \quad (10)$$

### **Humedad**

La humedad se determinó mediante la diferencia en peso entre la muestra húmeda y la muestra seca después de ser colocada en una estufa a 60 °C durante 24 h aproximadamente hasta obtener un peso constante. Calculando la humedad con la siguiente formula:

$$\text{Humedad (\%)}: \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100 \quad (11)$$

## **Ceniza**

El contenido de cenizas se obtuvo mediante diferencia de peso. Se colocó aproximadamente un gramo de muestra en un crisol previamente incinerado y se colocó en una mufla a 550 °C durante 4 h, una vez a temperatura ambiente se registró el peso y el porcentaje de humedad se determinó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ Ceniza: } \frac{\text{Peso de la muestra incinerada}}{\text{Peso inicial}} \times 100 \quad (12)$$

## **3.10 Actividad enzimática**

### **3.10.1 Toma de muestras**

Para la cuantificación de la actividad enzimática se utilizaron extractos enzimáticos provenientes del tracto digestivo de los abulones de cada tratamiento, previamente preparados y conservados a -80 °C. Para ello, se colectaron los organismos, se retiró el exceso de agua y se colocaron a una temperatura de -20 °C durante 30 min., hasta no presentar signos de vida. Una vez realizado lo anterior se procedió a registrar los datos de longitud y peso del organismo, después este fue desconchado y se diseco el tracto digestivo el cual, fue pesado de igual forma y colectado en un tubo falcón de 50 mL previamente enfriado. Una vez separados los sistemas digestivos (cuatro por réplica) se realizó una dilución 1:10 con agua destilada fría y se homogenizó la muestra con un POLYTRON® (PT-1200, Kinematica AG, Suiza). Después de la homogenización, la muestra fue centrifugada a 16,000 g durante 30 min. a 4 °C. Posterior a esto, se colecto el sobrenadante en tubos eppendorf de 1.5 ml. Las muestras fueron etiquetadas y resguardadas en alícuotas de 600 µL a -80 °C para su posterior análisis.

### **3.10.2 Análisis enzimático**

Previo al inicio de cada protocolo enzimático, las muestras de extractos enzimáticos se mantuvieron en frío a una temperatura de 4 °C. La actividad total se estimó para todo el tracto digestivo del abulón y las metodologías empleadas fueron adaptadas a la medición espectrofotométrica de un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific). Cada ensayo enzimático incluye dos muestras en blanco que sustituye el extracto enzimático por agua destilada y un control positivo con enzimas comerciales a una

concentración de  $1\text{mg mL}^{-1}$ . Además, con el fin de corroborar la calidad del pipeteo y la concentración de la enzima presente se realizaron curvas de calibración del extracto enzimático. En todos los casos, una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para causar un aumento de una unidad de absorbancia por minuto (Lazo *et al.*, 2000).

### 3.10.3 Tripsina

La actividad de tripsina fue determinada de acuerdo al protocolo propuesto por Erlanger *et al* (1961). Utilizando un buffer TRIS (concentración 50 mM) adicionado con  $\text{CaCl}_2$  (concentración 20 mM) y BAPNA (N $\alpha$ benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride, Sigma B-4875) como sustrato (concentración 1 mM). El volumen final de la reacción fue de 250  $\mu\text{L}$  (25  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático, 175  $\mu\text{L}$  del buffer + sustrato, 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético. Primero se dio inicio a la reacción con la colocación del buffer + sustrato y la enzima sobre la placa y se incubo a 37 °C durante 30 min. Posterior a esto, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético para detener la reacción durante 10 min y por último leer a una absorbancia de 410 nm.

### 3.10.4 Leucina aminopeptidasa

La actividad de esta enzima se evaluó mediante el método propuesto por Apple (1974). En el cual, se utilizó L-leucina-Pnitroanilida (Sigma, L-9125) 1.2 mM como sustrato en buffer HCl-Tris 50 mM con un pH 8.0. Agregando 175  $\mu\text{L}$  del buffer + sustrato, 25  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático a 37 °C e incubación de 30 min. Después, la reacción se detiene con 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético al 30% se espera 10 min. y se lee a una absorbancia de 405 nm.

### 3.10.5 Proteinasa alcalina total

La actividad de proteinasa alcalina total se midió de acuerdo al método de Sarath y colaboradores (2001). Utilizando caseína al 2% como sustrato buffer TRIS-HCL 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM a un pH de 9.0 y una temperatura de 37 °C. Agregando 50  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático y 75  $\mu\text{L}$  del buffer + sustrato para iniciar

la reacción e incubación a 37 °C durante 10 min. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 10 %. Las muestras se centrifugaron a 21,000 g durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante fue colectado y leído en una absorbancia de 280 nm en placa de cuarzo.

### **3.10.6 Quimiotripsina**

La actividad de quimiotripsina fue evaluada de acuerdo a la metodología propuesta por Hummel (1959) y modificada por Applebaum y colaboradores (2001). Utilizando BTEE 0.56 mM (éster etílico de N-benzoil-L-tirosina, Sigma 13110-F) como sustrato en buffer Tris-HCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 25 mM y metanol al 2.5% (v / v) a un pH de 7.8 y una temperatura de 37 °C. Para la cuantificación se utilizaron 225 µL del buffer + sustrato y 25 µL del extracto enzimático. La lectura se realizó en una placa de cuarzo a una absorbancia de 256 nm con lecturas por minuto durante 20 min.

### **3.10.7 Lipasa**

La actividad de lipasa se evaluó por el método descrito por Gjellesvik y colaboradores (1992). Utilizando un buffer TRIS-HCL 0.15 mM adicionado con taurocolato de sodio 15 mM y como sustrato Nitrofenil miristato 0.56 mM previamente disuelto en DMSO. Para la cuantificación se utilizaron 200 µL del buffer + sustrato, 25 µL del extracto enzimático y se incubo la muestra a 30 °C durante 30 min., con lecturas por minuto a una absorbancia de 405 nm.

### **3.10.8 Amilasa**

La enzima amilasa fue cuantificada mediante el método propuesto por Benfield (1951) del Worthington Biochemical Corporation. En el cual, se utilizó almidón (Marca sigma, S9765) al 1% como sustrato mezclado con un buffer de fosfato de sodio al 0.02 M, cloruro de sodio 6 mM con un pH de 6.9. Además, como colorante se utilizó ácido dinitrosalicílico al 2%. Se tomó 250 µL del homogenizado enzimático más 250 µL de la solución de almidón y se dejó incubar a 25 °C durante 3 min. Posterior a la incubación se agregaron 500 µL de ácido dinitrosalicílico al 2% y posteriormente se dejó incubar a 100 °C durante 5 min. Una vez a

temperatura ambiente se adicionaron 5 mL de agua destilada a la muestra, de dicha solución se tomaron 300  $\mu$ L para posterior leer a una absorbancia de 540 nm.

### **3.10.9 Proteínas solubles**

Con el propósito de cuantificar la concentración de proteínas solubles de los homogenizados y determinar la actividad específica, se utilizó el método de Bradford. El cual, consiste en colocar 250  $\mu$ L de solución Bradford (BIO RAD, Protein assay; Hercules, CA, U.S.) en posos de microplaca. Utilizando suero de albumina bovina (BIO RAD, U.S.) como estándar a temperatura ambiente registrando la absorbancia a 595 nm.

## **3.11 Digestibilidad *in vitro***

### **3.11.1 Toma de muestra**

Para la cuantificación de la digestibilidad *in vitro* de las diferentes dietas experimentales se utilizaron extractos enzimáticos provenientes del tracto digestivo previamente obtenidos de cada tratamiento, descritos en la sección anterior de toma de muestra para la actividad enzimática (3.10.1). Cada dieta fue molida, homogenizada y tamizada a 200  $\mu$ m. La cantidad requerida de cada dieta fue calculada en base al porcentaje de proteína contenida en ella, para obtener un valor en la reacción del 8% de proteína para llevar a cabo el análisis.

### **3.11.2 Grado de hidrolisis de la proteína cruda**

El grado de hidrolisis (GH) de la proteína cruda de cada dieta fue evaluado por medio del método pH-stat. Previo al análisis fue necesario que, la fuente proteica a evaluar sea molida y tamizada lo más finamente posible. Así mismo, es necesario calcular el porcentaje de proteína en la muestra el cual, no debe exceder del 8%. Ya calculado el porcentaje a agregar, se coloca la muestra en el vaso de agitación se adiciona agua destilada para disolverla y se ajusta el pH a 8 con NaOH (0.1 N). Una vez ajustado el pH, se agregan las enzimas digestivas y se da inicio a la reacción. Las proteasas presentes en el extracto enzimático comienzan a actuar sobre el sustrato provocando la liberación de hidrógeno (H) debido a la ruptura de los enlaces

peptídicos lo cual, provoca una acidificación de la muestra misma que, el pH-stat va midiendo y regulando con la adición de pulsos de NaOH (0.1 N) para mantener el pH óptimo de las enzimas. Por último, se registra el gasto de NaOH (0.1 N) y con este dato, se calcula el GH correspondiente a cada muestra.

El grado de hidrolisis fue calculado mediante la siguiente formula:

$$\text{GH (\%)}: B \times N_B \times 1/\alpha \times 1/M_p \times 1/h_{\text{tot}} \times 100\%$$

Donde B nos indica la suma en mililitros de la solución 0.1 mol/ l NaOH consumido para mantener la estabilidad de la reacción a un pH de 8.0,  $N_B$  es la normalidad de la solución NaOH (en este trabajo fue de 0.1 N),  $\alpha$  es el grado promedio de disociación de los grupos  $\alpha$ - aminoácidos liberados durante la hidrolisis, determinado por la ecuación  $\alpha = (10^{\text{pH}-\text{pK}}) / (1+10^{\text{pH}-\text{pK}})$  siendo pK valores dependientes de la temperatura y tamaño del péptido (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2002). Así, el valor de  $1/\alpha$  equivale al factor de calibración de  $\alpha$  para el pH-stat (pH 8 y temperaturas cercanas a 40 °C).  $M_p$  equivale a la masa proteica cruda en la mezcla de la reacción, estimada al multiplicar la concentración de nitrógeno (N) obtenido por el método de Kjeldahl multiplicado por el factor de conversión adecuado ( $fN$ ) y  $h_{\text{tot}}$  es el contenido total de enlaces peptídicos en la proteína, el cual se expresa como equivalentes de enlaces peptídicos por kilogramo (*miliequivalente* por gramo).

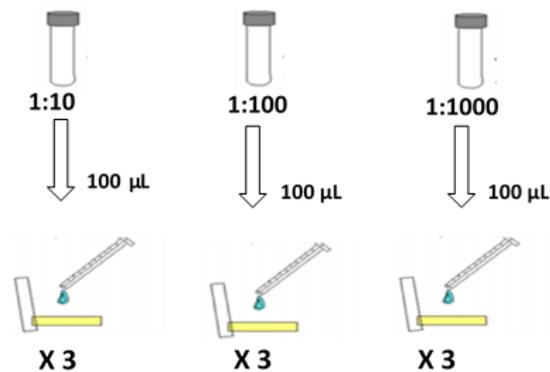
## 3.12 Cultivo de bacterias

### 3.12.1 Toma de muestras

El estimado de bacterias heterótrofas totales (BHT) y tipo *Vibrio* (BTV) se realizó al final del experimento con el objetivo de observar cambios en las bacterias cultivables ya mencionadas procedentes del tracto digestivo de los juveniles alimentados con las dietas formuladas a distinto pH y la dieta control, para lo cual se utilizaron un total de 12 organismos (3 por tratamiento). Los abulones fueron colectados de sus respectivos tanques y se extrajo el tracto digestivo. Posteriormente, se homogenizo el tracto digestivo junto con agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave (dilución 1:10). Después, se procedió a hacer diluciones subsecuentes del homogenizado (1:100 y 1:1000). Este procedimiento se realizó justo al momento de la siembra en los respectivos medios de cultivo.

### 3.12.2 Análisis Bacteriológico

Para el análisis bacteriológico se utilizó el medio de cultivo Agar Soya Tripticasa (TSA Dibico®) adicionado con 2% de NaCl con la finalidad de obtener las bacterias heterótrofas totales cultivables presentes del tracto digestivo del abulón. Mientras que, para obtener el crecimiento de las bacterias tipo *Vibrio* se utilizó el medio de cultivo selectivo Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS Difco™) adicionado con 2% de NaCl. Se tomó un mililitro del homogenizado del tracto digestivo y a partir de ahí se realizaron dos diluciones (1:100 y 1:1000). La siembra en placa de los tratamientos (por triplicado de cada dilución) se inoculó con 100 µL de la dilución y se incubaron a  $25 \pm 1$  °C durante 48 h.



**Figura 4.** Diluciones empleadas y siembra en el medio de cultivo

El conteo de colonias para ambos medios se realizó a las 24 y 48 h posteriores a la siembra, tomando en cuenta los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994) para el conteo de bacterias en placa. Se utilizó un contador de colonias (marca Felisa®), registrando el resultado en unidades formadoras de colonias por mililitro ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) tomando en cuenta la dilución y el inóculo.

Las colonias bacterianas que crecieron en la siembra, fueron aisladas por el método de estriado por separado en placas TSA al 2 % de NaCl y TCBS al 2 % de NaCl. Seleccionando las colonias a partir de su morfotipo, color y dominancia, esto con el fin de obtener un solo tipo de colonia, incubándose a  $25 \pm 1$  °C durante 48 h (Bergey *et al.*, 1994). Con la finalidad de realizar la caracterización fenotípica se realizó con las pruebas convencionales de morfología colonial (tomando en cuenta la forma, borde, superficie y color),

tinción Gram (Kit comercial Golden Bell) y la caracterización bioquímica de citocromo oxidasa, catalasa y gota pendiente (Fernandez-Olmos *et al.*, 2010).

### 3.13 Análisis estadístico

Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se evaluaron mediante la prueba de Shapiro-Wilks y Barlett. Los índices de desempeño biológico, composición proximal, actividad enzimática y conteo de bacterias fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey *post hoc* en caso de existir diferencias significativas. En cuanto al análisis de digestibilidad *in vitro* se analizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%  $p (< 0.05)$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SigmaPlot versión 14 para Windows. En cuanto al porcentaje de digestibilidad *in vitro* y supervivencia los datos fueron transformados mediante la ecuación:

$$y = \arcseno\sqrt{p/100}$$

Dónde:

Y= Valor en porcentaje transformando

P= valor en porcentaje

## Capítulo 4. Resultados

### 4.1 Parámetros evaluados

Durante el transcurso del bioensayo, se observó que los parámetros de cultivo evaluados como la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, irradiancia, amonio, nitritos y nitratos fueron similares entre tratamientos sin presentar diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Además, los valores de estos parámetros físico-químicos, estuvieron dentro de los límites tolerables y adecuados para la especie (Leighton, 2008; DOF, 2013) y presentaron muy poca variación durante los 5.5 meses del período de cultivo, por lo cual, se puede considerar que las condiciones ambientales se mantuvieron en condiciones adecuadas y similares entre los sistemas de recirculación experimentales (Tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros físico-químicos promedio evaluados durante el periodo experimental de 5.5 meses. Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE). n= 4

Variable	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4	Óptimo *
<b>Temperatura (°C)</b>	18.86 ± 0.65	18.87 ± 0.52	18.78 ± 0.68	18.6 ± 0.73	17 - 26
<b>Oxígeno (mg/mL)</b>	6.94 ± 0.11	6.95 ± 0.09	6.93 ± 0.09	6.94 ± 0.10	6.5 - 8
<b>pH</b>	7.77 ± 0.07	7.79 ± 0.08	7.77 ± 0.12	7.78 ± 0.09	7.5 - 8.5
<b>Salinidad (ppt)</b>	34.27 ± 0.23	34.031 ± 2.85	34.39 ± 0.29	34.42 ± 0.28	35
<b>Irradiancia (lum/ft<sup>2</sup>)</b>	1.9 ± 2.13	2.56 ± 3.36	2.62 ± 3.03	3.62 ± 4.71	n.d.
<b>Amonio (mg/L)</b>	0.25	0.25	0.25	0.25	0 - 0.1
<b>Nitritos (mg/L)</b>	0	0	0	0	0 - 0.5
<b>Nitratos (mg/L)</b>	0	0	0	0	0 - 0.025

n.d. no dato; \*Leighton (2008) y DOF (2013).

## 4.2 Índices de desempeño biológico

Los índices de desempeño biológico evaluados en el presente trabajo indican que no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) respecto al peso, crecimiento y supervivencia entre los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con las dietas de distintos niveles de pH (5, 7, 8) y la dieta control con *M. pyrifera* (Tabla 2). Sin embargo, los parámetros de crecimiento y la ganancia en peso final fueron ligeramente mayores en los juveniles alimentados con la dieta de pH 5 (Anexo 2 y 3).

**Tabla 2.** Desempeño biológico de juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con tres dietas formuladas ABKELP® con distintos niveles de pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* durante 5.5 meses. Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE). n= 3.

	Dieta pH 5	Dieta pH 7	Dieta pH 8	Control
Peso inicial (g)	2.20 ± 0.19	2.19 ± 0.11	2.17 ± 0.04	2.14 ± 0.03
Peso final (g)	3.35 ± 0.64	3.16 ± 0.19	2.82 ± 0.05	2.84 ± 0.17
<b>Peso ganado (g)</b>	1.14 ± 0.45	0.96 ± 0.29	0.65 ± 0.09	0.70 ± 0.19
<b>Peso ganado (%)</b>	51.19 ± 15.82	44.59 ± 15.88	30.23 ± 4.74	32.77 ± 9.53
<b>TCE (% día<sup>-1</sup>)</b>	0.22 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.03
Longitud inicial (cm)	2.56 ± 0.09	2.62 ± 0.02	2.61 ± 0.08	2.64 ± 0.006
Longitud final (cm)	3.04 ± 0.22	2.97 ± 0.08	2.88 ± 0.004	2.88 ± 0.05
<b>Crecimiento total (cm)</b>	0.48 ± 0.31	0.35 ± 0.10	0.26 ± 0.08	0.23 ± 0.05
<b>Tasa de crecimiento</b>				
µm día <sup>-1</sup>	29.05 ± 19.05	21.47 ± 6.32	16.02 ± 5.13	14.14 ± 3.15
mg día <sup>-1</sup>	6.88 ± 2.73	5.79 ± 1.75	3.92 ± 0.54	4.19 ± 1.16
<b>Supervivencia (%)</b>	97.6 ± 1.73	98.3 ± 1.15	98.6 ± 0.57	97.6 ± 2.3

- TCE: Tasa de crecimiento específica

## 4.3 Análisis proximal

### 4.3.1 Composición proximal de las dietas

En la tabla 3 se muestra la composición proximal de las tres dietas experimentales con distintos pH (5, 7, 8). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al contenido químico proximal de proteína, lípidos, ceniza y humedad ( $P > 0.05$ ). El contenido de carbohidratos fue calculado por diferencia del resto de los componentes promedio de las dietas y varió de 29.08 a 33.82 %.

Por el contrario, la estabilidad del alimento presentó diferencias significativas entre las dietas con pH 5.0 ( $81.12 \pm 1.5$  %) y pH 8.0 ( $74.67 \pm 0.84$  %). Mostrando una tendencia de que a menor pH menor porcentaje de pérdida de la materia por lixiviación, y por ende mayor estabilidad de la dieta formulada en el agua del sistema de recirculación. El ácido cítrico grado alimenticio usado para modular el pH de las dietas se adicionó en mayor porcentaje en la dieta ácida (pH 5; Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición proximal de las dietas experimentales de distinto pH (5, 7, 8). Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE). Los valores se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante un análisis *post hoc* de Tukey ( $P < 0.05$ ).

	Dieta pH 5	Dieta pH 7	Dieta pH 8	Datos etiqueta fabricante
<b>Proteína cruda (%)</b>	13.91 ± 0.08	14.05 ± 0.8	15.13 ± 0.97	18-20
<b>Lípidos (%)</b>	1.52 ± 0.03	1.52 ± 0.05	1.49 ± 0.11	2-3
<b>Humedad (%)</b>	23.95 ± 0.87	20.51 ± 2.53	22.77 ± 2.98	n.d.
<b>Ceniza (%)</b>	30.32 ± 0.47	30.10 ± 0.35	31.53 ± 1.25	20-22
<b>ELN<sup>1</sup> (%)</b>	30.3	33.82	29.08	50-55
<b>Ácido cítrico<sup>2</sup> (%)</b>	7.7	4.2	0.7	n.d.
<b>Estabilidad (%)</b>	81.12 ± 1.50 <sup>a</sup>	78.15 ± 3.89 <sup>ab</sup>	74.67 ± 0.84 <sup>b</sup>	n.d.

<sup>1</sup>ELN: extracto libre de nitrógeno calculado por diferencia; <sup>2</sup>dato proporcionado por empresa; n.d. no dato.

### 4.3.2. Composición proximal del alga

La composición proximal del alga *M. pyrifera* utilizada como dieta control durante el periodo experimental presentó diferencias significativas en su composición química a través de los meses. *M. pyrifera* tuvo un

porcentaje de proteína mayor en los meses de noviembre y febrero de 1.59 y 1.7 %, respectivamente. Mientras que, en el mes de enero presentó el porcentaje de proteína más bajo de proteína con un valor de 0.21 % (Tabla 4).

**Tabla 4.** Composición proximal (% en peso húmedo) del alga *Macrocystis pyrifera* utilizada como dieta control durante el periodo experimental de 5.5 meses. Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE). Los valores se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante un análisis *post hoc* de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Mes	N	D	E	F	M	A
<b>Proteínas (%)</b>	1.59 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.91 ± 0.23 <sup>c</sup>
<b>Lípidos (%)</b>	0.17 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.08 <sup>bc</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>c</sup>
<b>ELN<sup>1</sup> (%)</b>	49.83	45.34	57.06	36.74	53.86	67.71
<b>Ceniza (%)</b>	28.32 ± 2.48 <sup>b</sup>	33.99 ± 1.94 <sup>a</sup>	22.59 ± 1.25 <sup>c</sup>	36.08 ± 1.49 <sup>a</sup>	35.48 ± 0.63 <sup>a</sup>	20.83 ± 1.55 <sup>c</sup>
<b>Humedad (%)</b>	80.25 ± 0.66 <sup>a</sup>	80.17 ± 0.25 <sup>a</sup>	80.16 ± 0.21 <sup>a</sup>	75.22 ± 0.37 <sup>b</sup>	89.79 ± 0.34 <sup>c</sup>	89.63 ± 1.43 <sup>c</sup>

N: noviembre, D: diciembre, E: enero, F: febrero, M: marzo, A: abril; <sup>1</sup>ELN: extracto libre de nitrógeno calculado por diferencia.

#### 4.3.3. Composición proximal del músculo del abulón

De forma general, se observó que el contenido de proteínas aumento de la condición inicial al final del experimento, mientras que el contenido de lípidos y cenizas disminuyó. Por último, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de humedad inicial y final entre los tratamientos evaluados (Tabla 5).

Específicamente en la composición final, el contenido de ceniza y lípidos disminuyo dentro de los tratamientos evaluados (Tabla 5). El porcentaje lipídico en el músculo de los abulones fue significativamente diferente entre las dietas proporcionadas ( $P < 0.05$ ). Los abulones alimentados con la dieta de pH 5 presentaron el valor de lípidos más alto en músculo ( $0.81 \pm 0.11$  %); mientras que los abulones alimentados con la dieta control registraron el menor porcentaje ( $0.12 \pm 0.01$  %). Se observó que el porcentaje de proteínas en músculo no fue significativamente diferente en abulones alimentados con las dietas formuladas (10.01 a 10.74 %) respecto a aquellos alimentados con la dieta control de *M. pyrifera* (10.10 %;  $P > 0.05$ ). Así mismo se observó que los abulones alimentados con la dieta pH 5 resultaron con un mayor contenido de proteínas ( $10.74 \pm 1.53$  %); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Finalmente, en cuanto al porcentaje de humedad no se observaron diferencias significativas

entre los juveniles alimentados con las dietas formuladas y la dieta control con *M. pyrifera* ( $P > 0.05$ ; Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición proximal inicial y final (% en peso húmedo) del músculo de abulón azul *H. fulgens* alimentado con tres dietas con distinto nivel de pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera*. Los valores se presentan como media y desviación estándar (DE). Los valores se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante un análisis *post hoc* de Tukey ( $P < 0.05$ ). n= 5

	Inicial	Dieta pH 5	Dieta pH 7	Dieta pH 8	Control
<b>Proteína cruda (%)</b>	8.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	10.74 ± 1.53 <sup>b</sup>	10.33 ± 1.21 <sup>b</sup>	10.01 ± 1.23 <sup>b</sup>	10.10 ± 1.29 <sup>b</sup>
<b>Lípidos (%)</b>	1.5 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.44 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>c</sup>
<b>ELN<sup>1</sup> (%)</b>	4.09	3.86	5.95	5.91	5.22
<b>Ceniza (%)</b>	10.69 ± 0.04 <sup>a</sup>	8.94 ± 0.59 <sup>b</sup>	8.34 ± 0.51 <sup>b</sup>	8.69 ± 0.86 <sup>b</sup>	8.75 ± 1.05 <sup>b</sup>
<b>Humedad (%)</b>	75.52 ± 1.01 <sup>a</sup>	75.65 ± 1.52 <sup>a</sup>	75.24 ± 1.30 <sup>a</sup>	74.95 ± 2.0 <sup>a</sup>	75.81 ± 1.5 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>ELN: extracto libre de nitrógeno calculado por diferencia.

## 4.4 Actividad enzimática

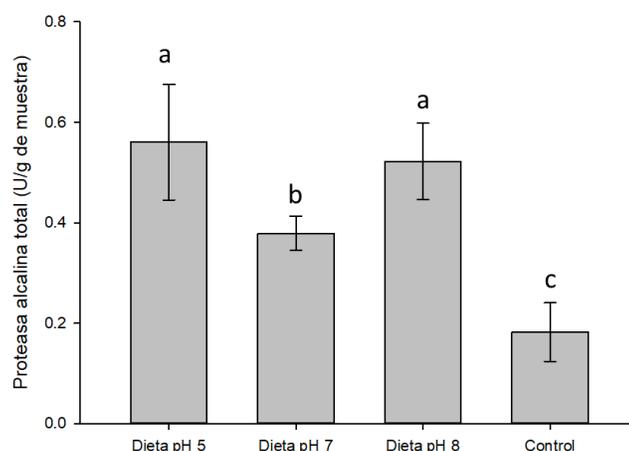
### 4.4.1 Proteasas alcalinas totales

La actividad de proteasas alcalinas presentes en el tracto digestivo del abulón *H. fulgens* varió respecto a la dieta proporcionada (Figura 5). Los juveniles alimentados con la dieta control y la dieta formulada de pH 7 presentaron una menor actividad de proteasas alcalinas ( $0.18 \pm 0.05$  y  $0.37 \pm 0.03$  U g<sup>-1</sup> de muestra, respectivamente) que los abulones alimentados con las dietas pH 5 y pH 8. Mostrando en estas dos últimas una actividad de las proteasas alcalinas similar ( $0.44 \pm 0.21$  y  $0.52 \pm 0.07$ , respectivamente).

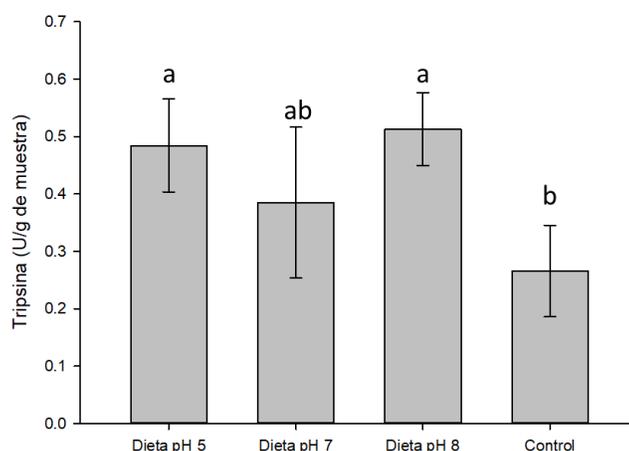
### 4.4.2 Tripsina

La actividad de tripsina en el tracto digestivo no fue significativamente diferente entre los abulones alimentados con la dieta formulada con distinto pH (5, 7, 8). Por el contrario, en los organismos

alimentados con la dieta control con *M. pyrifer* se observó una menor actividad de tripsina ( $0.266 \pm 0.07$  U g<sup>-1</sup> de muestra) respecto a las dietas con pH 5.0 y 8.0.



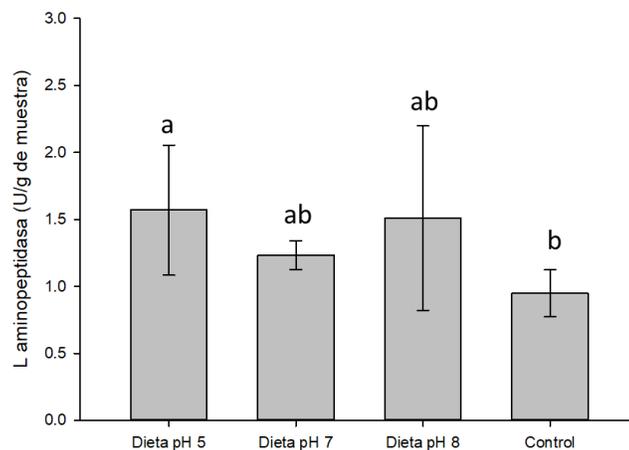
**Figura 5.** Actividad enzimática de proteasas alcalinas totales (U g<sup>-1</sup> de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifer* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar.



**Figura 6.** Actividad enzimática de tripsina (U g<sup>-1</sup> de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5, 7 y 8) y una dieta control con *M. pyrifer* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar.

### 4.4.3 Leucina aminopeptidasa

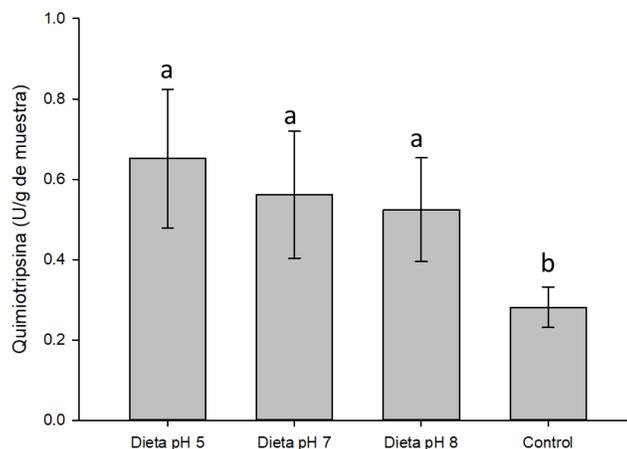
La actividad enzimática de Leucina aminopeptidasa en el tracto digestivo del abulón fue similar entre los tratamientos (con distinto valor de pH 5, 7, 8). Sin embargo, se mostraron diferencias significativas entre la actividad los organismos alimentados con la dieta control y la dieta con pH 5.0 ( $0.948 \pm 0.17$  y  $2.26 \pm 0.14$  U g<sup>-1</sup> de muestra, respectivamente).



**Figura 7.** Actividad enzimática de Leucina aminopeptidasa (U g<sup>-1</sup> de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar.

### 4.4.4 Quimiotripsina

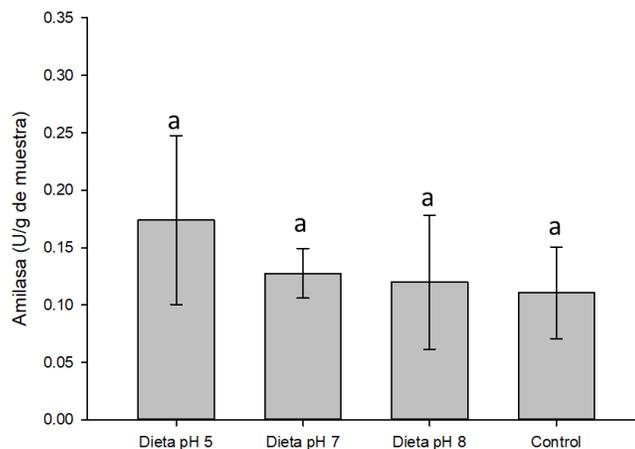
La actividad de quimiotripsina en el tracto digestivo de los abulones alimentados con las dietas formuladas a distintos niveles de pH (5, 7, 8) no fueron significativamente diferente entre ellas. Sin embargo, la actividad de quimiotripsina en los abulones alimentados con la dieta control con *M. pyrifera* resultó significativamente menor ( $0.282 \pm 0.05$  U g<sup>-1</sup> de muestra).



**Figura 8.** Actividad enzimática de la quimiotripsina ( $\text{U g}^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar.

#### 4.4.5 Amilasa

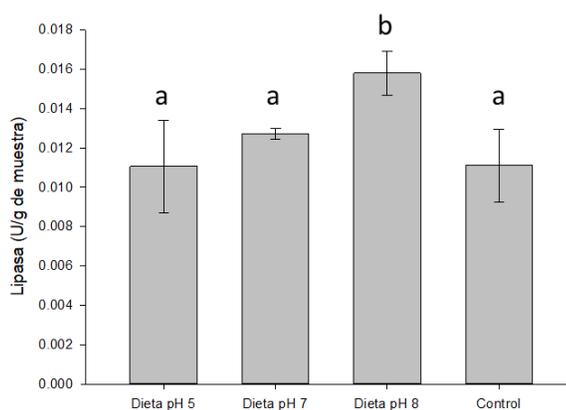
La actividad enzimática de amilasa no mostró diferencias significativas en los abulones alimentados con dietas formuladas con distinto pH (5, 7, 8) y la dieta control con *M. pyrifera* (Figura 9). Sin embargo, se observa un ligero incremento en la actividad de amilasa en el tracto digestivo de los abulones alimentados con la dieta pH 5.0 ( $0.174 \pm 0.07 \text{ U g}^{-1}$  de muestra).



**Figura 9.** Actividad enzimática de la amilasa ( $\text{U g}^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar.

#### 4.4.6 Lipasa

En cuanto a la actividad de la lipasa en el tracto digestivo se observó que, los abulones alimentados con la dieta pH 8 presentaron una actividad de lipasa significativamente mayor ( $0.0158 \pm 0.001 \text{ U g}^{-1}$  de muestra) que el resto de los abulones alimentados con las dietas experimentales (pH 5 y 7) y la dieta control con *M. pyrifera* (Figura 10).



**Figura 10.** Actividad enzimática de la lipasa ( $\text{U g}^{-1}$  de muestra) del tracto digestivo de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* al final del experimento. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar.

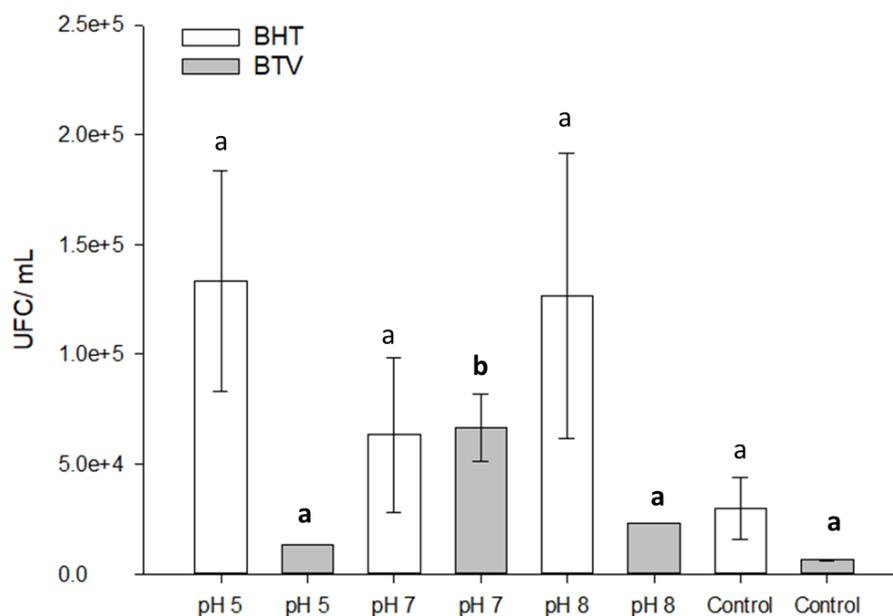
## 4.5 Cultivo bacteriológico

### 4.5.1 Conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT)

De acuerdo a los estimados de los conteos de bacterias heterótrofas totales (BHT) que se lograron cultivar en el medio de cultivo TSA, se observó que no hubo diferencias entre las unidades formadoras de colonias (UFC) en el tracto digestivo de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con las dietas formuladas de distinto pH (5, 7, 8) y la dieta control con *M. pyrifera* (Figura 11). El menor número de UFC se presentó en el tracto digestivo de organismos alimentados con la dieta control ( $30,000 \pm 14,142 \text{ UFC mL}^{-1}$ ).

#### 4.5.2 Conteo de bacterias tipo *Vibrio* (BTV)

Respecto a la carga de bacterias tipo *Vibrio* (BTV) que se lograron cultivar en el medio de cultivo TCBS se pueden observar diferencias significativas entre el tracto digestivo de abulones alimentados con la dieta formulada a pH 7.0 y el resto de las dietas (Figura 11). El cual, presentó una mayor presencia de BTV en el tracto digestivo del abulón con  $66,666 \pm 1,275$  UFC/ mL.



**Figura 11.** Conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT) y bacterias tipo *Vibrio* (BTV) en el tracto digestivo del abulón azul *H. fulgens* alimentados con tres dietas formuladas con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* durante 5.5 meses. Los datos se compararon mediante una prueba ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Las letras indican las agrupaciones realizadas mediante el análisis *post hoc* de Tukey, indicando las diferencias entre los distintos tratamientos. Las barras indican la media y su desviación estándar.

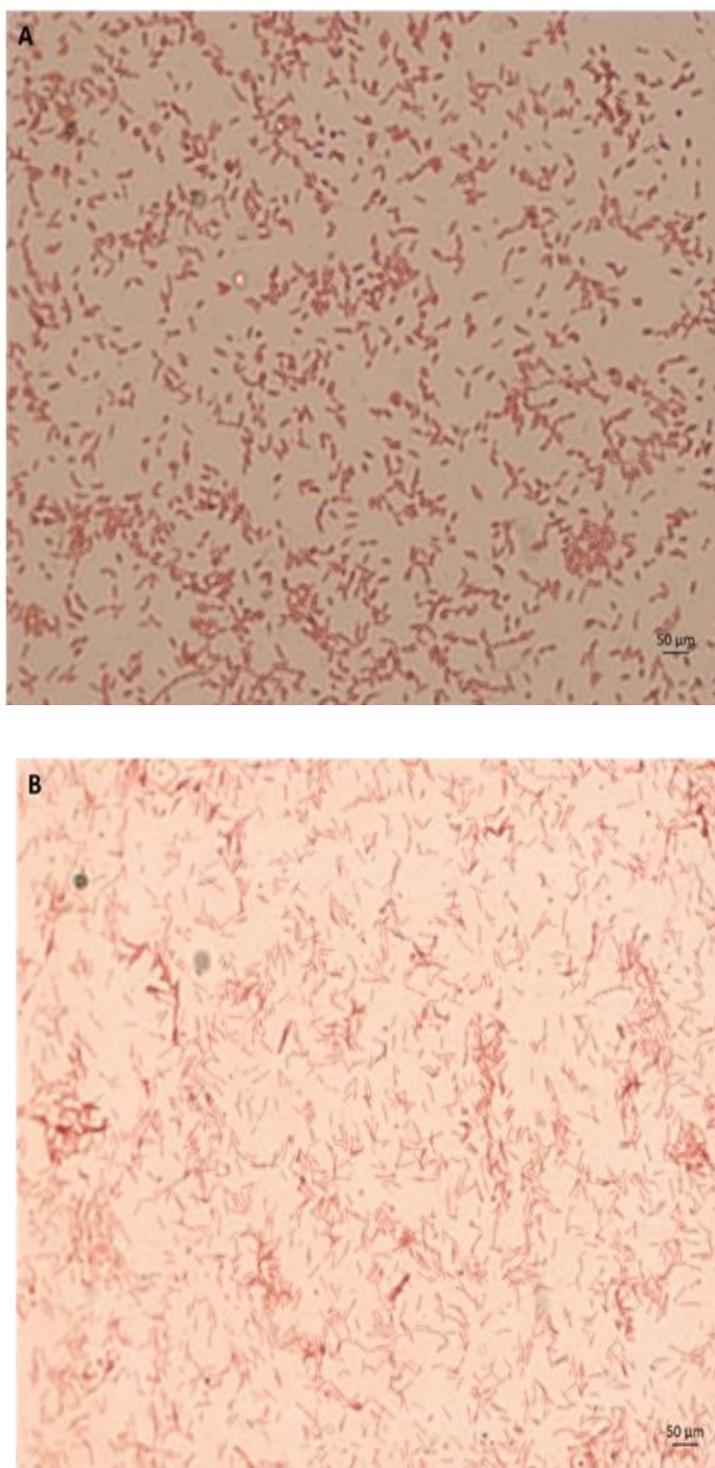
#### 4.5.3 Caracterización morfológica de bacterias

La caracterización de las bacterias heterótrofas presentes en el tracto digestivo del abulón alimentado con las tres dietas formuladas a distinto nivel de pH (5, 7, 8) y la dieta control con *M. pyrifera* se logró hacer mediante diferentes pruebas bioquímicas, y se observó que todas las colonias cultivables fueron positivas para la prueba de oxidasa, catalasa y gota pendiente (colgante o suspendida) esta última, para observar motilidad bacteriana (Tabla 7). Además, la tinción Gram indicó que las bacterias cultivables presentes en el tracto del abulón son tipo Gram negativas. En su mayoría, los tratamientos presentaron bacterias con

forma de bacilos a excepción de la dieta pH 8 y pH 7 que mostraron una colonia de bacterias filamentosas (Figura 12).

**Tabla 6.** Caracterización morfológica de las bacterias del tracto digestivo de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada a distinto pH (5,7 y 8) y una dieta control con *M. pyrifera* cultivables en el medio TSA.

Tratamiento	Colonia	Color	Forma	Borde	Superficie	Morfología microscópica	Tinción Gram	O	C	G.P.
Control	1	Beige	Circular	Entero	Convexa	Bacilos cortos	-	+	+	+
	2	Transparente	Circular	Entero	Convexa	Bacilos cortos	-	+	+	+
	3	Rosa tenue	Circular	Entero	Convexa	Bacilos cortos	-	+	+	+
Dieta pH 5	1	Beige	Circular	Entero	Convexa	Bacilos	-	+	+	+
	2	Beige	Circular	Entero	Convexa	Bacilos	-	+	+	+
Dieta pH 7	1	Beige	Circular	Entero	Convexa	Bacilos alargados	-	+	+	+
	2	Transparente	Filamentosa	Filamentoso	Convexa	Bacilos cortos	-	+	+	+
	3	Rosa tenue	Circular	Entero	Convexa	Bacilos alargados	-	+	+	+
Dieta pH 8	1	Rosa tenue	Circular	Entero	Convexa	Filamentos	-	+	+	+
	2	Amarilla	Filamentosa	Filamentosa	Convexa	Bacilos cortos	-	+	+	+
	3	Beige	Circular	Circular	Convexa	Filamentos	-	+	+	+

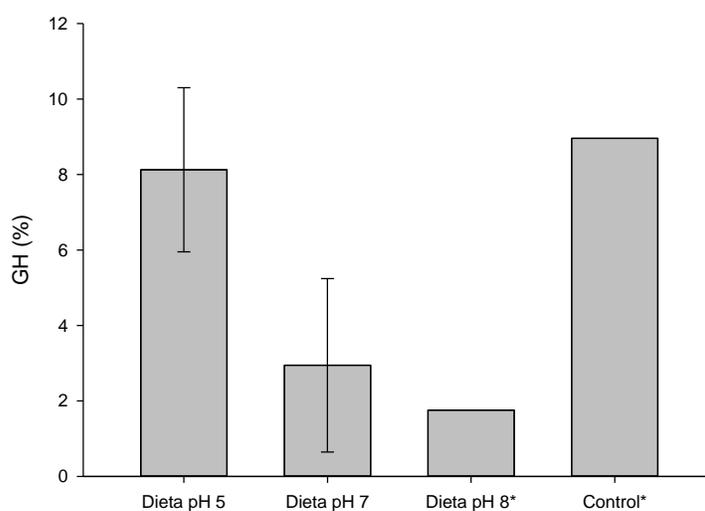


**Figura 12.** Bacterias heterótrofas aisladas del medio de cultivo TSA inoculadas del tracto digestivo de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distintos niveles de pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera*. **A)** bacterias tipo cocobacilos **B)** bacterias tipo filamentosa.

## 4.6 Digestibilidad *in vitro*

### 4.6.1 Digestibilidad *in vitro* de las dietas

En la figura 13 se presentan los resultados de digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales, (tres dietas formuladas con distintos niveles de pH 5, 7, 8), y la dieta control con *M. pyrifera*. La digestibilidad proteica *in vitro* expresada como el grado de hidrólisis (GH %) varió respecto a la dieta proporcionada, mostrando una tendencia a menor digestibilidad conforme aumenta el pH de la dieta de 5 a 8. Además, se detectaron diferencias significativas  $p < 0.05$  entre las dietas formuladas de pH 5 ( $8.12 \pm 2.17$  %) y la dieta formulada a pH 7 ( $2.94 \pm 2.29$  %). En las dietas con pH 8 y el control con *M. pyrifera* solo se pudo realizar una medición de este parámetro (por lo que no se considera en el análisis estadístico). Se observó un valor de GH de 1.75 y 8.96 %, respectivamente. Por lo que observamos que la dieta control con alga fresca y la dieta formulada con pH 5 presentan un valor similar de GH alrededor de 8%.



**Figura 13.** Digestibilidad proteica *in vitro*, expresada como grado de hidrólisis (GH%) de los tratamientos probados utilizando los extractos enzimáticos de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con tres dietas formuladas con distinto pH (5, 7, 8) y una dieta control con *M. pyrifera* durante 5.5 meses. El tiempo de reacción fue de 60 minutos. Las barras indican la media y su desviación estándar (n=2). \* representa los tratamientos con n=1.

Es preciso comentar que, debido al porcentaje proteico de las dietas y su naturaleza insoluble seguramente por el alto contenido de macroalgas (i.e, alginatos), se presentaron complicaciones en la puesta a punto de la técnica del pH-stat. Durante los ensayos preliminares se consumió mucho material de las dietas y no

se logró realizar por triplicado todas las muestras como se tenía pensado. Se intentaron distintas metodologías para intentar diluir al máximo la muestra y lograr un concentrado proteico sugerido en la metodología y no se logró plenamente disolver la proteína soluble requerida por lo que se deben de tomar los datos obtenidos con sus respectivas limitaciones. De igual manera, no se logró realizar el análisis estadístico de los valores de digestibilidad debido al bajo número de réplicas obtenidas.

## Capítulo 5. Discusión

---

El objetivo principal de una dieta formulada es proporcionar los requerimientos nutricionales de la especie y que estos a su vez, sean digeridos eficientemente. Así mismo, deben reflejar un aumento en la supervivencia, peso y crecimiento ganado. En dietas formuladas para abulón se presta atención a la estabilidad de la misma dentro del agua. Esto, con el fin de obtener el mayor aprovechamiento y la menor lixiviación de los nutrientes dada la lenta respuesta al consumo por parte del abulón. En este sentido se conoce que un pH bajo en la dieta favorece su estabilidad lo que podría influir en una mejora de los índices de desempeño biológico.

En el presente trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) en la supervivencia, peso y crecimiento ganado entre los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada a distintos niveles de pH (5,7,8) y un control con el alga *M. pyrifera*. Cabe mencionar que se observó un crecimiento y ganancia en peso ligeramente mayor en los organismos alimentados con la dieta pH 5 mismo que no fue estadísticamente significativo lo cual, podría estar estrechamente relacionado con la estabilidad del pellet dentro del agua lo que se traduce en un mayor aprovechamiento por parte del organismo.

En este sentido, en la actualidad existe una amplia literatura respecto a la formulación de dietas para abulón, con la finalidad de poder sustituir la dieta fresca tradicionalmente usada (i.e., macroalgas) por una dieta formulada que cumpla con los requerimientos nutricionales y optimice el crecimiento de la especie en cuestión (Durazo-Beltran *et al.*, 2003). Las ventajas que este tipo de dietas presentan, podemos mencionar su composición proximal constante, mayor disponibilidad, fácil de usar, menor factor de conversión alimenticia, fácil de almacenar y transportar, entre otras (Venter *et al.*, 2018). En México, la empresa Algas Marinas S. A. de C. V., produce una dieta comercial denominada *ABKELP*<sup>®</sup>, en varias presentaciones, que se encuentra bien posicionada a nivel internacional (Australia, EUA, Corea, China, Japón, Chile y Sudáfrica) por promover el crecimiento en el cultivo abierto o semi-abierto de diferentes especies de abulones (comm. Pers. Roberto Marcos, 2020). Por otra parte, a nivel internacional se están desarrollando investigaciones relacionadas con el uso de sistemas de recirculación acuícola (RAS) para el cultivo de abulón, con la finalidad de hacer un mejor uso del agua y reducir los costos de electricidad asociados al bombeo, principalmente (Xiaolong *et al.*, 2018). Sin embargo, uno de los factores que afecta la eficiencia de la dieta *ABKELP*<sup>®</sup> (formulada a un pH 8) es que presenta típicamente entre un 24 y 26 % de pérdida de materia seca (i.e., 74-76 % de estabilidad) en sistemas RAS de abulón (datos del presente estudio). En el desarrollo de dietas formuladas adecuadas para abulón se presta particular atención a la

estabilidad de la misma dentro del agua, ya que los hábitos alimenticios de la especie lo requieren (Sales y Janssens, 2004). Esto, con el fin de obtener el mayor aprovechamiento y la menor lixiviación de los nutrientes dada la lenta respuesta al consumo por parte del organismo (Bansemer *et al.*, 2016). En este sentido, existe evidencia que un pH bajo en la dieta favorece su estabilidad, lo que podría influir en una mejora de los índices de desempeño biológico de los organismos (crecimiento, supervivencia y salud). Rivero y Viana (1996) evaluaron el efecto del pH en la estabilidad, dureza y palatabilidad de la dieta en juveniles de abulón azul *H. fulgens* ( $14.5 \pm 1.7$  g) con una dieta de ensilados de vísceras de abulón moduladas a distintos pH (4, 5, 6, 7 y 8). En este estudio, el pH normal del ensilaje fue 4 (dieta control) y se neutralizó utilizando carbonato de calcio y sodio (2.5% de cada uno) en el resto de las dietas, y posteriormente se obtuvo el pH deseado adicionando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Los resultados del estudio indicaron que las dietas con pH 4, 6, 7 y 8 tuvieron una mayor estabilidad en el agua (> 82 %) y un mayor consumo respecto a la dieta con pH 5 (76.9 %), siendo esta última la menos consumida. En contraste, en el presente estudio se obtuvo una mayor estabilidad en la dieta con pH 5 (81 %) respecto a las dietas pH 7 y 8 (78 y 74 %, respectivamente). Otro aspecto que difiere entre el trabajo de Rivero y Viana (1996) y el reportado aquí, es que ellos encontraron un decremento en el pH del agua de cultivo al usar las dietas de pH 6, 7 y 8, mientras que en el presente estudio la dieta no modificó el pH del agua de cultivo. Es probable que la discrepancia entre los estudios pudiera deberse a la naturaleza y cantidad de los ingredientes usados en las dietas, y a los compuestos usados para neutralizar el ensilaje y ajustar el pH de cada dieta (Sales y Janssens, 2004). Como la formulación de las dietas no es la misma entre estudios, es probable que esta pueda estar interactuando en la estabilidad, dureza y palatabilidad de la dieta. Por ejemplo, Rivero y Viana (1996) utilizan como aglutinante almidón y alginato de sodio; mientras que en la dieta *ABKELP*<sup>®</sup> se utiliza el *ALGIBINDER*<sup>®</sup>, un producto 100% de algas marinas. Además, que, para modular el pH final en las dietas *ABKELP*<sup>®</sup> se utilizó un ácido orgánico (ácido cítrico), y también utilizan carbonato de calcio como fuente de minerales en conjunto con fósforo. Y en este sentido, de las cantidades usadas en la formulación de las dietas de este experimento se observa una relación indirecta entre porcentaje de ácido cítrico y el pH (pH 5 con 7.7 %; pH 7 con 4.2 % y pH 8 con 0.7 %) y su estabilidad (menor pH mayor estabilidad en el agua o menor pérdida por lixiviación).

Por otra parte, los índices de desempeño biológico (supervivencia, peso y crecimiento ganado) obtenidos en este trabajo no presentaron diferencias significativas entre los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con dieta formulada *ABKELP*<sup>®</sup> a distintos niveles de pH (5, 7, 8) y la dieta fresca con *M. pyrifera*. Resultados similares fueron obtenidos por Serviere-Zaragoza y colaboradores (2001), quienes observaron un crecimiento similar entre juveniles de abulón azul *H. fulgens* ( $17.3 \pm 2.2$  mm;  $0.44 \pm 0.2$  g) alimentados con *M. pyrifera* y una dieta formulada control. Sin embargo, cuando compararon con otras

dietas frescas, el crecimiento fue significativamente menor al alimentar con las macroalgas *Eisenia arborea*, *Gelidium robustum* y el pasto marino *Phyllospadix torreyi*. En contraste, en el presente trabajo se observó un crecimiento y ganancia en peso promedio mayor en los organismos alimentados con la dieta pH 5 con respecto a la dieta control de macroalgas. En la dieta pH 5 se obtuvo una tasa de crecimiento diario (TCD) de 29.05  $\mu\text{m}$  (DE 19.05) y 6.88 mg (DE 2.73); mientras que, en la dieta control con *M. pyrifera* fue de 14.14  $\mu\text{m}$  (DE 3.15) y 4.19 mg (DE 1.16), de longitud de concha y peso, respectivamente. Al comparar estadísticamente estos dos tratamientos no se observaron diferencias significativas, dada la alta variabilidad en longitud y peso observada en los organismos de la dieta pH 5 (Anexo 6). Sin embargo, en trabajos previos con la dieta ABKELP®, con diferentes niveles de proteínas y lípidos, y una dieta control con *M. pyrifera* llevados a cabo con juveniles de abulón rojo *H. rufescens* de 3 meses (6 mm) se registró un crecimiento significativamente mayor al alimentar los abulones con las dietas formuladas respecto al control (Lafarga-De la Cruz *et al.*, 2018).

Las tasas de crecimiento obtenidas en el presente trabajo son similares a otros estudios realizados en juveniles de abulón azul *H. fulgens*. Por ejemplo, Serviere-Zaragoza y colaboradores (2016) observaron resultados similares en un estudio evaluando distintas algas rehidratadas (12-18  $\mu\text{m dia}^{-1}$  y 4.5-8.2 mg  $\text{dia}^{-1}$ ) al alimentar juveniles de 3.16 cm (DE 0.01) y al utilizar alga fresca en este estudio (14.14  $\mu\text{m}$  y 4.19 mg). Por su parte, Serviere-Zaragoza y colaboradores (2001) reportan TCD promedio que variaron de 19-46  $\mu\text{m dia}^{-1}$  y 1.52-5.49 mg  $\text{dia}^{-1}$  en juveniles de 1.73 cm (DE 0.22), cuando los abulones fueron alimentados con diferentes dietas de algas frescas y una dieta formulada como control. Resultados que también son similares a otro trabajo previo, evaluando juveniles de 1.2-1.5 cm (6-7.6 meses) cultivados en barriles en el mar y alimentados con algas frescas locales, donde se obtuvieron TCD de 49.4  $\mu\text{m day}^{-1}$  (Gonzalez-Aviles y Shepherd, 1996). Las diferencias observadas en las TCD entre los diferentes estudios publicados (Anexo 7) pueden deberse a las tallas iniciales de juveniles utilizados en los bioensayos, la temperatura de cultivo, la variabilidad en la composición proximal de las dietas frescas, la densidad de cultivo (biomasa), los sistemas de cultivo usados, entre otros aspectos a considerar que pueden afectar el crecimiento de abulones (Morash y Alter, 2016). Por otro lado, el suministro de alimentos formulados provee tasas de crecimiento mayores. Un ejemplo de esto es el trabajo realizado por López y colaboradores (1998) donde observaron que al proporcionar una dieta formulada a base de harina de pescado en *H. tuberculata* se obtuvieron tasas de crecimiento de 134  $\mu\text{m dia}^{-1}$ . En cuanto a la supervivencia, no se encontraron diferencias significativas, obteniendo porcentajes mayores al 90% en los cuatro tratamientos lo cual, se considera relativamente alto. Durazo y colaboradores en (2003) evaluaron el efecto del alga *M. pyrifera* en contraste con una dieta formulada en juveniles de abulón azul de aproximadamente  $5.9 \pm 0.06$  mm

obteniendo una supervivencia mayor en la dieta formulada en comparación con el alga fresca de  $48.88 \pm 3.68$  y  $36.97 \pm 5.08$ , respectivamente.

Respecto al contenido proximal del músculo de los juveniles de abulón azul alimentados con una dieta formulada con distintos valores de pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de proteína, humedad y ceniza. En cuanto al contenido lipídico se observaron diferencias entre los tratamientos, siendo los abulones alimentados con la dieta pH 7 y la dieta control los que resultaron en los porcentajes lipídicos en músculo más bajos, cercanos al 0.1%. Esta variación en la composición lipídica del músculo podría atribuirse a un incremento en las reservas de glucógeno y al crecimiento del abulón. Resultados similares fueron reportados por Knauer en 1994 quien reportó la composición proximal del tejido blando de *H. midae* de dos distintas tallas (10-20 mm y 45-55 mm) observando una disminución de lípidos respecto al tamaño lo cual, dicho autor lo relaciono con el crecimiento y el incremento de reservas de glucógeno en el músculo. Así mismo, los resultados de la composición proximal de los abulones con talla inicial de 45-55 mm fueron similares a los obtenidos en el presente trabajo, indicando valores similares en el contenido de proteína, ceniza y humedad en el abulón *H. midae* y el abulón azul *H. fulgens* de tallas entre 45-55 mm. Por otro lado, Durazo y colaboradores (2003) reportaron resultados similares al evaluar el efecto de *Macrocystis pyrifera* y una dieta formulada en juveniles de abulón azul de 5.9 mm y un peso de 24.2 mg. Los autores mencionan, que la composición lipídica de los abulones fue menor al alimentar con una dieta formulada ( $4.69 \pm 0.16$  %), con respecto a los abulones alimentados con solo con *M. pyrifera* y también con una mezcla de ambas dietas ( $4.88 \pm 0.10$  y  $5.36 \pm 0.14$  %, respectivamente). En cuanto a la composición proteica del presente trabajo fue ligeramente más alta al proporcionar la dieta formulada a pH 5.0 ( $10.79 \pm 1.53$  %) respecto a la dieta control con alga fresca ( $10.10 \pm 1.29$  %). Cruz- Suárez y colaboradores (2000) mencionan que la composición dietética de vitaminas, aminoácidos y factores antinutricionales cambia significativamente durante el verano y el invierno dado que la composición del alga se ve directamente afectada por las condiciones ambientales. Es posible que los resultados de la composición proximal de los organismos en el tratamiento control del presente trabajo hayan sido directamente afectados por la calidad nutricional del alga *M. pyrifera* a través del tiempo (i.e., variaciones en la composición proximal); sin embargo, esto se tendría que evaluar en un estudio particular.

En dietas formuladas adicionadas con ácidos orgánicos el efecto sobre la composición proximal del músculo varía dependiendo del organismo en cuestión. Su y colaboradores (2014) evaluaron la inclusión de ácido cítrico a distintas concentraciones 0.0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 g kg<sup>-1</sup> en la dieta del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con un peso inicial de  $5.57 \pm 0.21$  g. Los distintos niveles de inclusión no resultaron en diferencias

estadísticamente significativas respecto a la composición proximal del músculo del camarón. Por su parte Khajepour y Hosseini (2012) evaluaron dietas con distintas fuentes de proteína y nivel de inclusión de ácido cítrico en el esturión *Huso huso*. Los resultados mostraron diferencias significativas en la composición de ceniza y lípidos, resultados similares a los observados en el presente trabajo. Dichos autores mencionan que estas variaciones podrían deberse a una mejor digestibilidad y aprovechamiento de los minerales presentes en la dieta lo cual, se ve reflejado en un mayor crecimiento por parte del organismo dado que, los minerales son esenciales en la formación de tejido esquelético y blando, así como también son componentes esenciales de enzimas encargadas de las reacciones bioquímicas del organismo. En abulón, se ha evaluado el efecto de ácidos y sales orgánicas como promotores del crecimiento. Goosen y colaboradores (2011) evaluaron dos dietas en juveniles de *H. midae* con talla inicial de 23 mm, una adicionada con una mezcla de ácidos orgánicos y la segunda una mezcla de sales orgánicas. Además, evaluaron dos dietas control (uno negativo y uno positivo adicionando 30 ppm de avilamicina como antibiótico). Los resultados mostraron que, al proporcionar la temperatura óptima para la especie (16.5 °C), se obtiene un incremento mayor en las dietas adicionadas con ácidos y sales orgánicas (15.8 y 17.9%, respectivamente) en contraste con ambos controles.

En cuanto a las enzimas digestivas de los organismos, es bien conocido que factores como la edad y talla del organismo, la temperatura de cultivo, la dieta o incluso con el sexo del organismo en cuestión por mencionar algunos pueden afectar la actividad de éstas (Serviere-Zaragoza *et al.*, 1997). Se piensa que estos cambios en la actividad enzimática tienen como principal propósito el incrementar el aprovechamiento de los nutrientes presentes en la dieta. Bansenmer y colaboradores en 2016 evaluaron la respuesta dependiente de la edad (1 y 2 años) de la actividad enzimática en *H. laevigata* respecto a la temperatura del agua (14, 18 y 22 °C) y distintos niveles de proteína en la dieta. Los resultados mostraron que conforme aumenta la edad del abulón la actividad de enzimas digestivas (tripsina, amilasa y lipasa) se puede disminuir hasta en un 53%. Además, mencionan que la actividad de lipasas y  $\alpha$  amilasas incrementaron respecto al incremento en la temperatura de cultivo.

Las enzimas presentes en el tracto digestivo de un organismo son un determinante clave en la digestibilidad y asimilación de los nutrientes. Enzimas tales como pepsina, tripsina y aminopeptidasas por mencionar algunas, son las responsables de la digestión de las proteínas presentes en la dieta. Serviere-Zaragoza y colaboradores (1997) caracterizaron las enzimas proteasas del tracto digestivo en el abulón azul *H. fulgens* con una talla inicial de aproximadamente 150 mm. Los resultados mostraron una actividad proteolítica mayor en los fluidos intestinales y rectales a pH alcalino seguido del hepatopáncreas y por último del estómago a pH ácido. Además, se observaron diferencias en el intestino y recto donde se

registró una actividad de tripsina de 0.05 y 0.18 U mg<sup>-1</sup> de muestra, respectivamente y de la quimi tripsina de 3.38 y 1.85 U mg<sup>-1</sup> de muestra, respectivamente. Además, reportan diferencias significativas en la actividad de estas enzimas respecto al sexo, siendo las hembras las que expresaban una actividad mayor. Con el fin de tener un panorama más completo sobre la actividad de las enzimas digestivas y su comportamiento con respecto a la dieta suministrada en abulón García- Esquivel y Felbeck (2006) evaluaron la actividad de las enzimas digestivas a lo largo del tracto digestivo del abulón rojo *H. rufescens* alimentado con una dieta formulada y una dieta natural a base macroalgas. Los resultados mostraron la presencia de dos regiones principales en la digestión: la región donde se encuentra la glándula digestiva, registrando actividad de celulasas y lisozimas, quimi tripsina y proteasas, así como la región de la boca e intestino donde se registró actividad de lipasas y aminopeptidasas, dicha actividad se vio significativamente modificada por la dieta suministrada.

Actualmente se conoce que la composición de la dieta puede modificar la actividad digestiva de un organismo. Sin embargo, el efecto de los ácidos orgánicos sobre la actividad de las enzimas digestivas es un área aun en desarrollo. Li y colaboradores (2009) reportaron que el ácido cítrico en la dieta (i.e., 10 g kg<sup>-1</sup>) dio como resultado un aumento en la actividad de las proteasas acidas en un 29.6 % en el tracto digestivo de la tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* de aproximadamente 150 g de peso. Además, reportan que la actividad de amilasa en intestino (54,464.3 ± 2063.2 y 113,482.8 ± 6534.6 U g<sup>-1</sup> por pez, respectivamente) eran elevadas debido a los cambios en el pH intestinal inducidos por el ácido cítrico en la dieta. Resultados similares se observaron en el presente trabajo, donde la actividad de proteasas fue significativamente mayor en los organismos alimentados con la dieta con un pH 5 (0.56 ± 0.11 U g<sup>-1</sup> de muestra) respecto a los alimentados con la dieta control y la dieta con un pH 7, los cuales presentaron una actividad de 0.18 ± 0.05 y 0.37 ± 0.03 g<sup>-1</sup> de muestra, respectivamente. Por el contrario, en el presente trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de amilasa entre los distintos tratamientos. Sin embargo, existe un ligero aumento en los organismos alimentados con la dieta pH 5 con una actividad de 0.174 U g<sup>-1</sup> de muestra. Resultados similares son reportados por Su y colaboradores (2014) en camarón *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 5.57 ± 0.21 g donde se evaluó la actividad de proteasas y amilasas tras ser sometidos durante 45 días a una dieta con distintas concentraciones de ácido cítrico (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 g kg<sup>-1</sup>). La actividad de amilasa respecto a las dietas no presentó diferencias significativas. Por otra parte, Castillo y colaboradores (2014) realizaron la inclusión de tres distintos ácidos orgánicos lactato de calcio (1.5 y 3 %), ácido cítrico (0.75 y 1.5 %) y dicromato de potasio (0.75 y 1.5 %) en la corvina roja *Sciaenops ocellatus* de 8.01 ± 0.29 g. Los resultados mostraron que el pH estomacal se relacionó con el pH de la dieta experimental generando un aumento en el peso conforme incrementaba el porcentaje de inclusión del ácido orgánico (1.5%). Dicho

crecimiento se le atribuyó al incremento en la actividad de las enzimas digestivas donde la pepsina (enzima presente en estómago), tripsina y lipasa (enzimas pancreáticas secretadas al intestino) así como leucina aminopeptidasa y fosfatasa (enzimas del borde de cepillo intestinal) presentaron mayor actividad conforme aumento la inclusión de ácido orgánico en la dieta. De manera similar la actividad de tripsina y leucina aminopeptidasa se vio afectada por el pH de la dieta en el presente trabajo.

En los resultados de la digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales utilizando un homogenizado del tracto digestivo de los abulones en el presente trabajo indicaron un mayor grado de digestibilidad (i.e., grado de hidrólisis) en la dieta con pH 5 y la dieta control con DH de 8.12 y 8.96 %, respectivamente. En contraste, las dietas con pH 7 y pH 8 resultaron con valores de DH menores al 3%. Hoy en día, se conoce que la adición de ácidos orgánicos en la dieta da como resultado un mejor aprovechamiento de los nutrientes (Li *et al.*, 2009; Khajepour y Hosseini, 2012; Castillo *et al.*, 2014). Dentro de las hipótesis asociadas a esto en animales rumiantes se encuentran las siguientes: la adición de ácidos orgánicos reduce el pH gástrico lo que conduce a un aumento de la actividad enzimática de la pepsina, el reducir el pH de la dieta puede aumentar la solubilización de minerales lo que lleva a un mayor aprovechamiento y por último, la adición de ácidos orgánicos inhibe la colonización de microbios dañinos en el intestino los cuales de cierta manera podrían estar utilizando nutrientes destinados al huésped. Dichas hipótesis podrían ayudarnos a explicar los valores de digestibilidad más altos en la dieta con pH 5 respecto a los pH 7 y pH 8. Sin embargo, también pudiera estar ocurriendo que la dieta con pH 5 permite una solubilización mayor de los nutrientes. Alarcón y colaboradores (2002) evaluaron diferentes fuentes de proteína utilizadas en alimentos acuícolas mediante el sistema de pH-stat. Los resultados indicaron que al realizar una pre-digestión ácida en las distintas fuentes de proteína utilizadas se observaba un mayor grado de hidrólisis (GH).

Castro Gonzales y colaboradores (1994) evaluaron el contenido proximal del alga *Macrocystis pyrifera* durante invierno y verano, los resultados mostraron que en ambas épocas del año predomina el contenido de ceniza y carbohidratos. Por el contrario, menciona que las algas pardas poseen un bajo porcentaje de nitrógeno y que gran parte de él no es de origen proteico. A pesar de este bajo porcentaje se considera de calidad aceptable debido al perfil de aminoácidos. Además, dicho autor menciona que la digestibilidad *in vitro* es mayor durante el invierno lo cual, está relacionado con una disminución en la concentración de alginatos debido a que estos complican la lectura de la muestra. Tomando como base estos resultados, ayudaría a explicar la

dificultad en el análisis de digestibilidad *in vitro* por medio del pH-stat en el presente trabajo. Sin embargo, no se realizó la digestión de las macroalgas a través del tiempo lo que nos hubiera ayudar a discernir mejor este factor. Los resultados de digestibilidad *in vitro* del presente trabajo deben tratarse con cautela, debido al tamaño de muestra. Cabe mencionar que el análisis en pH-stat de las dietas evaluadas presentaron dificultades en la lectura debido a la viscosidad de la misma y los posibles problemas que puede generar las lecturas del pH con el electrodo utilizado. Dado la naturaleza de la dieta es necesario la implementación de un electrodo para materiales viscosos (como el usado para medir pH en los alimentos) que permita cuantificar el cambio del pH durante la digestión por medio del método del pH-stat.

Se cree que los resultados del presente trabajo están relacionados con lo mencionado por Castro-Gonzalez y colaboradores (1994). Aunque no se cuenta con las cantidades y composición de los ingredientes exactos utilizados en las dietas experimentales dado que están bajo patente, se puede inferir que estas contienen una gran cantidad de carbohidratos y alginatos, así como un bajo porcentaje de proteína soluble, factores que dificultaron la lectura del pH por medio del pH-stat. Adicionalmente, por haber trabajado con una formulación cerrada por la protección del secreto industrial (Algamar S.A de C.V.), no se puede llegar a una conclusión concreta sobre los posibles factores que influyeron en los resultados del DH, debido en parte a la falta de información sobre la composición exacta de las dietas. Es necesario una mayor caracterización de los ingredientes utilizados para lograr inferencias más adecuadas sobre la misma. Otro factor importante es la baja concentración de proteína en las dietas, por lo que se recomienda buscar alternativas que permitan concentrar la proteína soluble presente en la dieta y poder así, realizar más mediciones.

Dentro de los trabajos acerca de la digestibilidad *in vitro* en abulón se encuentra el realizado por Shipton y Britz en 2002. En el cual, evaluaron la digestibilidad *in vitro* de 34 posibles fuentes de proteína utilizadas en las dietas formuladas para abulón *H. midae* por medio de pH-stat. Dichas fuentes proteicas fueron evaluadas individualmente utilizando un sistema de tres enzimas descrito por Hsu y colaboradores (1977). Los resultados de estos autores indican que es posible utilizar la técnica para predecir de manera confiable la digestibilidad aparente de la proteína tras ser comparada con los coeficientes de digestibilidad *in vivo*. Dichos autores registraron que la fuente de la proteína influye en la digestibilidad de la misma, mencionan que las fuentes de origen animal evaluadas tienen una digestibilidad mayor y más rápida a las fuentes de origen vegetal

Por último, es importante mencionar que la metodología de digestibilidad *in vitro* por medio del pH-stat, solo nos ayuda a simular una digestión alcalina. Esto podría de alguna manera alterar los resultados de

hidrolisis observados. Un claro ejemplo de esto se muestra en el trabajo realizado por Alarcón (2002) en el cual evaluó el efecto de una pre-digestión ácida a los ingredientes y dietas antes de realizar la digestión de las proteínas por medio de pH-stat. Los resultados mostraron diferencias significativas en el grado de DH donde las dietas previamente acidificadas mostraron un mayor porcentaje de hidrolisis.

Hoy en día se conoce que los cambios en la población y composición de la microbiota intestinal tienen un fuerte impacto en el rendimiento en términos de crecimiento, utilización de nutrientes, respuesta inmune y resistencia a organismos patógenos. Estos cambios pueden estar sujetos a distintos factores físicos, químicos y biológicos. En el presente trabajo se evaluaron las bacterias presentes en el tracto digestivo del abulón cultivables en los medios TSA y TCBS. De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que el conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT) no resultó con diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, las bacterias procedentes del tracto digestivo de los organismos alimentados con la dieta pH 5 y pH 8 mostraron un ligero incremento en las unidades formadoras de colonias (UFC) con un promedio de 133,333 y 126,666 UFC, respectivamente. Resultados similares han sido reportados en otras especies alimentadas con dietas formuladas a bajo pH (Ramli *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2014; Chuchird *et al.*, 2015). Por su parte, Wing-Keong y Chik-Boon (2017) mencionan que el suplementar con ácidos orgánicos en la dieta favorece el crecimiento de bacterias benéficas presentes en el tracto digestivo y reduce las poblaciones potencialmente patógenas tales como el tipo *Vibrio spp.*

Goosen y colaboradores (2011) probaron tres mezclas de ácidos orgánicos en contraste con un control positivo adicionado con antibiótico y un control negativo (sin antibiótico) en la dieta de juveniles de *H. midae* de  $2.1 \pm 0.77$  g y  $23.4 \pm 2.72$  mm. El experimento se desarrolló en dos fases, una en condiciones de temperatura controlada ( $16.5$  °C) y la segunda en condiciones de temperatura no controlada ( $18.5 - 20.5$  °C). Los resultados mostraron una mejora significativa en el peso y tasa de crecimiento de los organismos alimentados con las dietas adicionadas con ácidos orgánicos ( $27$  mg día<sup>-1</sup> y  $76$  µm día<sup>-1</sup>) respecto al control positivo ( $25.24 \pm 2.66$  mg día<sup>-1</sup> y  $71.43 \pm 6.69$  µm día<sup>-1</sup>) y el control negativo ( $24.78 \pm 2.45$  mg día<sup>-1</sup> y  $67.27 \pm 4.19$  µm día<sup>-1</sup>) en temperatura controlada. Sin embargo, los autores mencionan que no se logró demostrar el efecto de los ácidos orgánicos sobre la microbiota intestinal. Los estudios microbiológicos mostraron un total de 22 colonias distintas dentro de las que se encontraron 7 colonias Gram negativas, 9 Gram positivas y 6 colonias sin identificar. De manera similar, en el presente trabajo no se lograron detectar diferencias significativas en los conteos de las bacterias cultivables en medios (TSA y TCB) como resultado de los distintos tratamientos esto, debido a que los recuentos en placa mostraron variaciones altas. Sin embargo, se lograron hacer observaciones cualitativas con respecto a ciertas bacterias que dominaban la microflora intestinal cultivada en los distintos medios.

Actualmente, se ha demostrado que la adición de ácidos orgánicos en la dieta inhibe el crecimiento de varios tipos de *Vibrio*. La eficacia depende del tipo de ácido, pH y dosis utilizada. Sin embargo, este beneficio no es generalizado ya que influye significativamente por la especie en cuestión y el estadio de vida en el que se encuentra. La carga de bacterias tipo *Vibrio* (BTV) en el presente trabajo resultó con diferencias significativas en los organismos alimentados con la dieta pH 7 respecto a los demás tratamientos. Actualmente se acepta que los ácidos orgánicos tienen cierta eficacia antimicrobiana, la cual puede ser bacteriostática y bactericida. Esto, se debe a su capacidad de atravesar la membrana semipermeable de las bacterias y de esta manera disociarse en el citoplasma y modificar el pH neutro de la misma acidificándolo y afectando procesos vitales (Wing-Keong y Chik-Boon, 2017). Esto podría ayudar a explicar el incremento de las bacterias tipo *Vibrio* en los organismos alimentados con la dieta pH 7.

En organismos terrestres los ácidos orgánicos han sido utilizados en el control de patógenos bacterianos y como promotores en la salud del ganado. Específicamente en especies acuáticas tales como el camarón y peces se ha demostrado que la inclusión de ácidos orgánicos en la dieta reduce la población de bacterias potencialmente dañinas en el tracto intestinal (Adams y Boopathy, 2013; Silvia *et al.*, 2013; Chuchird *et al.*, 2015). Ramli y colaboradores (2005) adicionaron dicromato de potasio (0,2,3 y 5 g kg<sup>-1</sup>) en el alimento formulado de la tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) de aproximadamente 16.7 g. Los resultados mostraron una ganancia en peso y tasa de crecimiento respecto la adición del ácido. Además, tras ser sometidos a un reto con *V. anguillarum* se mostraron mejoras en la resistencia al patógeno al incrementar la dosis del ácido orgánico en la dieta. Wing-Keong y Chik-Boon (2017) mencionan que la colonización de bacterias benéficas en el intestino puede inhibir el crecimiento de otras por competencia directa. Sin embargo, en el caso particular del abulón no se ha reportado un efecto significativo en la adición de ácidos orgánicos respecto a la microflora intestinal.

Por último, es importante mencionar que la adición de ácidos orgánicos en las dietas formuladas no solo trae consigo una disminución en los costos de producción. Recientemente se ha descubierto que también presenta un beneficio en el organismo que lo consume, estos pueden ser en relación al crecimiento, ganancia en peso, un mayor aprovechamiento de los nutrientes o mayor resistencia a enfermedades por mencionar algunos. En el presente trabajo la adición de ácido cítrico en la dieta formulada ajustada a pH 5 presentó una mejora en la estabilidad de la dieta durante su exposición al agua (81.12 %). Así mismo, representó un beneficio en los abulones alimentados con ella. Por ejemplo, se observó un crecimiento ligeramente mayor y una mejor digestibilidad *in vitro*, lo que a largo plazo puede resultar en un menor tiempo de cultivo debido a una mayor eficiencia en el uso de esta dieta. El presente proyecto da pauta a futuras investigaciones sobre la inclusión de ácidos orgánicos en las dietas no solo de abulón si no de las

especies con potencial acuícola en la región. Esto, con el propósito de investigar los beneficios de su inclusión en la dieta.

## Capítulo 6. Conclusiones

---

- El pH (5,7,8) de la dieta formulada afectó la estabilidad de la misma. En el presente trabajo la dieta con pH 5 tiene una mayor estabilidad (81.12 %) durante su exposición al agua respecto a la dieta pH 7 y 8.
- En los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con la dieta formulada a pH 5 se observó un crecimiento y supervivencia promedio mayor en comparación con abulones alimentados con las dietas de pH 7 y 8, así como del control con la dieta fresca de *Macrocystis pyrifera*.
- El contenido proteico en músculo de los juveniles de abulón azul aumentó de la condición inicial a la final. El porcentaje de lípidos en músculo fue significativamente diferente entre tratamientos, los abulones alimentados con la dieta control resultaron con un menor porcentaje de lípidos en músculo ( $0.12 \pm 0.01$  %). En cuanto al porcentaje de proteína, carbohidratos, ceniza y humedad en músculo de los abulones, no existieron diferencias significativas.
- La actividad enzimática de proteasas alcalinas, tripsina, quimiotripsina, leucina aminopeptidasa y lipasa en los juveniles de abulón azul *H. fulgens* evaluada en el presente trabajo no se vio significativamente afectada entre las dietas formuladas con distinto pH.
- La actividad enzimática de la amilasa fue similar entre tratamientos lo que se relaciona con un alto contenido de carbohidratos en las dietas formuladas y la macroalga utilizada como control.
- El mayor porcentaje de hidrólisis se observó en los extractos enzimáticos de los abulones alimentados con la dieta formulada con pH 5 (GH= 8) asociado a una mayor solubilización de la proteína soluble en la dieta.
- El contenido de bacterias heterótrofas totales del tracto digestivo de los abulones alimentados con los diferentes tratamientos, no presento diferencias significativas. En contraste, el conteo de bacterias tipo *Vibrio* fue significativamente mayor en abulones alimentados con la dieta a Ph 7. La caracterización morfológica de las bacterias heterótrofas totales aisladas del tracto digestivo de los abulones alimentados con los diferentes tratamientos mostró que todas eran Gram negativas y, en su mayoría, presentaron forma de cocobacilos.

- La dieta formulada *ABKELP*<sup>®</sup> con pH 5 presentó mayor estabilidad en el agua (81.12 %), y los juveniles alimentados con ella obtuvieron un crecimiento ligeramente mayor y una mejor digestibilidad *in vitro*, lo que a largo plazo puede resultar en un menor tiempo de cultivo debido a una mayor eficiencia en el uso de esta dieta.

## Capítulo 7. Recomendaciones

---

- Evaluar el efecto del tipo y concentración de ácidos orgánicos en la dieta del abulón azul *H. fulgens* sobre los índices de desempeño biológico, digestibilidad, y resistencia a enfermedades.
- Determinar si el pH influye en la ingesta del alimento.
- Determinar si existe una mejora en la absorción de nutrientes y minerales de acuerdo a la concentración de ácidos orgánicos en el alimento.
- Determinar mediante histología convencional si existe algún cambio morfológico en la estructura del tracto digestivo del abulón conforme la concentración de ácidos orgánicos en la dieta formulada lo cual, trae consigo una disminución del pH digestivo.
- Específicamente en la evaluación de la digestibilidad *in vitro* mediante la técnica de pH-stat se recomienda buscar alternativas que permitan concentrar la proteína soluble presente en las dietas con bajo porcentaje de proteína (ie., 5 al 10%) para poder realizar una estimación más adecuada del grado de hidrólisis de la misma.
- Realizar la medición del pH y oxígeno en el tracto digestivo del abulón antes y después de ser sometido a la dieta formulada para determinar si existe algún cambio en relación a la adición de ácidos orgánicos en la dieta.
- Utilizar un electrodo más adecuado para muestras viscosas para poder cuantificar el cambio del pH durante la digestión por medio del método del pH-stat.
- Evaluar los ingredientes de la dieta formulada por separado por medio del pH-stat.
- Realizar un análisis molecular de las bacterias presentes en el tracto digestivo de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* para obtener una mejor caracterización de la microflora y complementar con medios de cultivo específicos.

## Literatura citada

---

- Adams, D., Boopathy, R. 2013. Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biología*. 68 (6), 1017–1021.
- Alarcón, F. J., Moyano, F.J., Díaz, M., Fernández-Díaz, C., Yúfera. M. 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. *Aquaculture Nutrition*, 1999 (5), 107-113.
- Alarcón, F.J., Moyano, F.J. y Díaz, M. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH- stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82, 697-704.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. Association of Analytical Chemists, Arlington, VA, SA.
- Apple, W. 1974. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Leucine Aminopeptidase Determination with L-Leucineamide as Substrate in Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York, 954–958.
- Applebaum, S.L., Pérez, R., Lazo, J.P., Holt, G.J. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish physiology and Biochemistry*, 25, 291–300.
- Bansemmer, M.S., Quin, J.G., Harris, J.O., Shaefer, E.N., Wang, H., Mercer, G.J., Howart, G.S., Stone, A.J. 2016. Age- dependent response of digestive enzyme activities to dietary protein level and water temperature in greenlip abalone *Haliotis leavigata*. *Aquaculture*, 451, 451-456.
- Bautista-Teruel, M.N., Fermin, A.C., Koshio, S.S. 2003. Diet development and evaluation for juvenile abalone, *Haliotis asinina*: animal and plant protein sources. *Aquaculture*, 219, 645-653.
- Beinfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis in: *Advances in enzymology XII*, by F. Noed, Interscience, New York, 379.
- Bergey, D.H., Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, H.A. 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. (9a. ed.) Williams and Wilkins, Baltimore.
- Britz, P. J. 1996. Effect of dietary protein level on growth performance of South African abalone, *Haliotis midae*, fed fishmeal-based semipurified diets. *Aquaculture*, 14, 55–61.
- Castillo S., Rosales M., Pohlenz C., Gatlin, D.M. 2014. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 433, 6–12
- Castro-González, M.I., Carrillo-Domínguez, S. Pérez-Gil, F. 1994. Composición química de *Macrocystis pyrifera* (sargazo gigante) recolectada en verano e invierno y su posible empleo en la alimentación animal. *Ciencias Marinas*, 20, 33-40.
- Castro-González, M.I., Carrillo-Domínguez, S. y Pérez-Gil, F. Composición química de *Macrocystis pyrifera* (sargazo gigante) recolectada en verano e invierno y su posible empleo en alimentación animal. *Ciencias marinas*, 20 (1), 33-40.
- Cho, D.M., Pyeun, J.H., Byun, D.S. 1983. Proteolytic activity of the crude enzyme extracted from the digestive tract of marine gastropods. *Korean Fisheries Society*, 16, 216-224.

- Chuchird, N., Rorkwiree, P., Rairat, T. 2015. Effect of formic acid and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. SpringerPlus, 4, 440.
- Clark, A.G., Jowett, D.A. 1978. Hydrolitic enzymes of the pua *Haliotis iris*, a marine gastropod. Journal of marine and freshwater research, 12, 221-222.
- Clausen, E. 1998. Kurshefte I biokjemi for fiskerifagstudenter. Norges fiskerihøyskole. Tromso, Norge. pp. 45.
- Coote, T.A., P.W. Hone, R. Kenyon., and G.B. Maguire. 1996. The effect of different combinations of dietary calcium and phosphorus on the growth of juvenile *Haliotis laevigata*. Aquaculture, 145, 267—279.
- Cruz-Suárez , L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C. 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Darling, D. 2016. Abalone. Consultado el 20 de septiembre de 2020, de: <https://www.daviddarling.info/encyclopedia/A/abalone.html>
- Diario oficial de la federación DOF. 2013. Publicado el 9 de septiembre de 2013.
- Diario oficial de la federación DOF. 2017. Publicado el 11 de junio de 2018.
- Durazo-Beltrán, E. 2014. Los lípidos en la nutrición del abulón azul, molusco con potencial de cultivo. Entreciencias, 2, 125-135.
- Durazo-Beltrán, E., Toro-Vázquez, J.F., Vásquez-Peláez, C., Viana, M.T. 2003. Efecto de la macroalga *Macrocystis pyrifera* y una dieta formulada sobre el crecimiento y la composición de ácidos grasos en el abulón azul, *Haliotis fulgens*, en condiciones de cultivo comercial. Ciencias marinas, 29, 645-654.
- Durazo-Beltrán, E., Viana, M.T., D´Abramo, L.R., Toro-Vázquez, J.F. 2004. Effects of starvation and dietary lipid on the lipid and fatty acid composition of muscle tissue of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*). Aquaculture, 238, 329 – 341.
- Erasmus, J.H., Cook, P.A., Coyne, V.E. 1997. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. Aquaculture. 155, 377-386.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95, 271–278.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Consultado el 15 de marzo de 2020, de: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229es>
- FAO. 2020. Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Consultado el 15 de noviembre de 2020, de: <http://www.fao.org/publications/sofia/2020/es/>
- Fernández-Olmos, A., García de la Fuente, C., Saénz-Nieto, J.A., Valdezate-Ramos, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). España.

- Fleming, R.J., Barneveld, V. y Hone, P.W. 1996. The development of artificial diets for abalone. *Aquaculture*, 140, 5-53.
- Gabner, M .1985. An *in vitro* method for measuring protein digestibility of feed components. *Aquaculture*, 48, 97-110.
- García-Concha, O. 2016. Descripción del desarrollo esquelético de *Totoaba macdonaldi*, caracterización de sus malformaciones y su efecto en el desempeño biológico. Tesis de maestría en ciencias. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada, Baja California. 100 pp.
- García-Esqivel, Z., Felbeck,H. 2006. Activity of digestive enzymes along the gut of juvenile red abalone, *Haliotis rufescens*, fed natural and balanced diets. *Aquaculture*, 261, 615–625.
- Geiger, D.L. and Owen, B. 2012. Abalone: world-wide Haliotidae. *ConchBooks*. 2-53.
- Gjellesvik, .R., Lombardo, D., Walther, B.T. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1124. 123–134.
- Gonzales-Aviles, J. G., & Shepherd, S. A. 1996. Growth and survival of the blue abalone *Haliotis fulgens* in barrels at Cedros Island, Baja California, with a review of abalone barrel culture. *Aquaculture*, 140(1-2), 169-176.
- Goosen, N.J., Gorgens, J.F., de Wet, L.F., Chenia, H. 2011. Organic acids as potential growth promoters in the South Africa abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture*, 321, 245–251.
- Gorfine, H.K. 1991. An Artificial Diet for Hatchery-reared Abalone *Haliotis rubra*. Marine Science Laboratories, Internal Rep. No. 190, Queenscliff, Australia.
- Hahn, K.O. 1989. Handbook of culture of abalone and other marine Gastropods. CRC press Boca Raton, Florida. pp. 348.
- Heasman, M. y Savva, N. 2007. Manual for intensive hatchery production of abalone. Fisheries research and development corporation. Australian government. pp. 95.
- 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.
- Iba, W. 2008. Nutrition requirement of cultured abalone postlarvae and juveniles: A review. *Indonesian Aquaculture journal*. Vol. 3 No. 1. 13 pp.
- Jarayabhand, P. y Paphavasit, N. 1996. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture*, 140, 159-168.
- Jin, S. E., Lee, S. J., Kim, Y., Park, C. Y. 2020. Spirulina powder as a feed supplement to enhance abalone growth. *Aquaculture Reports*. 17, 100318.
- Khajepour, F., Hosseini, S.A. 2012. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquaculture Research*, 43, 407–411.
- Knauer, J., Hecht, T., Duncan, J.R. 1994. Proximate composition of the South African abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture and fisheries management*, 25, 351-354.

- Lafarga-De La Cruz, F., Montes-Orozco, V., González-Aragón E.F., Valenzuela-Espinoza, E., Marcos-Ramírez, R., Mariscal-Medina, J. Effect of protein/lipid level of abkelp commercial feed on growth of the red abalone *Haliotis rufescens*. 10th International Abalone Symposium (IAS), Xiamen, China, del 8-12 de mayo de 2018 (póster) (ID:23736).
- Lazo, J.P., Davis, D.A., Arnold, C.R. 1998. The effects of dietary protein level on growth, feed efficiency and survival of juvenile Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). *Aquaculture*, 169, 225–232.
- Lazo, J.P., Holt, G.J., Arnold, C.R. 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition*, 6, 183–192.
- Lee, S.M. 2004. Utilization of dietary protein, lipid and carbohydrate by abalone *Haliotis discus hannai*: a review. *Journal of shellfish research*, 23, 1027-1030.
- Lehninger, A.L. 1985. *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular*. Omega, S.A. Barcelona. 97-120.
- Leighton, D.L. 2000. *The Biology and Culture of the California Abalone*. The University of California, USA: Dorrance Publishing Company. pp. 216.
- Leighton, P. 2008. Abalone hatchery manual. Robinson, G, y McGowan, N. (Editors). *Aquaculture Explained*. 25, pp. 95.
- Li, J.S., Li, J.L., Wu, T.T. 2009. Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). *Aquaculture Nutrition*, 15, 415–420.
- López, L.M., Tyler, P., Viana, M.T. 1998. The effect of temperature and artificial diets on growth rates of juvenile *Haliotis tuberculata*. *Journal of shellfish research*, 17, 657-662.
- Mai, K., Mercer, J. P., Donlon, J., 1995. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* and *Haliotis discus hannai*. IV. Optimum dietary protein level for growth. *Aquaculture*, 136, 165-180.
- McLean, N. 1970. Digestion in *Haliotis rufescens*. *Journal experimental zoology*, 173, 303-318.
- Morash, A.J., Alter, K. 2016. Effects of environmental and farm stress on abalone physiology: perspectives for abalone aquaculture in the face of global climate change. *Aquaculture*, 8, 342-368.
- Nava-Guerrero, R., Vásquez-Peláez, C., Viana, M.T. 2004. Substitución de la harina de *Macrocystis pyrifera* por harina de mosto de uva en alimento balanceado para el abulón azul (*Haliotis fulgens*). *Ciencias Marinas*, 30, 227–234.
- Navarrete-del-Toro, M.A., García-Carreño, F. 2002. Evaluation of the progress of protein hydrolysis. Unit B2.2. En: Unit B. Biochemical compositional analyses of protein. *Current protocols in food analytical chemistry*. Vol 1. Editorial John Wiley and Sons. B2.2.1-B2.2.14.
- Nie, Z.-Q., Wang, P., Wang, Z., Yan, J., 1986. Experiments on preparing of formulated feed and feeding efficiency of young abalone, *Haliotis discus hannai*. *Marine fish research*, 7, 53-64 (in Chinese, with English abstract).

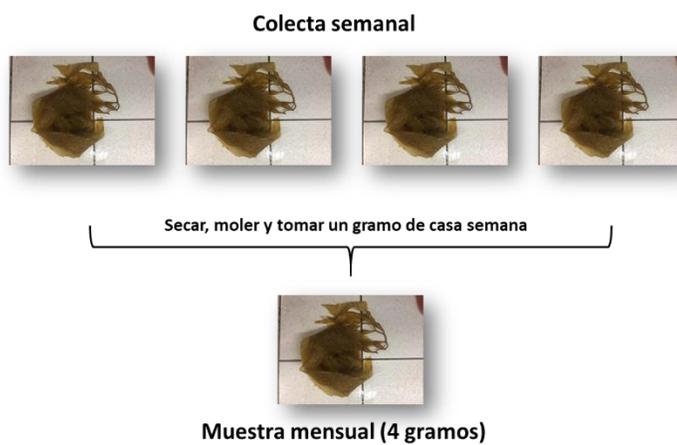
- Ogino, C., Kato, N. 1964. Studies on the nutrition of abalone-II protein requirements for growth of abalone, *Haliotis discus*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 30, 523-526.
- Picos- García, C. 1998. Proteasas digestivas de juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens*. Tesis de maestría en ciencias. Instituto politécnico nacional. 84 pp.
- Ramli, N., Heindl, U., Sunanto, S. 2005. Effect of potassium-diformate on growth performance of tilapia challenged with *Vibrio anguillarum*. Abstract, World Aquaculture, 2005, Bali, Indonesia.
- Rivero, L.E., Viana, M.T. 1996. Effect of artificial pH, water stability and toughness of diets on the palatability for juvenile abalone *Haliotis fulgens*. Aquaculture, 144, 353-362.
- Sales, J., Janssens, G. P. J. 2004. Use of feed ingredients in artificial diets for abalone: a brief update. In *Nutrition Abstracts and Reviews: Series B* (Vol. 74, pp. 13N-21N).
- Sarath, G., Del Monte, R.S., Wagner, F.W. 1989. Protease assay methods. In: Beynon, R.J., Bond, J.S. (Eds.), *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, 25–56.
- Searcy-Bernal, R., Anguiano-Beltrán, C. Espinoza-Montes, J.A., Carpizo-Ituarte, E. 2013. Restocking of Abalone populations (*Haliotis* spp.) in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 32 (1), 189-195.
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M.R. y Altamira, B. 2010. Current status of abalone fisheries and culture in Mexico. *Journal Shellfish Research*, 29, 573-576.
- Searcy-Bernal, R., Salas-Garza, A., & Flores-Aguilar, R. A. 1988. Postlarval and Juvenile Growth of Green Abalone (*Haliotis fulgens*) In A Mexican Laboratory. *Ciencias Marinas*, 14(4), 57-72.
- Serviere-Zaragoza, E., Mazariegos-Villareal, A., Ponce-Diaz, G., & Montes Magallón, S. 2001. Growth of juvenile abalone, *Haliotis fulgens* Philippi, fed different diets. *Journal of Shellfish Research*, 20 (2), 689-693.
- Serviere-Zaragoza, E., Navarrete del toro, M.A., García- Carreño, F.L. 1997. Protein-hydrolyzing enzymes in the digestive systems of the adult Mexican blue abalone, *Haliotis fulgens* (Gastropoda). *Aquaculture*, 157, 325-336.
- Serviere-Zaragoza, E., Perez-Estrada, C.J. y Aldana-Aranda, D. 2016. Status of the digestive gland and feed index in juvenile green abalone *Haliotis fulgens* fed rehydrated macroalgae. *Aquaculture Nutrition*, 22 (4), 767-775
- Shipton, T.A. y Britz, P.J. 2001. The effect of animal size on the ability of *Haliotis midae* L. to utilize selected dietary protein sources. *Aquaculture Research*, 32, 393-403.
- Shipton, T.A. y Britz, P.J. 2002. Evaluation of an *in vitro* digestibility technique for the prediction of protein digestibility in the South African abalone, *Haliotis midae*. *Aquaculture Nutrition*, 8, 15-21.
- Silva, B.C., Vieira, F.N., Mourino, J.L.P., Ferreira, G.S., Seiffert, W.Q. 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture*, 384, 104–110.
- Stone, D., James- Harris, O., Hanru, W., Georgia- Mercer, J., Schaefer, E. y Bansemer, M. 2013. Dietary protein level and water temperature interactions for greenlip abalone *Haliotis laevigata*. *Journal of Shellfish Research*, 32, 119-130.

- Su, X., Li, X., Leng, X., Tan, C., Liu, B., Gou, T. 2014. The improvement of growth, digestive enzyme activity and disease resistance of white shrimp by the dietary citric acid. *Aquacult int.* 22, 1823-1835.
- Tan, B., Mai, K., Liufu, Z. 2001. Response of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*, to dietary calcium, phosphorus and calcium/phosphorus ratio. *Aquaculture*, 198, 141–158
- Uki, N., Kemuyama, A., Watanabe, T. 1985. Development of semipurified test diets for abalone. *Bull. Jpn. Sot. Sci. Fish.* 5, 1825- 1833 (in Japanese, with English abstract).
- Uki, N., Watanabe, T., 1992. Review of nutritional requirements of abalone (*Halotis spp.*) and development of more efficient artificial diets. *Fisheries, Biology and Culture*. Fishing News Books, Oxford. 504-517.
- Vega-García, P.D. 2016. Cambios históricos en las poblaciones de abulón azul y amarillo en la península de Baja California. Tesis de doctorado en ciencias. Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, S.C. 67 pp.
- Venter, L., Loots, D. T., Vosloo, A., Jansen van Rensburg, P., Lindeque, J. Z. 2018. Abalone growth and associated aspects: now from a metabolic perspective. *Reviews in Aquaculture*, 10 (2), 451-473.
- Viana- Castrillón , M.T., Guzman, J.M., Escobar, R. 1999. Effect of heated and unheated fish silage as a protein source in diets for abalone *Haliotis fulgens*. *Journal of the aquaculture society*, 30, 481-489.
- Viana- Castrillón, M.T., López, L.M., García-Esquivel, Z., Méndez, E. 1996. The use of silage made from fish and abalone viscera as an ingredient in abalone feed. *Aquaculture*, 140, 87-98.
- Viana- Castrillón, M.T., López, L.M., Salas, A. 1993. Diet development for juvenile abalone *Haliotis fulgens* Evaluation of two artificial diets and macroalgae. *Aquaculture*, 117, 149-156.
- Viana-Castrillón, M.T. 2000. Avances en nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18,1998. La paz, B.C.S. México.
- Viana-Castrillón, M.T. 2002. Avances en la nutrición digestiva y metabolismo del abulón. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún Quintana Roo, México.
- Wing-Keong, N., Chik-Boon, K. 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Aquaculture*, 9, 342–368.
- Xiaolong, G., Mo, Z., Xian, L., Fucun, W., Changbin, S., & Ying, L. 2018. Effects of stocking density on survival, growth, and food intake of *Haliotis discus hannai* Ino in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 482, 221-230.

## Anexos

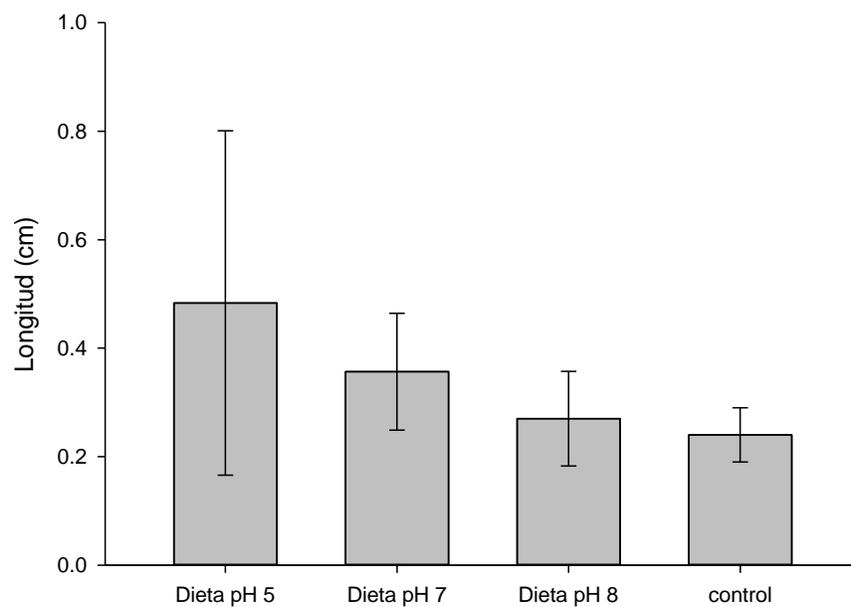
---

### Anexo 1



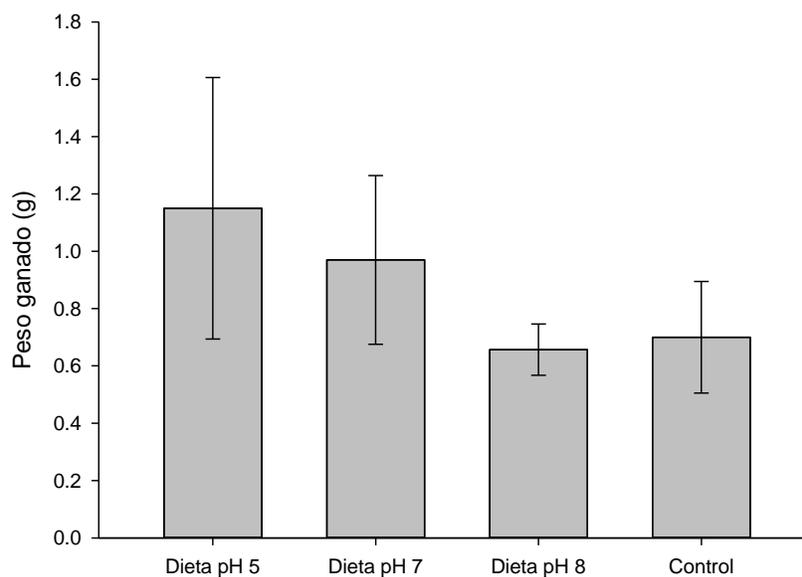
**Figura 14.** Colecta mensual del alga *Macrocystis pyrifera* destinada para el análisis químico proximal.

## Anexo 2



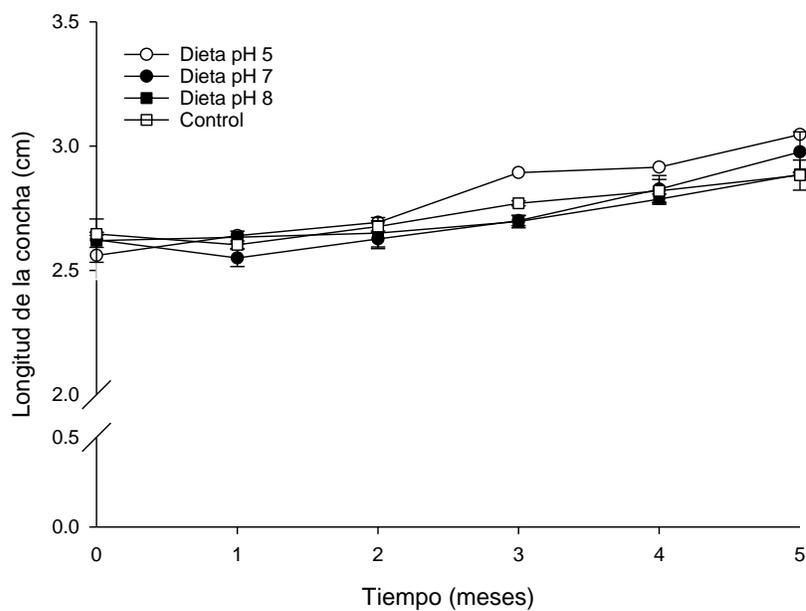
**Figura 15.** Crecimiento ganado al final del periodo experimental de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera*. Los datos representan la media más su desviación estándar. n= 3.

### Anexo 3



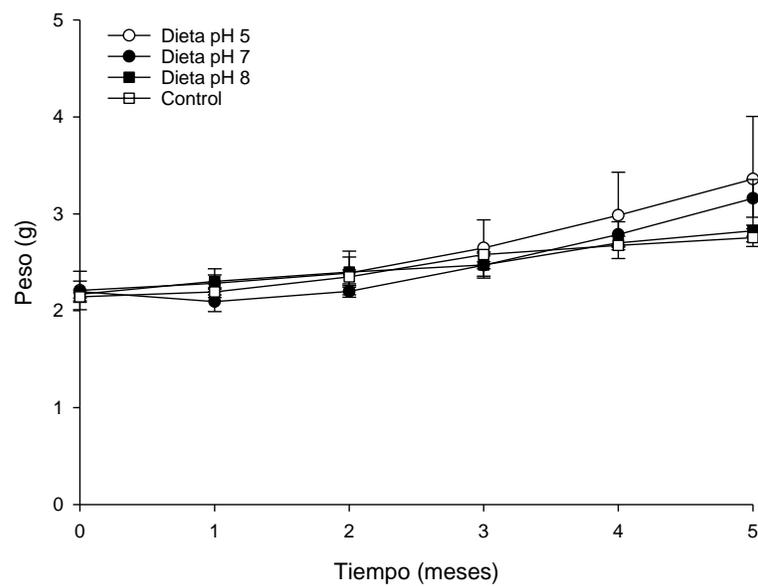
**Figura 16.** Peso ganado al final del periodo experimental de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera*. Los datos representan la media más su desviación estándar. n=3.

## Anexo 4



**Figura 17.** Valores promedio de la longitud de la concha durante el periodo experimental de juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera*. Los datos representan la media más su desviación estándar.

## Anexo 5



**Figura 18.** Valores promedio del peso durante el periodo experimental de juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con una dieta formulada con distinto pH (5,7,8) y un control con *M. pyrifera*. Los datos representan la media más su desviación estándar. n=3.

## Anexo 6

**Tabla 7.** Comparación de la longitud de la concha y el peso de los juveniles de abulón azul *H. fulgens* alimentados con la dieta pH 5 y la dieta control con *M. pyrifera* mediante una prueba de T.

	<b>Valor de P</b>
<b>Longitud de la concha (cm)</b>	0.184
<b>Peso del organismo (g)</b>	0.255

## Anexo 7

Tabla 8. Tasas de crecimiento de *Haliotis fulgens* alimentado con distintas dietas.

Autor	Año	Título	Especie	Talla experimental	Tiempo cultivo	Localidad	Sistema cultivo	Temperatura	Alimento	Tasa crecimiento	supervivencia
Durazo-Beltrán y colaboradores	2003	Los lípidos en la nutrición del abulón azul, molusco con potencial de cultivo	<i>Haliotis fulgens</i>	5.9 mm	329 días	Ejido Eréndira (Baja California)	Abierto	13.1 C Invierno y 21.1 C verano	Dieta formulada	44.26 $\mu\text{m día}^{-1}$	49 %
									Alga fresca ( <i>Macrocystis pyrifera</i> )	48.31 $\mu\text{m día}^{-1}$	37 %
									combinación de ambas	61.77 $\mu\text{m día}^{-1}$	54 %
Nava-Guerrero y colaboradores	2004	Substitución de la harina de <i>Macrocystis pyrifera</i> por harina de mosto de uva en alimento balanceado para el abulón azul	<i>Haliotis fulgens</i>	15.09 mm	60 días	Ejido Eréndira (Baja California)	Abierto	20 C	0 % sustitución	31 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d.
									25 % sustitución	27 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d.
									50 % sustitución	32 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d.
									75 % sustitución	24 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d.
									100% sustitución	26 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d.
Viana y colaboradores	1996	El uso de ensilaje de pescado y vísceras de abulón como ingrediente en la alimentación del abulón	<i>Haliotis fulgens</i>	18.3 mm	25 semanas	Bahía tortugas Baja California	Abierto	20 - 23 C	Ensilaje cocido	53 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d.
									Ensilaje sin cocer	61 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d.
									Alga fresca ( <i>Macrocystis pyrifera</i> )	1.5 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d.
Viana y colaboradores	2007	Fisiología digestiva y metabolismo del abulón verde <i>Haliotis fulgens</i> desde postlarvas hasta juveniles, alimentado con tres diatomeas diferentes	<i>Haliotis fulgens</i>	909.21 $\mu\text{m}$	90 días	s.d.	cerrado	20 $\pm$ 1 C	<i>Navicula incerta</i>	46.60 $\mu\text{m día}^{-1}$	83.23 %
									<i>Amphiphora paludosa</i>	39.38 $\mu\text{m día}^{-1}$	81.7 %
									<i>Nitzshia thermalis</i>	35.14 $\mu\text{m día}^{-1}$	63.52 %
									Combinación de las tres	51.37 $\mu\text{m día}^{-1}$	87.92 %

									Dieta pH 4	s.d.	s.d.
									Dieta pH 5	s.d.	s.d.
Rivero y Viana	1996	Efecto del pH artificial, la estabilidad del agua y la dureza de las dietas sobre la palatabilidad del abulón juvenil <i>Haliotis fulgens</i>	<i>Haliotis fulgens</i>	14.5 g.	s.d.	Laboratorio de nutrición (IIO-UABC)	Abierto	22 - 24 C	Dieta pH 6	s.d.	s.d.
									Dieta pH 7	s.d.	s.d.
									Dieta pH 8	s.d.	s.d.
González - Avilés y Sheperd	1996	Crecimiento y supervivencia del abulón azul <i>Haliotis fulgens</i> en barriles en Isla Cedros, Baja California, con una revisión del cultivo en barril de abulón	<i>Haliotis fulgens</i>	12-15 mm	11 meses	Isla de Cedros (Baja California)	Maricultivo	s.d.	<i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Eisenia arborea</i> y otras algas disponibles.	49.4 $\mu\text{m día}^{-1}$	87 %
Serviere-Zaragoza y colaboradores	2016	Estado de la glándula digestiva e índice de alimentación en abulón verde juvenil <i>Haliotis fulgens</i> alimentados con macroalgas rehidratadas	<i>Haliotis fulgens</i>	31.67 mm	136 días	s.d.	Flujo continuo	20 $\pm$ 1 C	<i>Ulva sp.</i> rehidratada <i>Eisenia arborea</i> rehidratada <i>Macrocystis pyrifera</i> rehidratada <i>Egregia menziesii</i> rehidratada <i>Porphyra perforata</i> rehidratada	1.6 - 47.8 $\mu\text{m día}^{-1}$	s.d. s.d. s.d. s.d.
Pérez-Estrada y colaboradores	2011	Crecimiento y composición bioquímica del abulón verde juvenil <i>Haliotis fulgens</i> alimentado con macroalgas rehidratadas	<i>Haliotis fulgens</i>	31.67 mm	136 días	s.d.	Flujo continuo	20 $\pm$ 1 C	<i>Ulva sp.</i> rehidratada <i>Macrocystis pyrifera</i> rehidratada <i>Porphyra perforata</i> rehidratada <i>Eisenia menziesii</i> rehidratada <i>Eisenia arborea</i> rehidratada	1.6 $\mu\text{m día}^{-1}$ 18.1 $\mu\text{m día}^{-1}$ 15.1 $\mu\text{m día}^{-1}$ 17.5 $\mu\text{m día}^{-1}$ 12 $\mu\text{m día}^{-1}$	44 % 69 % 67 % 59 % 65 %
Serviere-Zaragoza y	2001	Crecimiento de abulones		17.3 mm	106 días		Flujo continuo	20 $\pm$ 1 C	<i>Macrocystis pyrifera</i>	5.49 mg $\text{día}^{-1}$	93 %

colaboradores		juveniles, <i>Haliotis fulgens</i> Philippi, alimentados con diferentes dietas.	<i>Haliotis fulgens</i>			Eréndira, Baja California			<i>Eisenia arborea</i>	1.52 mg día <sup>-1</sup>	93 %
									<i>Gelidium robustum</i>	2.07 mg día <sup>-1</sup>	89 %
									Dieta artificial	4.39 mg día <sup>-1</sup>	97 %
Ponce- Díaz y colaboradores	2004	Crecimiento y composición bioquímica tisular de <i>Haliotis fulgens</i> a temperaturas elevadas en Baja California bajo dos dietas secas de algas pardas	<i>Haliotis fulgens</i>	29 mm	120 días	Bahía Asunción Baja California Sur	Flujo continuo	Temperatura regular (18 – 21 C) y temperatura elevada (20 – 28 C)	<i>Macrocystis pyrifera</i>	39 µm día <sup>-1</sup>	96 %
									<i>Eisenia arborea</i>	16 µm día <sup>-1</sup>	95 %
Viana y colaboradores	1993	Desarrollo de dieta para juveniles de abulón <i>Haliotis fulgens</i> Evaluación de dos dietas artificiales y macroalgas	<i>Haliotis fulgens</i>	s.d.	90 días	s.d.	s.d.	s.d.	Harina pescado	13.5 µm día <sup>-1</sup>	s.d.
									Harina caseína	17 µm día <sup>-1</sup>	s.d.
									Harina de macroalgas	s.d.	s.d.