

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

“DISEÑO Y FUNCIONAMIENTO DE UN LABORATORIO  
PARA ESTUDIOS DE NUTRICIÓN Y METABOLISMO EN  
MOLUSCOS MARINOS”

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA  
PRESENTA:  
ZACHARY GORDON KAIN

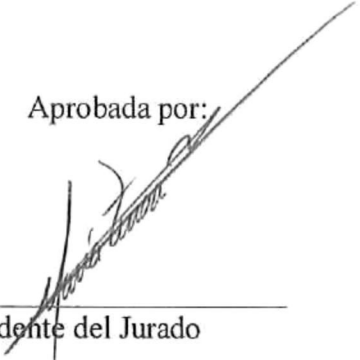
ENSENADA, B.C.,

AGOSTO DEL 2001

“DISEÑO Y FUNCIONAMIENTO DE UN LABORATORIO  
PARA ESTUDIOS DE NUTRICIÓN Y METABOLISMO EN  
MOLUSCOS MARINOS”


TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN OCEANOGRAFIA COSTERA  
PRESENTA:  
ZACHARY GORDON KAIN

Aprobada por:



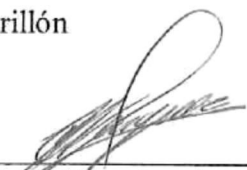
\_\_\_\_\_  
Presidente del Jurado

Dra. María Teresa Viana Castrillón



\_\_\_\_\_  
Sinodal Propietario

Dr. Armando Shimada Miyasaka



\_\_\_\_\_  
Sinodal Propietario

Dr. Carlos Vazquez Pelaez

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. María Teresa Viana y los doctores Shimada y Vazquez por su continuo apoyo. También quisiera agradecer a Zaul García Esquivel por su ayuda con los problemas técnicos y al equipo de traducción: Ruth, Tona, Christian, Loreli, Alejandra, Jessica, Laura, Adriana, y Tania. A mi Mamá, Papá, Gregorio y Navy, gracias por su apoyo incondicional y por hacerme sentir orgulloso por ser parte de esta familia.

## RESUMEN

Este estudio presenta una solución integral para asegurar la calidad e incrementar la eficiencia en un laboratorio de nutrición que trabaja con moluscos marinos. A partir de un estudio específico donde se pretendía comparar la digestión de carbohidratos en el abulón azul, *Haliotis fulgens*, se evaluaron los riesgos asociados utilizando como base el sistema de HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point). Asimismo, se establece una serie de recomendaciones para cada elemento del proceso, desde el diseño experimental hasta el análisis de datos. Por último, se construyó una base de datos para manejar el laboratorio FEED Haliotis de la UABC, tomando en cuenta las recomendaciones y consideraciones tanto prácticas como económicas.

## INDICE

Lista de anexos.....	viii
Lista de figuras.....	x
Introducción y antecedentes.....	1
Proceso de estudios de nutrición de moluscos marinos.....	1
Control de calidad y análisis de riesgos en la nutrición de moluscos.....	2
Control de calidad de la información.....	5
Integración de la información.....	6
Construcción de una base de datos.....	7
Beneficios de las bases de datos relacionales.....	11
Objetivos.....	13
Métodos.....	14
Análisis de riesgos utilizando una estructura modificada del proceso HACCP.....	16
Formación del equipo de análisis de riesgos.....	17
Descripción del producto.....	17
Identificar la intención de uso.....	18
Construcción del diagrama de flujo.....	18
Construcción de la base de datos FEED Haliotis.....	20
Resultados,	
Descripción de los riesgos.....	22
Diseño experimental y estadística.....	22
Calidad del ambiente marino	
Diseño del sistema.....	24
Calidad del agua.....	26
Parámetros físicos	
Rango de temperatura.....	26
Rango de salinidad.....	27
Sólidos en suspensión.....	27
Luz.....	28
Parámetros químicos	
pH y alcalinidad.....	28
Gases	
Presión de gas total.....	29
Oxígeno.....	29
Acido sulfídrico (H <sub>2</sub> S).....	30

Nutrientes .....	30
Compuestos tóxicos	
Metales pesados .....	31
Biocidas .....	31
Parámetros biológicos: Patógenos .....	32
Calidad de los organismos experimentales	
Selección.....	32
Transporte.....	33
Acondicionamiento .....	34
Calidad de las dietas experimentales	
Formulación.....	35
Evaluación de los requerimientos nutricionales.....	37
Energía.....	39
Proteína y amino ácidos .....	39
Lípidos.....	39
Vitaminas .....	40
Minerales.....	40
Tamaño de partícula.....	40
Recepción, registro y almacenamiento de los ingredientes	
Generalidades .....	40
Harina de pescado .....	43
Harina de soya .....	45
Preparación de las dietas experimentales .....	46
Molido y tamizado de los ingredientes.....	46
Pesado de los ingredientes.....	47
Mezcla .....	47
Calentamiento .....	48
Extrusión.....	48
Almacenamiento y manejo .....	49
Confirmación la calidad y aceptabilidad de la dieta experimental .....	50
Realización del experimento	
Limpieza .....	53
Inspección del sistema .....	54
Alimentación.....	55
Pesado y medición de los organismos.....	56
Análisis de laboratorio.....	56
Registro, procesamiento e interpretación de datos.....	56
Reporte de Riesgos .....	se encuentra en Anexo 14

La base de datos FEED Haliotis	
Estructura de la base de datos .....	59
Base de datos “Riesgos” .....	62
Base de datos “Ingredientes” .....	63
Base de datos “Requerimientos del organismo” .....	63
Base de datos “Dietas” .....	64a
Base de datos “Estanques” .....	64b
Base de datos “Sistemas” .....	65a
Base de datos “Cálculos Rápidos” .....	65b
Base de datos “Proveedores y colegas” .....	66a
Base de datos “Equipo” .....	66b
Base de datos “Adquisiciones” .....	66b
Base de datos “Responsabilidades” .....	67a
Base de datos “Protocolos” .....	67b
Discusión .....	69
Implementación: desarrollo y plan de acción .....	69
Plan de producto específico .....	70
Mejoramiento de la base de datos .....	72
Control de la información.....	73
Complejo pero simple .....	75
Identificación de debilidades:	
Conociendo el valor de la información.....	75
La aplicación de este sistema de manejo a	
granjas de acuicultura comerciales .....	76
La conservación de recursos .....	77
La conservación de tiempo .....	77
El ahorro de dinero.....	78
Entrenamiento de nuevos miembros del equipo.....	78
Preocupación por el ambiente.....	78
Preparación de alimentos balanceados .....	79
Cuidado de los organismos.....	79
Conclusiones .....	80
Glosario .....	81
Bibliografía .....	84

## LISTA DE ANEXOS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Formulación de dietas experimentales.....	ANEXO 1
2. Porcentaje composición de las dietas experimentales.....	ANEXO 2
3. Composición de alimentos experimentales con harina de pescado como fuente de proteína .....	ANEXO 3
4. Efecto de materiales a cultivos de algas .....	ANEXO 4
5. Propiedades de agua de mar que afectan la capacidad de biomasa .....	ANEXO 5
6. Valores de límites preliminares de calidad de agua y niveles de producción para aplicaciones marinas.....	ANEXO 6
7. Criterios químicos para condiciones de agua en acuicultura .....	ANEXO 7
8. Ingredientes usados en alimentos para acuicultura y factores que afectan su calidad.....	ANEXO 8
9. Especificaciones de harinas de pescado Noruegas de alta calidad .....	ANEXO 9
10. Sumario de pruebas químicas para medir la calidad de harina de pescado en alimentos acuáticos.....	ANEXO 10



11. Valores típicos de pescado fresco, semifresco y en malestado que se utilizan para hacer harina de pescado .....	ANEXO 11
12. Calidades físicas típicas de varios tipos de pelets en alimentos balanceados para peces .....	ANEXO 12
13. Características de las diferentes alimentos balanceados que son importantes a los acuacultores.....	ANEXO 13
14. Análisis de riesgos .....	ANEXO 14
Descripción del producto .....	Forma 1
Entrada de materiales e ingredientes.....	Forma 2
Diagrama de flujo .....	Forma 3
Plant schematic/floor plan .....	Forma 4
Identificación de riesgos: Riesgos biológicos.....	Forma 5
Identificación de riesgos: Riesgos químicos.....	Forma 6
Identificación de riesgos:Riesgos físicos.....	Forma 7
Determinación de puntos críticos de control .....	Forma 8
Riesgos no controlables.....	Forma 9
Plan de HACCP.....	Forma 10
Riesgos y medidas preventivas.....	Forma 11

## LISTA DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Secuencia lógica para aplicar el HACCP .....	4
2. Esquema de tres partes usada en el diseño de bases de datos.....	8
3. Construcción y implementación de un base de datos .....	15
4. Diagrama de flujo del proceso experimental.....	19
5. Modelo conceptual de la base de datos FEED Haliotis .....	61

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Para poder llevar a cabo estudios de nutrición y metabolismo en un laboratorio, es esencial que este sea funcional, confiable y preciso. Por ésta razón, para el estudio de la mayoría de las especies domesticadas, ya existe una serie de protocolos que valida la investigación. Estos protocolos no han sido completamente desarrollados para estudios que involucran organismos acuáticos, lo cual dificulta la comparación de resultados de diferentes autores y/o laboratorios.

El trabajar con organismos marinos presenta una serie de retos únicos. Durante los periodos, tanto de acondicionamiento como experimentales, el investigador debe asegurarse que los organismos estén expuestos a agua de mar, que se encuentre dentro de los parámetros definidos como óptimos. Siendo poikilotérmicos, su tasa metabólica está directamente relacionada a la temperatura ambiental (Campbell, 1987), así que el óptimo desempeño requiera de condiciones ideales de medio ambiente. El asegurar un flujo constante de agua de mar de alta calidad implica, entre otras cosas, la necesidad de bombear, calentar y/o, enfriar y filtrar. En consecuencia, es necesario considerar todas las normas de seguridad asociadas a instalación y mantenimiento del equipo. En principio, se debe diseñar correctamente el sistema, aplicar un mantenimiento constante del mismo, monitorear la calidad del agua, y el manejo de los organismos antes y después de los experimentos. Si estas actividades se llevan a cabo correctamente, se pueden eliminar

muchos de los factores no nutricionales que pueden influenciar de manera no deseable la sobrevivencia y ganancia de peso de los organismos (D'Abramo y Castell, 1997).

Para hacer válidas las comparaciones entre diferentes dietas experimentales, el investigador debe asegurarse que los organismos se mantengan en un ambiente que motive la alimentación. Dentro de los factores que afectan la tasa de alimentación, se incluyen atractabilidad y gustocidad, apetito, sabor, olor, vista y factores físicos como la textura (Church y Pond, 1988). Por lo tanto, en cualquier experimento de crecimiento, la disponibilidad y el tamaño de la ración no debe ser limitada (excepto en el que la intención es provocar una respuesta a la alimentación restringida).

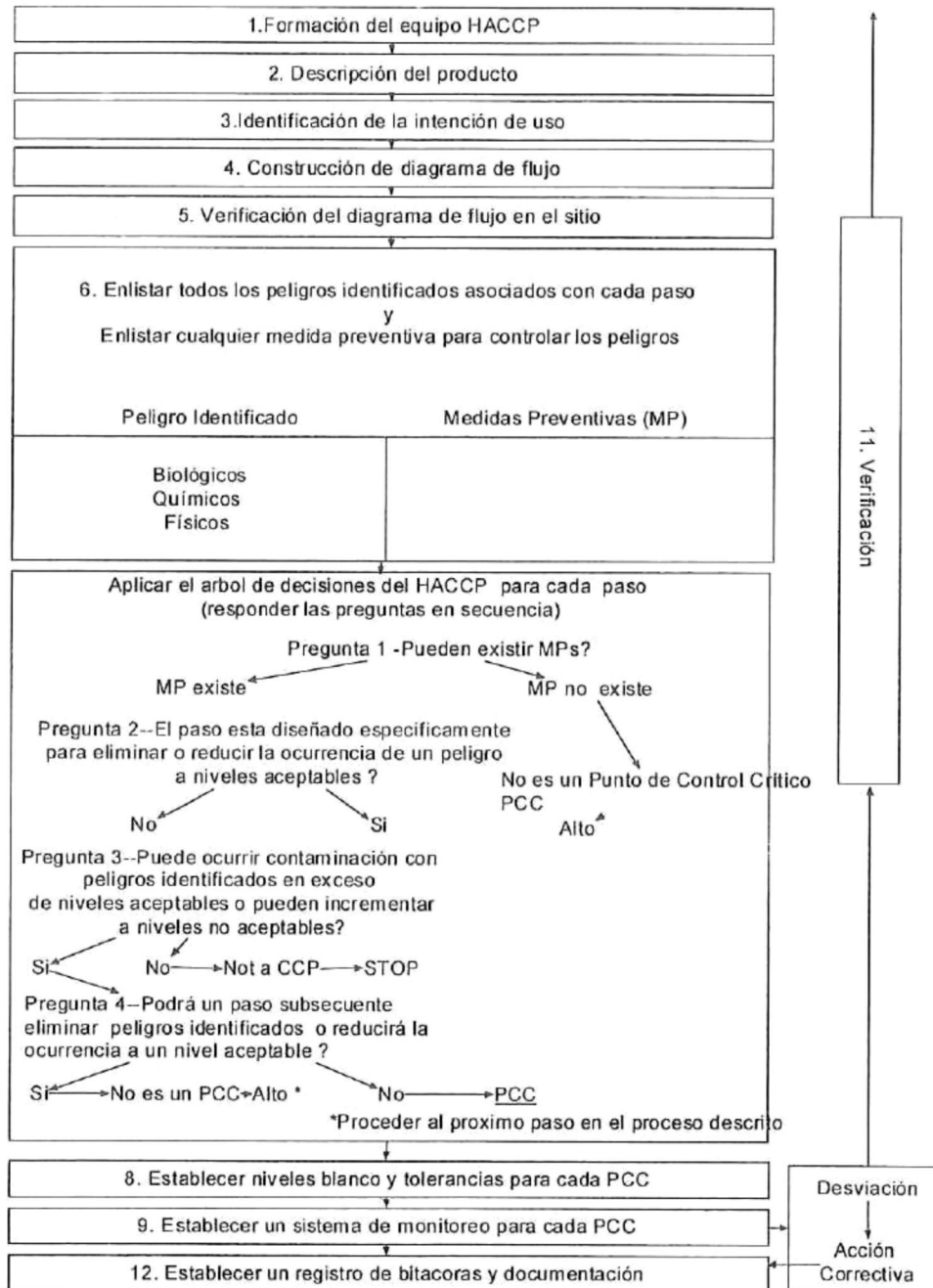
Los estudios de nutrición se llevan a cabo generalmente, para establecer estándares alimenticios (el consumo diario recomendado de un nutriente), para desarrollar dietas a menor costo o para mejorar el desempeño en aspectos como el crecimiento o maduración. Los estudios pueden realizarse para cuantificar la conveniencia de un solo ingrediente, o para comprender el mecanismo en el cual un ingrediente individual es ingerido, digerido, asimilado, y por último metabolizado por el organismo estudiado. Por esto, todos los estudios de nutrición demandan precisión.

### **Control de calidad y análisis de riesgos en la nutrición de moluscos**

Las dietas usadas en nutrición de moluscos marinos, son en si, una herramienta de investigación, que deben estar dentro de criterios específicos, para conocer los estándares necesarios y producir resultados experimentales válidos. Un medio para estandarizar la preparación y ejecución de experimentos es la implementación de protocolos como los

usados en la producción comercial. Los sistemas de control de calidad, como el ISO-9000 y programas de evaluación de riesgo como el HACCP (Análisis de Riesgos y Determinación de Puntos Críticos de Control), ayudan a los productores a mantener un estándar de alta calidad reconocido internacionalmente, y evitar peligros asociados con la producción de su producto. El sistema HACCP se desarrolló por primera vez por la corporación Pilsbury, para asegurar la calidad de la comida usada por la NASA en la exploración espacial a principios de la década de los 70's (Hardy, 1991; Pierson y Corlett, 1992). El programa HACCP es un sistema de control de calidad preventivo que involucra sistemáticamente el estudio de materia prima, las condiciones de procesamiento, manejo, almacenamiento, empaque, distribución y uso del consumidor del producto final (Pierson y Corlett, 1992). El programa no fue diseñado para eliminar peligros, sino para asegurar el control de los parámetros y así evitar los riesgos. También evalúa todos los riesgos asociados con la producción de alimento, que pueden resultar peligrosos para la salud del consumidor. Esto involucra la descripción de riesgos biológicos, químicos o físicos para cada parte del proceso de producción, desde la obtención de la materia prima, hasta el consumo del producto final. Una vez identificados los peligros, se propone un medio para evitar estos riesgos, así como el establecimiento de medidas de monitoreo y corrección; se crea un plan de acción, un sistema de documentación y uno de registro basado en los resultados (Pierson y Corlett, 1992). El proceso HACCP se muestra en la Figura 1.

Figura 1: Secuencia lógica para la aplicación del HACCP (Pierson y Corlett, 1992).



El programa HACCP tiene como objetivo el enfocarse en asuntos que afectan la seguridad del producto. Otras cuestiones de calidad deben ser dirigidas a un programa que aseguren los estándares de calidad (Pierson y Corlett, 1992). Las buenas prácticas de manufactura (GMP) y buenas prácticas de higiene y sanitación (GHP) como el control de movimiento de personal, tapete sanitario y la utilización de uniformes, son partes esenciales en un programa de este tipo (Pierson y Corlett, 1992).

El resultado final de un análisis de riesgos para un experimento de investigación mejorará la calidad de los experimentos realizados, ya que al igual que durante el proceso de elaboración de cualquier producto, se tendría un control de las posibles etapas de error o peligro. De esta manera, habría un patrón establecido de la manera más adecuada en la cual se puede conducir un experimento, de tal manera que sería mucho más fácil detectar cualquier anomalía u olvido dentro del proceso de experimentación. Lo anterior daría entonces como resultado un incremento en la facilidad de realización y la obtención de resultados de mayor confiabilidad, aún cuando el personal sea nuevo o no este familiarizado con el laboratorio.

### **Control de calidad de la información**

En cualquier estudio de nutrición es de gran importancia el poder basarse en fuentes de información confiables, ya que si la información es incorrecta, en el diseño o ejecución del experimento, los resultados pueden cambiar de manera importante. De esta manera, el investigador debe tener acceso a información precisa, para tomar decisiones correctas.

Para poder entender los requerimientos del medio ambiente y nutricionales, que el

organismo necesita para crecer de manera óptima (o por lo menos en homeostasis), el investigador necesita reportes confiables de otras personas con experiencias similares. Ya sea que vengan del mismo laboratorio o de la comunidad científica internacional, la información debe ser confiable. Dentro del laboratorio, las fuentes confiables de información pueden incluir datos válidos previamente colectados (posiblemente sin publicar); las externas pueden ser publicaciones internacionalmente arbitradas.

Al reportar los resultados experimentales, es necesario llevar un registro de bitácora para validar la metodología del investigador. Ésta debe contener toda la información necesaria para asegurar que el experimento sea reproducible la capacidad de reproducción y en caso de necesitarse, ayudar a explicar las anomalías en el resultado. Entre menos complicado sea el proceso de registro, más fácil será hacer éste y la extracción de información. Algunos ejemplos de registros incluyen una bitácora para el sistema de cultivo, una hoja de formulación de dietas y una hoja de calibración del equipo.

### **Integración de la información**

Los miembros del equipo de investigación que trabajan en los estudios de nutrición en organismos acuáticos, se moverán libremente en tres diferentes laboratorios: el analítico, el de producción de alimentos y el húmedo. Estos integran el laboratorio de investigación nutricional de organismos acuáticos. El consumo de materiales, la necesidad de protocolos, la comunicación entre colegas, y las referencias a literatura científica para resolver problemas, son características comunes para todos estos laboratorios. Cada miembro tiene diferentes actividades, necesidades de diferentes materiales, se comunican

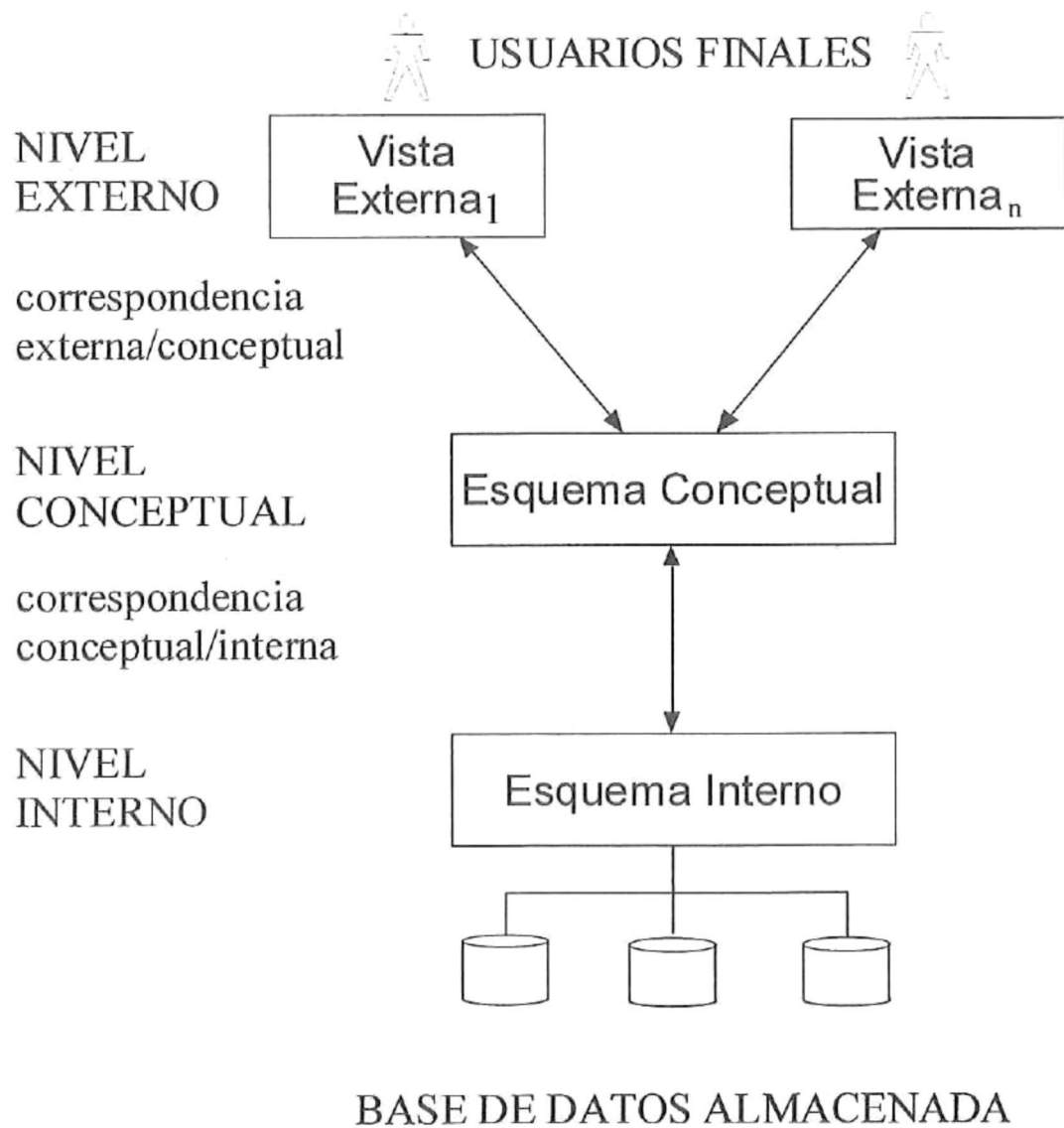


con gente diferente y consulta diferente literatura científica. La base de datos permite a los miembros del equipo encontrar información específica que facilita su investigación, sin tomar en cuenta el laboratorio en el cual estén trabajando. Esto es, que una base de datos central, puede responder a necesidades comunes de todos los miembros del laboratorio, mientras que aún conserva la flexibilidad de responder a necesidades específicas de los miembros del equipo

### **Construcción de un base de datos**

Una base de datos es una colección de datos relacionados a cerca de una empresa con usos múltiples (Atre, 1980). Se debe seguir una secuencia lógica al diseñar una base de datos para asegurar un desempeño óptimo. El comité del Instituto Americano Nacional de Estyares (ANSI/X3/SPARC) ha presentado un marco que consta de tres partes para organizar los datos manejados por un SMBD (Sistema de Manejo de Bases de Datos) (Fleming y Von Halle, 1989).

Figura 2: Esquema de tres partes usada en el diseño de bases de datos. (Elmasri y Navathe, 1997).



El modelo conceptual proporciona una vista general del flujo o vista comunal de los datos en la empresa (Fleming y Von Halle, 1989). El modelo interno o físico considera la distribución de los datos, métodos de acceso y una técnica para poder referenciar (Atre, 1980). La creación del modelo interno requiere: 1.) El diseño de un modelo interno físico de la base de datos 2.) La evaluación del modelo interno físico de la base de datos. Esto involucra la determinación de lo estimado en espacio, en tiempo y la aplicación de la base de datos (Atre, 1980) 3.) El modelo externo final subraya como el usuario podrá ver y acceder los datos.

El método de modelaje lógico de datos está basado en este sistema de tres esquemas. Este método es un proceso controlado por los datos que alienta un entendimiento comprensivo de los requerimientos de información de la empresa y permite una comunicación efectiva entre los diseñadores, desarrolladores y usuarios durante el proceso del diseño (Atre, 1980). El método de modelaje lógico forma las bases para una diseño correcto de la base de datos consistente, compartida y flexible utilizando cualquier tecnología de base de datos (Fleming y Von Halle, 1989).

A continuación se presentan los pasos de la metodología:

1. Identificar entidades principales (ejemplo: investigador, ingrediente, vendedor)
2. Determinar relaciones entre entidades (ejemplo: producto a vendedor).
3. Determinar claves principales y alternativas (ejemplo: nombre del investigador).
4. Determinar claves externas (ejemplo: número internacional del ingrediente).

5. Determinar las reglas de las claves de la empresa (ejemplo: no duplicar nombre del investigador).
6. Agregar atributos faltantes (ejemplo: tipo de estudiante, matrícula).
7. Validar las vistas del usuario a través de la normalización (ejemplo: no duplicar la información).
8. Determinar dominios (ejemplo: matrícula tiene diez dígitos).
9. Determinar operaciones de detonador (ejemplo: si la fecha de hoy es menor que la fecha de nacimiento, mensaje de error).
10. Combinar vistas de usuarios (ejemplo: considerar quien va a usar la base de datos).
11. Integración de datos existentes (ejemplo: comparar el modelo con otros y documentar las relaciones e inconsistencias).
12. Análisis para estabilidad y crecimiento (ejemplo: asegurar la exactitud y utilidad, hará que sean necesarios pocos cambios durante un periodo de uso útil).

(Fleming y Von Halle, 1989)

Al construir una base de datos uno debe considerar todos los aspectos que contribuyen al desempeño del producto final. Algunos elementos del desempeño en el diseño son:

A.) Implementación como creación física, conversión e integración;

B.) Operaciones. Este último involucra respaldos, recuperación, reorganización, restructuración, monitoreo del desempeño y afinamiento, seguridad y privacidad en el medio de la base de datos (Atre 1980).

### **Beneficios de los bases de datos relacionales**

Los errores que resultan de una comunicación pobre y una inadecuada evaluación de los riesgos, son costosos tanto en tiempo como en dinero. Equipo caro puede ser mal utilizado o dañado, los reactivos pueden llegar a contaminarse o deteriorar en calidad y pueden los experimentos perderse por completo. Para los laboratorios con recursos económicos limitados los programas de base de datos, son una opción relativamente económica que puede ahorrar tiempo y dinero; que pueden ser de otra manera invertidos, como diferentes actividades tediosas, entre ellas el etiquetar o buscar información. La base de datos permite a varios usuarios actualizar y acceder constantemente varios tipos de información de una localización central. Una base de datos local permite a los miembros del equipo de investigación avanzar en su trabajo armados con el conocimiento de las experiencias de otros investigadores.

El beneficio de una base de datos relacional cae en su facilidad de diseño y uso. Cada ocurrencia de datos es almacenada en un solo archivo a la vez, pero la información puede ser accesada y trabajada desde cualquier archivo (Feiler, 1999). Por lo tanto, se evita la necesidad de duplicar los datos, la entrada de datos es consistente haciendo que la obtención de la información sea más fácil. Así, éste trabajo plantea proveer una solución

amigable al usuario para incrementar la calidad de resultados experimentales y minimizar los riesgos asociados con la investigación nutricional de los moluscos.

## OBJETIVOS

### General

Presentar los medios para prevenir y controlar problemas potenciales asociados con la investigación en nutrición de moluscos marinos.

### Particulares

1. Llevar a cabo un análisis de riesgos de todo el proceso experimental basado en el crecimiento del abulón azul, *Haliotis fulgens*, utilizando dietas balanceadas con varias fuentes de carbohidrato.
2. Construir una base de datos relacional para responder a todos los riesgos encontrados en el análisis de riesgos. Las consideraciones en la creación de una base de datos son los siguientes:
  - A. Incrementar la precisión, reducir costos
  - B. Facilidad de uso
  - C. Laboratorios con recursos económicos limitados
  - D. La aplicabilidad a sistemas comerciales

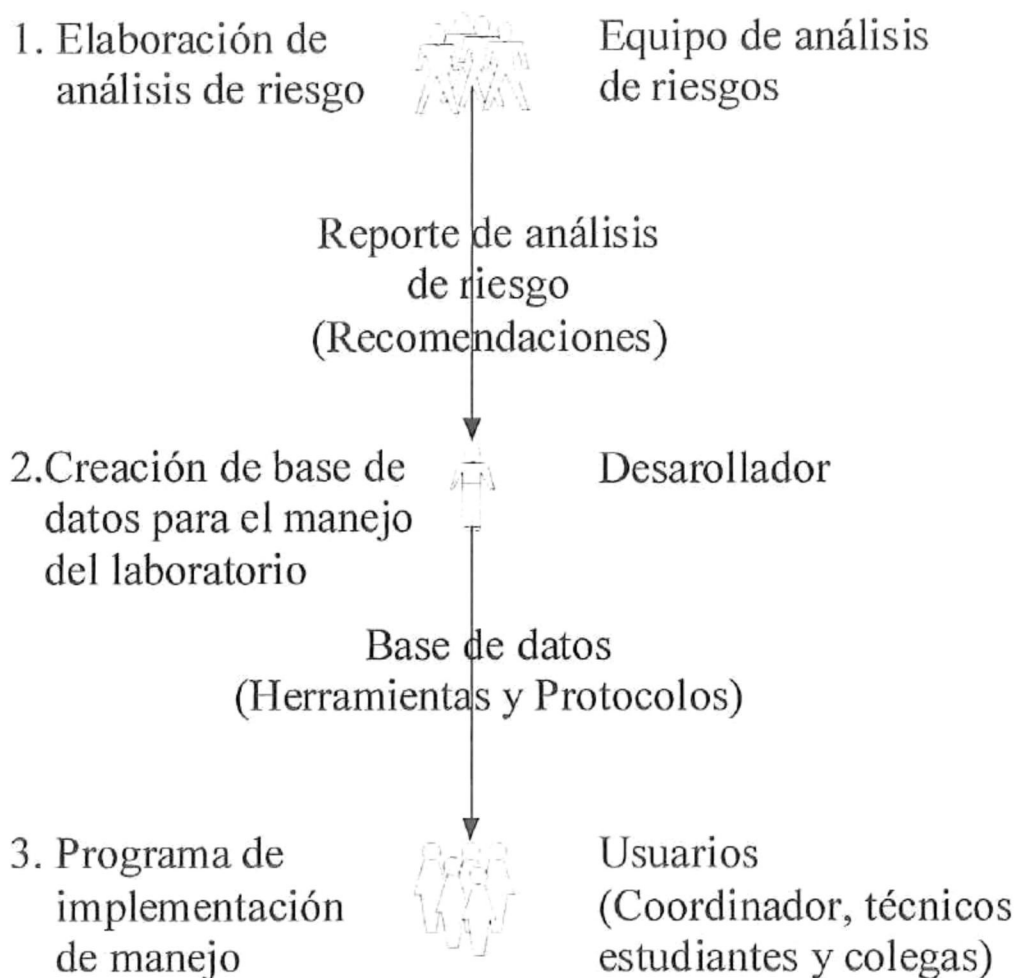
## MÉTODOS

La estimación del análisis de riesgos fue realizada en los experimentos de nutrición fisiología en moluscos que se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología nutricional/Energética y Elaboración de Dietas para *Haliotis* (FEED *Haliotis*), ubicado en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas en Ensenada B.C, México. De manera específica se realizaron experimentos de crecimiento de juveniles de *H. fulgens* utilizando cinco tipos de dietas balanceadas cuya variable fue la fuente de carbohidratos.

Con base en los resultados encontrados en el análisis de riesgos, se propuso una base de datos fundamentada en el proceso mostrado en la Figura 3, con un programa para el manejo de los laboratorios de nutrición.



Figura 3: Proceso para la elaboración e implementación de la base de datos.



Como se muestra en la Figura 3, un equipo de expertos (el equipo de análisis de riesgos) identificó los riesgos asociados al llevar a cabo experimentos de crecimiento en la nutrición de moluscos marinos. El reporte de análisis de riesgos se entregó al desarrollador, el cual construyó una base de datos para el manejo del laboratorio que reflejara las recomendaciones del análisis de riesgos. Posteriormente la base de datos se

pone a la disponibilidad de los usuarios. Estos últimos pueden acceder las herramientas de investigación y los protocolos contenidos en la base de datos, permitiendo la implementación de las recomendaciones del análisis de riesgos.

### **Análisis de riesgos utilizando una estructura modificada del proceso HACCP**

En el presente estudio, la metodología del análisis de riesgos sigue la estructura del proceso HACCP. El método HACCP es utilizado generalmente para la identificación de riesgos en un producto específico, durante su proceso de elaboración, en donde el destino final es para consumo humano. Sin embargo, en este estudio el plan HACCP fue esto aplicado a cinco dietas experimentales, en donde el consumo de éstas fue dirigido al abulón. Ya que las cinco dietas experimentales fueron tratadas idénticamente, fue posible realizar un solo estudio de HACCP a la vez. Debido a que la calidad de un experimento implica un control en la excelencia de la planeación, el análisis e interpretación de los datos; los riesgos fueron estimados para todo el proceso experimental, incluyendo la formulación, producción y almacenamiento de la dieta. Los principios del HACCP que se enlistan a continuación fueron usados en la parte de análisis de riesgos.

- 1.) Formación del equipo HACCP
- 2.) Descripción del producto
- 3.) Identificación del uso
- 4.) Construcción del diagrama de flujo
- 5.) Verificación del diagrama de flujo en el sitio

- 6.) Listado de los los riesgos identificados para cada paso y establecimiento de medidas preventiva para controlar los riesgos
- 7.) Aplicación de el árbol o esquema de decisión HACCP a cada etapa del proceso, para la determinación de puntos críticos de control
- 8.) Establecer los puntos claves y tolerancia para cada punto crítico de control (PCC)
- 9.) Establecer un sistema de monitoreo para cada CCP
- 10.) Establecer el almacenamiento de archivos y documentación

(Pierson y Corlett, 1992)

### **Formación del equipo de análisis de riesgos**

El equipo de investigación fue seleccionado por su nivel y diversidad de conocimiento en la investigación y cultivo de los moluscos marinos. Los miembros del equipo fueron Zachary Kain, Dra. María Teresa Viana, Dr. Zaul García Esquivel, M.C. Cassandra Anguiana Beltrán, José Muñoz y Steven Walker.

### **Descripción del producto**

El resultado final de los experimentos realizados en el laboratorio de nutrición FEED Haliotis, es información experimental válida y reproducible. Un producto intermediario es la dieta experimental usada durante el experimento de crecimiento. Las dietas formuladas, que hemos designadas como “aquafeed”, son una herramienta importante de investigación en los experimentos sobre nutrición y fisiología. Para el presente estudio,

las dietas experimentales fueron denominadas como ZKAD41 a la ZKAD 45 con el contenido de ingredientes en la tabla encontrado en Anexo 1.

Los niveles de inclusión de cada ingrediente en las cinco dietas experimentales están listadas en Anexo 2. Las diferencias en la formulación de cada una son únicamente en la fuente de carbohidratos. Los carbohidratos usados fueron almidón de maíz, dextrina, celulosa, carboximetilcelulosa y sucrosa.

Después de la extrusión en frío, abajo de 50°C, la dieta fue cortada en pedazos de 10 mm × 10 mm × 2 mm. La dieta se almacenó congelada y se le administró al organismo descongelada en raciones previamente pesadas.

#### **Identificación del uso.**

Se pretende que los resultados de los experimentos describan el aprovechamiento relativo de diferentes carbohidratos en dietas formuladas para abulón. Los resultados serán publicados para conocimiento y uso de la comunidad global científica.

Para ser apropiadas para el experimento, las dietas deben de ser atractivas para el abulón y deben de ser consumidas a una velocidad considerada adecuada para la especie. La dieta debe de carecer de cualquier otro elemento no nutritivo que interfiera con la velocidad de consumo, la salud o sobrevivencia de los organismos experimentales y que previene la comparación válida entre las dietas experimentales.

#### **Construcción del diagrama de flujo**

El proceso de diseñar y ejecutar experimentos de nutrición en moluscos constituye un proceso de diez etapas, lo cual está en la Figura 4.

Figura 4: Diagrama de flujo del proceso experimental en moluscos marinos



### **Construcción de la base de datos de FEED Haliotis**

La base de datos fue diseñada para el equipo del proyecto FEED Haliotis, ubicado en la Universidad Autónoma de Baja California, México. La directora del proyecto, Dra. María Teresa Viana dirige un grupo que trabaja con moluscos marinos y se dedica a estudiar su nutrición y su fisiología. El equipo de personas del laboratorio consiste en dos encargados de laboratorio, siete estudiantes de posgrado, dos tesisistas universitarios y un estudiante de servicio social. Los estudios que se realizan en el laboratorio fueron sobre la factibilidad de introducir nuevos ingredientes a las dietas de los moluscos, así como de algunos aspectos de interés fundamental de la nutrición de los mismos. Los estudios realizados sobre fisiología, se basan principalmente en la respirometría.

El proyecto de la base de datos que se presenta aquí utiliza el paquete de software FileMaker<sup>®</sup> Pro 5 para interconectar los datos, usando el modelo de relación. Así, cierta información de un archivo o base de datos hace juego con la información de otro archivo o base de datos, permitiendo que la información sea compartida entre las diferentes bases de datos (Feiler, 1999).

La base de datos no consiste en un solo archivo, sino en un número determinado de archivos interconectados que juntos forman un sistema completo de manejo de laboratorio. Primero se creó un almacén central que contiene la información utilizada por todos los archivos periféricos. Las bases de datos DataRef, Referencias y Colegas y Proveedores forman esta unidad central. Después, se creó un menú que contiene una conexión con el almacén central y un archivo enlazado también a éste último. Este

archivo se modificó con los protocolos deseados, los cálculos para los estanques y el sistema, ingredientes, dietas, compras, tareas, proveedores, formulación de dietas balanceadas y análisis de riesgos. Los datos-meta (ver glosario) que generalmente se encuentran en los datos del diccionario se encuentran saturando el paquete de software. Finalmente, todos los archivos fueron creados independientemente y se agregaron las conexiones apropiadas entre ellos.

El presente documento pretende existir como guía para 1.) Investigadores que trabajan con nutrición de abulón, 2.) Investigadores y acuacultores interesados en la reducción de riesgos, el mejoramiento de la calidad de su producto y 3.) Investigadores con interés en bases de datos relacionales como herramienta de manejo. Para que la información contenida sea fácil de leer, la descripción del equipo de análisis de riesgos, el diagrama de flujo y factores considerados en la evaluación de riesgos fueron escritos en formato de ensayo dentro de la tesis. El resto del análisis de riesgos se encuentra en formato de tablas dentro del Anexo 14: Analisis de Riesgos.

## RESULTADOS

### **Descripción de los Riesgos**

Los riesgos se basan en el siguiente resumen de las consideraciones relacionadas con cada segmento del diagrama de flujo del proceso. El análisis de riesgos se encuentra en el Anexo 14.

### *Diseño experimental y estadística*

El diseño experimental es crítico para lograr ver las diferencias entre los diferentes tratamientos. La duración del experimento, el número de individuos por unidad experimental, la elección del tamaño y especie del organismo experimental, juegan un papel crítico en la utilidad de la información que resulte del experimento (D'Abramo y Castell, 1997).

Cuando se considera el número de organismos por unidad experimental, se deben tomar en cuenta las condiciones específicas de la especie. Por ejemplo, algunos investigadores que trabajan con algunos invertebrados, específicamente crustáceos decápodos, recomiendan hacerlo con organismos en unidades o recipientes separados. Esto es para que la respuesta de cada organismo sea una observación independiente (D'Abramo y Castell, 1997).

Los animales deben ser asignados a la unidad experimental al azar, y realizar los ajustes por efecto de espacio mediante un procedimiento estadístico de ajuste de espacios



entre las unidades experimentales. Además, cuando sea posible se recomienda el uso de organismos de progenitores comunes (D'Abramo y Lovell, 1991).

El uso de controles y referencias (como la dieta de referencia) ayuda a encontrar fuentes de ruido en la estadística. Las dietas estándar usadas de referencia son muy útiles en los experimentos de nutrición, pero también para estudios de enfermedades, genética, fisiología o toxicología (D'Abramo y Castell, 1997). Dependiendo del tipo de datos de referencia o de control, la información puede o no ser usada en las comparaciones estadísticas. En la actualidad, no existe una dieta de referencia en el campo de la nutrición de abulón. Hasta que no sea desarrollada una dieta de referencia, cualquier dieta que previamente haya permitido un buen crecimiento en un abulón de la misma talla y especie que el utilizado, es suficiente. Por supuesto, la dieta de referencia no debe de mostrar ninguna señal de disminución de calidad (rancidez de los lípidos, crecimiento de hongos).

Los datos preliminares pueden ser de gran utilidad para un diseño experimental apropiado. Con estos datos (crecimiento, producción de heces, etc.) se puede realizar un análisis preliminar y determinar el número de réplicas (observaciones) necesarias para lograr un nivel de confianza que pueda detectar las diferencias entre los diferentes tratamientos (Searcy-Eernal, 1994; D'Abramo y Castell, 1997)

#### *Diseño del sistema.*

Las necesidades fisiológicas del organismo combinadas con las necesidades prácticas, como el número y tamaño de organismos y espacios necesarios de trabajo disponible, determinarán el tamaño del sistema a construir. El equipo requerido para el sistema

dependerá de varios factores, incluyendo la confiabilidad, el precio, facilidad de mantenimiento y tamaño. Los materiales utilizados dependerán de su toxicidad relativa, costo y funcionamiento. El Anexo 4 muestra la toxicidad relativa de varios materiales, en los cultivos de algas.

En la elección de materiales, Huguenin recomienda que en sistemas de agua de mar, como regla general, se deben enjuagar los materiales en agua de mar con flujo continuo por dos semanas antes de su uso (Huguenin y Colt 1989). Los ensayos biológicos pueden indicar también la toxicidad de cualquier material cuestionable (Huguenin y Colt 1989), como el ensayo de fertilización de células espermáticas o ensayo de larva trocófora de abulón. Adicionalmente se debe tener especial cuidado cuando se empleen metales en el sistema (aún acero inoxidable) y, además, se deben considerar las propiedades del agua de mar que se reciba (potencial oxidativo, carga de sólidos en suspensión y su contenido biológico), durante la etapa de diseño del sistema.

Una vez construido el sistema, y antes de colocar los organismos en éste, se deben efectuar los cálculos de capacidad de carga (biomasa), tasa de flujo, capacidad de refrigeración y/o calentamiento, dosis de desinfección y medicación. Otro factor importante cuando se enfrenta con unidades experimentales con bajo recambio o tasa de flujo, es el área de superficie disponible (D'Abramo y Castell). Los parámetros que afectan la calidad del agua se muestran en Anexo 5.

Por otra parte, ciertos tratamientos considerados benéficos para la calidad del agua, pueden resultar perjudiciales al momento de evaluar los requerimientos nutritivos de un

organismo particular. Por ejemplo, la luz ultravioleta, que es comúnmente usada para desinfectar el agua de mar, también estimula el desove en abulones maduros (Leighton et al., 1981). Los aminoácidos disueltos en agua de mar, pueden constituir una fuente de energía para invertebrados como larvas de ostión o abulón, los cuales pueden ser un suplemento no deseado al momento de comparar tratamientos. Peor aún es la presencia de vitaminas, minerales, lípidos o aminoácidos en el agua que ingresa, ya que pueden prevenir la detección de la respuesta a una deficiencia, y hacer que las determinaciones de los requerimientos dietéticos sea imposible (D'Abramo and Castell, 1997). Además, como los abulones son pastoreadores bentónicas, la presencia natural de microalgas o detritus orgánico puede presentarse como un alimento suplementario para el abulón. Durante los afloramientos de fitoplancton, las microalgas que ingresan al sistema también compiten por oxígeno (a través de la respiración en ausencia de la luz) y, si se encuentran en grandes números, pueden mecánicamente inhibir la respiración obstruyendo el ctenidium. Algunos afloramientos de algas pueden ser tóxicos y promover una respuesta a la toxicidad durante el acondicionamiento o periodo experimental (Shumway y Cucci, 1987; Shumway, 1990). Por lo tanto, si bien, esta alimentación suplementaria puede ser benéfica para el productor, el ingreso de los nutrientes al sistema y el riesgo de toxicidad, hace que se recomiende el uso de la filtración del agua de mar que ingresa al sistema.

Aunque el agua de mar pueda estar dentro de los parámetros definidos, fluctuaciones rápidas pueden provocar una respuesta de estrés por parte de los organismos experimentales y conducir a conclusiones incorrectas sobre los requerimientos de

nutrición o que tan completa es la nutrición empleada (D'Abramo and Castell, 1997). Por lo tanto el diseño del sistema experimental debe limitar de forma efectiva los cambios en la calidad de agua u ocasionados por cambios diarios, periódicos o estacionales.

### *Calidad del agua*

Para la mayoría de los tipos de acuicultura marina, es suficiente mantener el agua de acuerdo con la tabla encontrada en el Anexo 6. Para asegurar que el organismo en estudio sea mantenido en homeostasis se deben proveer las necesidades ambientales especie específicas. A continuación se presenta una lista de información relacionada con los requerimientos específicos *H. fulgens*.

### **Parámetros físicos**

- Rango de temperatura.

La tasa metabólica del abulón se ve afectada por la temperatura del agua, como también por la tasa de alimentación. El total consumido por *H. discus hannai* a 12.5°C es 2.3% en base a peso corporal, a 17.2 °C es de 7.2 % y a 22.7°C es de 15.3% (Hahn, 1989).

El abulón azul juvenil muestra mayor crecimiento y se recomienda un acondicionamiento a temperaturas entre 20 y 28°C (Hahn, 1989), aunque en ocasiones se han observado mortalidades a temperaturas cercanas al límite superior del intervalo antes mencionado<sup>1</sup>. La tasa de crecimiento de abulones azules juveniles (conchas de 1 a 2 cm

---

<sup>1</sup> Viana, M.T. com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453, Ensenada, México.

de largo) a 28°C es aproximadamente 1.6 veces mayor que a 16°C (Hahn, 1989).

Abulones azules con concha de  $1.0 \pm 0.2$  mm de longitud criados por un mes, crecieron mejor en el rango entre 23 y 25 °C (Leighton en Hahn, 1989). La  $LT_{50}$  (temperatura a la cual la mitad de la población de abulones muere) en 48 horas de *H. fulgens* es de 31.5°C (Hahn, 1989).

#### ▪ Rango de salinidad

Los abulones muestran tolerancia a un amplio rango de salinidad en el agua (Hahn, 1989) donde individuos juveniles de *H. discus hannai* han probado sobrevivir a un rango de salinidad de entre 25 y 44 ‰ (Hahn, 1989). La salinidad optima para una alta supervivencia de larvas de *H. discus* es entre 24.1 y 36.3 ‰, con las mejores supervivencias en intervalos entre 30.8 y 36.3 ‰ (Hahn, 1989). La tasa de consumo de oxígeno es constante (2.7 mililitros de O<sub>2</sub> por litro) para clorinidad por arriba de 14 ‰, pero decrece rapidamente por debajo de 13‰ (Hahn, 1989).

#### • Sólidos en suspensión

Generalmente, la turbidez alta (medida como el grado de translucidez en el agua) no afecta a los organismos directamente, pero puede afectar al sistema de su desempeño de vida de los organismos. Sin embargo, si la turbidez proviene de un afloramiento de fitoplancton, los problemas pueden incrementarse debido a la toxicidad de dinoflagelados, o algas tóxicas., o mediante la competencia por oxígeno o por la descomposición de

---

células de algas muertas. Piper en 1992 sugirió que mediciones de turbidez menores a 2,000 partes por millón, son aceptables en cultivo de peces. La esterilización ultravioleta y remoción de partículas a  $<5 \mu\text{m}$  es estándar para cultivo de abulón (Leighton, 2000).

- Luz

La alimentación de *H. discus hannai* es diurna, siendo máxima entre el atardecer y medianoche (Hahn, 1989). De acuerdo a Uki y Kikuchi en 1975, *H. discus hannai* tiene un ritmo circadiano, con tasa metabólica creciente entre el atardecer y medianoche y decreciente entre medianoche y mediodía (Uki y Kikuchi, 1984). Datos de respirometría no publicados de Chacón (2001) también demuestran un aumento de la tasa respiratoria de *H. fulgens* durante la noche<sup>2</sup>.

### **Parámetros Químicos**

- pH y alcalinidad

En sistemas de flujo marino, la alcalinidad y dureza expresadas como equivalentes de carbonato de calcio, son relativamente constantes y muy difíciles de controlar. Sin embargo, en un estudio relacionado con sistemas de agua de mar recirculantes, se encontró que en estanques donde fue adicionada conchas de ostión molido (una fuente de carbonato de calcio) no ocurrió erosión severa de la concha como se observó en los estanques control. La adición de conchas de ostión no han mostrado afectar significativamente el pH del agua (Sakai, 1980 en Hahn 1989).

- Gases

Los criterios generales para parámetros relacionados con gases en aguas para acuicultura están enlistados en el Anexo 7: Criterios químicos en aguas para acuicultura.

A continuación se presentan las consideraciones relacionadas al abulón:

#### Presión de Gas Total

Cuando los niveles de oxígeno aumentan entre 0.5 y 2.0 mg/l sobre el nivel de saturación el abulón es sometido a estrés o demuestra un comportamiento anormal (Hahn, 1989).

- Oxígeno

La solubilidad del oxígeno en el agua de mar, con una salinidad de 35 y temperatura de 12°C es de 8.648 mg/l y a 26°C es 6.658 mg/l (Krause, 1984 en Huguerin y Colt 1989). (La solubilidad que corresponde a 2 mg/l o 30% mayor a la temperatura más baja). El nivel crítico de oxígeno para la vida del abulón es mayor a 4 mg/l O<sub>2</sub> (Jan, 1980 y Chen, 1984 en Hahn 1989).

El consumo de oxígeno está directamente relacionado con la temperatura del agua y el peso corporal. *H. discus* consume 17-47 ml·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> a 13-14°C, pero a 22-23°C consume 52-85 ml·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (Uki y Kikuchi, 1975). La relación general entre el peso del cuerpo y el consumo de oxígeno es  $R=kW^b$ , donde b es 0.75 para organismos poiquiloterms y peces (Hahn, 1989).

---

<sup>2</sup> Chacon. Aguirre, O. com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453,

- Acido sulfhidrico

El ácido sulfhídrico, un producto de la degradación anaeróbica de la materia orgánica generalmente asociado a la acumulación de material fecal o alimentos no ingeridos en la unidad experimental. El control se mantiene generalmente a través de un buen diseño del sistema o de limpiezas rutinarias de este último. Concentraciones de sulfuro de hidrógeno tan bajas como 0.05 ppm retardarán el crecimiento del abulón (Chiu, 1981 en Hahn 1989).

- Nutrientes

Sano y Maniwa encontraron que la tasa de alimentación de *H. discus hannai* se encuentra altamente afectada por los niveles de amoníaco en el agua y es prácticamente inhibida por concentraciones de amoníaco de 70 µg/l (Sano, 1962 en Hahn 1989).

La proporción de compuestos nitrogenados del tipo  $\text{NH}_3\text{-NH}_4$  que se encuentre en la forma amoniacal dependerá en gran medida del pH y de la temperatura del agua del sistema. Dentro del intervalo de temperatura y pH óptimos para *H. fulgens* (temperatura 20-25 C y pH 7.8-8.2) la proporción de la forma tóxica  $\text{NH}_3$  varía entre 0.0243 y 0.0825% (Huguenin, 1989).

- Compuestos Tóxicos

- Metales Pesados



Los metales pesados pueden tener un profundo impacto en el crecimiento y supervivencia del abulón. Se puede mantener el control, evitando el uso de dichos metales (por ejemplo tuberías de cobre) en el diseño del sistema y haciendo revisiones periódicas del agua que ingresa al sistema. Algunos valores conocidos de toxicidad por metales pesados son: La  $DL_{50}$  en 72 horas por cobre en *H. fulgens* es de 100 partes por billón (Marks, 1938). La mortalidad por cobre ocurre a niveles tan bajos como 80 ppb en larvas y 50 ppb en adultos de *H. rufescens* y *H. cracherodii* (Martin et al., 1977). Concentraciones de cobre sobre 32 ppb en *H. cracherodii* y 56 ppb en *H. rufescens* causan anormalidad en el tejido branquial (Martin et al., 1977).

Concentraciones de 40 ppb de cobre matan la totalidad de las larvas de *H. discus hannai* en 2 días (Zongqing en Hahn 1989). La  $DL_{50}$  en 96 horas por cobre para individuos adultos de *H. rufescens* es de 65 ppb (Martin et al., 1977). La  $DL_{50}$  en 96 horas por cobre para larvas de *H. rufescens* es de 114 ppb (Martin et al., 1977).

#### - Biocidas

Los biocidas pueden constituir una seria amenaza para los laboratorios o instalaciones de acuicultura situadas en zonas agrícolas.

### **Parámetros Biológicos**

- Patógenos

Las enfermedades pueden ser controladas mediante el control de la temperatura y haciendo fluir constantemente agua fresca al sistema (Hahn, 1989). Se encontró que una

infección de *Vibrio alginolyticus* en Monterrey, California, se relacionó con estrés (Elston, 1983 in Hahn 1989). Se puede usar sulfato de neomicina a concentraciones de 50 mg/l para el tratamiento de infecciones por *Vibrio spp.* (Ebert, 1974 en Hahn 1989).

### *Calidad de los organismos experimentales*

#### **Selección**

Cuando se trabaja con animales vivos es necesario conocer diversos aspectos de éstos como lo son su fecha de nacimiento, historia alimenticio, y el lote del que provienen entre otros. Los organismos deben ser seleccionados por su edad y no por su tamaño, esto es para evitar diferencias debidas al estadio de desarrollo o nivel de maduración (D'Abramo y Castell, 1997). Idealmente los organismos seleccionados deberán ser de tamaño uniforme, cuando esto no es posible el tamaño de muestra deberá ser mayor para disminuir la variación debida al peso o talla. Esta variación dependerá de la especie, lote, grado de aleatorización, historial *etc.* (D'Abramo y Castell, 1997).

Es necesario asegurar que las condiciones del sistema de cultivo sean similares a aquellas que nos han permitido tener un adecuado crecimiento de los animales (temperatura, salinidad, *etc.*). En caso de requerirse el uso de anestésicos para el manejo de los organismos, se debe asegurar de que no existan efectos colaterales que alteren el crecimiento o la salud de los mismos. Chacón (2001) encontró que el sulfato de magnesio es efectivo para el anestesiado de juveniles de abulón azul y mostró que el tiempo de recuperación con este fue menor comparado con otros anestésicos (fenoximetanol,

benzocaina)<sup>3</sup>. También encontraron que después del uso de anestésicos en los organismos estos se observaron débiles y además no se alimentaron al siguiente día<sup>4</sup>. Por lo tanto se recomienda dar un mínimo de dos días de recuperación post-anestésico antes de iniciar un experimento.

### Transporte

Aunque algunos argumentan que el mejor método para transportar abulones juveniles es el agua de mar (Hahn, 1989) por consideraciones prácticas y económicas la mayoría de los productores de abulón transportan sus organismos en húmedo y frío. Este sistema está basado en la disminución de la tasa metabólica, mediante la reducción de su temperatura. Una vez que el abulón llega se recomienda que la temperatura se incrementara un grado centigrado por hora hasta que la temperatura del agua alcanza la temperatura ambiental<sup>5</sup>.

Leighton presenta la siguiente metodología para transportar abulón vivo:

---

<sup>3</sup> Esquivel, Z.G., com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453, Ensenada, México.

<sup>4</sup> Viana, M.T., com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453, Ensenada, México.

<sup>5</sup> Viana, M.T., com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453, Ensenada, México.

*“Los abulones son comunmente colocados uno al lado del otro en foam húmedo (hojas de espongas artificial) utilizando varias capas y éstas encerradas en una bolsas de polietileno y empacado a su vez en cajas de “estirofoam”. Hielo en gel es colocado debajo de las bolsas de polietileno y se adiciona aire eriquicido con oxígeno a las bolsa de polietileno. El transporte de abulones vivos y saludables a destinos distantes puede ser asegurado en un tiempo de uno o dos días cuando el manejo proporcionado en tránsito de los contenedores aislados sea adecuado y sin contratiempos. A su llegada este debe de ser colocado en agua de mar entre at 10-15 °C con flujo y aereación” (Leighton, 2000)*

### **Acondicionamiento**

Previo al acondicionamiento de los abulones es importante su revisión para asegurar que no haya organismos epífitas, pues éstos pueden resultar en un sobrepeso, por lo que es recomendable su remoción usando un cepillo de alambre.

Con la finalidad de uniformizar la historia alimenticia de los organismos experimentales, durante el acondicionamiento es recomendable el uso de una dieta control que cuente con características similares a las dieta experimentales por un periodo determinado,.

La duración del periodo de acondicionamiento dependerá del tipo de experimento (aun cuando el ingrediente a probarse sea rápidamente metabolizado o atrapado), tamaño,

edad y temperatura (D'Abramo y Castell, 1997). Para poder garantizar que los animales han aceptado la dieta y que están creciendo adecuadamente estos pueden ser marcados individualmente. Así mismo para tener una evaluación rápida y sencilla del crecimiento de forma visual se pueden emplear dietas que contengan algún pigmento que marque la conch (por ejemplo, *Spirulina*), distinguiéndolo fácilmente del crecimiento anterior<sup>6</sup>. Una tasa de crecimiento normal en el abulón azul es 2 mm/mes<sup>7</sup>

### *Calidad de las Dietas Experimentales*

#### *Formulación*

La elección de los ingredientes para la formulación de dietas, debe realizarse conforme a los requerimientos nutricionales del organismo. Sin embargo también deben tomarse en cuenta la calidad, disponibilidad, presencia o no de agentes no nutricionales (como inhibidores de enzimas digestivas) y características físicas del ingrediente (como lo son el tamaño de grano, textura, solubilidad).

Es necesario comprender los hábitos de alimentación y conocer los requerimientos de los abulones antes de iniciar un experimento (Hahn, 1989; Fleming et al., 1996). Es necesario considerar las aseveraciones que se hacen al determinar los requerimientos nutricionales de organismos experimentales.

---

<sup>6</sup> Viana, M.T., com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453, Ensenada, México.

<sup>7</sup> Viana, M.T., com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453. Ensenada, México.

Los riesgos relacionados con la formulación de alimentos están asociados a una aproximación errónea de los valores nutricionales de los ingredientes y con una inadecuada inclusión de los niveles de nutrientes esenciales en el alimento (Hardy, 1991). Es necesario considerar que algunos ingredientes puedan variar considerablemente en su composición nutricional (Lazo y Davis, 2000).

Aun se conoce poco de los requerimientos nutricionales de invertebrados acuáticos, por lo que los valores encontrados en la literatura pueden variar por diferentes motivos tales como estadio de vida, tamaño o etapa del ciclo reproductivo de los organismos en estudio y condiciones de manejo entre otros.

La disponibilidad de cualquier ingrediente puede verse afectada por numerosos factores tanto físicos como químicos. Al formular dietas se deben considerar las interacciones tanto positivas como negativas entre ingredientes así como las diferencias entre sus digestibilidades. Por ejemplo se sabe que el alginato y el ácido fítico son quelantes por lo que disminuyen la disponibilidad de metales iónicos divalentes como el calcio (D'Abramo y Castell, 1997), punto de gran importancia en organismos en los que el crecimiento involucra la depositación de calcio en la concha. Además es importante considerar el lavado del alimento ya que esto puede reducir significativamente la disponibilidad de cualquier nutriente. Goldblatt en 1979 encontró que de un 20 a un 70% de los nutrientes solubles en agua se pierden durante los primeros 20 minutos posteriores a la inmersión del alimento en el agua. Se ha encontrado que el agar, el gluten y el

alginato son buenos ligantes, sin embargo solo cuando se cubre con una cápsula 30% lípidos y 70% etil celulosa se pudo controlar el lavado (D'Abramo y Castell, 1997).

Pueden además existir problemas sencillos durante la formulación mientras que los investigadores tratan de cubrir los requerimientos en la dieta, el porcentaje de inclusión de los ingredientes puede estar calculado erróneamente. Un formato o programa que verifique que la formulación de ingredientes llene los requerimientos para el experimento y que fueron calculados correctamente puede en gran medida, reducir el riesgo del error humano. La formulación de las dietas experimentales debe ser comparada con otras previamente utilizadas observando el desarrollo que estas tuvieron para tener una idea general de lo que se espera obtener de las nuevas dietas y así con esto saber si se están teniendo resultados aceptables o no.

#### *Evaluación de Requerimientos Nutricionales*

Algunas de las técnicas empleadas para estimar los requerimientos nutricionales son el uso de las mediciones alométricas, índice de condición, cuantificación de la ganancia de peso, sobrevivencia, porcentaje de los diferentes tejidos y de los índices bioquímicos calculados (D'Abramo y Castell, 1997). También pueden ser medidas respuestas histopatológicas y físicas. Sin embargo, para determinar los requerimientos actuales de un organismo es recomendable hacer una comparación entre los requerimientos propuestos y los ya existentes, así como determinar la disponibilidad de los nutrientes para el organismo.

En el caso de los nutrientes solubles en agua se debe poner particular atención, sobre todo cuando se está trabajando con animales marinos de pastoreo los cuales comen lentamente raspando su alimento.

Es importante determinar los requerimientos básicos de un nutriente en los tejidos animales antes de iniciar un experimento. Ya que de no hacerlo, los signos de una deficiencia no podrían ser observados en el tiempo apropiado debido a las reservas de este nutriente en el organismo (D'Abramo y Castell, 1997).

Al formular se debe decidir si los experimentos se desarrollarán con dietas puras o con dietas prácticas. Las dietas puras están compuestas principalmente por ingredientes refinados, definidos por el Comité de Nutrición Animal del Instituto Americano de la Nutrición Experimental, EANCAIN 1987, (D'Abramo y Castell, 1997). La nomenclatura de los ingredientes debe seguir el criterio establecido por la Unión Internacional de las Ciencias de la Nutrición (1978) (D'Abramo y Castell, 1997).

Los requerimientos nutricionales específicos de especie aun no están bien definidos. A continuación se mencionan algunos de los valores aceptados en general para la formulación de dietas de juveniles de *H. fulgens*.

### *Energía*

En gasterópodos se asume que la energía metabolizable y la energía digestible son casi iguales. La demanda de energía de mantenimiento para *H. rubra* a 15° C es de 47.6  $\text{JW}^{-0.75} \text{día}^{-1}$  (peso metabólico) (Fleming, 1991 en Fleming et al., 1996)



### *Proteína y Amino Acidos*

La harina de pescado, de soya y caseína son la fuente primaria de proteína en la mayoría de las dietas balanceadas para abulones (Fleming et al., 1996). El contenido de proteína en las dietas de abulón con el cual trabajan algunos laboratorios se encuentra entre 30 y 40%. En algunos trabajos de crecimiento se muestra que existe un incremento lineal del crecimiento con respecto al aumento de proteína, dentro de un rango que va del 15 al 44% (Uki, *et al.*, 1985a en Fleming et al., 1996), sugiriendo que el nivel óptimo de proteína se encuentra en algún punto cercano al nivel máximo o incluso por encima de éste. Aun cuando no se ha estudiado profundamente el perfil de aminoácidos requerido, Allen y Kilgore en 1975 al incorporar glucosa marcada radioactivamente con (U-<sup>14</sup>C), en la estructura de treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, triptofano, lisina, histidina y arginina encontraron que estos aminoácidos, no son sintetizados por el abulón rojo *H. rufescens*.

### *Lípidos*

En abulones el requerimiento de lípidos es muy bajo y su capacidad para utilizar lípidos exógenos es altamente eficiente (Fleming et al., 1996). La mayoría de las investigaciones reportan un contenido total de lípidos en la dieta menor a un 5% (Fleming et al., 1996).

### *Vitaminas*

La mayoría de los investigadores usan una mezcla rica de vitaminas en una proporción de 1.5% de la dieta formulada (Fleming et al., 1996).

### *Minerales*

La mayoría de los investigadores usan una mezcla rica de minerales del 4% del peso de la dieta formulada (Fleming et al., 1996).

### *Tamaño de Partícula*

El tamaño de partícula reportado varía, pero se piensa que está relacionado con el tamaño de la rádula del abulón (Fleming et al., 1996). En las dietas comerciales y experimentales se encuentra un tamaño de partícula que varía entre 50 y 500  $\mu\text{m}$  (Fleming et al., 1996).

### *Recepción, registro y almacenamiento de los ingredientes*

#### *Generalidades*

El control de calidad de las dietas experimentales inicia con el control de cada ingrediente. El criterio de control para cada ingrediente dependerá de la naturaleza de su composición y de su variabilidad en calidad.

La llegada de los ingredientes deben ser observados para detectar cualquier evidencia obvia de una deficiente preparación, un inadecuado almacenaje o transporte. Un signo de inadecuado almacenaje es la presencia de moho en los ingredientes a su llegada (Lazo y Davis, 2000). Para prevenir el crecimiento de moho, la humedad debe de ser menor a un 13%. Si el ingrediente excede el 13% de humedad, deben tomarse medidas como el secar el ingrediente o bien eliminarlo. Los ingredientes relativamente húmedos como el maíz antes de ser almacenados deberán ser secados. Otros posibles contaminantes que puede ser detectados durante la llegada de los ingredientes es la presencia de pedazos de metal,

pedras, polvo y otros contaminantes no biológicos, así como la presencia de larvas, insectos, pelos o heces de roedor y bacterias (Martinez-Millan et al., 1988; O'Keefe, 2000).

Los muestreos microbiológicos para asegurar la calidad de los ingredientes alimenticios no son recomendados por HACCP, dado que son costosos y los resultados se obtienen demasiado tarde para ser usados (Pierson y Corlett, 1992). Una forma de asegurar la calidad biológica y química de los ingredientes es pidiendo a los proveedores un certificado de calidad o asegurándose por medio del desarrollo de pruebas químicas que los ingredientes se encuentren dentro de los límites químicos críticos permisibles (Pierson y Corlett, 1992).

Dentro de las pruebas químicas recomendadas para los ingredientes alimenticios se encuentra por lo general el análisis químico proximal (determinación de humedad, proteína cruda, lípidos, fibra cruda, cenizas y extracto libre de nitrógeno) (Martinez-Millan et al., 1988). La exactitud de las pruebas químicas se puede ver afectada por un muestreo inadecuado, errores en el laboratorio durante el procesamiento de la muestra, medición de un inadecuado número de réplicas, técnicas de laboratorio imprecisas, errores al hacer los cálculos o simplemente y por no entender los valores y límites de los resultados obtenidos (Dong y Hardy, 2000).

El muestreo puede ser útil para asegurar la uniformidad y sobre todo la calidad de los ingredientes experimentales. Es recomendable realizar muestreos tanto para grandes lotes grandes de productos terminales así como para pequeñas cantidades de dietas

experimentales terminadas para que definir que métodos de muestreo deben ser utilizados. Pierson y Corlett recomiendan guardar una muestra de cada ingrediente para análisis posteriores, en caso de presentarse problemas en los productos terminales (dieta) (Pierson y Corlett, 1992). La calidad de los ingredientes pueden variar considerablemente. En el Anexo 8 se enlistan algunos ingredientes usados en alimentos para acuicultura y sus fuentes de variación

Una vez que se ha verificado la calidad, los ingredientes deben ser almacenados acorde con un método sistemático. El estandarizar el etiquetado de los contenedores hace más sencilla la organización e identificación y por tanto reduce el riesgo de confundir ingredientes. Es necesario escribir clara y correctamente el nombre del ingrediente, el código internacional, la fecha de caducidad y criterio de almacenaje. Deben existir varias etiquetas con esta información acompañando a cada ingrediente para hacer sencillo transferir esta información a los cuadernos de notas de laboratorio. Así mismo los ingredientes del mismo tipo pero de diferente etiquetado deben mantenerse separados y con un orden secuencial. Los ingredientes que han sido almacenados en condiciones diferentes a las recomendadas deberán ser eliminados.

#### *Harina de Pescado*

La harina de pescado merece atención especial debido a que es muy empleada en animales acuáticos. Ésta por lo general tiene un alto valor nutricional, aunque su calidad puede variar considerablemente, por lo que es necesario garantizar su calidad antes de incluirla en cualquier dieta experimental. La harina de pescado puede ser preparada como

harina de pescado completa o como harina precocida, en la que los solubles (agua de cola) no son regresados al lote antes de ser secada y molida (Dong y Hardy, 2000). El uso de la harina precocida es preferible debido a la pérdida de sustancias solubles del alimento terminado. La harina de pescado puede ser preparada como harina de pescado blanca (preparada a partir de pescado de carne blanca) o como harina de pescado café (preparada a partir de pescado de carne roja o café). A pesar de que antes se pensaba que la harina de pescado blanca era de mayor calidad nutricional, estudios recientes indican que en condiciones similares de elaboración y frescura, además del uso de antioxidantes no existen diferencias o estas son mínimas entre la harina de pescado roja y la blanca. Esto aplica solo cuando la frescura del material en crudo y las condiciones de manejo de éste son similares (Dong y Hardy, 2000). La calidad de la harina de pescado esta fuertemente correlacionada con el manejo que reciba antes y durante su elaboración. Un alto contenido de sales nos indica que existió un periodo de almacenaje prolongado antes de ser usada (Hardy, 1991). El almacenar harina de pescado en ambientes tropicales puede provocar rápidamente su rancidez; así como la oxidación de las grasas puede ser catalizada en presencia de minerales traza como el cobre y el hierro. Por lo cual los antioxidantes deben ser añadidos preferentemente durante la manufactura para limitar la degradación durante el proceso y aumentar considerablemente su vida de anaquel (Hardy, 1991).

Las harinas de pescado de alta calidad, generalmente caen dentro de las especificaciones presentadas en el Anexo 9: Especificaciones de harinas de pescado de calidad especial.

La harina de pescado con alto contenido de cenizas (17-23%) es generalmente menos deseables que aquellas con bajo contenido de cenizas. Las harinas de pescado producidas a partir de peces con hueso, como la macarela y merluza, tienen mayor porcentaje de cenizas (minerales) y menor porcentaje de proteínas que aquellas harinas producidas a partir de peces con menor cantidad de huesos, como el arenque, capelin, pilchard y anchoveta (Dong y Hardy, 2000). Las harinas de pescado elaboradas a partir de productos de atún, contienen típicamente un 20% de cenizas<sup>8</sup>. El contenido de proteína soluble en agua debe estar entre 20 y 30% en harinas de pescado completas. TVN (Nitrógeno Total Volátil) usualmente medido en el material crudo, es bajo en las harinas de pescado (Hardy, 1991; Dong y Hardy, 2000). El contenido de grasa en las harinas de pescado varía entre 6 y 12% (Hardy, 1991). El porcentaje de lípidos crudos está usualmente en el rango de 7-10% para harinas de arenque, anchoveta y merluza, y cercano a 5% para harina de pescado (Dong y Hardy, 2000).

La frescura de la harina de pescado puede ser medida como TVN (Nitrógeno Volátil Total, "Total Volatile Nitrogen") que incluye el contenido total de ácidos volátiles ("Total Volatile Acids, TVA) y de las bases volátiles (Total Volatile Bases, TVB). TVB también

---

<sup>8</sup> Viana, M.T. com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453, Ensenada, México.

incluye el óxido de trimetilamina (TMAO) (Dong y Hardy, 2000). Las fuentes de aminas biogénicas encontradas en las harinas de pescado incluyen la histamina (derivada de la histidina), cadaverina (lisina), putrecina (glutamina), tiramina (tirosina), mollerossina (histidina y lisina) e spermidina (arginina o espermina). Las aminas biogénicas pueden ser determinadas mediante HPLC (Dong y Hardy, 2000).

Las pruebas para determinar la calidad de las harinas de pescado, incluyen los análisis proximales y la composición de aminoácidos, las pruebas de proteína soluble en agua, aminas biogénicas y la digestibilidad *in vitro* (pepsina y digestibilidad pH-stat.). Otras pruebas utilizadas para asegurar la calidad de la harina de pescado son: a) ureasa b.) gossipol c.) isothiocyanato d.) aflatoxinas e.) rancidez. Existe una tabla que sintetiza las pruebas químicas utilizadas en la determinación de la calidad de la harina de pescado, la cual se presenta en el Anexo 10

### *Harina de Soya*

La harina de soya es de especial interés debido a su uso común en alimentos acuáticos, pero también por su variabilidad en calidad dependiendo del tipo de proceso. La harina de soya contiene inhibidores de tripsina que son destruidos por calentamiento, mejorando la digestibilidad (Dong y Hardy, 2000). Sin embargo, si el sobrecalentamiento es excesivo se puede reducir la digestibilidad. El sobrecalentamiento puede detectarse mediante la medición de la solubilidad de la proteína en 0.2% KOH o mediante el tinte-enlazante azul de Coomassie (Hardy, 1991; Dong y Hardy, 2000). Además, la examinación visual puede ayudar a identificar si la harina de soya está sobrecalentada.

Para verificar un calentamiento insuficiente, se puede probar la actividad inhibitoria de la ureasa y/o tripsina (Hardy, 1991).

### *Preparación*

La forma en la cual la dieta es preparada, puede afectar drásticamente. Factores como el tamaño de partícula, forma, densidad, carga estática, higroscopicidad, viscosidad y flotabilidad (D'Abramo y Castell, 1997), las cuales pueden afectar grandemente su aceptabilidad para el organismo experimental. La producción de alimentos involucra el molido y tamizado de los ingredientes, pesado, mezclado, calentamiento, extrusión y posiblemente el cortado de los pelets. El tiempo de mezcla así como el manejo de la misma, debe asegurar una distribución uniforme de los nutrientes y al mismo tiempo minimizar la pérdida de nutrientes lábiles al calor (mezcla en frío). Esto no puede ser posible si es necesaria la gelificación del almidón, donde el almidón debe ser calentado por arriba de los 80°C (Barrows, 2000).

### *Molido y tamizado de los ingredientes*

Antes del tamizado y pesado, cada uno de los ingredientes debe ser revisado mediante la lectura de la etiqueta. El investigador debe asegurarse que las condiciones de almacenamiento se han cumplido, y que la fecha de expiración no ha caducado, así como de verificar que el contenido del envase sea el correspondiente a la etiqueta, el contenido del envase, es el intentado producto (ingrediente) antes de revisar la hoja de la formulación de la dieta. Los datos de la etiqueta deben ser transferidos al cuaderno del laboratorio.



El tamaño de partícula de la dieta puede ser controlado mediante el tamizado de todos los ingredientes, a un tamaño uniforme. Así como en 1996, cuatro dietas experimentales presentaron tamaños máximos de partículas de 50 a 500  $\mu\text{m}$  (Fleming et al., 1996).

### *Pesado de los Ingredientes*

Cada ingrediente debe ser pesado separadamente, y tener los cuidados necesarios para prevenir la contaminación de los ingredientes durante el pesado. Para lograr esto se deben de utilizar espátulas o cucharas limpias, que serán utilizadas preferentemente para un solo ingrediente.

Para mejorar la técnica de medición y pesado, los protocolos deben estar disponibles para todos los miembros del equipo de laboratorio. Los talleres pueden también ayudar a los miembros a medir y pesar correctamente los ingredientes y así reducir el riesgo de contaminación.

### *Mezcla*

El aseguramiento de una mezcla correcta es de vital importancia, la cual puede ser realizado mediante muestreo, pruebas químicas y el uso de marcadores. A escala industrial no hay ningún problema en cuanto a mezcla se refiere, debido a que hacen uso de “ultramezcladores”<sup>9</sup>, pero a escala de producción de laboratorio, la carencia de una buena mezcla significa un posible riesgo para la calidad total de la dieta

---

<sup>9</sup> Viana, M.T., com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453, Ensenada, México.

### *Calentamiento*

El proceso de calentamiento, como lo es el cocimiento y la extrusión, incrementa la digestibilidad del almidón en algunos peces y especies animales (Dong y Hardy, 2000). Aunque el calentamiento incrementa la digestibilidad de proteína en las harinas de soya mediante la inactivación de inhibidores de tripsina y otros factores antinutricionales, el calentamiento excesivo permite la reducción de la digestibilidad de proteína y la disponibilidad de aminoácidos (Dong y Hardy, 2000; Sugiura y Hardy, 2000). Bajo condiciones de sobrecalentamiento y en la presencia de compuestos reactivos disponibles, como lo son la glucosa y lisina, se pueden formar enlaces químicos no digeribles (Dong y Hardy, 2000). El sobrecalentamiento puede también provocar la desnaturalización de las vitaminas que contiene la dieta (O'Keefe, 2000).

### *Extrusión*

En el interés de conservar los nutrientes lábiles al calor, el prensado a mano o la extrusión en frío es generalmente lo preferido y usualmente requieren más de un 25% de humedad (Barrows, 2000). En el peletizado por compresión, el peletizado por vapor es el más común de los tipos de peletizado de alimentos para animales y peces, y utiliza un 16-18% de humedad y temperaturas de 65 a 80°C (Barrows, 2000). El acondicionamiento mediante vapor, parcialmente coce o gelatiniza el almidón y ligantes activos, como la lignina sulfonato, la cual es un derivado de la madera (Barrows, 2000). La elaboración por extrusión permite controlar la densidad del alimento balanceado y completar con la gelatinización del almidón. La flotabilidad del pelet puede ser controlada mediante la

reducción de la presión y/o la temperatura del alimento antes de que deje el extrusor. De esta manera, se puede obtener una mejor flotabilidad (Barrows, 2000). Además la extrusión permite adicionar agregar más grasa como aderezo (Barrows, 2000), sin embargo, esto no es necesariamente favorable para las dietas de abulón, debido a que el requerimiento de lípidos en abulones es bajo (Fleming et al., 1996). Errores en el proceso de peletizado puede causar que se produzcan pelets inferiores (Hardy, 1991). Algunas tablas que enmarcan la calidad de pelets y atributos importantes para los cultivadores de peces, pueden ser encontradas en los Anexos 12 y 13.

Una vez extruídos, para prevenir la pérdida de nutrientes lábiles al calor, se realiza preferentemente el secado de los pelets mediante aire más que con calor o bien por congelamiento (D'Abramo y Castell, 1997).

#### *Almacenamiento y Manejo*

Condiciones pobres de almacenamiento pueden drásticamente reducir el valor nutricional de una dieta terminada, y por consiguiente disminuir o nulificar la validez de los resultados experimentales. Un pobre almacenamiento en alimentos comerciales puede dar como resultado cuatro tipos de pérdidas. A.) Pérdida de peso, B.) Pérdida de calidad, C.) Riesgos para la salud y D.) Pérdidas económicas.

Un tiempo máximo de almacenamiento de las materias primas es generalmente aceptable, además cada ingrediente debe ser considerado individualmente. Para prevenir el decremento en calidad, el almacenamiento debe ser en un espacio bien ventilado con protección a rápidos cambios de temperatura (O'Keefe, 2000). Un etiquetado apropiado

de los alimentos puede también prevenir errores fatales en un diseño o experimento de alimentación o en un experimento de crecimiento (Pierson y Corlett, 1992; Lazo y Davis, 2000). Además, un mal etiquetado, especialmente alimento medicado puede ocurrir (Hardy, 1991).

Para experimentos, se recomienda almacenar el alimento de la manera más cuidadosa posible, idealmente las dietas experimentales deberán ser liofilizadas y empacadas con gas nitrógeno, y posteriormente congeladas<sup>10</sup>.

La prevención de la formación de bolsas de alta humedad es un punto crítico en la prevención de crecimiento de hongos. La migración de humedad puede ocurrir si las diferencias de temperatura que hay dentro del contenedor, lo cual puede resultar como crecimiento de hongos (no apilarlos contra pisos y paredes frías).

A una humedad de 18%, *Apergillus flavis* puede crecer y producir aflotoxinas. En la trucha arcoiris, solo 0.5 mg de aflotoxina B1 por Kg de peso corporal puede causar la mortalidad en sólo 3 a 10 días. Alimentos que contienen aflotoxinas, con la mínima cantidad de 0.1-0.5 ppb de aflotoxina B1 pueden causar hepatomas en 4 a 6 meses (O'Keefe, 2000).

La rancidez de lo lípidos, es el resultado de la oxidación de los constituyentes grasos, y también pueden ser el resultado de una inadecuada formulación y almacenamiento. Un medio para controlar la oxidación de lípidos es a través de la adición de antioxidantes,

---

<sup>10</sup> Viana, M.T. com. pers. Universidad Autónoma de Baja California. km 103 Carretera Federal, Aparto Postal 453, Ensenada, México.

como la ethoxyquina, butylated hydroxyanasole, butylated hydroxytoluene (“BHT”) (Dong y Hardy, 2000; O’Keefe, 2000)

Un manejo brusco del alimento puede provocar el rompimiento del alimento (Hardy, 1991; O’Keefe, 2000), de manera que el alimento se debe manejar lo más cuidadoso posible. La producción de pequeñas partículas “polvo”, puede también reducir la calidad del ambiente dentro del estanque (Barrows, 2000).

La preparación de un juego de raciones completas, individualmente empaquetadas y almacenadas en condiciones apropiadas (por ejemplo, congelada a  $-25^{\circ}\text{C}$ ), asegura que el riesgo de contaminación del alimento y la disminución de la calidad se minimicen durante el período experimental.

#### *Confirmación de la Calidad y Aceptación de la Dieta Experimental*

La calidad biológica de los materiales para el alimento implica que se asegure que no exista contaminación por microorganismos no deseables (ie. moho, hongos o bacterias) o macroorganismos (ie. Insectos o roedores). La revisión de la presencia de microorganismos puede llevarse a cabo mediante una inspección visual o por análisis químicos. El tipo de revisión de contaminación por macroorganismos son los mismos que para los ingredientes alimenticios. Para la prevención de contaminación, es importante que el almacenamiento de la dieta se encuentre en un ambiente limpio y libre de pestes, con un adecuado empaquetamiento de cada ración, y se controle la temperatura y humedad de la dieta experimental.

Las pruebas finales de la calidad biológica de las dietas experimentales, son las pruebas de gustocidad, atractabilidad (consumo). Si los organismos experimentales consumen el alimento a una tasa aceptable, entonces el alimento es considerado apropiado.

La evaluación física de los materiales alimenticios incluye la evaluación del tamaño de partícula, distribución, densidad, estabilidad, forma, calidad del alimento particulado, color, contraste y olor (rancidez del aceite o amonio) (Lazo y Davis, 2000). La prueba de estabilidad en el agua y la dureza de los pelets es dependiente de la temperatura. Se puede probar la dureza con el uso de un penetrómetro (Utne y Rosenlund, 1981 en D'Abramo y Castell, 1997). También se puede determinar el lavado y la pérdida de nutrientes solubles en agua en un periodo de tiempo determinado (D'Abramo y Castell, 1997).

El primer medio para asegurar una calidad química de una dieta terminada, generalmente es mediante los análisis proximales, desarrollados hace más de un siglo. La descripción detallada del Sistema de Análisis Proximales (o el método Weende) se pueden encontrar en los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analíticos (Official Methods of Analysis of the American Association of Analytical Chemists) (Barrows, 2000). El contenido de energía generalmente se determina directamente, mediante la oxidación de materiales orgánicos y la medición de calor producido por una muestra utilizando una bomba calorimétrica. Con el uso de este método, el valor promedio de proteínas es 5.6 kcal/g, para lípidos 9.5 kcal/g y de carbohidratos 4.1 kcal/g (Lazo y Davis, 2000). Los métodos para determinar la

composición de aminoácidos de las proteínas incluyen los métodos microbianos, cromatografía de columna y el método del HPLC. Estos métodos se pueden encontrar en AOAC, así como los métodos para determinar vitaminas (Lazo y Davis, 2000). El contenido mineral es generalmente determinado mediante la combustión de una muestra puesta en una mufla a una temperatura en la cual libera todo el contenido orgánico. Determinación de un mineral en forma específica, se realiza a través de espectrofotometría de absorción atómica, espectrofotometría inductiva acoplada, colorimetría o fluorimetría (Lazo y Davis, 2000).

#### *Realización del experimento*

##### *Limpieza*

Se requiere mantenimiento del sistema de cultivo durante el experimento, además las actividades deben estar limitadas a aquellas que no estresen a los organismos. El cuidado debe ser el mismo que durante el periodo de acondicionamiento, de tal forma que no habrá respuesta de estrés provocada por cualquiera de los cambios en la rutina diaria. El mantener un laboratorio limpio y eficiente, requiere de la elaboración de horarios de las obligaciones

La limpieza diaria de la unidad de cultivo previene la acumulación de alimento no comido, material fecal y detritus. Lavar semanalmente las paredes de los estanques para reducir el crecimiento de diatomeas y de otras biotas oportunistas como lo son los copépodos. También se recomienda el cambio y desinfección de los filtros cada dos días,

así como el retrolavado de los filtros de área (este régimen puede variar de acuerdo a la carga sobre los filtros).

Se recomienda una limpieza semanal para prevenir la lenta declinación higiénica en todo el laboratorio. Todas las superficies deben ser lavadas para reducir el moho y el crecimiento de patógenos, así como también las piedras para el aire, las válvulas de agua y aire deben ser limpiadas y el tapete sanitario cambiado.

Para reducir el riesgo de transmisión de enfermedades, la limpieza del equipo utilizado en el laboratorio debe ser manejado separadamente para cada experimento y cada juego debe ser desinfectado. El equipo común como las cubetas y los cilindros graduados, deben ser lavados, desinfectados, enjuagados varias veces, secados y almacenados inmediatamente después de su uso. Para mantener a los trabajadores limpios y secos, se recomienda el uso de botas y delantales. Las superficies de trabajo se deben mantener ordenadas y limpias para permitir a todos los miembros del laboratorio trabajar con comodidad.

### *Inspección del sistema*

La inspección diaria involucra el registro de temperaturas altas y bajas 24 horas previas, inspección del equipo de refrigeración y calefacción, bomba de agua y ventilación, nivel de agua en el estanque de distribución, presión de agua y aire anterior y posterior al equipo de filtrado, verificación de flujo de aire y agua y la presencia de luz. Es conveniente hacer inspecciones periódicas puntuales de turbidez, salinidad, contenido planctónico en condiciones de lluvia, viento o de tormenta. Una vez terminada la revisión



de los sistemas y antes de dejar el laboratorio húmedo, asegurarse que todos los organismos tengan flujo correcto de agua y aire. Se recomienda hacer chequeos de fluidos tanto al principio, como al final del día.

### *Alimentación*

El alimento es pre-pesado diariamente en raciones asignadas por unidad de cultivo. Las raciones son retiradas del congelador inmediatamente antes de ser administradas. Antes de administrar el alimento, el investigador debe lavar sus manos y si es posible, evitar el tocar los pelets con las manos. El alimento se debe distribuir aleatoriamente en el estanque, y cualquier respuesta anormal tanto de los organismos como del alimento, debe ser registrada

### *Pesado y medición de los organismos*

Los organismos experimentales se deben manejar con el mayor cuidado posible al momento de pesarlos y medirlos. Los abulones juveniles (1.3-2.8 mm) sobreviven 30 minutos en exposición al aire, pero el 50% muere a exposiciones de 40 a 60 minutos (Hahn, 1989). Los abulones sobreviven por un periodo mayor cuando están expuestas al aire a temperaturas bajas (Olley y Thrower en Hahn, 1989).

Para determinar si los animales en experimentación están creciendo, se puede tomar una muestra de cada unidad. Se retiran aleatoriamente de cada unidad experimental tres animales marcados individualmente y se pesan y se midan. Usando la longitud o peso de los animales el porcentaje de incremento puede ser calculado posteriormente para cada animal, y así se puede calcular el promedio por unidad experimental. Estos promedios

pueden ser registrados en una hoja de cálculo para desarrollar análisis de varianza y generar una estimación preliminar del desarrollo de las dietas experimentales una de otras.

#### *Análisis de laboratorio*

Se requiere de un análisis pos-alimentación para determinar el efecto de la dieta en la composición bioquímica del organismo. De ser posible, son necesarias muestras de tejido, y un análisis de las depositaciones de proteína, lípidos, carbohidratos y cenizas y así demostrar si el crecimiento real está presente en los organismos sujetos a experimentación.

#### *Registro, procesamiento e interpretación de datos*

Una vez colectados, la transferencia, procesamiento e interpretación de los datos deben ser exactos para que las conclusiones sean válidas. El ingreso de datos a partir de un cuaderno de laboratorio puede validarse al poner filtros en los archivos donde se localiza la información de los mismos, o el registrar los datos por duplicado para identificar errores de transcripción. Una hoja de cálculos con un formato preestablecido puede ayudar a encontrar errores en el formato, tales como dígitas significativas pérdidas o la falta de muestras. Como los datos son transcritos de el cuaderno de laboratorio, el investigador debe verificar que la información haya sido registrada correctamente e identificar el archivo al cual han sido transcritos los datos.

El reporte de crecimientos tiene sus retos, pues no es siempre es continuo. Las formas de reportar crecimiento continuo son crecimiento absoluto o ganancia de peso, porcentaje

de ganancia de peso, tasa de crecimiento absoluto (AGR) y tasa de crecimiento relativo (RGR). Las medias de los reportes de crecimiento discontinuo incluyen la tasa de crecimiento instantáneo (g), tasa de crecimiento exponencial (GRE), y la tasa de crecimiento específico (G) (D'Abramo y Castell, 1997).

$$\text{Ganancia de peso} = W_f - W_i$$

Porcentaje de ganancia de peso (crecimiento relativo):

$$\% \text{ Ganancia de peso} = (W_f - W_i) / W_i \times 100$$

Tasa de crecimiento absoluto (AGR):

$$\text{AGR} = (W_f - W_i) / (t_f - t_i)$$

Tasa de crecimiento relativo (RGR):

$$\text{RGR} = (W_f - W_i) / [W_i \times (t_f - t_i)]$$

Tasa de crecimiento instantanea (g):

$$g = (\ln W_f - \ln W_i) / (t_f - t_i)$$

Tasa de crecimiento específico (G):

$$G = g \times 100$$

(Lazo y Davis, 2000)

La tasa de crecimiento exponencial, GRE, es la pendiente calculada de una línea recta de regresión plot del logaritmo del peso de cada animal a diferentes tiempos sobre el tiempo continuo (D'Abramo y Castell, 1997).

La forma de reportar conversión alimenticia, eficiencia alimenticia y sobrevivencia son muy simples y se muestran abajo.

Tasa de conversión alimenticia (FCR):

$$\text{FCR} = \text{Peso del alimento proporcionado/ganancia de peso}$$

Razón de eficiencia alimenticia: (FE):

$$\text{FE} = \text{Ganancia de peso/peso del alimento proporcionado}$$

Porcentaje de sobrevivencia:

$$\% \text{ Sobrevivencia} = [(\text{Inicial \# peces} - \text{Final \# peces})/\text{Inicial \# peces}] \times 100$$

(Lazo y Davis, 2000)

Para determinar la variación entre tratamientos, es más apropiado usar el error estándar (D'Abramo y Castell, 1997). Se puede observar el efecto del peso inicial en los resultados cuando se realiza el análisis de covarianza usando el peso inicial como el covariante (D'Abramo y Castell, 1997). Antes de desarrollar el análisis de varianza, se debe determinar si el rango de la varianza es muy amplio, si la varianza es heterogénea o si la desviación estándar es directamente proporcional a las medias. Si es así, se le debe

hacer la transformación logarítmica a los datos antes de realizar el análisis estadístico (D'Abramo y Castell, 1997).

Si la sobrevivencia de los organismos del grupo control es menor al 75%, no se recomienda desarrollar análisis estadísticos a los datos obtenidos. Idealmente, las tasas de crecimiento de los organismos que consumen la dieta control deben de caer dentro del 80% de la tasa de crecimiento estándar reconocida bajo condiciones de crecimiento similares (D'Abramo y Castell, 1997).

La estimación de los requerimientos nutritivos basados en la curva de respuesta de crecimiento pueden determinarse utilizando el método de "continuous broken line". Este método, aunque es objetivo al seleccionar un punto de inflexión en la curva (D'Abramo y Castell, 1997). La reducción de la pendiente a un 70% representa el punto en el cual los animales de una población cubren el mínimo de sus requerimientos proporcionando un estimado conservativo de los requerimientos. Existen otros estimados de dieta determinan un valor que representa las necesidades del promedio de la población animal (D'Abramo y Castell, 1997).

## **La Base de Datos FEED Haliotis**

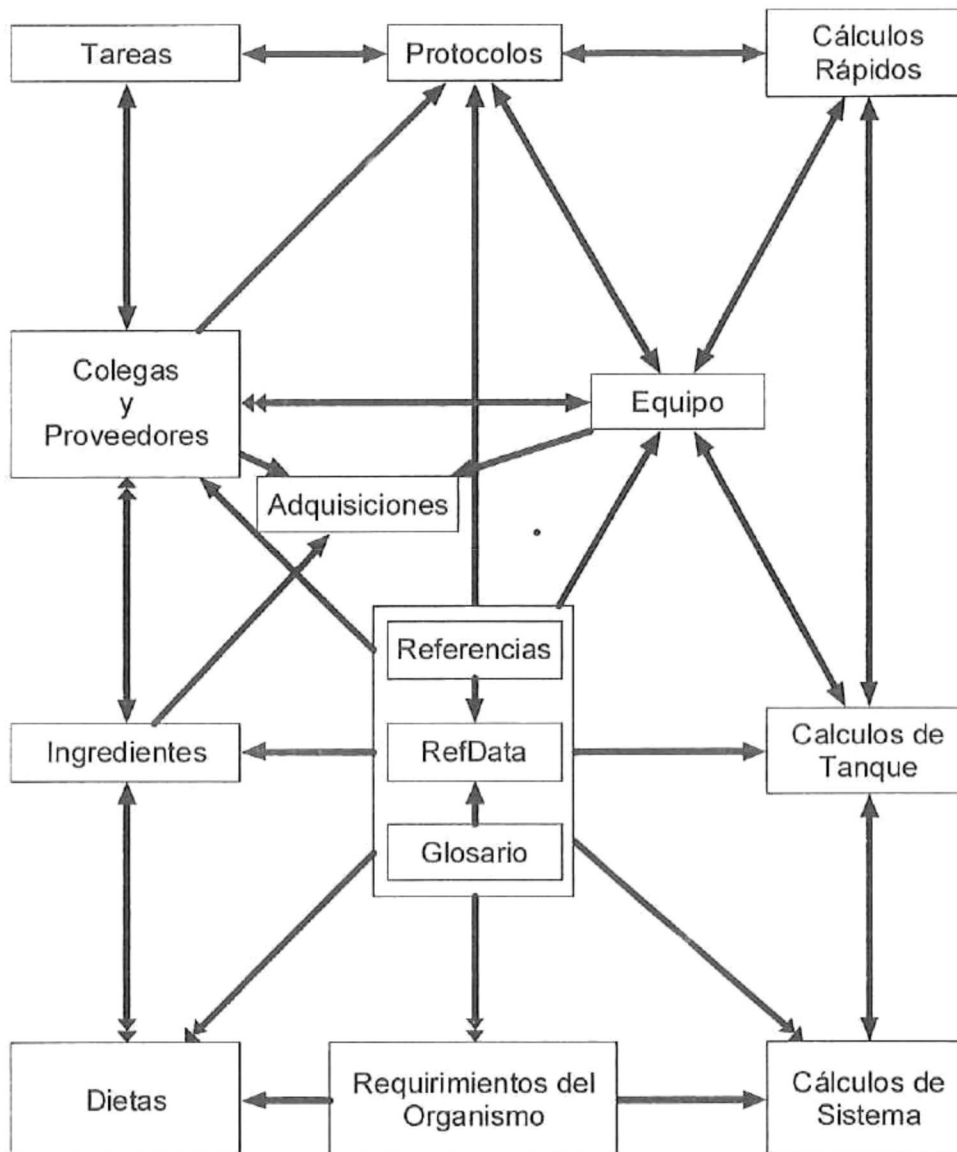
### *Estructura de la Base de Datos*

Los riesgos, medidas preventivas, recomendaciones de monitoreo y acciones correctivas de los riesgos demuestran la diversidad de piezas de información utilizadas en el desarrollo de experimentos en la nutrición de moluscos marinos. La base de datos de manejo del laboratorio FEED Haliotis fue construida considerando todas las

recomendaciones de los análisis de riesgos incluyendo las necesidad de integración de información y confiabilidad.

El corazón de la base de datos FEED Haliotis, como se puede observar en la Figura 4, es la combinación de bases de datos de referencias, DataRef y Glosarios. Estas tres bases de datos constituyen el diccionario de datos, el depósito central que contiene información común con el resto de las bases de datos o archivos (Atre, 1980). Los datos de estos archivos forman el fundamento en el cual se basan otras suposiciones o cálculos. Usando un modelo común, cada archivo periférico permite al usuario el buscar información de varias citas usando solo una palabra clave. Si la palabra clave es seleccionada en cualquiera de los archivos, aparecerán las frases relacionadas ésta. Una vez que el usuario selecciona la frase de datos de su elección (por ejemplo, “la tasa respiratoria de un *H. fulgens* juvenil es 96 ml O<sub>2</sub>•gm peso húmedo<sup>-1</sup>•hora<sup>-1</sup>”) el valor del dato relacionado a esta frase (en este caso el valor 96) es seleccionado automáticamente y es puesto en un campo vacío. Por lo tanto, para cada valor que aparece en la base de datos, la fuente de datos (un artículo científico específico, libro o cita similar) puede ser rastreada.

Figura 4: Modelo conceptual de la base de datos FEED Haliotis



El usuario puede además, buscar rápidamente cualquier otro artículo concerniente a tópicos específicos, viendo a través de un portal incluido en todas las bases de datos periféricas. En todos los artículos que coinciden en palabras claves permitan al investigador leer la lista de citas con tales palabras claves.

Los archivos periféricos dentro del sistema de manejo del laboratorio FEED Haliotis son: Riesgos, Dietas, Ingredientes, Requerimientos del Organismo, Estanques, Sistemas, Tareas, Proveedores y Colegas, Adquisiciones, Equipo, Cálculos Rápidos y Protocolos. A continuación se presenta una breve descripción de cada uno de los archivos.

#### *La Base de Datos "Riesgos"*

Siguiendo los principios del HACCP, este archivo lleva metódicamente al usuario a través del proceso de identificación de puntos críticos asociados con la producción de un producto alimento por comida dado. Al comprender la identificación de los puntos críticos de control asociados a cada parte del proceso de producción, el usuario puede subsecuentemente describir las medidas preventivas, las recomendaciones de monitoreo, y las medidas correctivas. Cada actividad recomendada en el análisis de riesgos es posteriormente asociada con uno o más archivos de la base de datos FEED Haliotis. Al hacer esto, el usuario asegura que cada actividad recomendada sea incluida en el programa de manejo del laboratorio.

La información pertinente se imprime en una hoja de etiquetas par ser almacenadas junto con el ingrediente. Las etiquetas pueden ser despegadas y transferidas a la libreta de



notas del investigador, asegurando así que la transferencia de información sea rápida y segura.

#### *La Base de Datos "Ingredientes"*

La base de datos de los ingredientes es una lista que comprende todos los ingredientes usados en la formulación y elaboración de dietas. Además del contenido de nutrientes, se provee de información sobre: precio, vendedor, propiedades físicas y análisis proximal. Número de lote, fecha de caducidad, y código internacional del ingrediente, lo cual permite el rastreo de un ingrediente y evita confusión alguna. Información sobre fecha de llegada, recomendaciones de almacenamiento que permiten al usuario determinar si ha pasado la vida útil de un ingrediente o si ha sido almacenado bajo condiciones inadecuadas. La información sobre el vendedor y los precios a partir de esta base de datos son usados por los compradores para adquirir cantidades adicionales del mismo ingrediente en un futuro.

De igual manera, la información se imprime en etiquetas. Las etiquetas pueden ser despegadas y transferidas a la libreta de notas del investigador, asegurando así que la transferencia de información sea rápida y segura.

#### *La Base de Datos "Requerimientos del Organismo"*

Como la formulación de las dietas y los cálculos del sistema ambos están basados en las necesidades específicas de los organismos experimentales, las bases de datos tanto de las dietas como de los sistemas están enlazadas a los requerimientos de los organismos. Por conveniencia, los requerimientos nutricionales y fisiológicos para cada una de las

especies se muestran en diferentes presentaciones. Los requerimientos están enlistados por especies, por estadio de vida y por tamaño (longitud y/o peso corporal).

#### *La Base de Datos "Dietas"*

Aquí se enlistan todas las formulaciones de las dietas experimentales de laboratorio. Los promedios de peso se calculan para cada uno de los ingredientes y para cada nutriente. Aparecen mensajes de alarma si los ingredientes totales son mayores o menores al 100%. Los códigos internacionales de los ingredientes, la fecha de recepción de ingrediente y número de lote proporcionan precisión a la búsqueda del ingrediente deseada. La base de datos de la dieta contiene conexiones con la base de datos de etiquetas, lo que permite el imprimir etiquetas de raciones.

La base de datos de las dietas permite al investigados el comparar sus dietas con otras del mismo equipo de investigación antes de su preparación. Si la formulación falla al desarrollarse adecuadamente o si se sospecha de algún ingrediente contaminado, las dietas se pueden comparar aislando el problema.

#### *La Base de Datos "Cálculos de Estanque"*

La base de datos de los estanques permite un cálculo rápido de volúmenes, área de superficie y concentraciones de un solo tratamiento, volumen estático, tal como el estanque, y la longitud de la tubería del depósito. Esta base de datos, permite también al usuario el calcular una densidad fijada previamente de los organismos experimentales basada en el área de superficie o del volumen de la unidad experimental. Se presentan los cálculos para desinfectar con cloro o con yodóforo. Además de todo, se proveen los

cálculos para el control de la salinidad usando cristales de sal, y para remover el cloro y/o amonio usando el producto comercial Amquel<sup>MR</sup>.

#### *La Base de Datos "Sistemas"*

El uso de este archivo permite al investigador el hacer cálculos que asegure la calidad del medio ambiente antes y durante el experimento, permaneciendo dentro de las especificaciones de su sistema. En esta base de datos se incluyen los cálculos para volumen del sistema, número de recambios por día, biomasa, tasa de flujo, desinfección, calentamiento y enfriamiento.

#### *La Base de Datos "Cálculos Rápidos"*

Los cálculos rápidos permiten al usuario hacer conversiones rápidas de cualquier tipo de unidad. El usuario selecciona el tipo de unidad, y luego registra los valores a convertir. Desde la primera variable de la lista automáticamente se selecciona la primera unidad, el formato de la segunda variable de la lista automáticamente selecciona el segundo valor. Para evitar confusiones, la frase que describe los cálculos y el producto se genera a partir de los datos registrados. Por ejemplo, cuando el usuario selecciona "tiempo" como tipo de unidad, registra un valor de "600", la primera unidad de "minutos" y la segunda unidad de "horas", y aparece la frase "600 minutos es igual a 10.0 horas".

La base de datos de cálculos rápidos también contiene ecuaciones para calcular la ganancia de peso, porcentaje de ganancia de peso (tasa de crecimiento absoluto), tasa de crecimiento relativo (RGR), tasa de crecimiento instantánea (g), tasa de crecimiento específica (G), tasa de conversión alimenticia (FCR), tasa de eficiencia alimenticia (FE),

porcentaje de sobrevivencia, producción fecal, % de absorción, extensión de crecimiento, y factor de condición

#### *La Base de Datos "Proveedores y Colegas"*

La base de datos de proveedores y colegas contiene información de contactos (números telefónicos, direcciones de correo electrónico, *etc.*), vendedores y de expertos en el campo de la nutrición de moluscos. Esta base de datos permite a los investigadores y a los técnicos el contactar fácilmente a especialistas para la discusión de un diseño experimental, uso del equipo, o colaboración en proyectos. Para facilitar la comunicación, se ha incluido un teléfono de marcado automático y un formato especial para escribir cartas.

Esta lista, contiene además información actualizada de todos los miembros del equipo de investigación y los números de los contactos en caso de emergencias. De las bases de datos de equipos, ingredientes y compras, el usuario puede revisar esta información para hacer ordenes de equipo y evitar errores de transcripción.

Este archivo contiene además un escrito y presentación, el cual aparte de enlistar a todos los miembros del equipo de investigación, establece quien está o no en el lugar de trabajo. Al seleccionar un botón, se registra el tiempo de entrada o de salida de cada uno de los miembros del equipo.

#### *La Base de Datos "Adquisiciones"*

La base de datos de Adquisiciones contiene un formato de orden de compra e información adicional que facilita en la compra de materiales nuevos. Enlazada con las

bases de datos de el Equipo, Ingredientes y Proveedores y Colegas, la base de datos de Información de precios de proveedores y su descripción es copiada de otro archivo eliminando el riesgo de errores y el desperdicio de tiempo asociado con la transcripción manual. Este base de datos permite calcular el monto de los gastos realizados hasta el momento y tener conocimiento del equipo o materiales faltantes y el dinero disponible.

#### *La Base de Datos “Responsabilidades”*

El archivo de tareas define las responsabilidades o tareas de cada uno de los miembros del equipo de investigación. Además de enlistar las recomendaciones, se establece la frecuencia y partes responsables, para permitir al usuario la búsqueda de sus responsabilidades tareas. Se encuentra en elaboración un reporte/plan diario, el cual presenta las tareas actualizadas por día por miembro del equipo. Una vez concluida, los miembros del equipo seleccionaran un botón para borrar la tarea de la lista.

#### *La Base de Datos “Protocolos”*

En la base de datos de protocolos se presentan los protocolos disponibles para muchas metodologías usadas en el laboratorio. Para cada método en la lista, se incluye un protocolo oficial en un formato de procesador de palabras para permitir la edición, al igual que una hoja de chequeo (en formato de hoja de cálculos), video y/o imagenes asociados, consejos, recomendaciones de seguridad, lista de equipo y citas. Se creó un formato de impresión rápida, así como una hoja de escritura y un botón exclusivo que permita la impresión rápida del protocolo. La base de datos de los protocolos está

enlazada a la base de datos de referencias para permitir al usuario el localizar la publicación con la versión del método original.

## DISCUSIÓN

El análisis de riesgos y la base de datos de manejo del laboratorio presentada, es el primer paso para el desarrollo de un sistema de manejo de laboratorio efectivo a largo plazo. A pesar de que la base de datos FEED Haliotis es relativamente pequeña, ésta abarca todos los riesgos encontrados por el equipo de análisis de riesgos y representa un paso decisivo hacia el crecimiento y el éxito del proyecto a largo plazo. Este éxito sin embargo, depende de la ejecución de medidas de control y acciones correctivas propuestas en el análisis de riesgos.

La coordinación del proyecto debe llevarse a cabo con alguien familiarizado con el proceso experimental y con la autoridad para asignar tareas a otros miembros del equipo. Esta persona debe también ser responsable de la verificación y el constante mejoramiento de la calidad y seguridad del producto. En el caso estudio presentado, el coordinador del control de calidad es el director del proyecto FEED Haliotis la Dra. Ma Teresa Viana. Los miembros del equipo incluyen a los estudiantes, técnicos y otras personas que usan regularmente el laboratorio FEED Haliotis en la UABC, Ensenada.

### **Implementación**

El completar el reporte de análisis de peligro no asegura que las medidas de control de calidad y seguridad sean aplicadas. De hecho, un programa HACCP mal planeado puede llevar a un falso sentido de seguridad (Pierson y Corlett, 1992) y como consecuencia

puede dar resultados desastrosos. Al terminar el reporte de riesgos se debe hacer enseguida un plan de acción que asegure que se lleve a cabo las actividades requeridas (Pierson y Corlett, 1992). Un plan de acción necesita objetivos, una política bien definida, un coordinador del equipo, y el desarrollo de planes específicos del producto y del usuario.

La política de riesgo y seguridad puede ser descrita en una sola línea. Por ejemplo, la política de laboratorio FEED Haliotis puede ser :“Todos los experimentos se llevarán a cabo en condiciones para minimizar la mortalidad y maximizar el crecimiento de los organismos experimentales”. Los objetivos deben escribirse simple y claramente. En este caso, los objetivos primarios pueden ser 1.) Producir dietas que resulten en crecimiento las cuales reflejen su valor nutricional (minimizar efectos no nutricionales), 2.) Comparar objetivamente dietas experimentales. y 3.) Entrenar a todos los miembros del equipo e implementar el programa de control de calidad para el primero de agosto de 2001.

### **Plan del producto específico**

En la producción comercial de alimentos, el proceso de producción y formulación no cambia con frecuencia por lo que se puede crear un plan específico del producto. Sin embargo, en la investigación de nutrición la fórmula de cada dieta experimental difiere, así que para cada dieta individual generalmente no es factible un plan de producto específico.

Sin embargo, se puede crear un plan del producto describiendo la formulación y el proceso similar a la mayoría de las dietas. Se pueden hacer desviaciones de este plan



tomando en cuenta consideraciones basadas en diseño experimental válido. Por ejemplo, si un experimento propone el comparar el efecto del tamaño de los pelets, el investigador entonces puede alterar el protocolo, cortando los pelets en dimensiones diferentes a las especificadas en el plan del producto. Todos los demás pasos en la producción de la dieta se llevarían a cabo de acuerdo con el plan del producto.

Mientras que la dietas experimentales varían constantemente la dieta de referencia presenta las mismas características, por lo que un plan específico de producto es factible y recomendable siempre. Esta última debe permanecer en todos los experimentos para permitir una comparación válida del desempeño y para ayudar a reconocer fallas durante el experimento. Teóricamente, la cantidad y calidad de ingredientes utilizados y el proceso implementado en su producción no varía entre lotes. Sin tomar en cuenta la precisión al reproducir la dieta de referencia, sin embargo se debe llevar a cabo la verificación postproducción de calidad de cada lote.

Si se considera necesario se pueden crear procedimientos individuales detallados de los procedimientos de operación de los supervisores de producción. Por ejemplo, un técnico familiarizado con el proceso de extrusión puede llegar a ser el responsable del cuidado del extrusor. El técnico entonces hará una descripción detallada del proceso y todos los usuarios estarían entrenados para seguir este procedimiento.

La base de datos FEED Haliotis ayuda a delegar y distribuir responsabilidades de manera efectiva mediante una relación entre el individuo y sus responsabilidades. Esto fomenta que los miembros individuales contribuyan al éxito del equipo.

Los miembros del equipo de investigación deben estar entrenados para maximizar la utilidad de la base de datos, si este entrenamiento se lleva a cabo en forma de grupo, el aprendizaje se hará más eficiente y permitirá que todos los miembros aclaren sus dudas e inquietudes acerca de su uso. Puede ser necesario entrenamiento adicional para cubrir las necesidades específicas de algunos usuarios.

### **Mejoramiento de la base de datos**

La base de datos aquí presentada ha sido diseñada para ser flexible y dinámica tanto en estructura como contenido. Esta debe contener la información más actualizada posible del estatus de nutrición de moluscos marinos. Esto incluye la incorporación de nuevas técnicas analíticas, la asimilación y diseminación de cualquier información nueva (artículos, libros, etc.) que contribuyen al conocimiento de este campo. Sin embargo el cambio de la estructura de la base de datos puede ser necesaria con el desarrollo de nuevas herramientas por los investigadores para incrementar la productividad y calidad de su trabajo. Por ejemplo, uno puede agregar nuevos cálculos en la base de datos Cálculos Rápidos para obtener resultados rápidos y precisos. La versatilidad del programa File Maker Pro y su facilidad de uso permiten al desarrollador incrementar la estructura de la base de datos y adicionar continuamente al contenido de información.

Se hacen necesario en este contexto un cambio continuo o revisión periódica de la calidad total del programa. Cambios como la construcción de un laboratorio húmedo, mejoramiento de técnicas de producción de dietas y nuevas técnicas analíticas deben estar incluidas en el programa de calidad total así que los nuevos trabajos y protocolos reflejen

estos cambios. Una vez que estos cambios estan hechos en el sistema de calidad total se requiere un nuevo entrenamiento de los miembros del equipo.

### **Control de la información**

Algunos campos contienen información que debe ser verificada y solo cambiada por un miembro del equipo calificado o el coordinador del proyecto. Debido a que los usuarios solo necesitan ver los datos para utilizarlos, algunas porciones de la base de datos estan bloqueados para prevenir cambios no autorizados. Dentro de cada archivo se puede aplicar un control en el que los usuarios solo pueden ver las plantillas y los campos.

El control se puede aplicar a través de un sistema de clave de tres niveles. Estos tres niveles de seguridad son 1.) Coordinador o director del proyecto, 2.) Técnicos, 3.) Estudiantes y colegas.

#### *Coordinador/Director del proyeco*

Esta persona tiene la habilidad de ver o editar casi todos los elementos del sistema de manejo del laboratorio, incluyendo el análisis de riesgos, protocolos de laboratorio, componentes de estructura actual de la base de datos y el control de acceso de todos los usuarios. El acceso a algunos campos esta restringido aún al coordinador, para prevenir cambios inadvertidos por el director o coordinador del proyecto. Los datos como los factores de conversión estan incluidos en los campos que permanecen bloqueados. Para reemplazar este tipo de información ésta se debe borrar y posteriormente importar los datos nuevos verificados.

### *Técnicos*

Los técnicos son los responsables de proveer información a los otros miembros del laboratorio para hacer su rutina diaria más eficiente como el reordenar materia prima y contactar colegas. Por lo tanto los miembros de este equipo tienen la habilidad de insertar información nueva como ingredientes y reactivos nuevos. Los técnicos también tienen la posibilidad de observar la información del presupuesto del proyecto el cual no es accesible a los colegas o a los estudiantes.

### *Estudiantes/Colegas*

Los estudiantes y colegas pueden observar toda la información que se refiere a su investigación, pero no pueden modificar la información. Si un estudiante o un colega tiene dudas acerca de un protocolo o referencia, pueden encontrar a un miembro del equipo o un colega asociado con su tópico utilizando la base de datos de tareas asignadas.

Ya que es importante el control, los usuarios de la base de datos primarios son los investigadores (estudiantes, técnicos y colegas), así como la libertad para observar la información que necesitan es también importante. Esto permite a los investigadores un fácil acceso a la información para su trabajo lo cual disminuye la necesidad de una guía constante del director de los técnicos y uno de otro.

La base de datos puede ser diseñada para enfatizar y presentar conceptos críticos a miembros recién llegados al equipo. También se puede imprimir una versión de la información para uso personal. Una transmisión clara de la misión del proyecto, sus

objetivos y otros conceptos clave se traduce en una fuerza más unificada que trabaja de forma autónoma y efectiva.

### **Complejo pero Simple**

Mientras que la estructura de la base de datos es compleja, su diseño permite al usuario encontrar fácilmente la información y llevar a cabo tareas. Las relaciones creadas (como el ingrediente a la dieta, tareas asignadas a un miembro del equipo, referencias a palabras claves, productor a producto) forman una red a través de la cual el usuario puede navegar o simplemente ver los datos de los archivos ligados mientras que se encuentre en otra. Esto evita la redundancia y hace más eficaz la compilación de la información. El usuario sin embargo no necesita entender la complejidad inherente para usar la información contenida en la base de datos.

Los botones y los escritos también simplifican el uso mediante la automatización de tareas repetitivas como es la creación, clasificación e impresión de etiquetas. Por ejemplo en la porción de análisis de riesgos de la base de datos, los botones llevan de la mano al usuario paso por paso a través del proceso, que de otra manera se llevarían a cabo metódicamente en una tarea tediosa y confusa para identificar los riesgos y las medidas de prevención y corrección. Los botones y los escritos son muy útiles para ejecutar búsquedas, y evitan la necesidad de deambular sobre datos no relacionados.

### **Identificación de debilidades: Conociendo el valor de la información**

La base de datos presentada permite al investigador reconocer la fuerza o debilidad de las acepciones utilizados en la investigación. El comparar la información le permite a uno

seleccionar los puntos de información más apropiados a los intereses del investigador. Mientras que puede considerarse información anecdótica se prefiere para la base de datos información estadísticamente comprobada. El consumo diario recomendado de muchos nutrientes en dietas de abulón todavía está en vías de formulación en lugar de los requerimientos dietéticos experimentalmente probados. Cuando se tenga duda el investigador puede ver los dos valores conflictivos y determinar cual es más creíble y apropiado.

### **La aplicación de este sistema de manejo a granjas de acuicultura comerciales**

El manejo de granjas de acuicultura comerciales se asemeja a un laboratorio de investigación. Ambos tienen la necesidad de capacitar y entrenar a sus empleados, el mantenimiento de sus organismos en condiciones que minimicen la mortalidad y promuevan el crecimiento y una constante mejora en la calidad del producto (ya sea abulones vivos o datos experimentales). Algunos de los puntos que aplican en control de calidad tanto en la investigación como en los sistemas comerciales se mencionan a continuación:

- Asegurando seguridad y calidad a través de todo el proceso de producción

La preocupación por la seguridad del consumidor y del empleado es de las más alta importancia. En términos de competencia, un producto de calidad reducida hará que el laboratorio o el cultivo sea de menor valor y posiblemente obsoleto. Por lo que un continuo mejoramiento de la calidad de vida debe ser uno de los valores principales en la producción de cualquier producto.

En el caso de recibir gente nueva con poco o ninguna experiencia con las especies en cuestión, puede llevar a perder el control de la calidad debido a la falta de comunicación de la información que se necesita para llenar los estándares de calidad.

- La Conservación de Recursos

Cuando se optimiza el uso de materiales en el laboratorio o granja de cultivo, esto se traduce en bajar los costos. El bombear la cantidad correcta de agua implica ahorrar energía y otros recursos que serían gastados bombeando el agua de exceso. En este sentido, la preparación apropiada, almacenamiento y racionamiento del alimento, por ejemplo, puede reducir costos de alimentación. Este punto es crítico en sistemas de acuicultura donde los costos de alimentación pueden llegar a representar hasta el 40% de costos de operación (O'Sullivan, 1994). Incluso, el calcular la ración apropiada de alimento, puede reducir desperdicios y mejorar la calidad general del medio ambiente, otro factor que se puede reducir en un crecimiento más rápido y en una producción mayor.

- La Conservación de Tiempo

Cuando se optimizan las condiciones del medio ambiente se reduce el tiempo para que los organismos lleguen a su talla requerida. Los organismos llegarán al mercado más rápido, los costos de labor y los costos energéticos serán reducidos. Si se reduce el tiempo gastado ordenando nuevos materiales, ese tiempo ahorrado puede utilizarse para invertirlo en otras actividades que mejoren la producción, incrementen la calidad o reduzcan los costos.

- El Ahorro de Dinero

Al comprar productos consumibles competitivamente y con tiempo se ahorra dinero. La inclusión de una base de datos del equipo permite al investigador comparar y adicionar constantemente precios de vendedores por lo que cada producto ordenado se compra en cantidades apropiadas y a tiempo. El uso eficiente de las facilidades en instalaciones, material, recursos de labor y financieros se traduce en más producto por la misma cantidad de dinero.

- Entrenamiento de Nuevos Miembros del Equipo

Es necesario que exista uniformidad en el conocimiento común esencial entre los miembros del equipo lo cual permite que cada miembro desarrolle sus obligaciones de manera más competente e independiente. Cuando se presenta la información en un formato organizado no hay pérdida de información a causa de la falta de comunicación entre los veteranos y la gente nueva. La base de datos puede proveer entrenamiento inicial y actúa como apoyo a preguntas que pueden surgir en un futuro. En este sentido un entrenamiento rápido ahorra tiempo y conserva los recursos del personal.

- Preocupación por el Ambiente

El educar a los empleados en prácticas amigables al medio ambiente pueden ser importantes para el bienestar de éste que rodea la granja o el laboratorio, pero también son críticos para cumplir con los requisitos de las leyes gubernamentales. El desechar antibióticos, lo cual es ilegal en la mayoría de los países, puede llevarnos a la resistencia de



los patógenos. Si se desecha cloro sin haberlo neutralizado puede acabar con la fauna endémica o además de regresar a través de la entrada de agua. El diseño apropiado de las descargas y el tratamiento de aguas negras puede preveer la diseminación de enfermedades humanas en las instalaciones hacia los empleados o clientes.

- Preparación de Alimentos

En las instalaciones comerciales donde se lleva a cabo la preparación de alimentos en el mismo lugar, se puede llevar a cabo un seguimiento del proceso que se describe en el estudio aquí presentado. En las instalaciones en donde el alimento es comprado de otros productores se necesitan aplicar algunos pasos como: asegurar la calidad del alimento que llega, almacenado y alimentación.

- Cuidado de Organismos (“Husbandry”)

Se deben llevar a cabo consideraciones y riesgos acerca del cuidado de los animales los cuales son esencialmente los mismos para los organismos usados en experimentos de nutrición y en uso comercial.

## CONCLUSIONES

Se llevó a cabo de manera exitosa un análisis de riesgos basado en los resultados del sistema de manejo de laboratorio. Se incluyeron recomendaciones del equipo de análisis de riesgos, medidas preventivas, medidas correctivas y de monitoreo en el sistema de manejo. Se ha mostrado que el sistema presentado puede incrementar la calidad mientras que los costos se reducen lo cual es un punto particularmente importante en laboratorios y granjas de acuacultura con recursos limitados. La solución presentada aquí es una base de datos de ambiente amigable que puede guardarse en un diskette o en un disco duro para el uso de todos los miembros de la investigación. Se ha mostrado que muchos atributos del programa de manejo de laboratorio puede ser utilizado en un negocio de acuacultura comercial. El éxito a largo plazo de la solución presentada dependerá de su implementación revisión y mejoramiento

## GLOSARIO

**Atributos (o Elementos de datos).** Características que describen una entidad. Por ejemplo, una casa puede ser descrito por su tamaño, color, edad, etc. Un atributo también se conoce como un elemento, un campo, un artículo, o un artículo elemental (Atre, 1980).

**Categoría de Riesgo.** Una serie de categorías que establece las prioridades del riesgo con base en el grado de peligro en alimentos (Pierson and Corlett, 1992).

**Base de Datos.** Una colección de datos relacionados con una empresa con varios usos (Atre, 1980).

**Empresa.** Es cualquier tipo de organización como un laboratorio, banco, universidad, fábrica u hospital. (Atre, 1980).

**Entidad.** Una persona, lugar, cosa, evento o concepto de lo cual se registra información (Atre, 1980).

**Independencia de Datos.** La habilidad de usar la base de datos sin saber los detalles de su representación (Atre, 1980).

**Límite Crítico.** Uno o más tolerancias descritas que se tiene que cumplir para asegurar que un punto crítico de control pueda controlar de manera eficaz un límite microbiológico de salud (Pierson and Corlett, 1992).

**Meta-datos.** Información sobre los datos. Meta-datos incluye los nombres de los campos (lo cual es distinto de su valores) y sus presentaciones (“layouts”). (Feiler, 1999)

**Monitoreo.** Una secuencia de observaciones o mediciones planeadas de los límites críticos, implementada para producir un registro verdadero e intencionado para asegurar que el límite crítico mantenga la seguridad del producto (Pierson and Corlett, 1992).

**Monitoreo Continuo.** Un registro continuo de datos (Atre, 1980)

**Peligro.** Cualquier propiedad biológica, química o física que pueda resultar en una amenaza para el salud del consumidor (Pierson and Corlett, 1992).

**Plan de HACCP.** El documento escrito que delinea los procedimientos formales que se siguen de acuerdo con los principios generales (Pierson and Corlett, 1992).

**Punto de Control.** Cualquier punto en un sistema de alimento en que una falta de control no lleva a un riesgo no aceptable para la salud (Pierson and Corlett, 1992).

**Punto Crítico de Control.** Cualquier punto en un sistema de alimento en que una falta de control puede llevar a un riesgo no aceptable a la salud (Pierson and Corlett, 1992).

**Registro de Datos.** Una colección de valores que proviene de elementos de datos relacionados (Atre, 1980).

**Riesgo.** Un estimado de la ocurrencia probable de un peligro (Pierson and Corlett, 1992).

**Sistema de HACCP.** El resultado de la implementación de los principios de HACCP (Pierson and Corlett, 1992).

**Valor de Dato.** El valor real del dato o información contenido en cada elemento de datos (Atre, 1980).

**Verificación.** Métodos, procedimientos y pruebas que son usados para determinar si el sistema de HACCP está de acuerdo con el plan HACCP (Pierson and Corlett, 1992).

## REFERENCIAS

- Atre, S. (1980). Data base: Structured techniques for design, performance and management. New York, John Wiley and Sons, 442 pp.
- Barrows, F. T. (2000). Feed Manufacturing Technology. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickey. New York, John Wiley and Sons: 354-359.
- Campbell, N. A. (1987). Biology. Menlo Park, The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., 1101 pp.
- Church, D. C. y W. G. Pond (1988). Basic Animal Nutrition and Feeding, Third Ed. New York, John Wiley and Sons, 472 pp.
- D'Abramo, L. y R. T. Lovell (1991). "Aquaculture Research Needs for the Year 2000: Fish and Crustacean Nutrition." World Aquaculture 22(2) 22: 57-62.
- D'Abramo, L. R. y J. D. Castell (1997). Research Methodology. Crustacean Nutrition. L. R. D'Abramo, D. E. Conklin y D. M. Akiyama. Baton Rouge, World Aquaculture Society: 3-25.
- Dong, F. y R. W. Hardy (2000). Feed Evaluation, Chemical. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickey. New York, John Wiley and Sons: 340-349.
- Elmasri, R. y S. B. Navathe (1997). Systemas de bases de datos. Naucalpan de Juárez, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., 887 pp.
- Feiler, J. (1999). Filemaker Pro and the World Wide Web. London, Academic Press, 526 pp.

- Fleming, A., R. J. Van Barnaveld, et al. (1996). "The development of artificial diets for abalone: a review and future directions." Aquaculture **140**: 5-53.
- Fleming, C. C. y B. Von Halle (1989). Handbook of relational database design, Addison-Wesley Publishing Company, 605 pp.
- Hahn, K. (1989). Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods. Boca Raton, CRC Press, 349 pp.
- Hardy, R. W. (1991). Applications of hazard analysis and critical control point principles to feed manufacturing. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing Workshop, Singapore, American Soybean Association.
- Lazo, J. P. y D. A. Davis (2000). Ingredient and feed evaluation. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickney. New York, John Wiley and Sons: 453-463.
- Leighton, D. L. (2000). The biology and culture of the California abalones. Pittsburgh, Dorrance Publishing Co., 216 pp.
- Leighton, D. L., M. J. Byhower, et al. (1981). "Acceleration of development and growth in young Green abalone (*Haliotis fulgens*) using warmed effluent sea water." J. World Maricult. Soc. **12**(1): 1970.
- Marks, G. W. (1938). "The copper content and copper tolerance of some species of mollusks of the southern California coast." Biol. Bull. **75**(2): 224.
- Martin, M., M. D. Stevenson, et al. (1977). "Copper toxicity experiments in relation to abalone deaths observed in power plant's cooling waters." Calif. Fish and Game **63**(2): 95.

- Martinez-Millan, L., I. Cañas-Guerrero, et al. (1988). Selección y valoración de materias primas. Control de calidad de los alimentos. Alimentación en Acuicultura: -.
- O'Keefe, T. (2000). Feed handling and storage. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickney. New York, John Wiley and Sons: 350-353.
- O'Sullivan, D. (1994). "Research underway for the replacement of fishmeal in aquaculture diets." Austasia Aquaculture 8: 44-45.
- Pierson, M. D. y D. A. Corlett, Jr. (1992). HACCP: Principles and applications. New York, Chapman and Hall, 212 pp.
- Piper, R. G. et al. (1992). Fish hatchery management. Washington D.C., Fish and Wildlife Service, 517 pp.
- Searcy-Bernal, R. (1994). "Statistical power and aquaculture research." Aquaculture 127: 371-388.
- Shumway, E. (1990). "A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture." Journal of the World Aquaculture Society. 21-2: 65-104.
- Shumway, E. y L. T. Cucci (1987). "The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs." Aquatic Toxicology 10: 9-27.
- Sugiura, S. H. y R. W. Hardy (2000). Environmentally friendly feeds. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickney. New York, John Wiley and Sons. 1: 305-311.



Uki, N. y S. Kikuchi (1975). "Oxygen consumption of the abalone, *Haliotis discus hannai*, in relation to body size and temperature." Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. **35**: 73.

Uki, N. y S. Kikuchi (1984). "Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors." Aquaculture **39**: 247-261.

ANEXO 1

Formulación de las dietas experimentales ZKAD41-ZKAD45.

<i>Ingrediente</i>	<i>Nombre/características</i>	<i>Pureza</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Lote</i>
Harina de pescado	P/elaboración de alimentos para animales, grado AA.	min. 68%,	Proesa	
Sucrosa	Bioreactivo ultrapuro, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> , 4097-04			D4270
Almidón	Fécula de maíz		Maizena	15A2/Mar 02
Dextrina	CAS 9004-53-9		Polarchem	A40588
Celulosa	α-cellulose [9004-34-6], C-8002	No ensayada	Sigma	125H0397
Carboximetilcelulosa	CM Cellulose, cation		Sigma	88F0734
Harina de Soya	CAT #: 905456	Proteína de Soya, 92%	ICN Biomedicals, Inc	3084 B
Gelatina	poder gel. 180 Bloom		Diamante	
Mezcla mineral			Roche	9810823
Sta-C				
BHT			Sigma	#78H0689
Cloruro de colina		min. 98%,	Sigma	C-1879
Ensilaje de atún				

## ANEXO 2

Porcentaje de la composición de dietas experimentales ZKAD41-45.

<i>Nombre del Ingrediente</i>	<i>%</i>
Harina de pescado	43.75
Fuente de carbohidratos (almidón, dextrina, celulosa, carboximetilcelulosa, sucrosa)	25.00
Harina de soya (92%)	10.00
Gelatina	8.00
Mezcla de minerales	6.00
Ensilaje de atún	5.00
Mezcla de vitaminas	2.00
Stay-C	0.20
BHT	0.04
Cloruro de colina	0.01
	100.00

### ANEXO 3

Composición de alimentos experimentales con harina de pescado como fuente de proteína. Las cantidades se expresan en porcentaje del peso seco.

Ingredientes	HP	HP* 0.5%	HP* 1%	HP* 1.5%	HP* 2%	HP* 2.5%
Harina de pescado	34.5	34.5	34.5	34.5	34.5	34.5
Harina de algas	10	10	10	10	10	10
Harina de soya	5	5	5	5	5	5
Almidón de maíz	24.35	23.85	23.35	22.85	22.35	21.85
Harina de maíz	8	8	8	8	8	8
Celulosa	12	12	12	12	12	12
Minerales	4	4	4	4	4	4
Vitaminas	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Vitamina C	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Metionina	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Benzoato de sodio	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Cloruro de colina	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072
Butilhidroxitolueno	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036
Ficocoloide*	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

\*Tratamientos: agar (HPAG), carragenano (HPCA), alginato (HPAL)

## ANEXO 4

## Effects of materials on algal cultures

<i>Material</i>	<i>Safe</i>	<i>Inhibitory</i>	<i>Toxic</i>
Acrylite (Lucite, Perspex, Plexiglass)	abdde	-	-
Aluminum alloy	eeeeeee	-	-
Charcoal, activated	-	bg	-
Copper alloy	ee	e	eee
Cotton	b	-	-
Epoxy resin	ee	-	-
Iron	-	e	-
Membrane filter (Millipore, Membranfilter)	ab	-	-
Nylon	bc	a	ab
Paraffin	d	-	-
Plywood	-	d	-
Polycarbonate	e	-	-
Polyethylene, black	e	e	-
Polyethylene, white, clear	-	ab	-
Polypropylene	abe	aa	e
Polystyrene	b	-	-
Polytetrafluoroethylene (Teflon, <i>etc.</i> )	abe	-	-
Polyurethane foam	-	a	-
Polyvinyl chloride	aa	aab	aaaabee
Polyvinyl chloride (Tygon, clear)	abccc	a	-

Polyvinyl chloride (Tygon, black)	-	-	b
Rubber-white, black, green, Buna N, neoprene, etc.	e	abd	aaaaaaaaabc ee
Silicone (stoppers, tubing, stopcock grease)	abeee	-	-
Silicone (cement sealant)	e	b	c
Solder, silver	ee	-	-
Solder, soft	e	-	-
Stainless steel	eeeeee	a	-
Titanium	e	-	-

#### REFERENCES:

- a. Bernhard, M., Zattera and P. Filesi, 1966. Suitability of various substances for use in the culture of marine organisms. *Pubbl. Sta. Zool. Napoli*, 35: 89-104.
- b. Blankley, W.F., Unpublished observations
- c. Davis, E.A., J. Dedrick, C.S. French, H.W. Milner, J. Myers, J.H.C. Smith and H.A. Spoehr, 1953. Laboratory experiments on *Chlorella* culture at the Carnegie Institution of Washington, Department of Plant Biology. In Burlew, J.S., Editor, *Algal culture from laboratory to pilot plant*, pp. 105-153. Carnegie Inst. Washington Publ. 600.
- d. Doty, M.S. and M. Oguri, 1959. The carbon-fourteen technique for determining primary plankton productivity, *Pubbl. Sta. Zool. Napoli*, 31 (suppl.) 70-94.
- e. Dyer, D.L. and D. E. Richardson, 1962. Materials of construction in algal culture, *Appl. Microbiol.*, 10: 129-132.
- f. Lewin, J., 1966. Physiological studies of the boron requirement of the diatom, *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewis, *J. Exp. Bot.*, 17: 473-479.
- g. Ryther, J.H. and R.R. Guillard, 1962. Studies of marine planktonic diatoms. II. Use of *Cyclotella nana* Hustedt for assays of vitamin B-12 in seawater, *Can. J. Microbiol.*, 8: 437-445.

From Blankley, 1973. Each letter represents the result of one test of a specific formulation or product, as reported by the indicated author (see reference list). Where more than one species was tested by an author, the most adverse result is tabulated. All tests were marine except those of references c and e. This table should only be used as a general guide, as specific manufacturer and product formulation, prior treatment of materials, and conditions of use can dramatically alter the acceptability of materials (Courtesy of Cambridge University Press.)

Source: Huguenin, J. and J. Colt (1989). Design and Operating Guide for Aquaculture Seawater Systems. New York, Elsevier, 264 pp.

## ANEXO 5

Seawater properties affecting carrying capacity

### **Physical parameters**

Temperature range (daily and seasonal variability)

Salinity range (tidal and seasonal variability)

Particulates (solids)

- Composition (organic or inorganic)
- Size
- Concentration

Color

Light

- Artificial or natural
- Total annual incident energy
- Intensity of radiant energy
- Quality of light
- Photoperiod (daily cycle)

### **Chemical parameters**

pH and alkalinity

Gases

- Total gas pressure
- Oxygen
- Nitrogen



- Carbon dioxide
- Hydrogen sulfide

#### Nutrients

- Nitrogen compounds
- Phosphorous compounds
- Trace metals and speciation

#### Organic compounds

- Biodegradable
- Non-biodegradable

#### Toxic Compounds

- Heavy metals
- Biocides

#### **Biological parameters**

Bacteria (type and concentration)

Virus

Fungi

Others

Source: John E. Huguenin and John Colt. Design and operating guide for aquaculture seawater systems (New York: Elsevier, 1989) table 2.3.

ANEXO 6

Preliminary water quality screening and production levels for marine applications

<u>Parameter</u>	<u>Screening level</u>	<u>Production Level</u>
Ammonia	< 1 µg/l NH <sub>3</sub> -N	< 1 µg NH <sub>3</sub> -N research < 10 µg NH <sub>3</sub> -N production < 1 µg NH <sub>3</sub> -N holding, little or no feeding
Nitrite	< 0.05 mg/l NO <sub>2</sub> -N	< 0.10 mg/l NO <sub>2</sub> -N
Dissolved oxygen	> 90% of saturation	> 6 mg/l
Total gas pressure	< 76 mm Hg	< 20 mm Hg
Carbon dioxide	5 mg/l CO <sub>2</sub>	< 10 mg/l CO <sub>2</sub>
Hydrogen sulfide	2 µg/l as H <sub>2</sub> S	< 1 µg/l as H <sub>2</sub> S
Chlorine residual	10 µg/l	< 1 µg/l
pH	7.9-8.2	< 7.9-8.2
Temperature	depends on life stage and species, -1 to 40°C Temperature	depends on life stage and species, -1 to 40°C Temperature
Salinity	depends on life stage and species, 1-40 g/kg	depends on life stage and species, 1-40 g/kg
<u>Metals (total)</u>		
Cadmium	< 1 µg/l	< 3 µg/l
Chromium	< 10 µg/l	< 25 µg/l
Copper	< 1 µg/l	< 3 µg/l
Iron	< 300 µg/l	< 100 µg/l
Mercury	< 0.05 µg/l	< 0.1 µg/l

Manganese		< 50 µg/l	< 25 µg/l
Nickel		< 2 µg/l	< 5 µg/l
Lead		< 2 µg/l	< 4 µg/l
Zinc	< 10 µg/l < 25 µg/l	< 10 µg/l	< 25 µg/l

Source: John E. Huguenin and John Colt. Design and operating guide for aquaculture seawater systems (New York: Elsevier, 1989) table 2.4.

## ANEXO 7

### Chemical criteria for aquaculture water conditions

<i>Gas Name</i>	<i>Criteria</i>
Oxygen	5 parts per million or greater
Nitrogen	100% saturation or less
Carbon Dioxide	10 parts per million or less
Hydrogen sulfide	0.1 part per billion or less
Hydrogen cyanide	10 parts per billion or less

Source: Piper, R. G. and e. al (1992). Fish hatchery management. Washington D.C., Fish and Wildlife Service, 517 pp.

## ANEXO 8

Common ingredients used in aquaculture feeds and factors that affect their quality.

<i>Ingredient</i>	<i>Quality Factor</i>	<i>Quality Testing</i>
Fishmeal	Proximate Composition	Proximate Analysis
Fishmeal	Freshness of Raw Material	Total volatile nitrogen
Fishmeal	Manufacturing conditions	Chemical tests
Fish oil	Oxidative rancidity	Chemical tests
Blood meal	Digestibility	Chemical tests
Poultry by-product meal	High ash, variability	Chemical tests
Feather meal	Digestibility	Chemical tests
Meat and bone meal	High ash, variability	Chemical tests
Crustacea meal	Manufacturing conditions	Chemical tests
Squid meal	Manufacturing conditions	Chemical tests
Soybean meal	Trypsin inhibitors	Chemical tests
Grain meals and by-products	Mold	Chemical tests

Source: Hardy, R. W. (1991). Applications of hazard analysis and critical control point principles to feed manufacturing. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing Workshop, Singapore, American Soybean Association.

## ANEXO 9

Specifications for Norwegian special-quality fishmeals.

<i>Category</i>	<i>NorseMink®</i>	<i>NorseEel®</i>	<i>NorseLT-94®</i>
Moisture(%)	5-10	5-8	6-10
Protein (%)	70	66	68
Fat (%)	-	-	11.5
Ash (Max. %)	-	20	-
Salt (Max %)	3.0	-	3.0
Water-soluble protein (g/16 g N)	-	12	32
NH <sub>3</sub> -N (g/16 g N Max.)	0.18	0.18	0.18
Protein digestibility (%) <sup>1</sup>	-	-	90.0
TVN (mg/100 g)	>90	>90	50

<sup>1</sup> Measured using adult male mink.

Source: Hardy, R. W. (1991). Applications of hazard analysis and critical control point principles to feed manufacturing. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing Workshop, Singapore, American Soybean Association.

Especificaciones para harinas de pescado noruegas de calidad especial.

<i>Categoría`</i>	<i>NorseMink®</i>	<i>NorseEel®</i>	<i>NorseLT-94®</i>
Humedad(%)	5-10	5-8	6-10
Proteína (%)	70	66	68
Grasa (%)	-	-	11.5
Cenizas (Max. %)	-	20	-
Sal (Max %)	3.0	-	3.0
Proteína soluble en agua (g/16 g N)	-	12	32
NH <sub>3</sub> -N (g/16 g N Max.)	0.18	0.18	0.18
Digestibilidad de la proteína (%) <sup>1</sup>	-	-	90.0
TVN (mg/100 g)	>90	>90	50

<sup>1</sup> Medición realizada en un visón macho adulto.

Source: Hardy, R. W. (1991). Applications of hazard analysis and critical control point principles to feed manufacturing. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing Workshop, Singapore, American Soybean Association.

## ANEXO 10

Summary of chemical tests to measure fishmeal quality for aquatic feeds.

<i>Chemical Test</i>	<i>Recommended Values</i>
Total volatile nitrogen (TVN)	< 60 mg N/100 g sample (raw material)
Total volatile nitrogen (TVN)	< 150 mg N/100 g sample (meal)
Pepsin digestibility (Torry)	> 87.5%
Histamine	< 800 µg/g
In vivo “apparent digestibility” coefficient (protein)	> 90% (> 94%) with “feces settling” method

Source: Dong, F. and R. W. Hardy (2000). Feed Evaluation, Chemical. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickey. New York, John Wiley and Sons: 340-349.



## ANEXO 11

Typical values for fresh, moderately fresh and stale raw fish used to make fishmeal.

<i>Category</i>	<i>Fresh</i>	<i>Moderately Fresh</i>	<i>Stale</i>
TVN (mg/100 g)	< 25	< 60	< 140
NH <sub>3</sub> -N (g/16 g N Max.)	0.12	0.16	0.18
Cadaverine (µg/g)	330	1000	1600
Putricine (µg/g)	30	230	630
Histamine (µg/g)	<30	440	830
Tyramine (µg/g)	<30	400	800

<sup>1</sup> Pike (1991).

Source: Dong, F. and R. W. Hardy (2000). Feed Evaluation, Chemical. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickey. New York; John Wiley and Sons: 340-349.

## ANEXO 12

Typical physical qualities of various types of fish-feed pellets

<i>Physical Quality</i>	<i>Compressed</i>	<i>Annular Gap</i>	<i>Extruded</i>	<i>UPC</i>
Density <sup>a</sup>	590	680	400-500	400-600
Maximum temperature	95	135	150	150
Time exposed to steam	< 1 min	< 1 min	2-5 min	2-3 min
Starch gelatinization (%)	< 40	65-70	> 80	60-80
Maximum fines (%)	2-3	< 1	< 1	< 1
Maximum fat level (%)	18	25	38	30

<sup>a</sup> 480 g/L is the breakpoint for pellets to float; higher density pellets sink, lower density pellets float in freshwater

Source: Barrows, F. T. (2000). Feed Manufacturing Technology. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickey. New York, John Wiley and Sons: 354-359.

## ANEXO 13

### Attributes of Pellet Types Important to Fish Farmers

<i>Physical Quality</i>	<i>Compressed</i>	<i>Annular Gap</i>	<i>Extruded</i>	<i>UPC</i>
Starch digestibility <sup>a</sup>	Low	High	High	Med to High
Pellet buoyancy	Sinking	Sinking	Floating/Sink ing	Floating/Si nking
Water stability	Low	Low	High	High
Durability	Low	Medium	High	High
Nutrient destruction <sup>b</sup>	Low	Low	Medium	Medium/Lo w
Cost of pelleting	Lowest	Low	Highest	Medium

<sup>a</sup> Starch digestibility is a function of the degree of gelatinization

<sup>b</sup> Nutrient destruction during pelleting is caused by high temperature, high pressure, length of time that feed mixture is exposed to high temperature, and most greatly affects certain vitamins and the carotenoid pigment, astaxanthin

Source: Barrows, F. T. (2000). Feed Manufacturing Technology. Encyclopedia of Aquaculture. R. R. Stickey. New York

ANEXO 14

## **Análisis de Riesgos**

# **Hazard Analysis**

**For the process of producing:**

**Experiment 2: Growth of *H. fulgens* with various carbohydrate sources**

**by**

**Zachary Kain**

**3 August, 2001**

## Form 1

### PRODUCT DESCRIPTION

<b>1. Product name(s)</b>	Experimental Results: Growth of <i>H. fulgens</i> with various sources of CHO
<b>2. Important product characteristics of end product (e.g.) Aw, pH, etc.</b>	Humidity less than 10%. Ingredient particulate size of less than 355 um (1.5 phi)
<b>3. How the product is to be used</b>	Used as in feeding trials of green abalone <i>Haliotis fulgens</i>
<b>4. Packaging</b>	Sealed plastic bags
<b>5. Shelf-Life</b>	If frozen, the shelf life is three months
<b>6. Where the product will be sold</b>	The product will not be sold
<b>7. Labelling instructions</b>	Label with diet name, date produced, storage specifications, date of ration
<b>8. Special distribution control</b>	Feed to abalone immediately following removal from the freezer. Feed without touching the diet

**Form 2****PRODUCT INGREDIENTS & INCOMING MATERIAL**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

RAW MATERIAL	PACKAGING MATERIAL	DRY INGREDIENTS
water tuna silage	plastic bags	fish meal corn starch dextrin cellulose carboxymethylcellulose sucrose gelatin soybean meal, 92% protein vitamin mixture mineral mixture choline chloride

## Form 3

### FLOW DIAGRAM

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

1. Experimental Design
2. Assuring Quality of the Marine Environment
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms
4. Formulation of Experimental Diets
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients
6. Preparation and Storage of Experimental Diets
7. Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets
8. Running of Experiment
9. Laboratory Analyses
10. Analysis of Data

## Form 5

### HAZARD IDENTIFICATION: BIOLOGICAL HAZARDS

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all biological hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified biological hazards	Controlled at
2. Assuring quality of the marine environment - Cross-contamination from restrooms	GMP/GHP-B Personal Hygiene
2. Assuring Quality of the marine environment - Disease due to infection from other tanks in the laboratory	GMP/GHP-B Establishment: Maintenance and Sanitation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Disease due to pathogenic organisms arriving in air or system water	See Form 9
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Incoming seawater contains suspended organic matter (algae, detritus) that may constitute supplemental feed to the experimental organisms	GMP/GHP-B Control of Operation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Phytoplankton bloom: Risk of toxicity, may consume oxygen, interference with feeding	GMP/GHP-B Control of Operation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Toxicity due to the production of hydrogen sulfide in anaerobic portions of the rearing system	GMP/GHP-B Establishment: Design and Facilities
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Contaminated tubing, valves, etc. from previous experiment affect current experiment	GMP/GHP-B Establishment: Maintenance and Sanitation



## Form 5

### HAZARD IDENTIFICATION: BIOLOGICAL HAZARDS

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all biological hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified biological hazards	Controlled at
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms - Pathological substances present in transport equipment (ie. dry ice, bags, ice chest)	GMP/GHP-B Establishment: Maintenance and Sanitation
4. Formulation of Experimental Diets - Incorrectly assuming nutritional requirements for other species are the same for organism being studied	GMP/GHP-B Product Information and Product Awareness
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Mold growth in ingredients	GMP/GHP-B Primary Production
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Mold growth in ingredients or prepared diet	GMP/GHP-B Control of Operation
5. Reception, recording and storage of feed ingredients - Ingredient quality is not uniform	GMP/GHP-B Control of Operation
6. Preparation and Storage of Experimental Diets - Diets stored for too long in refrigerator, resulting in mold growth	GMP/GHP-B Control of Operation
6. Preparation and Storage of Experimental Diets - Microbial contamination of diet while extruding diet	GMP/GHP-B Control of Operation

## Form 5

### HAZARD IDENTIFICATION: BIOLOGICAL HAZARDS

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all biological hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified biological hazards	Controlled at
6. Preparation and Storage of Experimental Diets - Microbial contamination of diet while mixing ingredients	GMP/GHP-B Control of Operation
6. Preparation and Storage of Experimental Diets - Microbial contamination of diet while weighing ingredients	GMP/GHP-B Control of Operation
8. Running of Experiment - Growth of diatoms on tank surface interfere with nutritional results by acting as a diet supplement	GMP/GHP-B Establishment: Maintenance and Sanitation
8. Running of Experiment - Growth of epiphytes on walls of culture units and shells of animals	GMP/GHP-B Establishment: Maintenance and Sanitation
8. Running of Experiment - Microbial contamination of diets at time of feeding	GMP/GHP-B Control of Operation
8. Running of Experiment - Pathogenesis of experimental organisms	See Form 9
9. Laboratory Analyses - Microbial contamination of reagents	GMP/GHP-B Control of Operation

**Form 5****HAZARD IDENTIFICATION:  
BIOLOGICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all biological hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified biological hazards	Controlled at
-------------------------------	---------------

**DATE:** \_\_\_\_\_ **APPROVED BY:** \_\_\_\_\_

**Form 6****HAZARD IDENTIFICATION:  
CHEMICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all chemical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified chemical hazards	Controlled at
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Accumulation of metabolites	GMP/GHP-C Control of Operation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Contamination from disinfectant (Chlorine, Iodophore, other disinfectant)	GMP/GHP-C Establishment: Maintenance and Sanitation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - The presence of compounds produced within system or arriving with the incoming seawater affects abalone feeding behavior or physiology	GMP/GHP-C Establishment: Design and Facilities
2. Assuring Quality of the marine environment - The presence of nutritionally valuable substances in the incoming seawater interferes with experimental results	See Form 9
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Toxicity due to toxic substances used in the system	GMP/GHP-C Establishment: Design and Facilities
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Toxicity to the experimental organisms due to the entrance of contaminants. ie. heavy metals	See Form 9
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Contaminated tubing, valves, etc. from previous experiment affect current experiment	GMP/GHP-B Establishment: Maintenance and Sanitation

**Form 6****HAZARD IDENTIFICATION:  
CHEMICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all chemical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified chemical hazards	Controlled at
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms - Toxicity due to presence of disinfectants or other contaminant	GMP/GHP-C Control of Operation
4. Formulation of Experimental Diets - Inappropriate choice of ingredient (ie. wrong viscosity of CMC or type for HPLC, wrong gel strength of gelatin, wrong quality grade)	GMP/GHP-C Product Information and Product Awareness
4. Formulation of Experimental Diets - Ingredients of different lots used for one experiment	GMP/GHP-C Control of Operation
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Minerals: wrong ingredient, chemically contaminated, contains moisture (affecting weight)	GMP/GHP-C Control of Operation
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Use of chemically contaminated ingredients	GMP/GHP-C Control of Operation
6. Preparation and Storage of Experimental Diets - Chemical contamination of diet while weighing ingredients	GMP/GHP-C Control of Operation
6. Preparation and Storage of Experimental Diets - Chemical contamination of reagents during weighing or measuring	GMP/GHP-C Control of Operation

**Form 6****HAZARD IDENTIFICATION:  
CHEMICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all chemical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified chemical hazards	Controlled at
8. Running of Experiment - Chemical contamination of feed at time of feeding	GMP/GHP-C Personal Hygiene
9. Laboratory Analyses - Chemical contamination of glassware	GMP/GHP-C Establishment: Maintenance and Sanitation

**DATE:** \_\_\_\_\_ **APPROVED BY:** \_\_\_\_\_

**Form 7****HAZARD IDENTIFICATION:  
PHYSICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all physical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

<b>Identified physical hazards</b>	<b>Controlled at</b>
2. Assuring quality of the marine environment - Air and water flow ceases due to power outage	GMP/GHP-P Establishment: Design and Facilities
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Air or water pumping equipment failure	GMP/GHP-P Control of Operation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Clogging of water and air tubing	GMP/GHP-P Control of Operation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Daily fluctuations in environmental parameters elicit a stress response from the experimental organism	GMP/GHP-P Control of Operation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Dissolved oxygen falls outside of acceptable range for experimental organism	CCP-P
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Light intensity in experimental unit interferes with feeding behavior or promotes diatom growth in experimental units	GMP/GHP-P Establishment: Design and Facilities
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Photoperiod affects feeding behavior of experimental organisms	GMP/GHP-P Establishment: Design and Facilities

**Form 7****HAZARD IDENTIFICATION:  
PHYSICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all physical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified physical hazards	Controlled at
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Risk of electrocution due to the presence of electricity in a humid, salty environment	GMP/GHP-P Establishment: Design and Facilities
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Salinity is outside of acceptable range for experimental organism	See Form 9
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Supersaturation of incoming water	GMP/GHP-P Establishment: Design and Facilities
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Temperature falls outside of acceptable range for experimental organism	CCP-P
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Turbidity of incoming water impedes respiration, feeding of experimental organisms	GMP/GHP-P Control of Operation
2. Assuring Quality of the Marine Environment - Contaminated tubing, valves, etc. from previous experiment affect current experiment	GMP/GHP-B Establishment: Maintenance and Sanitation
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms - Handling stress due to over manipulation of experimental organisms	GMP/GHP-P Control of Operation



## Form 7

### HAZARD IDENTIFICATION: PHYSICAL HAZARDS

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all physical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified physical hazards	Controlled at
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms - Stress to organism due to transport at incorrect temperature	CCP-P
4. Formulation of Experimental Diets - Errors in formulation: total doesn't add to 100%. Silage included as wet weight instead of dry weight	GMP/GHP-P Product Information and Product Awareness
4. Formulation of Experimental Diets - Fish meal falls outside of quality criteria	CCP-P
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Ingredient has passed its useable life	GMP/GHP-P Control of Operation
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Ingredient not found	GMP/GHP-P Control of Operation
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Ingredient stored in conditions not in accordance with its storage criteria	GMP/GHP-P Primary Production
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Misreading of ingredient labels	GMP/GHP-P Product Information and Product Awareness

**Form 7****HAZARD IDENTIFICATION:  
PHYSICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all physical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified physical hazards	Controlled at
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients - Mistranscription of ingredient label information	GMP/GHP-P Control of Operation
5. Reception, recording and storage of feed ingredients - Ingredient quality is not uniform	GMP/GHP-B Control of Operation
6. Preparation and Storage of Experimental Diets - Insufficient mixing of ingredients	GMP/GHP-P Control of Operation
6. Preparation and Storage of Experimental Diets - Repeated removal and replacement of diets to freezer causes deterioration of diet quality	GMP/GHP-P Control of Operation
7. Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets - Diets fall below water stability requirements or show high leaching rate	CCP-P
7. Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets - Diets swell, decreasing density and reducing intake	-P
7. Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets - Pellets float	-P

**Form 7****HAZARD IDENTIFICATION:  
PHYSICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all physical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

<b>Identified physical hazards</b>	<b>Controlled at</b>
8. Running of Experiment - Availability of experimental diets is dissimilar	GMP/GHP-P Product Information and Product Awareness
8. Running of Experiment - Lost pellets at time of feeding	GMP/GHP-P Control of Operation
8. Running of Experiment - Rearing system is difficult to clean due to insufficient space	GMP/GHP-P Establishment: Design and Facilities
8. Running of Experiment - System flows or temperatures vary within buckets	-P
8. Running of Experiment - Timing of feeding is dissimilar between diets	GMP/GHP-P Control of Operation
9. Laboratory Analyses - Improper storage of reagents	GMP/GHP-P Control of Operation
9. Laboratory Analyses - Improper weighing or measuring technique when weighing, or preparing reagents	GMP/GHP-P Training

**Form 7****HAZARD IDENTIFICATION:  
PHYSICAL HAZARDS**

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all physical hazards related to ingredients, incoming material, processing, product flow, etc.

Identified physical hazards	Controlled at
9. Laboratory Analyses - Inaccurate weighing or measurement of liquids	GMP/GHP-P Training
9. Laboratory Analyses - Reagents stored in the incorrect place	GMP/GHP-P Control of Operation
9. Laboratory Analyses - Risk of heat or chemical burns, electrocution	GMP/GHP-P Establishment: Design and Facilities

**DATE:** \_\_\_\_\_ **APPROVED BY:** \_\_\_\_\_

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Experimental Design	- Duration of experiment too short to detect differences or too long, creating statistical "noise"	yes	no	yes	yes	
Experimental Design	- Existence of pseudoreplicates	yes	no	no	no	GMP/ GHP
Experimental Design	- Experiment lacks statistical strength	yes	no	yes	yes	GMP/ GHP
Experimental Design	- Variation of environmental quality between replicates creates statistical "noise"	yes	no	no		
Assuring quality of the marine environment	B - Cross-contamination from restrooms	no	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Assuring Quality of the marine environment	B - Disease due to infection from other tanks in the laboratory	yes	no	yes	yes	GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	B - Disease due to pathogenic organisms arriving in air or system water	yes	no			
Assuring Quality of the Marine Environment	B - Incoming seawater contains suspended organic matter (algae, detritus) that may constitute supplemental feed to the experimental organisms	yes			no	GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	B - Phytoplankton bloom: Risk of toxicity, may consume oxygen, interference with feeding	no	no	no	no	GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	B - Toxicity due to the production of hydrogen sulfide in anaerobic portions of the rearing system	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Assuring Quality of the Marine Environment	C - Accumulation of metabolites	no	no	no	no	GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	C - Contamination from disinfectant (Chlorine, Iodophore, other disinfectant)	no	no	no	no	GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	C - The presence of compounds produced within system or arriving with the incoming seawater affects abalone feeding behavior or physiology	yes	no			GMP/ GHP
Assuring Quality of the marine environment	C - The presence of nutritionally valuable substances in the incoming seawater interferes with experimental results	yes	no	yes		
Assuring Quality of the Marine Environment	C - Toxicity due to toxic substances used in the system	no	no	no	no	GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Assuring Quality of the Marine Environment	C - Toxicity to the experimental organisms due to the entrance of contaminants. ie. heavy metals	no	no	no	no	
Assuring quality of the marine environment	P - Air and water flow ceases due to power outage	no	no			GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Air or water pumping equipment failure	yes	no	no		GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Clogging of water and air tubing	yes	no			GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Daily fluctuations in environmental parameters elicit a stress response from the experimental organism	yes	no			GMP/ GHP



## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Dissolved oxygen falls outside of acceptable range for experimental organism	yes	no	yes	no	CCP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Light intensity in experimental unit interferes with feeding behavior or promotes diatom growth in experimental units	yes	no			GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Photoperiod affects feeding behavior of experimental organisms	yes	no			GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Risk of electrocution due to the presence of electricity in a humid, salty environment	yes	no			GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Salinity is outside of acceptable range for experimental organism	no	no			

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Supersaturation of incoming water	yes	no			GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Temperature falls outside of acceptable range for experimental organism	yes	no	yes	no	CCP
Assuring Quality of the Marine Environment	P - Turbidity of incoming water impedes respiration, feeding of experimental organisms	yes	no			GMP/ GHP
Assuring Quality of the Marine Environment	B - Contaminated tubing, valves, etc. from previous experiment affect current experiment	no	no			GMP/ GHP
Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	B - Pathological substances present in transport equipment (ie. dry ice, bags, ice chest)	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	C - Toxicity due to presence of disinfectants or other contaminant	yes	no			GMP/ GHP
Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	P - Handling stress due to over manipulation of experimental organisms	yes	no			GMP/ GHP
Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	P - Stress to organism due to transport at incorrect temperature	yes	yes			CCP
Formulation of Experimental Diets	B - Incorrectly assuming nutritional requirements for other species are the same for organism being studied	yes	no			GMP/ GHP
Formulation of Experimental Diets	C - Inappropriate choice of ingredient (ie. wrong viscosity of CMC or type for HPLC, wrong gel strength of gelatin, wrong quality grade.)	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Formulation of Experimental Diets	C - Ingredients of different lots used for one experiment	no	no			GMP/ GHP
Formulation of Experimental Diets	P - Errors in formulation: total doesn't add to 100%. Silage included as wet weight instead of dry weight		no			GMP/ GHP
Formulation of Experimental Diets	P - Fish meal falls outside of quality criteria	yes	yes			CCP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	B - Mold growth in ingredients	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	B - Mold growth in ingredients or prepared diet					GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	C - Minerals: wrong ingredient, chemically contaminated, contains moisture (affecting weight)	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	C - Use of chemically contaminated ingredients	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	P - Ingredient has passed its useable life	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	P - Ingredient not found	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	P - Ingredient stored in conditions not in accordance with its storage criteria	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	P - Misreading of ingredient labels	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	P - Mistranscription of ingredient label information	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- BHT past expiration date	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- Carboxymethylcellulose: risk of chemical contamination, wrong viscosity, wrong grade	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- Cellulose: chemical contamination, wrong grade	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- Dextrin: chemical contamination, wrong grade	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- Fish meal is inadequate due to improper storage					GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- Soy Meal: Soy meal trypsin inhibitor not inactivated. Overheated, reduced digestibility Incorrect selection of grade (% protein)	yes	no			GMP/ GHP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- Starch: Mold growth Insect growth Wrong source of starch: corn wheat	yes	yes			CCP
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- Tuna silage: chemical contamination contains toxic molds, fungus	yes	yes			CCP

**Form 8****CCP DETERMINATION**

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	- Vitamins: stored in inadequate conditions activity lost during storage or due to heating during processing	yes	yes			CCP
Reception, recording and storage of feed ingredients	B - Ingredient quality is not uniform					GMP/ GHP
Preparation and Storage of Experimental Diets	B - Diets stored for too long in refrigerator, resulting in mold growth	no	no	no	no	GMP/ GHP
Preparation and Storage of Experimental Diets	B - Microbial contamination of diet while extruding diet	yes	no			GMP/ GHP
Preparation and Storage of Experimental Diets	B - Microbial contamination of diet while mixing ingredients	yes	no			GMP/ GHP



## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Preparation and Storage of Experimental Diets	B - Microbial contamination of diet while weighing ingredients	yes	no			GMP/ GHP
Preparation and Storage of Experimental Diets	C - Chemical contamination of diet while weighing ingredients	yes	no			GMP/ GHP
Preparation and Storage of Experimental Diets	C - Chemical contamination of reagents during weighing or measuring	yes	no			GMP/ GHP
Preparation and Storage of Experimental Diets	P - Insufficient mixing of ingredients	yes	no			GMP/ GHP
Preparation and Storage of Experimental Diets	P - Repeated removal and replacement of diets to freezer causes deterioration of diet quality	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets	P - Diets fall below water stability requirements or show high leaching rate	yes	yes			CCP
Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets	P - Diets swell, decreasing density and reducing intake	yes	no	yes	yes	
Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets	P - Pellets float	yes	no	yes	yes	
Running of Experiment	B - Growth of diatoms on tank surface interfere with nutritional results by acting as a diet supplement	yes	no			GMP/ GHP
Running of Experiment	B - Growth of epiphytes on walls of culture units and shells of animals	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Running of Experiment	B - Microbial contamination of diets at time of feeding	yes	no			GMP/ GHP
Running of Experiment	B - Pathogenesis of experimental organisms	no	no			
Running of Experiment	C - Chemical contamination of feed at time of feeding	yes	no			GMP/ GHP
Running of Experiment	P - Availability of experimental diets is dissimilar	yes	no			GMP/ GHP
Running of Experiment	P - Lost pellets at time of feeding	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Running of Experiment	P - Rearing system is difficult to clean due to insufficient space	yes	no			GMP/ GHP
Running of Experiment	P - System flows or temperatures vary within buckets	yes	no	yes	yes	
Running of Experiment	P - Timing of feeding is dissimilar between diets	yes	no			GMP/ GHP
Laboratory Analyses	B - Microbial contamination of reagents	yes	no			GMP/ GHP
Laboratory Analyses	C - Chemical contamination of glassware	yes	no			GMP/ GHP

## Form 8

### CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Laboratory Analyses	P - Improper storage of reagents	yes	no			GMP/ GHP
Laboratory Analyses	P - Improper weighing or measuring technique when weighing, or preparing reagents	yes	no			GMP/ GHP
Laboratory Analyses	P - Inaccurate weighing or measurement of liquids	yes	no			GMP/ GHP
Laboratory Analyses	P - Reagents stored in the incorrect place	yes	no			GMP/ GHP
Laboratory Analyses	P - Risk of heat or chemical burns, electrocution	yes	no			GMP/ GHP

# Form 8

## CCP DETERMINATION

Process Step/ incoming material	Category and identified hazard	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP #
Analysis of Data	- Erroneous data entry	yes	no			GMP/ GHP

**Instructions:**

- \* **Category and identified hazard:** Determine if hazard is fully controlled by adherence to Codex General Principles of Food Hygiene. If **Yes**, indicate "GMPs", describe and proceed to next identified hazard. If **No**, proceed to Question 1.
- \* **Question 1: Do control preventative measure(s) exist?** If **No**, this is not a CCP. Identify how the hazard can be controlled before or after the process and proceed to the next identified hazard. If **Yes**, describe and proceed to the next question.
- \* **Question 2: Is the operation specifically designed to eliminate or reduce the likely occurrence of a hazard to an acceptable level?** If **No**, proceed to Question 3. If **Yes**, this is a CCP; identify it as such in the last column
- \* **Question 3: Could contamination with identified hazard(s) occur in excess of acceptable levels or could these increase to unacceptable levels?** If **No**, this is not a CCP; proceed to the next identified hazard. If **Yes**, proceed to Question 4.
- \* **Question 4: Will a subsequent operation eliminate identified hazard(s) or reduce likely occurrence to an acceptable level?** If **No**, this is a CCP; identify it as such in the last column. If **Yes**, this is not a CCP; identify the subsequent step and proceed to the next identified hazard.

## Form 9

### UNADDRESSED HAZARDS

PRODUCT NAME(S): Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all biological, chemical or physical hazards that are not controlled by the establishment.

Unaddressed hazard from previous list	Identified methods of addressing the hazard (e.g. cooking instructions, public education, use by date)
B. - Disease due to pathogenic organisms arriving in air or system water	Total disinfection of incoming seawater Intake far from effluent Place filters in air system
C. - Toxicity to the experimental organisms due to the entrance of contaminants. ie. heavy metals	Regularly check water for the presence of toxicants Perform bioassays to assess toxicity Assess health of maintenance organisms
P. - Salinity is outside of acceptable range for experimental organism	Periodically check salinity using refractometer
P. - Fish meal falls outside of quality criteria	Visual inspection of fish meal Microscopic inspection of fish meal Test humidity Chemical tests Check freshness on label (arrival date) Check storage conditions

# Form 9

## UNADDRESSED HAZARDS

PRODUCT NAME(S): Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

List all biological, chemical or physical hazards that are not controlled by the establishment.

<b>Unaddressed hazard from previous list</b>	<b>Identified methods of addressing the hazard (e.g. cooking instructions, public education, use by date)</b>
B. - Mold growth in ingredients	Visual checks for mold growth Assure that variations in temperature do not occur that might allow for localized increased humidity and subsequent mold growth Store dry ingredients at low temperature with desiccant and in darkness
C. - Use of chemically contaminated ingredients	Maintain ingredients in separate, sequenced containers Use clean spoons, spatulas when removing ingredients for weighing Never return spatula to container containing ingredient Throw out any know contaminated ingredients

DATE: \_\_\_\_\_ APPROVED BY: \_\_\_\_\_



# Form 10

## HACCP PLAN

**PRODUCT NAME(S):** Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

Process Step	CCP #	Hazard Description	Critical limits	Monitoring procedures	Deviation procedures	Records
2. Assuring Quality of the Marine Environment	CCP 1 P	Dissolved oxygen falls outside of acceptable range for experimental organism	Oxygen level falls below 80% of saturation: approximately 6 mg per liter dissolved oxygen	Check oxygen concentration weekly using dissolved oxygen meter Check flow rates periodically During periods of	Increase air flow to individual buckets as needed In case of power failure, use battery powered air pumps to aerate the experimental	methods system calculations physiological requirements equipment
2. Assuring Quality of the Marine Environment	CCP 2 P	Temperature falls outside of acceptable range for experimental organism	Maintain green abalone between 20 and 23 degrees Celcius. Daily variation no greater than +/- 1 degree Celcius	Use high/low thermometer and/or thermographer(?) to monitor temperatures in experimental system	If temperature varies outside of limit, check to see that heating/chilling apparatus is operating properly Compare ambient	equipment system calculations methods physiological requirements
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	CCP 3 P	Stress to organism due to transport at incorrect temperature	Maintain between 0 and 10 degrees Celcius? Ideal temperature is 6 degrees Celcius	Transport abalone with high/low thermometer contained in ice chest Assure that the proper amount of dry ice is included	If, during transport the temperature rises above acceptable range, add 1 pack of gel-ice If, during transport the temperature	methods

# Form 10

## HACCP PLAN

PRODUCT NAME(S): Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

Process Step	CCP #	Hazard Description	Critical limits	Monitoring procedures	Deviation procedures	Records
4. Formulation of Experimental Diets	CCP 4 P	Fish meal falls outside of quality criteria	Certificate of guarantee from supplier Chemical Test Recommended Values Total volatile nitrogen (TVN)	Upon each arrival of ingredients verify presence of certificate of guarantee from supplier Upon the ingredient's	If ingredient fails test criteria, discard Order more ingredient with higher quality specifications	ingredients methods
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	CCP 5	Starch: Mold growth Insect growth Wrong source of starch: corn, wheat Gelatinized Reduced binding or increased digestibility due to	Maintain temperature during diet processing below or above gelatinization temperature, depending upon the objective	Measure temperature in experimental diet following mixing	If temperature falls outside of acceptable range of temperature during preparation, reprepare the diet	diets methods
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	CCP 6	Tuna silage: chemical contamination contains toxic molds, fungus	pH of silage < 3.5	Check pH of silage before weighing/measuring remove mold and stir every month. Check for presence of aflatoxins	If pH is greater than ___ and less than ___ add acid to reduce pH. If pH is greater than ___ discard silage If aflatoxins found, discard	methods duties ingredients

# Form 10 HACCP PLAN

PRODUCT NAME(S): Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO-

Process Step	CCP #	Hazard Description	Critical limits	Monitoring procedures	Deviation procedures	Records
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	CCP 7	Vitamins: stored in inadequate conditions activity lost during storage or due to heating during processing	If vitamin mixture is found stored outside of refrigerator, discard. If today's date > expiration date, discard Process diet below	Check high/low thermometer in refrigerator	If refrigerator falls outside of acceptable temperature range, repair refrigerator Discard vitamins if activity has been significantly	duties equipment methods
7. Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets	CCP 8 P	Diets fall below water stability requirements or show high leaching rate	Each experimental diet <10% loss in dry weight over 12 hours	Perform stability test of experimental diets before each experiment	If experimental diet fails stability test, re-formulate and re-prepare experimental diet	diets ingredients nutritional requirements methods

DATE: \_\_\_\_\_ APPROVED BY: \_\_\_\_\_

## Form 11

### HAZARDS AND PREVENTATIVE MEASURES

PRODUCT NAME(S): Experimental Results: Growth of *H. fulgens* with various sources of CHO

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
1. Experimental Design	Duration of experiment too short to detect differences or too long, creating statistical "noise"	Maintain system in optimal conditions to maximize growth Select appropriate experimental organisms	system calculations
1. Experimental Design	Existence of pseudoreplicates	Check experimental design with a statistician	contacts methods
1. Experimental Design	Experiment lacks statistical strength	Run statistical test using sample data Increase number of organisms Increase number of replicates per treatment Homogenize organism size Increase duration of experiment Review optimum experimental conditions of organisms	methods physiological requirements

DATE: \_\_\_\_\_ APPROVED BY: \_\_\_\_\_

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
1. Experimental Design	Variation of environmental quality between replicates creates statistical "noise"	Design system with as little variation as possible. Record changes in environmental parameters so they might be associated with changes in the data	system calculations methods
2. Assuring quality of the marine environment	Cross-contamination from restrooms	Place foot bath at entrance of laboratory Change into boots in laboratory Build bathroom in separate building from wet lab	methods
2. Assuring Quality of the marine environment	Disease due to infection from other tanks in the laboratory	Isolate water, equipment between systems	system calculations
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Disease due to pathogenic organisms arriving in air or system water	Total disinfection of incoming seawater Intake far from effluent Place filters in air system	system calculations physiological requirements methods

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Incoming seawater contains suspended organic matter (algae, detritus) that may constitute supplemental feed to the experimental organisms	Filter incoming seawater	system calculations physiological requirements methods
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Phytoplankton bloom: Risk of toxicity, may consume oxygen, interference with feeding	Filter incoming seawater Increase water quality control measures Increase cleaning of tanks with greater frequency Filtration is expensive for a farm (You need to decide the minimum acceptable, not maximum possible)	physiological requirements system calculations
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Toxicity due to the production of hydrogen sulfide in anaerobic portions of the rearing system	Perform periodic cleaning of sumps, water lines to remove any organic sediment from the system. Provide adequate aeration in areas where the production of sulfides might occur.	system calculations methods physiological requirements
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Accumulation of metabolites	Perform theoretical calculations to assure that biomass, feeding rates, and flow rates will be sufficient to remove all accumulated metabolites. Assure proper mixing of water within experimental unit to prevent localized accumulation of metabolites Set flow rates daily	system calculations methods

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Contamination from disinfectant (Chlorine, Iodophore, other disinfectant)	Use disinfectants that are relatively less toxic, such as iodophores, rinse thoroughly equipment immediately following disinfection, leave system running several days before use.	methods physiological requirements tank calculations
2. Assuring Quality of the Marine Environment	The presence of compounds produced within system or arriving with the incoming seawater affects abalone feeding behavior or physiology	Quantify (or collect information from colleagues) amount of the said substances. Perform bioassays to assess effect of these substances Treatment, such as ozone, to destroy these substances	methods system calculations physiological requirements
2. Assuring Quality of the marine environment	The presence of nutritionally valuable substances in the incoming seawater interferes with experimental results	Biofiltration Quantify effect of incoming nutrient Control light level	physiological requirements methods system calculations
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Toxicity due to toxic substances used in the system	Assure than no known toxic materials exist in the system Allow sufficient time for "leaching" of toxic chemicals	system calculations physiological requirements methods

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Toxicity to the experimental organisms due to the entrance of contaminants. ie. heavy metals	Regularly check water for the presence of toxicants Perform bioassays to assess toxicity Assess health of maintenance organisms	physiological requirements methods system calculations
2. Assuring quality of the marine environment	Air and water flow ceases due to power outage	Install generator to produce electricity for the water pump and blower	duties equipment
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Air or water pumping equipment failure	Equipment regular maintenance and monitoring, log sheet Back-up air pump and blower	methods equipment
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Clogging of water and air tubing	Perform regular maintenance of valves, air stones Clean the entire system before initiating each experiment Prepare one replacement set of tubing	methods system calculations duties



<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Daily fluctuations in environmental parameters elicit a stress response from the experimental organism	Monitor variation in environmental parameters and control variation before starting experiment Assure that organisms are not stressed after conditioning period and before the initiation of the experiment Control water temperature, flow rates	system calculations methods physiological requirements
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Dissolved oxygen falls outside of acceptable range for experimental organism	Perform theoretical calculations that air flow will be sufficient given the addition of oxygen from the incoming water Regular maintenance of air stones.	methods system calculations physiological requirements equipment
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Light intensity in experimental unit interferes with feeding behavior or promotes diatom growth in experimental units	Place shade cloth above experimental units at an intensity that does not stress experimental organisms and does not encourage diatom growth	physiological requirements methods equipment
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Photoperiod affects feeding behavior of experimental organisms	Maintain light cycle within laboratory Install timer to control lighting within laboratory	methods physiological requirements system calculations

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Risk of electrocution due to the presence of electricity in a humid, salty environment	Use ground fault interrupters Maintain floors as dry as possible using squeegee	methods equipment
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Salinity is outside of acceptable range for experimental organism	Periodically check salinity using refractometer	physiological requirements system calculations methods
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Supersaturation of incoming water	Use chart to calculate expected dissolved oxygen in tanks compared to actual Perform periodic checks for supersaturation using saturometer Splash water into tank and maintain good aeration	methods system calculations physiological requirements equipment
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Temperature falls outside of acceptable range for experimental organism	Perform regular checks of heating equipment Provide redundant heating/chilling equipment Use high/low thermometers to monitor variability in temperature Insulate system to limit heat losses	equipment system calculations methods physiological requirements

<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Turbidity of incoming water impedes respiration, feeding of experimental organisms	Filtration of system water Monitor turbidity	system calculations equipment methods physiological requirements
2. Assuring Quality of the Marine Environment	Contaminated tubing, valves, etc. from previous experiment affect current experiment	Clean tubing, valves, etc. with disinfectant at the end of experiment and/or before initiating new experiment	
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	Pathological substances present in transport equipment (ie. dry ice, bags, ice chest)	Disinfect transport equipment before each use	tank calculations methods
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	Toxicity due to presence of disinfectants or other contaminant	Rinse transport equipment thoroughly following disinfection	methods tank calculations

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	Handling stress due to over manipulation of experimental organisms	Use anaesthetic before or following transport Transport organisms on flexible material to more easily separate and manipulate the organisms Transport abalone without water at low temperatures using burlap sacks or algal	tank calculations system calculations methods physiological requirements
3. Transport, Reception and Conditioning of Experimental Organisms	Stress to organism due to transport at incorrect temperature	Transport organisms at their ideal transport temperature and within acceptable time	methods
4. Formulation of Experimental Diets	Incorrectly assuming nutritional requirements for other species are the same for organism being studied	Check organism requirements at the species level before starting diet formulation	nutritional requirements diets methods
4. Formulation of Experimental Diets	Inappropriate choice of ingredient (ie. wrong viscosity of CMC or type for HPLC, wrong gel strength of gelatin, wrong quality grade)	Proper labeling of ingredients Verify that data in formulation program is correct	label maker methods ingredients diets

<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
4. Formulation of Experimental Diets	Ingredients of different lots used for one experiment	Check labels of ingrediets Do not use ingredients from different lots	
4. Formulation of Experimental Diets	Errors in formulation: total doesn't add to 100%. Silage included as wet weight instead of dry weight	Use a program which automatically calculate totals and displays error message when criteria are not met	
4. Formulation of Experimental Diets	Fish meal falls outside of quality criteria	Visual inspection of fish meal Microscopic inspection of fish meal Test humidity Chemical tests Check freshness on label (arrival date) Check storage conditions	ingredients methods
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Mold growth in ingredients	Visual checks for mold growth Assure that variations in temperature do not occur that might allow for localized increased humidity and subsequent mold growth Store dry ingredients at low temperature with desiccant and in darkness	ingredients methods nutritional requirements

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Mold growth in ingredients or prepared diet	Install dryer in storage room Keep window closed Store dry diets at low temperature with desiccant and in darkness Use dry diets within one week	
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Minerals: wrong ingredient, chemically contaminated, contains moisture (affecting weight)	Always use the same mineral mixture Label clearly Test for moisture content	
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Use of chemically contaminated ingredients	Maintain ingredients in separate, sequenced containers Use clean spoons, spatulas when removing ingredients for weighing Never return spatula to container containing ingredient Throw out any know contaminated ingredients	ingredients methods
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Ingredient has passed its useable life	Print clearly ingredient expiration date on label Check expiration date before use of ingredient Use criteria to decide if an ingredient has passed it's expiration date Do not mix of different lots for one experiment	label maker methods ingredients

<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Ingredient not found	Store ingredients according to an organization system Label ingredients clearly	ingredients methods
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Ingredient stored in conditions not in accordance with its storage criteria	Label clearly the storage criteria of the ingredient Discard ingredients that have been stored in conditions other than by their storage criteria	ingredients methods
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Misreading of ingredient labels	Label ingredients with large, readable labels	label maker methods
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Mistranscription of ingredient label information	Ingredient label sheets that can be transferred without the error associated with transcription	methods ingredients

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	BHT past expiration date	Order these reagents in small lots on a regular basis Assess appropriate criteria (age, moisture content) to discard these ingredients	
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Carboxymethylcellulose: risk of chemical contamination, wrong viscosity, wrong grade	Proper labelling Check database for appropriate grade	
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Cellulose: chemical contamination, wrong grade	Proper labelling Check database for appropriate grad	
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Dextrin. chemical contamination, wrong grade	Proper labelling Check database for appropriate grad	



Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Fish meal is inadequate due to improper storage	Store in well-ventilated space without rapid changes in temperature Assure that fish meal contains antioxidants Store in sealed container that prevents the entrance of insects Maintain moisture content of feed low (below 10%) Add mold inhibitor to prevent mold growth Provide expiration date readily visible on storage	
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Soy Meal: Soy meal trypsin inhibitor not inactivated. Overheated, reduced digestibility Incorrect selection of grade (% protein)	Use a reliable source with guaranteed analysis For insufficient heating test for urease and or trypsin inhibitor activity For overheating measure protein solubility in 0.2% KOH or by Coomassie Blue dye-binding Assure that grade is correct	ingredients
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Starch: Mold growth Insect growth Wrong source of starch: corn, wheat Gelatinized Reduced binding or increased digestibility due to gelatinization	Store in a well labelled, sealed container in a dry location Heat above or below gelatinization temperature, as desired	diets methods
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Tuna silage: chemical contamination contains toxic molds, fungus	Visual checks, periodic removal of mold, stirring, sampling for contamination, use small containers in series, assure proper storage Vacuum seal silage container	methods duties ingredients

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
5. Reception, Recording and Storage of Feed Ingredients	Vitamins: stored in inadequate conditions activity lost during storage or due to heating during processing	Store in refrigerator Process the diet cold Define expiration date	duties equipment methods
5. Reception, recording and storage of feed ingredients	Ingredient quality is not uniform	Stir ingredient before weighing Perform sampling and analyses to check quality Assure than all diets contain ingredients from the same lot	methods
6. Preparation and Storage of Experimental Diets	Diets stored for too long in refrigerator, resulting in mold growth		
6. Preparation and Storage of Experimental Diets	Microbial contamination of diet while extruding diet	Use of preservatives Maintain working area clean: disinfect extruder before each use	ingredients diets physiological requirements nutritional requirements methods

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
6. Preparation and Storage of Experimental Diets	Microbial contamination of diet while mixing ingredients	Disinfect mixer Cover diet while mixing	
6. Preparation and Storage of Experimental Diets	Microbial contamination of diet while weighing ingredients	Disinfect weighing area Weigh ingredients as quickly as possible and cover with lid Use preservatives in diet formulation	
6. Preparation and Storage of Experimental Diets	Chemical contamination of diet while weighing ingredients	Use separate weigh boat/spoon while weighing each ingredient Never replace unused material into storage container	ingredients methods
6. Preparation and Storage of Experimental Diets	Chemical contamination of reagents during weighing or measuring	Always use a clean spatula or pipet when removing material from a chemical jar or bottle Never replace chemicals to chemical container	methods

<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
6. Preparation and Storage of Experimental Diets	Insufficient mixing of ingredients	Mix all diets for a period known to sufficiently mix ingredients Confirm proper distribution of nutrients via analyses (color variation, proximal analysis) Assure uniform particle size	methods diets nutritional requirements
6. Preparation and Storage of Experimental Diets	Repeated removal and replacement of diets to freezer causes deterioration of diet quality	Individually weigh, separate, label and seal rations Store rations in same conditions.	diets methods
7. Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets	Diets fall below water stability requirements or show high leaching rate	Re-make diets using other binder Coat all diets with water-repelling substance	diets ingredients nutritional requirements methods
7. Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets	Diets swell, decreasing density and reducing intake	Formulate diets ingredients that do not swell substantially, such as CMC	ingredients diets nutritional requirements methods

Process Step	Hazard Description	Preventative Measures	Location in Database
7. Assuring Quality and Acceptability of Experimental Diets	Pellets float	Remove gas from pellets using vacuum Minimize loss of dry matter due to low stability or poor binder Formulate diets with higher density to prevent floating Rather than hot extrusion, perform cold extrusion or hand-make diets Mix thoroughly during feed preparation and include compaction in processing of diet	diets methods
8. Running of Experiment	Growth of diatoms on tank surface interfere with nutritional results by acting as a diet supplement	Maintain experimental organisms in dark environment that prevents diatom growth Wipe surface of experimental unit periodically with a clean sponge to minimize diatom growth Filtration of incoming seawater to 1 um	methods physiological requirements system calculations
8. Running of Experiment	Growth of epiphytes on walls of culture units and shells of animals	Before conditioning, remove epiphytes gently using a wire brush or small wire Select organisms without epiphytes for experiment Disinfect and scrub experimental units before use Scrub walls of buckets every two weeks during experiment	methods
8. Running of Experiment	Microbial contamination of diets at time of feeding	Feed immediately after removing rations from storage (freezer, plastic bag)	methods diets

<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
8. Running of Experiment	Pathogenesis of experimental organisms	Treat organisms with antibiotic Treat <i>Vibrio alginolyticus</i> with 50 mg/l neomycin sulfate Cease experiment immediately and disinfect system Start over, no antibiotics or you will select for resistant strains in your system	physiological requirements methods tank calculations
8. Running of Experiment	Chemical contamination of feed at time of feeding	Do not touch pellets when feeding experimental organisms Feed using clean gloves Wash hands before feeding experimental organisms	methods
8. Running of Experiment	Availability of experimental diets is dissimilar	Assure similar availability by calculating based upon number of pellets, ration (% body weight/day), average distance to reach feed total surface area	methods system calculations
8. Running of Experiment	Lost pellets at time of feeding	Register number of pellets fed on log sheet	methods sign maker

<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
8. Running of Experiment	Rearing system is difficult to clean due to insufficient space	Design rearing system with adequate space Maintain working space clean Post signs	system calculations methods sign maker
8. Running of Experiment	System flows or temperatures vary within buckets	Perform periodic spot-checks of temperature and water flows Rotate experimental units daily during experiment	methods
8. Running of Experiment	Timing of feeding is dissimilar between diets	Randomize location of experimental unit so error is distributed. If randomized block design, feed by block Feed at the same time, in the same way each day	methods
9. Laboratory Analyses	Microbial contamination of reagents	Use clean weighing spatula or spoon for each ingredient (clean spatula between ingredients) Leave reagents capped when not in use. Store reagents upside-down Use dedicated spatula for each ingredient	

<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
9. Laboratory Analyses	Chemical contamination of glassware	Always wash glassware following use using a laboratory-grade detergent, followed by rinses of tap water and deionized (distilled) water Make a notice describing glassware cleaning protocol Use dedicated glassware	methods
9. Laboratory Analyses	Improper storage of reagents	Verify content of container Print clear, easy to read labels	equipment methods label maker
9. Laboratory Analyses	Improper weighing or measuring technique when weighing, or preparing reagents	Make measurement protocols available to all laboratory personnel Measurement workshop for all laboratory personnel	methods
9. Laboratory Analyses	Inaccurate weighing or measurement of liquids	Make safety protocols available to all laboratory personnel Safety workshop Place safety signs up	methods sign maker



<b>Process Step</b>	<b>Hazard Description</b>	<b>Preventative Measures</b>	<b>Location in Database</b>
9. Laboratory Analyses	Reagents stored in the incorrect place	Dispose immediately of improperly stored materials, if quality check cannot be performed Print clear, easy to read labels	methods label maker
9. Laboratory Analyses	Risk of heat or chemical burns, electrocution	Regular maintenance and log book of equipment use Post safety reminders in laboratory Perform periodic clean-up	methods equipment
10. Analysis of Data	Erroneous data entry	Use a pre-formatted spreadsheet to catch errors in formatting, number of samples, etc Double type data into computer to verify accuracy Check off data from original worksheet as is added to the spreadsheet Always have a logbook with the important data and notations In addition to information on the PC, always carry a	methods