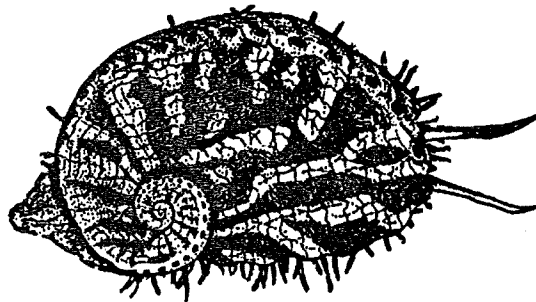


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**DESARROLLO DE DIETAS ARTIFICIALES PARA ABULONES
JUVENILES DE *Haliotis fulgens* (Phillips, 1845), UTILIZANDO DIFERENTES
FUENTES DE PROTEINA.**



TESIS QUE PRESENTA

Lus Mercedes López Acuña

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

ENSENADA, B.C.

MAYO DE 1994.

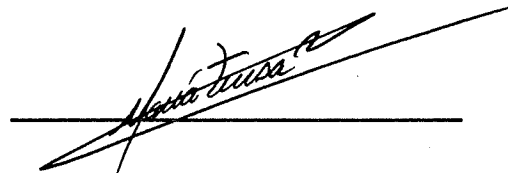
"DESARROLLO DE DIETAS ARTIFICIALES PARA ABULONES JUVENILES DE
Haliotis fulgens, UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE PROTEINA".

DEFENSA DE TESIS
QUE PRESENTA

Lus Mercedes López Acuña

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

Aprobada por :



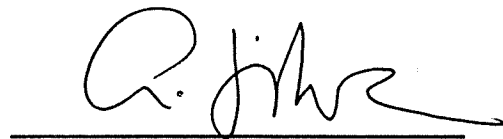
Presidente del Jurado

Dra. María Teresa Viana Castrillón



Sinodal Propietario

M.C. Eugenio Carpizo Ituarte



Sinodal Propietario

M.C. Antonio Silva Loera

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California, a la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de Ensenada, por haber facilitado sus instalaciones y el material necesario para la realización de esta investigación.

A la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera de Bahía Tortugas, por la donación de abulones juveniles. A la empresa Tecnología y Servicios del Mar, S.A.de C.V.(TECMAR) por el subproducto de pescado otorgado.

Muy especialmente a la directora de tesis Dra. Maria Teresa Viana C., por todo ese tiempo que invirtió en transmitir sus conocimientos, su ayuda y amistad incondicional.

A los sinodales M.C. Eugenio Carpizo Ituarte y M.C. Antonio Silva Loera, por su paciencia y tiempo invertido en la corrección de este trabajo.

A mi esposo M.C. Luis Felipe Navarro O., por su ayuda incondicional y por brindarme siempre lo mejor de El. Con todo mi Amor.

A mi hija Ana Karen y a esa lucecita que empieza a brillar. Por hacerme sentir completa y llena de amor.

A mis padres Santiago, Rosa y Enrique, a mis hermanas y sus familias por su cariño y apoyo.

A las familias Godfnez Macías, Ferreira Sarracino y Durazo Moreno, por su gran amistad.

A mis compañeros del proyecto de Bioquímica Marina: Marcos, Soledad, Ruth, Elda, Carmen, Sonia, Hugo y al M.C. Zaúl Garcia E. por su amistad y ayuda en todo momento.

Al departamento de Ocenografía Física del I.I.O. por su cooperación en la elaboración del escrito.

El presente trabajo formó parte del proyecto de investigación "Biotecnología de productos pesqueros para ser aprovechados dentro de la acuicultura" del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, financiado por la Secretaria de Educación Pública dentro del programa SEP/DIGICSA de acuerdo al convenio No. 91-01-02-001-648 y al convenio CONACyT No. 237A9107.

PREFACIO

El presente trabajo está dividido en tres artículos que incluyen el desarrollo de dietas artificiales como una alternativa para elevar las tasas de crecimiento de abulones juveniles de *Haliotis fulgens*, utilizando diferentes fuentes de proteína con materia prima regional de bajo costo. Los artículos mencionados a continuación serán referidos en el texto mediante números romanos.

Artículo I

Maria Teresa Viana.; Lus M. López y Alfredo Salas.

Diet development for juveniles abalone *Haliotis fulgens*. Evaluation of two artificial diets and macroalgae. *Aquaculture* (1993). 117:149-156.

Artículo II

Maria Teresa Viana.; Lus M. López.; Zaul García-Esquivel y Elda Mendez.

The use of silage from fish and abalone viscera as an ingredient for abalone feed. *Aquaculture* (febrero 1994).

Artículo III

Lus M. López y Viana Maria Teresa.

Determinación de la calidad del alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo y cocido, para abulones juveniles de *Haliotis fulgens*.

RESUMEN

Dietas artificiales elaboradas con harina de pescado, caseína, ensilaje de pescado crudo y cocido, ensilaje de vísceras de abulón y harina de macroalga, probaron dar mejores tasas de crecimiento que el obtenido con la macroalga *Macrocystis pyrifera*, alimento natural de *Haliotis fulgens*, abulón nativo del norte de México. Con las dietas de harina de pescado y caseína se realizó un experimento con grupos de 20 abulones cada uno por triplicado. La duración del estudio fue de 90 días. El crecimiento fue similar en ambos tratamientos con tasas máximas de $101 \mu\text{m}/\text{día}$. Por otro lado con las dietas elaboradas con ensilaje de pescado crudo y cocido se realizó un experimento de 6 meses con tres grupos de 35 organismos marcados individualmente. La máxima tasa de crecimiento fue de $69 \mu\text{m}/\text{día}$ con el alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ensilaje de pescado crudo y cocido, sugiriendo que el porcentaje de hidrólisis no afectó la utilización de la proteína en abulones. Se obtuvo que el lavado de proteína es independiente a la estabilidad. El consumo es fácilmente sobreestimado pudiendo subevaluar la tasa de eficiencia alimenticia. Sin embargo, se obtiene que la máxima eficiencia alimenticia fue obtenida para el ensilaje crudo 1:1.6, mientras que para el cocido 1:1.1. Entre los alimentos elaborado con vísceras de abulón y harina de macroalga el primero fue el que mostró los mejores resultados ($110 \mu\text{m}/\text{día}$). Sin embargo, abulones alimentados con macroalga fresca y harina de macroalga al ser expuestos a una dieta con ensilaje de vísceras de abulón mostraron un significativo incremento en tasa de crecimiento ($177 \mu\text{m}/\text{día}$) (crecimiento compensatorio).

Tabla de Contenido

1 INTRODUCCION _____	1
1.1 OBJETIVOS GENERALES _____	4
2 DISCUSION GENERAL _____	5
2.1 Artículo I _____	5
2.2 Artículo II _____	6
2.3 Artículo III _____	9
3 CONCLUSIONES GENERALES _____	11
4 LITERATURA CITADA _____	12
5 ARTICULOS _____	14

1 INTRODUCCION

Entre las pesquerías artesanales importantes en la costa noroeste de México sobresale la pesquería del abulón, que por su alto valor comercial (70 dolares/kg) y su ocurrencia a profundidades accesibles para el buceo deportivo y comercial lo han hecho un recurso de fácil extracción.

En las costas de México la pesquería del abulón ha mostrado un decremento continuo y pronunciado, desde el inicio de su comercialización (Rocha, 1985). Los volúmenes de producción fueron en 1950 de hasta 6000 toneladas, como record, y en la actualidad se capturan entre 500 y 600 toneladas por año (Guzmán del Proó, 1992).

Este decremento en la pesquería del abulón ha ocurrido también en otros países, lo cual ha propiciado la implementación de programas de investigación sobre el recurso. Japón, siendo el pionero en esta área inició investigaciones desde fines del siglo pasado, seguidas por Estados Unidos, en 1939 (Cox, 1962); Australia, Nueva Zelanda y México en 1966, (Mottet, 1978; Guzmán del Proó, 1992).

La disminución en la pesquería del abulón ha despertado un considerable interés en el desarrollo de métodos para su cultivo. El problema principal de la acuicultura del abulón ha sido su lento crecimiento, aparte de la disponibilidad y abundancia del alimento natural, primordialmente de algas marinas (Norman-Boudreau, 1989). La mayoría de los cultivadores de abulón requieren de grandes cantidades de alimento, microalgas y diatomeas para los estadios juveniles tempranos y macroalgas para juveniles y adultos. Esfuerzo que eleva el costo de producción en el cultivo.

Los alimentos naturales mencionados son bajos en proteína (2 a 10 %) y contienen un alto porcentaje de agua (85 %) (Uki *et al.*, 1986); por lo que el crecimiento del organismo es del orden de 2.5 cm/año. Es decir, para que un abulón del medio natural alcance la talla comercial (7.5 a 10 cm), se requiere de 3 a 5 años (Hahn, 1989). Así mismo se ha observado que a mayor cantidad de proteína en la dieta hay mayor crecimiento, lo que

establece la posibilidad de utilizar alimento artificial (Uki *et al.*, 1985 a y b; Hahn, 1989). De esta manera el desarrollo de alimento artificial para abulones se ha encausado a obtener niveles óptimos de proteínas, lípidos y otros nutrientes necesarios para aumentar su tasa de crecimiento, asegurando así el éxito de su cultivo (Gorfine y King, 1991).

Por las razones antes expuestas, investigaciones recientes en este contexto se enfocan a la implementación y mejoramiento de dietas artificiales, que además de asegurar la existencia de alimento (ya que es fácil de guardar y podría ser más barato que el alimento natural), ayuden a incrementar la tasa de crecimiento en peso corporal del abulón (Gorfine y King, 1991; Uki y Watanabe, 1992).

En el Japón, utilizando una especie nativa de abulón (*Haliotis discus hannai*) han probado diferentes fuentes de proteína a diversas concentraciones, entre las que podemos mencionar: caseína, soya, concentrado de centeno, albúmina de huevo, huevo entero, extracto de pescado y gluten de maíz. Con base en estas fuentes de proteína, en dietas experimentales para juveniles, la tasa de eficiencia de proteína (REP) sugiere que la caseína es la mejor, presentando una alta calidad nutricional de 4.2 gramos ganados por gramo de proteína consumida. Se ha observado también que cuando se utiliza caseína como fuente de proteína la eficiencia de conversión alimenticia (ECA) es de 1.27. El crecimiento reportado con esta fuente de proteína es de aproximadamente 5.03 cm/año, para dicha especie, lo cual representa el doble del crecimiento de abulones con dieta de alimento natural (Uki *et al.*, 1985 a y b).

Como se mencionó anteriormente el alimento artificial Japonés les ha dado buenos resultados, abaratando el costo de producción y reduciendo el tiempo de crecimiento de los abulones *H. discus hannai* en cultivo. Sin embargo su costo de 7.00 dólares por kilogramo de alimento (alimento comercial Japonés), lo hace ser inaccesible para acuicultura fuera de ese país. La causa de su precio elevado aparte de la mano de obra cara, es aparentemente debido a que se trata de un alimento que es elaborado con una fuentes de proteína cara

(soya y harina de pescado), de alta calidad. Además, utilizan aglutinantes de alta calidad para obtener un alimento que permanezca estable en el agua, durante varios días. De esta manera se asegura que los micronutrientes necesarios lleguen al organismo para permitir un buen desarrollo (Uki *et al.*, 1985 a y b).

Por lo general se busca la utilización de proteína barata (subproductos) como una alternativa en alimentación para la industria de la acuicultura (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Curatolo *et al.*, 1993), logrando así reducir los costos.

Los subproductos por lo general se consiguen a un precio bajo, mismos que pueden ser almacenados sin deteriorarse mediante la adición de ácidos, dando por resultado el ensilaje. Ensilar es el proceso de guardar alimento en un silo tratando de conservar sus características nutritivas. La conservación del producto se logra por el efecto de los ácidos sobre las bacterias presentes (Gildberg, 1982). El producto terminado tiene consistencia líquida debido al alto grado de hidrólisis que se produce durante su almacenamiento y contiene una alta concentración de aminoácidos libres. Se considera que la actividad enzimática (enzimas endógenas) es la causa principal de licuefacción en ensilajes de pescado, que mediante la disminución del pH (Gildberg, 1982), se crea un ambiente propicio para que las enzimas digestivas hidrolicen las proteínas, efecto que es observado aún después de mucho tiempo de almacenamiento. Esta utilización de los subproductos ha probado ser una buena fuente de proteína para peces marinos en cultivo (Raa y Gildberg, 1982). Es aceptable para salmonidos y los valores nutricionales son tan buenos como la materia prima fresca (Austreng, 1982). Sin embargo cuando el ensilaje de pescado es muy líquido, grandes volúmenes de harinas y aglutinantes son necesarios para obtener un pellet de aceptable consistencia (Raa y Gildberg, 1982; Raa *et al.*, 1983).

En este trabajo se pretende conocer la tasa de crecimiento de los abulones juveniles *H. fulgens*, utilizando diferentes fuentes de proteína y materia prima regional. En la primera parte (artículo I) se utilizó caseína y harina de pescado como fuente de proteína.

En la segunda parte (artículo II) con el fin de conocer el efecto de la proteína hidrolizada en el crecimiento del abulón *H. fulgens* la fuente de proteína fue ensilaje de pescado crudo y cocido, ensilaje de vísceras de abulón y harina de macroalga. En ambos experimentos se utilizó una tercera dieta con la macroalga (*Macrosystis pyrifera*) como testigo. En el tercer artículo se analizó el lavado de proteína, estabilidad del alimento, consumo y eficiencia alimenticia del alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo y cocido.

1.1 OBJETIVOS GENERALES

- 1.-Conocer la tasa de crecimiento en abulones juveniles de *H. fulgens* utilizando dos dietas artificiales (harina de pescado y caseína como fuente de proteína) y *M. pyrifera* fresca como testigo.
- 2.-Evaluación de ensilaje de pescado crudo y cocido y de vísceras de abulón como una fuente de proteína en alimento para abulones juveniles de *H. fulgens*. Probar si el grado de hidrólisis en los ensilajes crudo y cocido afecta la utilización de la proteína en abulones.
- 3.-Analizar el lavado de proteína, estabilidad del alimento, consumo y eficiencia alimenticia del alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo y cocido.

2 DISCUSION GENERAL

Se sabe que el abulón, aparentemente herbívoro (Hahn 1989), es capaz de aceptar alimento artificial con alta cantidad de proteína (20-30%). Nie *et al.* (1986) y Hahn (1989) han probado, que el crecimiento rápido de los organismos, es atribuido a la calidad de proteína, se ha reportado que abulones alimentados con caseína presentaron un crecimiento significativamente diferente al de harina de pescado, soya, albúmina de huevo, huevo completo y gluten de maíz (Uki *et al.*, 1985b).

Las dietas elaboradas en este trabajo estan basadas en los experimentos realizados por Uki *et al.* (1985b) para el abulón *H. discus hannai*. Estudios hechos con otras especies (Nie *et al.*, 1986; Hahn, 1989; Uki y Watanabe, 1992), muestran tasas de crecimiento diferentes, lo cual hace imposible comparar las tasas de crecimiento entre dos, tres o más especies.

2.1 Artículo I

Las tasas de crecimiento obtenidas con harina de pescado y caseína fueron de 98 $\mu\text{m}/\text{día}$ y 101 $\mu\text{m}/\text{día}$ respectivamente, sin observar diferencias significativas entre tratamientos, a lo largo de 90 días de experimentación. De cualquier manera las tasas obtenidas fueron semejantes a las reportadas por Nie *et al.* (1986) para varias especies del Japón.

Con respecto a las dietas naturales, se sabe que abulones alimentado con macroalgas dan por resultado un crecimiento menor que con dietas artificiales. La causa principal se debe probablemente a que los abulones en condiciones naturales se alimentan de macroalgas frescas conteniendo una microflora epífita, misma que es perdida al ser llevada a las condiciones experimentales. Esto puede explicar el hecho de que abulones alimentados

con macroalgas en condiciones de cultivo presenten tasas de crecimiento por debajo a las esperadas en condiciones naturales, llegando a la pérdida de peso, como ocurrió en nuestros trabajos (publicaciones I y II).

Los alimentos naturales (*M. pyrifera*) son bajos en proteína, por lo que crecimiento de los organismos es lento. Se ha observado que a mayor cantidad de proteína incluida en una dieta tiene por consecuencia un mayor crecimiento con especies estudiadas en Japón (Uki *et al.*, 1985b). En una dieta artificial donde la fuente de proteína fue la caseína ha obtenido tasas de crecimiento hasta de 3.6 veces mayores que con el alimento natural (Uki *et al.*, 1989).

Sin embargo, desde un punto de vista práctico, las dietas artificiales elaboradas con caseína difícilmente muestran una estabilidad suficiente. Esto, posiblemente debido a que el tipo de caseína utilizado no sea el adecuado, o bien la manera de preparación. Por otro lado, se sabe que dietas comerciales elaboradas con caseína presentan una buena estabilidad (alimento Makara, Nueva Zelanda). Esta diferencia es quizá, debida a que el alimento Makara esta elaborado con caseína de muy buena calidad. La desventaja en este caso, es el precio, ya que es una de las fuentes de proteína comercial más cara.

2.2 Artículo II

Si el abulón acepta cantidades altas de proteína en su dieta, el costo del alimento va a ser un problema, como lo ha sido en la elaboración de dietas artificiales para peces (Espe, 1993). Por ésto la búsqueda de fuentes de proteína no convencional es de suma importancia. El ensilaje de pescado ha sido la mejor alternativa (Stone y Hardy, 1986; Espe, 1993).

El ensilaje ácido es generalmente elaborado a partir de subproductos pesqueros, mismos que aparte de constituir un problema de contaminación pueden ser utilizados como un ingrediente en la elaboración de dietas para abulones.

Aparte del precio, la utilización de fuentes de proteína parcialmente hidrolizada han demostrado tener ventajas sobre el aprovechamiento en la absorción de proteína en pollos, ratas, salmón y trucha (Espe *et al.*, 1989; Stone *et al.*, 1989; Espe *et al.*, 1992). Se sabe que la absorción de proteína esta dada por tres mecanismos diferentes e independientes, donde aminoácidos libres, oligopéptidos y proteína intacta son diferencialmente captados (Espe, 1993). Esto trae como ventaja que se pueda utilizar el ensilaje conteniendo proteína hidrolizada a diferentes niveles.

En el presente trabajo, para disminuir el grado de hidrólisis se realizó un tratamiento cuya actividad enzimática fue reducida térmicamente casi en su totalidad (alimento elaborado a partir de ensilaje cocido), para obtener menores cantidades de proteína soluble y aminoácidos libres (Viana *et al.*, 1993).

Los ensilajes de pescado crudo y cocido y de vísceras de abulón, mostraron ser una fuente proteica aceptable en dietas para abulones. Si bien los resultados no pueden ser comparados con los tratamientos hechos con base en harina de pescado y caseína, por no haberse realizado en forma simultánea, si puede establecerse que los ensilajes dieron por resultado un crecimiento alto.

En este trabajo, el alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo y cocido dió resultados similares en tasas de crecimiento, no importando el grado de hidrólisis del ensilaje. Esto probablemente se debió a que no haya habido mucha diferencia en el grado de hidrólisis entre los dos tratamientos, ya que los ensilajes se almacenaron a 4 °C,

reduciendo la tasa de hidrólisis, misma que no fue cuantificada en los tratamientos. Se sabe que cuando un 30 % de la proteína se encuentra en aminoácidos libres en dietas para el Salmón (*Salmo salar*) da por resultado un retardo en el crecimiento (Espe, 1993). Dicho 30 % es un porcentaje alto, mismo que difícilmente pudo haberse llegado con los ensilajes relativamente nuevos (almacenados durante 5 meses a 4 °C).

Si se comparan las dietas de ensilaje de pescado con la de vísceras de abulón se observa que esta última fue mejor. Esto es quizá debido a que se le añadió harina de pescado como aporte de proteína intacta asegurando una dieta completa. Ya que la harina de pescado contiene proteínas más completas que los ensilajes y éstas son necesarias en la dieta de los abulones. Si bien ésta pudo haber sido una razón, otro factor de importancia es la aceptación y palatabilidad de los ingredientes. Se ha demostrado (Viana *et al.*, en prensa) que el abulón es altamente atraído por el ensilaje, mostrando preferencia por el de vísceras de abulón neutralizado. En el experimento con ensilaje de vísceras de abulón no fue posible medir el consumo por lo que no puede asegurarse esta diferencia, sin embargo es un hecho el que el abulón prefiera consumir ensilaje de vísceras de abulón que ensilaje de pescado.

Otro factor importante es lo relacionado al crecimiento compensatorio observado en este trabajo. Cuando organismos que han sufrido un período de desnutrición, con un crecimiento pobre se les somete a dietas mejoradas, estos pueden llegar a presentar un crecimiento mucho mayor al esperado por un tiempo determinado, compensando lo perdido (crecimiento compensatorio). El crecimiento compensatorio es observado tanto en estados de subalimentación y cambio a una alimentación apropiada, como en cambios de manejo, causados por tensión de los organismos al manipularlos.

En el primer experimento con harina de pescado y caseína no hubo acostumbramiento (su alimentación fue con macroalgas). Tal vez, esta sea una de las razones por la que los abulones presentaron una tasa alta de crecimiento al inicio y una disminución posterior. En el experimento con ensilaje de pescado, los organismos fueron acostumbrados al alimento artificial durante dos meses por lo que no puede asegurarse una etapa de crecimiento compensatorio. Por otro lado, en el experimento realizado con ensilaje de vísceras de abulón se observó un crecimiento compensatorio de los organismos. Después de alimentarse durante ocho semanas con macroalgas fueron expuestos a la dieta de ensilaje de vísceras de abulón.

2.3 Artículo III

Hoy en día, sabemos con claridad que con un alimento artificial se obtienen mejores tasas de crecimiento (longitud y peso corporal) que con el alimento natural en diferentes especies de abulones.

Sin embargo, es de suma importancia obtener un alimento que no pierda los micronutrientes, esenciales para el organismo, al sumergirlo en el agua. El pellet debe tener una estabilidad suficiente para cubrir los requerimientos de los abulones, y por ello es importante analizar en un experimento de alimentación, la eficiencia de conversión alimenticia y así conocer la calidad del alimento.

En este trabajo se observó que los alimentos elaborados con ensilaje de pescado crudo y cocido sufren un lavado de proteína a medida que pasa el tiempo y aumenta la temperatura (siendo mayor en el de ensilaje crudo). Esta relación es también observada en el porcentaje de pérdida de materia seca para ambos tratamientos, aunque en esta ocasión la mayor pérdida fue para el ensilaje cocido.

Al analizar el consumo de los organismos para ambas dietas, se observó que es alto al inicio del experimento y posteriormente disminuye. Comportamiento que afecta obviamente la tasa de eficiencia alimenticia, misma que fluctúa durante todo el experimento.

Si el consumo del alimento se saca en proporción a el peso corporal, podemos intuir que el consumo está sobreestimado, subevaluando por consiguiente, la tasa de eficiencia alimenticia. Hacia el final del experimento con porcentajes de consumo esperado (Hahn, 1989) se obtienen tasas de eficiencia alimenticia satisfactorias.

3 CONCLUSIONES GENERALES

- * Con las dietas artificiales se obtuvieron mejores tasas de crecimiento que con la dieta natural. El porcentaje de crecimiento en longitud y peso fue de 2.6 y 3.7 veces superior al obtenido con la macroalga fresca (*M. pyrifera*).
- * La diferencia entre 35 y 44 por ciento de proteína no afecta la tasa de crecimiento.
- * Entre las tasas de crecimiento obtenidas con caseína y harina de pescado como fuente de proteína no se observaron diferencias.
- * Los abulones pueden utilizar la proteína de ensilaje crudo y cocido de igual manera sin afectarles el grado de hidrólisis.
- * Después de haber estado en un período de subalimentación, la especie *H. fulgens* es capaz de compensar su crecimiento tan pronto como son expuestos a la dieta elaborada con ensilaje de vísceras de abulón como fuente de proteína.
- * La máxima eficiencia alimenticia de abulones *H. fulgens* entre ensilaje crudo y cocido, fue con el alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo (1:1.6).

4 LITERATURA CITADA

- Austreng, E. 1982. Ensilerte Fiskeoppdrett. In Husdyrforsoksmotet. Aktuelt fra statens fagtjeneste for landbruket, NLH, As, Norway, 1:525-530.
- Coutteau, P. y P. Storangelos. 1992. The use of algal substitute and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusk: An international survey. J. Shell Res. 11:467-476.
- Cox, W. 1962. California abalones, family *Haliotidae* Calif. Dept. Fish. and Game. Fish. Bull. 118. pp 130.
- Curaloto, A.; M.J. Ryan y J.P. Mercer. 1993. An evaluation of the performance of manila clam spat (*Tapes philippinarum*). Aquaculture. 112:179-186.
- Espe M., Raa J., y Njaa L.R. 1989. Nutritional value of stored fish silaje as a protein source for young rats. J. Sci. Food Agric. 49:259-270.
- Espe M., Haaland H. y Njaa L.R. 1992. Growth of young rats on diets based on fish silage with different degrees of hydrolysis. Food Chem. 44:195-200.
- Espe M. 1993. Studies on the utilization of pre-digested fish proteins in atlantic salmon (*Salmo salar*). Dissertation for the degree of doctor scientiarum. Bergen 1993.
- Gildberg A. 1982. Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. J. Food Technol. 11:619.
- Gorfine, H. y R. King. 1991. New food for abalone. Austasia Aquaculture September/October. 5(11):1-40.
- Guzmán del Prío. 1992. A review of the biology of abalone and its fishery in Mexico. In: S.A. Shepherd; M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Prío (Editors), Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture. Fishing News Books, Oxford. pp 341-360.

- Hahn, K. 1989. Nutrition and growth of abalone. In: K. Hahn (Editor), Handbook of Culture of abalone and other Marine Gastropods CRC press, Boca Rato, FL. pp 135-180.
- Mottet, M.G. 1978. A review of the fishery biology of abalones. State of Washington Department of Fisheries. Technical Report. 37:1-81.
- Nie, Z.-Q.; Z.-Q Wang and J.-P Yan. 1986. Experiments on preparing of formulated feed and feeding efficiency of young abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. Mar Fish. Res. 7:53-64.
- Norman-Boudreau, K. 1989. Abalone nutrition and the potential role of purified diets. Abstract of Annual Meeting, February 12-16. National Shellfisheries Association, Los Angeles California. p. 564.
- Raa, J. y A. Gildberg. 1982. Fish Silage: A review In: CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 116:343-419.
- Raa, J. y A. Gildberg and T Strom. 1983. Silage Production-Theory and Practice. In: Upgrading Wastw for Feeds and Food. (Leward, D.A.; A.V. Taylor and R.A. Lawrie (Editors). Butterworths. 1:117-132.
- Stone, F.E.; Hardy, R.W.; Shearer, K.D. y Scott, T.M. 1986. Utilization of fish Silage by Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 76:109-118.
- Uki, N.; A. Kemuyana y T. Watanabe. 1985a. Development of Semipurified Test Diets for Abalone. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51(11):1825-1833.
- Uki, N.; A. Kemuyana y T. Watanabe. 1985b. Nutritional Evaluation of Several Protein Sources in Diets for Abalone *Haliotis discus hannai*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51(11):1835-1839.
- Uki, N.; A. Kemuyana y T. Watanabe. 1986. Optimum Protein Level in Diets for Abalone. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52(6):1005-1012.

- Uki, N y Watanabe, T. 1992. Review of the nutritional requirements of abalone (*Haliotis ssp.*) and development of more efficient artificial diets. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Proó (Editors), Abalon of the World. Biology, Fisheries and Culture. Fishing News Books, Oxford. pp 504-517.
- Viana, M.T., C. Nava-López y R. Solana-Sansores. 1993. Ensilajes ácidos de pescado. efecto del precalentamiento y adición de ácidos fosfórico y cítrico sobre la calidad bioquímica. Ciencias Marinas. 19(4):415-433.

ARTICULO I

REPRINTED FROM:

Aquaculture

Aquaculture, 117 (1993) 149–156
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

AQUA 50103

Diet development for juvenile abalone
Haliotis fulgens
Evaluation of two artificial diets and macroalgae

Maria Teresa Viana, Lus M. López and Alfredo Salas
*Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada,
B.C., México*

(Accepted 25 May 1993)



ELSEVIER, Amsterdam — London — New York — Tokyo

AQUA 50103

Diet development for juvenile abalone *Haliotis fulgens* Evaluation of two artificial diets and macroalgae

Maria Teresa Viana, Lus M. López and Alfredo Salas

*Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada,
B.C., México*

(Accepted 25 May 1993)

ABSTRACT

Two artificial diets made with local ingredients, fish meal (FM) and casein meal (CM), proved to give better growth than that obtained with macroalgae (MA), the natural food of *Haliotis fulgens*, a native abalone from the northern coast of Mexico. The experiment was conducted on triplicate groups, each consisting of 20 abalone. The duration of the study was 90 days. Diets were offered as dry pellets of 2 cm². The growth pattern was very similar for both treatments fed artificial diets (FM and CM), and the highest growth rate was during the first weeks, decreasing gradually thereafter. The abalone fed with FM showed the highest growth rate, being 101 μm per day. The rate at the end of the experiment was 13.5 μm per day. For the CM the daily growth rate decreased from 98 to 17 μm per day. With MA, the growth rate decreased from 25 to 17 μm per day. The decrease in growth rate may be due to several factors.

INTRODUCTION

The abalone is an animal with a slow and very heterogeneous growth rate. According to Hahn (1989a), typical growth rates of abalone are approximately 2–3 cm per year. Hence, proper nutrition and improved growth rates are critical factors to make abalone culture successful. Abalone fisheries in Mexico have greatly diminished during the last two decades (Guzmán del Próo, 1992). Therefore, to increase the natural stock, the fishery cooperatives have been forced to develop abalone hatcheries to produce juveniles (Secretaría de Pesca, 1987). In addition, the low survival rate observed in the laboratory and in nature as well as the predation of juveniles (Tegner and Butler, 1985) have made it impossible to re-establish overexploited stocks. Thus, more efforts are necessary to develop the aquaculture of abalone, not only for

Correspondence to: Dr. Maria Teresa Viana, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, P.O. Box 453, 22800 Ensenada, B.C., Mexico.

production of seed stock, but also for culturing abalone juveniles to commercial size (7–8 cm).

Abalone in nature eat macroalgae and diatoms. The giant kelp *Macrocystis pyrifera* is the dominant algal species of southern California. Hahn (1989a) reports that abalone eat 10–30% of its body weight of algae each day, which means that a large amount of algae would be necessary to develop a commercial farm. Furthermore, *M. pyrifera* is economically important, particularly for alginic acid which is used as a food additive. In Mexico there is a growing interest in the macroalgae industry and competing interests for this kelp will make it an unreliable food resource. In addition, it would be expensive to maintain or to culture an adequate supply of kelp. For this reason most of the abalone culture facilities in Japan use artificial food after the juveniles are removed from the corrugated plates (used for rearing early juveniles with diatoms) (Hahn, 1989a). Natural food is not the only food offered due to the high harvesting costs and the electricity for storage. In addition, kelp has a low protein content (Uki, 1981). It has been shown that the abalone *H. discus*, *H. discus hannai* and *H. sieboldii* fed with various artificial diets grow faster than those fed with natural algae (Nie et al., 1986; Hahn, 1989a). The faster growth was attributed to the higher protein content and protein quality of the feed. Research conducted by Uki et al. (1985) showed that abalone growth was better when fed a diet containing casein as the protein source (the abalone were fed for 40 days with diets containing 30% protein). The reason for better growth was the protein quality due to differences in the digestibility of each protein source by juvenile abalone. Thus, high-quality protein is necessary for a good abalone feed.

This paper describes the growth rate of juveniles of the abalone *H. fulgens* fed with two artificial feeds containing different protein sources, local fish meal and commercial casein, compared to its natural food, macroalgae.

MATERIALS AND METHODS

Test animals

One hundred and eighty specimens of 8-month-old abalone (*H. fulgens*) of 1.3 ± 0.1 cm in average shell length hatched in our laboratory were used. The abalone were held in running aerated sea water with controlled flow at the rate of 300 ml/min. Temperature, pH, oxygen and ammonium content of the water were monitored. The feeding experiments were conducted on triplicate groups of 20 abalone each, in plastic buckets (20-liter capacity). Abalone were fed ad libitum at intervals of 2 days with fresh algae *M. pyrifera* or with one of two artificial diets (see Table 1) for 90 days from June 1991. Every feeding time, all growing algae were washed out from the buckets. Growth was measured as the gain in weight and length. An electronic balance with 0.001 error

TABLE 1

Formulation of the two artificial diets for juvenile abalone *Haliotis fulgens* (dry weight basis)

Ingredients	Fish meal (FM) (%)	Casein (CM) (%)
Fish meal ¹	51.4	—
Casein meal (98% protein) ²	—	38.2
Corn meal ³	4.7	6.4
Sodium alginate ⁴	23.4	25.5
Soya meal (50% protein) ⁵	7.5	10.2
Cod liver oil	6.5	6.4
Vitamin mixture ⁶	1.9	1.9
Mineral mixture ⁷	4.7	5.1
Cellulose	—	6.4

¹Produced locally in Ensenada.²Purchase from SIGMA Biochemical.³Mazeca, produced in Mexico.⁴Kelgin MV, kindly supplied by Kelco.⁵Kindly supplied by the American Soya Association.⁶ICN vitamin diet fortification mixture.⁷As recommended by Hahn (1989a).

was used to register the mg weight gain, and a micrometer was used to measure the length increase.

Preparation of diets

Dietary formulations, as presented in Table 1, were based on the requirements as reported by Uki et al. (1985) and Uki and Watanabe (1992). Vitamin and mineral mixtures were used as recommended by Hahn (1989a). All ingredients were mixed with 60% water until a completely homogenized mixture was obtained. The mix was flattened by a kitchen roller to form a product of 2 mm thickness. In order to form the pellets, pieces of 2 cm² were cut, and dried at 60°C for 30 h. The pellets were tested for stability in sea water by leaving them in similar control buckets and measuring the loss of dry matter after 34 and 35 h.

Proximate analysis

Diet composition was determined as follows: Duplicate samples (4–5 g each) of individual completed pellets were dried to constant weight at 100°C in a convection oven for 24 h. Percentage dry matter was calculated as the dried residue weight. Total nitrogen was determined in triplicate analyses by the Kjeldahl method (AOAC, 1985). Crude protein was calculated as % N × 6.25. Complete lipid determination was performed on duplicate samples (of 5 g each) by a dry column procedure utilizing methanol/chloroform (1:1)

as the eluting solvent. Duplicate samples (of 3 g each) were ashed at 600°C for 18 h (AOAC, 1985).

Statistical significance

To test possible differences in growth as a result of feeding abalone, a factorial analysis with three levels was performed. The statistical program Systat 5.1 for a nested ANOVA was used at the significance level $P < 0.05$.

RESULTS

Diet composition analysis revealed differences in the content of protein and lipid between the artificial feed and the kelp (MA). The highest protein content was in the CM, being 10% higher than that of FM (Table 2). The stability tests for the pellets indicated that the CM lost more dry matter than the FM (results not shown). After 35 h the pellets made of fish meal remained in shape, while pellets with casein started to disintegrate after 24 h.

Water quality analyses showed that pH (7.9–8.1), oxygen (7.2–7.3 mg/l)

TABLE 2

Proximate analysis of the three diets for juvenile *Haliotis fulgens*

	<i>M. pyrifera</i> (MA)	Fish meal (FM)	Casein (CM)
Protein (%)	2.2	35.1	44.1
Fat (%)	1.1	10.0	9.3
Ash (%)	2.0	3.1	2.7

% given as dry matter.

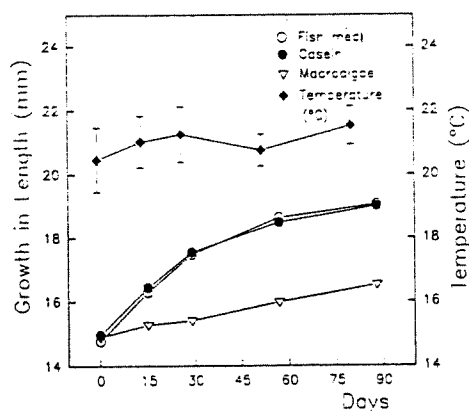


Fig. 1. Mean growth in length (mm) of abalone fed for 90 days with two artificial diets (FM and CM) and macroalgae (MA). Temperature is given as the average of maximum temperatures reported.

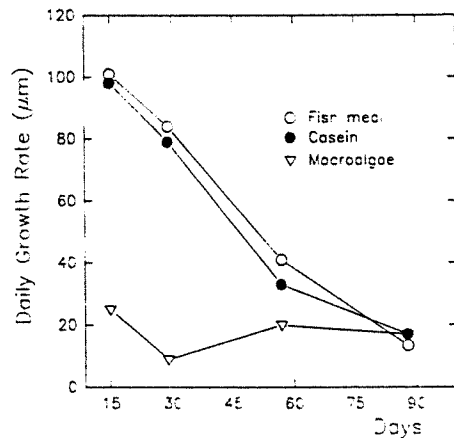


Fig. 2. Mean daily growth rate (μm) obtained after feeding juvenile abalone (*Haliotis fulgens*) for 90 days with two artificial diets (FM and CM) and macroalgae (MA).

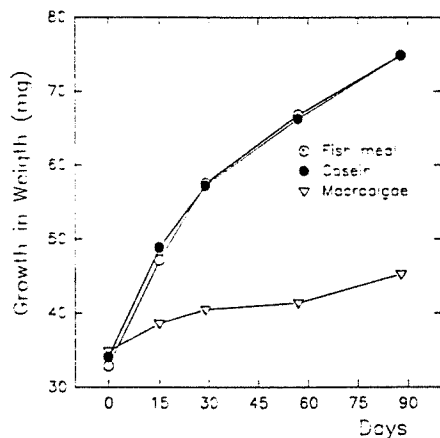


Fig. 3. Mean growth in weight (mg) of abalone fed for 90 days with two artificial diets (FM and CM) and macroalgae (MA).

and ammonium (0.0327–0.0412 mg/l) were within acceptable (Hahn, 1989b) limits throughout the experiment. The daily average temperatures varied between 20.5 and 22.5°C with the maximum being 24°C and the minimum temperature registered during the experiment was 21°C.

Both groups of abalone fed with artificial diets (FM and CM) grew better than those fed with macroalgae (MA). The growth pattern, in length and weight, was very similar for both treatments fed the artificial diets (Figs. 1 and 3). During the first 2 weeks, the daily growth rate was 101 μm and 144 mg for FM and 98 μm and 147 mg for CM as compared to 25 μm and 37 mg for MA. Later on, a gradual decrease was observed, and at the end of the

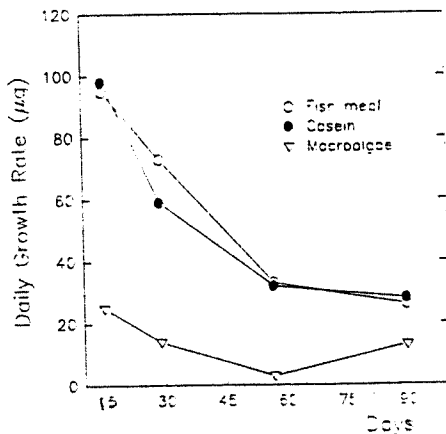


Fig. 4. Mean daily growth rate (μg) obtained after feeding abalone (*Haliotis fulgens*) for 90 days with two artificial diets (FM and CM) and macroalgae (MA).

experiment the respective values were $13.5 \mu\text{m}$ and 2 mg for FM, $17 \mu\text{m}$ and 2 mg for CM, and $17 \mu\text{m}$ and 1 mg for MA (Figs. 2 and 4). The average daily growth rate during the whole experiment was $47 \mu\text{m}$ for FM, $45 \mu\text{m}$ for CM and $16 \mu\text{m}$ for MA.

According to nested ANOVA, at the beginning of the experiment the average length and weight of abalone did not differ significantly ($P < 0.05$). After 15 days there were significant differences ($P < 0.05$) between the artificial treatments compared to macroalgae. These significant differences were maintained throughout the experiment. However, no differences were observed between the treatments fed the artificial diets ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The CM diet had a higher protein content than that of FM, due to a lower protein content than expected in the fish meal. However, the difference between 35 and 44% protein did not affect the growth rate, either in length (μm) or in weight gain (mg) (no significant difference in growth was observed between the treatments). This is in accordance with Uki et al. (1985) who reported that protein levels above 30% were of no significance for the growth of abalone.

Diet stability was acceptable using 23.4 and 25.5% sodium alginate as the binder for FM and CM, respectively. However, the diet containing casein tended to disintegrate after 24 h while the diet containing fish meal lasted 35 h before starting to disintegrate. Additionally, after 48 h a partial disintegration of both diets was registered. Casein is more difficult to bind than fish meal, and therefore more efforts have to be made to find a better binder for

casein. In the present work, feeding was carried out every second day. It is not known if protein, minerals, vitamins or other important nutrients are lost due to the partial disintegration; therefore, it is better to feed the abalone every day.

The artificial diets (FM and CM) were shown to be better than natural food (MA). The average respective growth rate in length and weight was 2.6 and 3.7 times superior to that of the natural food (Figs. 1 and 3). This is similar to the results reported by Nie et al. (1986) that growth of *H. discus hannai* was 2.39 faster on an artificial feed than on *Laminaria*. In this work, FM proved to be as good as CM, which differs from the results of Uki et al. (1985) who reported that casein resulted in better growth. In this study, fish meal and casein were used as the main dietary components. It is known that abalone show a preference for certain ingredients resulting in better food consumption (Harada, 1992; Sakata and Ina, 1992; Shepherd and Steinberg, 1992); perhaps the diet containing fish meal may have been more palatable than the casein diet, resulting in better growth. In addition, some nutrients may have leached from the CM pellets, thus making them unavailable. However, the daily growth rates in all treatments decreased throughout the experiment.

Several factors may have influenced the decrease in growth rate during the experiment. Since the average growth rate was higher for the artificial diets than for the natural feed, and the growth rate was high at the beginning, it cannot be assumed that the dietary ingredients were inappropriate. The decrease in growth rate with time during the experiment is consistent with the development of a nutritional deficiency, which may have resulted for one or more of the following reasons: incomplete diet formulation, vitamin destruction during the drying process (30 h at 60°C), or the leaching of essential nutrients during the feeding process. We offered the diets every second day, but we do not know how fast micronutrients such as vitamins or minerals were lost from the pellets. According to several authors (Grabner et al., 1981; Tacon, 1989), soluble proteins, minerals and hydrosoluble vitamins can leach from pellets a few minutes after immersion in water, resulting in poor growth and low survival rate.

The above discussion may explain the growth decrease in both artificial diets. However, the abalone fed with kelp also showed a slight decrease in growth (length and weight). The decrease was much less, but the growth rate was less too. In this context, an external problem may have been responsible. Temperature was relatively constant throughout the experiment, with maximum temperatures of 22–24°C, which were less than that reported to limit growth in *H. fulgens* (Hahn, 1989b). Water quality is often responsible for poor growth in aquaculture; however, oxygen, ammonium, pH and temperature were all within acceptable levels (Hahn, 1989b). Other factors which can

be associated with water quality, such as heavy metals, bacteria content, etc., were not examined in this experiment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from DIGICSA/SEP No. 91-01-02-001-648. We would like to thank Dr. Scoresby Shepherd for helpful criticism and editorial comments.

REFERENCES

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC), 1985. Official Methods of Analysis, 14th Edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1018 pp.
- Grabner, M., Wieser, W. and Lackner, R., 1981. The suitability of frozen and freeze-dried zooplankton as food for fish larvae: a biochemical test program. *Aquaculture*, 26: 85-94.
- Guzmán del Prío, 1992. A review of the biology of abalone and its fishery in Mexico. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Prío (Editors), *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 341-360.
- Hahn, K., 1989a. Nutrition and growth of abalone. In: K. Hahn (Editor), *Handbook of Culture of Abalone and other Marine Gastropods*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 135-180.
- Hahn, K., 1989b. Artificial induction of conditioning gonad maturation. In: K. Hahn (Editor), *Handbook of Culture of Abalone and other Marine Gastropods*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 41-51.
- Harada, K., 1992. Feeding attraction activity of fragrant and pungent spice extracts in black abalone, *Haliotis discus* (Studies on the Feeding Attractants for Fishes and Shellfishes XVII). In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Prío (Editors), *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 193-200.
- Nie, Z.-Q., Wang, Z.-Q. and Yan, J.-P., 1986. Experiments on preparing of formulated feed and feeding efficiency of young abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Mar. Fish. Res.*, 7: 53-64.
- Sakata, K. and Ina, K., 1992. Algal feeding stimulants for abalone. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Prío (Editors), *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 182-192.
- Secretaría de Pesca, 1987. Esquema de Regulación Propuesto para la Administración de la Pesquería del Abulón. Secretaría de Pesca, Dirección General de Administración de Pesquerías, Dirección de Estudios y Normas, Mexico, 80 pp.
- Shepherd, S.A. and Steinberg, P.D., 1992. Food preferences of three Australian abalone species with a review of the algal food of abalone. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Prío (Editors), *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 169-181.
- Tacon, A.G.J. (Editor), 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación, FAO-Italia. Proyecto Aquila II. Documento de Campo 4 GCP/RLA/102/ITA, 572 pp.
- Tegner, M.J. and Butler, R.A., 1985. The survival and mortality of seeded and native red abalone *Haliotis rufescens*, on the Palos Verdes Peninsula. *California Fish Game*, 17: 150-163.
- Uki, N., 1981. Food value of marine algae of order Laminariales for growth of the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, 42: 19-29.
- Uki, N. and Watanabe, T., 1992. Review of the nutritional requirements of abalone (*Haliotis* spp.) and development of more efficient artificial diets. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Prío (Editors), *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 504-517.
- Uki, N., Kemuyama, A. and Watanabe, T., 1985. Nutritional evaluation of several protein sources in diets for abalone *Haliotis discus hannai*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 51: 1835-1839.

ARTICULO II

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS

THE USE OF SILAGE FROM FISH AND ABALONE VISCERA AS AN INGREDIENT FOR ABALONE FEED

María Teresa Viana*; Lus M. López; Zaul García-Esquivel and Elda Mendez

Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de
Baja California. PO Box 453, 22 800 Ensenada, B.C. México.

SUMMARY

Silage prepared from fish and abalone viscera are effective dietary protein sources for juvenile abalone, *Haliotis fulgens*. Significantly higher growth rates were found in abalones fed with silage as a protein source, compared with kelp, *Macrocystis pyrifera*. However, no differences were found between heated and unheated fish silage, suggesting that the percentage of hydrolysis did not affect the protein utilization in abalones. Similar results were obtained when abalone viscera silage was used, being a better diet than fresh kelp and kelp meal. In the same experiment was also observed that abalones with low growth rate after being fed with kelp showed a significant increase in growth rate, as a compensatory growth, when exposed to the abalone viscera silage diet.

INTRODUCTION

*Correspondance: Maria Teresa Viana at the above address.

Artificial diets based on cheap protein sources are becoming increasingly important as an alternative to live feeds in the aquaculture industry (Coutteau and Sorgeloos, 1992, Curatolo et al., 1993). Recently set abalone spat are usually reared on plates containing diatom films as food (Hahn, 1989), and shifted to fresh macroalgae diets when the organisms reach a size of ca. 0.3 to 0.4 mm (Hahn, 1989). Nevertheless it has been documented that *Haliotis discus*, *H. discus hannai* and *H. sieboldii* fed with various artificial diets grow faster than those fed with natural algae (Nie et al., 1986; Hahn, 1989a). The faster growth was attributed to the higher protein content and quality of the feed. Research conducted by Uki et al. (1985) showed that compared to other protein sources, abalone growth was better when fed a diet supplemented with casein as the protein source. The reason for better growth was the protein quality since digestibility of each protein source by juvenile abalone was different. Thus, cheap high quality protein is an essential element for profitability in the aquaculture industry.

Silage has proved to be a good protein source for sea farmed fish (Raa and Gildberg, 1982). Fish silage preserved by adding acid (a combination of organic and inorganic acids) is acceptable to salmonids and the nutritional value is as good as that of the fresh raw material (Austreng, 1982). Nevertheless, when fish silage becomes so liquefied large volumes of dry binder meals are needed to produce a moist pellet of acceptable consistency. In such a moist feed 60-70% of the dry matter may result from the added dry meal (Raa and Gildberg, 1982; Raa et al. 1983). Besides, during prolonged storage a large amount of free amino acids may be present due to the activity of endogenous enzymes of fish tissues. This may result in a reduction of its nutritional value. Since protein is the major structural component in fish tissue, it is mainly proteases the responsible for autolysis. At acid pH the most active enzymes are pepsin type stomach proteases, but certain lysosomal enzymes like cathepsin D, which is the major muscle protease, may also be important (Gildberg, 1982; Gildberg, 1988).

Amino acids are rather stable in fish silage since a small percentage of the amino nitrogen is released as ammonia in a silage of by-catch fish after three weeks at tropical temperatures (Kompiang et al. 1980). Nevertheless, it has been shown that partially hydrolyzed material is superior in nutritional value to fully hydrolyzed material (Stone et al., 1989; Espe et al., 1993). In order to avoid excessive hydrolysis, it has been shown that enzyme activity from proteases present in fish silage can be inactivated by heating the fish raw material to 60°C for 15 min (Viana et al., 1993a). This results in 15% reduction of free amino acids after 90 days by heating the raw material prior to ensiling the fish.

The use of fish silage as an alternative protein source for abalone could result in cheaper artificial feed, making its culture more viable. The aim of the present study was to test whether diets made with fish silage from mackerel (*Scomber japonicus*), heated and unheated had a significant effect on growth rates of juvenile abalone, *Haliotis fulgens*. Additional diets were also tested as alternative protein sources.

MATERIALS AND METHODS

Diet preparation:

Silage was made as described by Viana et al. (1993a) with heated or unheated mackerel (Experiment I) and heated abalone viscera (Experiment II) silage by adding 2.6 % phosphoric acid, 2.6 % citric acid and 0.1 % sodium benzoate as preservative. The mixture was blended to obtain a homogenized mixture and was then left for 60 days in a plastic bucket. Silage composition is given in Table I. Dietary formulations (Table II) were based on the constituents recommended by Uki et al. (1985) and Uki and Watanabe (1992). Vitamin and mineral mixtures were those recommended by Hahn (1989a). All ingredients were mixed with 22 to 27 % water until a completely homogenized mixture was obtained, besides the water contained in the silage. The diet was rolled flat to a thickness of 2 mm, and pieces of 2x2 cm were cut for Experiment I, and 1x1 cm for Experiment II, and then frozen at -20° until used. The pellets were tested for stability in sea water by leaving them in similar control buckets and measuring the loss of dry matter after 6 and 12 h. For Experiment I the enzyme activity present in the pellets was also tested since it is normally present in unheated silage (Gildberg, 1982). The activity was tested according to Barret (1972) at pH 3, using hemoglobin as a substrate and tyrosine as a standard after determination of soluble protein by Lowry's methods (Lowry et al., 1951), and at pH 5, using azocasein as a substrate. In this case 0.25 ml azocasein solution (6 % dissolved in distilled water) was incubated with 0.65 ml citrate-phosphate buffer and 0.1 ml pellet extract. Enzyme reaction was stopped with 3 ml of 3 % trichloroacetic acid (TCA) after being incubated for 40 min at 37°C.

Proximate analysis:

Diet composition was determined as follows: Triplicate samples (4-5 g each) of individual pellets were dried to constant weight at 100°C in a convection oven. Percentage dry matter was calculated as the dried residue weight. Total nitrogen was determined in triplicate analyses by the Kjeldahl method (A.O.A.C., 1985), and crude protein was calculated as %N x 6.25. Total lipid determination was performed on triplicate samples (of 10 g each) by a dry column procedure utilizing methanol-chloroform/water as the eluting solvent (Bligh and Dyer, 1959). Duplicate samples (of 3 g each) were ashed at 600°C for 18 h (A.O.A.C., 1985). In the Experiment I, the pellets were tested for protein leaching by leaving them in sea water at constant turbulence and temperature (16, 20 and 24°C). One ml sample was taken from the remaining material at 2, 4, 6 and 12 hours for quantitation of soluble protein leached from pellets by Lowry method (1951). The amount of protein is reported here as equivalent to bovine serum albumin (BSA).

Experimental procedure:

Experiment I

Six-month old abalone (*H. fulgens* of 13.0-22.9 mm and 23.0-103.0 mg) obtained from the laboratory of Bahía Tortugas B.C.S., were held in running, aerated sea water with controlled flow rate of 300 ml per min. Temperature, pH, oxygen and ammonium content in the water were monitored (data not shown). Feeding experiments were conducted after 21 days of acclimation to laboratory conditions. During this period abalone were offered fresh kelp (*Macrocystis pyrifera*) as food. The effect of silage diets on growth was tested in 20 l plastic containers (3 replicates per treatment) with 32 abalones per container. The organisms were individually marked with plastic marks in order to follow their growth

over time. One group of abalones were fed with heated mackerel silage (**HS**), an other group with unheated (raw) mackerel silage (**US**) and a third group fed with kelp (**M**, *Macrocystis pyrifera*) served as a control. Silage preparation is described elsewhere (Viana et al., 1993a). Diets were offered during the night *ad libitum* every day for 12 hours, and the remains of food were collected. Twice a week, all growing algae were removed from the containers with a soft brush. Whole-body wet weight was measured with an electronic balance (0.001 error) and shell length with a electronic digital caliper ($\pm 0.01 \mu\text{m}$).

Experiment II

For the second experiment, 384 specimens of 2 month old abalone (*H. fulgens*) (0.4 cm mean shell length) obtained from the laboratory of Bahía Tortugas B.C.S., were used. Abalones were held under the same conditions of Experiment I. Three groups of four containers with 32 abalone each were used to test different diets. Abalones were fed during the night during 8 weeks *ad libitum* every day for 12 hours. One group was fed with fresh algae *M. pyrifera* (**K**), the second with a diet containing kelp meal (**KM**), and the third with a diet containing heated abalone silage as a protein source (**AS**). After the 8th week all animals were fed with the diet **AS** during the 7 following weeks. Under the recovery experiment, feed was offered to satiation during 24 hours a day, and twice a week all growing algae were removed from the container walls with a soft brush. To standardize the experimental conditions, all the containers were rotated clockwise once a week. Growth was measured as the gain in weight and length. An electronic balance with 0.001 error was used to register the mg weight gain, and a micrometer was used to measure the length increase.

Statistical Analyses

In the first experiment, one way analysis of variance (ANOVA) or a two-sample t-test were used at specific times in order to compare mean growth rate, total length or total weight of abalone across diet treatments. One way repeated ANOVA was also used for comparisons of growth rate over time, followed by multiple comparison of means. Diet effects in the second experiment were compared with ANOVA, while changes in mean body weight or shell length over time were tested with multiple comparisons of pooled means (pooling of 4 replicate buckets). Heteroscedastic samples (Bartlett test for homogeneity of variances) were compared with non-parametric tests. The computer packages of Biom (Rohlf, 1987) or Sigma-Stat were used in the statistical analyses.

RESULTS

Experiment I

The proximal analyses (Table III) shows that fish silage diets were similar in protein and lipid content, and superior to fresh macroalgae. The pellet stability tested in the control buckets indicate a dry matter loss of 19.0 % (SE = 0.24) for HS and 4.0 % (SE = 0.15) for US after the pellets were exposed for 12 hours in the water. Significantly greater mean protein leaching was observed at higher temperatures, in both treatments, however, not significant differences between treatments were detected at 20 and 24°C (F = 3.44; DF = 1,3; P = 0.161 and F = 0.52, DF = 1,3; P = 0.523, respectively). Sixteen-degree treated pellets exhibited significantly different mean protein leaching (F = 12.09; DF = 1,3; P = 0.04), with higher values observed in the raw silage (98.7 vs. 90.1 mg/ g protein).

One way repeated ANOVA test indicated that silage fed abalones exhibited significantly different shell growth rates throughout the experiment ($F = 55.1$ and 45.2 for **HS** and **US**, respectively, with 5, 125 DF) with lower values observed during the first month (ca. $3.0 \mu\text{m/day}$). Mean growth rates double during the following month, but after the third month they continued to show significant differences (Table IV). The control group **K** showed significantly lower growth rate compared to both silage fed groups, resulting in the death of the animals during the second month of experimentation.

Significantly different shell growth rates (Kruskal-Wallis test, $H = 30.15$, 2 DF, $p < 0.001$) were found among diet treatments in the third month (end of kelp treatment), but no differences were detected between silage-fed abalones at this time (Dunn's multiple comparison, $p < 0.05$) or by the end of the experiment (two-sample test, $t = -0.523$, 50 DF, $p = 0.603$).

Unlike shell growth rates, daily weight gain consistently increased throughout the experimental period, with the exception of kelp-fed organisms (**K**) that lost 2.1 mg/day from the second to the third month. Mean daily weight gain of about 2 mg/day was observed in silage-fed organisms during the same period of time (Fig. 2). No significant differences were found in the mean daily weight gain between silage treatment at any given time (two sample tests, $p > 0.05$); however, the **US**-fed abalones exhibited greater variability than **HS** organisms (Table IV). Daily weight gain ranged from 2.5 (initial month) to 8.4 mg/month (end).

At pH 3 in pellets containing heated silage showed a remaining enzyme activity of $0.36 \mu\text{mol tyr eq/ml per hour}$, compared to $2.15 \mu\text{mol tyr eq/ml per hour}$ of unheated silage diet. When those pellets with activity were assayed at pH 5, typical of abalone stomach (measured from 20 abalone collected at the sea) no activity was registered.

Experiment II

Diet effects:

The mean shell length of juvenile abalones was significantly affected ($P < 0.001$) by the different diet ($F = 38.1$, $DF = 2$) and time treatments ($F = 53.6$, $DF = 2$). A significant interaction between time x diet factors was also observed during the first half of the experiment ($F = 12.6$, $DF = 4$, $P < 0.001$), due to the sustained shell increase of organisms fed on the abalone diet, and the halt in growth produced with the **KM** and **K** diets (Fig. 5). Kelp-fed juveniles showed increased mean shell length at the beginning of the treatments, but they stopped growing thereafter (Table V). At the end of the feeding trial the performance of abalones on the different diets was, in decreasing order (Table V): **AS** > **KM** > **K** [mean shell length and standard errors were 12.1 (0.10); 9.9 (0.12); 9.5 (0.11), respectively]. A change in shell pigmentation was associated with the diet treatments, the **AS** diet produced intense blue-colored organisms; **KM** and **K**-fed organisms resulted in light blue shells.

Changes in body weight followed the same pattern as observed for body length (Fig. 5), such that at the end of the diet treatments abalone fed with the **AS** diet showed the best growth (215 mg, $SE = 5$), followed by **KM** (116 mg, $SE = 4$) and **K** (93 mg, $SE = 3$).

Compensatory growth after nutritional stress:

Juveniles subjected to the **KM** and **K** diets exhibited a remarkable compensatory growth and increased variability on the growth parameters once they were switched to the **AS** diet (Fig. 5 and 6). When compared with the **AS**-treated abalones (Table V), only the **K** showed significantly lower mean body weight (527 vs. 781 mg) and shell length (16.2 vs. 18.1 mm) at the end of the recovery period (Games & Howell statistic = 5.08, $DF = 170$;

and 6.6, DF = 186, respectively; $P < 0.05$). Nevertheless, the growth rate of the **KM** and **K** abalone increased by more than one order of magnitude once they were shifted to the **AS** diet, while those organisms initially under the **AS** diet only increased their growth rate by approximately 4-fold (Table VI). Shell growth rates in all three diet treatments were similarly high after the eight week (114.3 to 177.1 $\mu\text{m}/\text{day}$), whereas abalones initially fed the **KM** diet outperformed the **AS** and **K** organisms on a weight-specific basis (Table VI).

DISCUSSION

In Experiment I no growth differences could be observed between organisms fed the fish diets. Nevertheless, heated silage showed a lower content of soluble protein and free amino acids compared to unheated silage (Table I). The lack of statistical significance probably means that abalone were able to use free amino acids, as reported for abalone larvae (Jaeckle and Manahan, 1989), or that 32 to 33 % protein is higher than the requirements of abalone. No enzyme activity was detected in the pellets at pH 5, and therefore, it can not be assumed that the remaining enzyme activity could enhance protein digestibility. Time-course protein leaching experiment showed that there were not significant differences among diet treatments at 20 or 24°C. Nevertheless, significant differences were detected at 16°C. Thus, further experiments are recommended where hydrolysis can be completely controlled and the exact free amino acid levels measured before stating any conclusion about the role of free amino acids or enzyme activity in controlling nutrient availability. A major conclusion from the experiment, however, is that fish silage produced better growth rates than natural macroalgae and at a protein level of 32-33% abalone can utilize equally well the protein from heated and unheated silage.

An attempt was made to estimate Food conversion efficiency (FCE), but the results (not shown) were unreliable due to problems during pellet recovery, after feeding. Pellets showed erosion caused by the abalone itself when they were eating. Abalone damaged the uneaten pellets mainly by crawling on top of them, thus making very difficult to collect the disintegrated food particles remaining in the water. More efforts will be necessary in order to design a better way of food collection.

In Experiment II, the diet **AS** proved to be more effective for abalone growth. The reason for the lower growth rate for **AS** under the first 8 weeks of experiment, could be due to shorter feed exposure (12 hours compared to 24 under the recovery period), and the stress of washing and collecting the food every morning. It has been reported that abalone are easily stressed by light and handling (Hahn, 1989). During the recovery phase abalone were disturbed once every day in our experiment, compared to twice a day in the previous weeks. No correlation was found between external variables (temperature, oxygen and ammonia content) and growth. The growth observed in groups **KM** and **K** was much lower than **AS**. Previous reports have shown that single kelp diets offered in the lab, do not seem to provide a proper nutrition (Gorfine, 1993). In nature abalone eat many macro- and microalgae which better satisfy their nutritional requirements. In the present experiment abalone viscera and kelp meal appeared to be more complete than fresh kelp alone. This is probably due to higher concentrations of nutrients in **KM** since humidity of the pellets was much lower than that of fresh macroalgae (Table III). Another reason could be due to the nutrient degradation of fresh macroalgae due to decomposition of the plant. Fresh kelp was collected once a week and some times even more often depending on kelp availability. The kelp was held in running water in a separate tank to keep the kelp as fresh as possible. Interestingly, the compensatory growth of groups **KM** and **K** during the recovery phase was even higher than that observed for **AS** at any stage of the experiment. It has been reported that organisms under longer periods of nutritional

deficiency show poorer compensatory growth. In this experiment nutritionally-deficient abalones were able to compensate in growth as soon as they were switched to the AS diet.

ACKNOWLEDGMENTS

We like to thank Francisco Fonseca and the Cooperative of Bahia Tortugas for the contribution of animals, and also a special thank you to Dr. Scoresby Shepherd, for helpful criticism and editorial comments. This study was supported by a grant from CONACYT No. A9107-0237.

REFERENCES

Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C.), 1985. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 14th Ed. Washington, DC, U.S.A., 1018 pp.

Austreng, E. (1982) Ensilerte fiskeavfall i fiskeoppdrett. In: Husdyrforsøksmøtet. Aktuelt fra statens fagtjeneste for landbruket, NLH, Ås, Norway, (1):525-530

Barret, A.J. (1972) Lysosomal enzymes. In: J.T. Dingle (ed.), Lysozymes, a laboratory handbook, North-Holland Publishing Co., Amsterdam pp. 46-135.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian J. of Biochemistry and Physiology, 37(8):911-917

Coutteau, P. and Sorgeloos, P. (1992) The use of algal substitute and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusk: An international survey. J. Shell Res., 11:467-476.

Curatolo, A; Ryan, M.J. and Mercer, J.P. (1993) An evaluation of the performance of manila clam spat (*Tapes philippinarum*) fed on different rations of spray-dried algae (*Tetraselmis suecica*). Aquaculture, 112:179-186.

Espe, M.; Lied, E. and Torrissen, K.R. (1993) Changes in plasma and muscle free amino acids in atlantic salmon (*Salmo salar*) during absorption of diets containing different amounts of hydrolysed cod muscle protein. Comp. Biochem. Physiol., 105A(3):555-562

Gildberg, A. (1982) Autolysis of fish tissue - General aspects. *Thesis* for the degree of Doctor scientiarum. Tromso, Norway.

Gildberg, A. (1988) Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B(3):425-435.

Hahn, K., 1989a. Nutrition and growth of abalone. In: K. Hahn (Editor), *Handbook of Culture of Abalone and other Marine Gastropods* CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 135-180.

Jaeckle, W.B. and Manahan, D.T. (1989) Feeding by a "nonfeeding" larva: uptake of dissolved aminoacids from seawater by lecithotrophic larvae of the gastropod *Haliotis rufescens*. *Marine Biology*, 103, 87-94.

Kompiang, I. P.; Arifudin, R. and Raa, J. (1980) Nutritional value of ensilaged by-catch fish from Indonesian shrimp trawlers. In: *Advances in fish science and technology*. (J.J. Connell, ed.) Fishing News Books Ltd, Farnham, Surrey, England, 349-352.

Lowry, O.U.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randal, P.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Nie, Z-Q., Wang, Z-Q. and Yan, J-P., 1986. Experiments on preparing of formulated feed and feeding efficiency of young abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Mar. Fish. Res.*, 7:53-64.

Raa, J. (1980) Utilization of Fish By-Catch Fish on Shrimp Trawlers. *Report to FAO* (Fisheries Department) Based on a visit to Thailand and Malaysia during September 1980. 30 p.

Raa, J. and Gildberg, A. (1982) Fish Slage: A review. In: CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 116:343-419

Raa, J.; Gildberg, A. and Strøm, T. (1983) Silage Production-Theory and Practice. *En: Upgrading Waste for Feeds and Food.* (Leward, D.A.; Taylor, A.V. & Lawrie, R.A. ed.) Butterworths. 8:117-132.

Rohlf, F.J. (1987) Biom, a package of statistical programs to accompany the text biometry. State University of N.Y. at Stony Brook (Unpublished) 70 pp.

Sokal and Rohlf, F.J. (1981) Biometry. 2th Ed. W.H. Freeman and Co. San Francisco, Ca. 859 pp.

Stone, F.E.; Hardy, R.W.; Shearer, K.D. and Scott, T.M. (1989) Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneiri*) *Aquaculture*, 76:109-118.

Uki, N. and Watanabe, T., 1992. Review of the nutritional requirements of abalone (*Haliotis spp.*) and development of more efficient artificial diets. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Prío (Editors), *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture.* Fishing News Books, Oxford, pp. 504-517.

Uki, N., Kemuyama, A. and Watanabe, T., 1985. Nutritional evaluation of several protein sources in diets for abalone *Haliotis discus hannai*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 51:1835-1839.

Viana, M.T.; López, L.M. and Salas, A. (1993) Diet development for juvenile abalone *Haliotis fulgens*. Evaluation of two artificial diets and macroalgae. Aquaculture, in press

Viana, M.T. Nava, C. and Solana-Sansores R. (1993) Ensilajes ácidos de pescado. Efecto de precalentamiento y de la adición de ácidos fosfórico y cítrico sobre su calidad bioquímica. Ciencias Marinas, 19(4), in press.

Zar, J.H. (1984) Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Inc. New Jersey, 718 pp.

Table I Silage characteristics for heated and unheated mackerel silage used as a protein source in Experiment I.

Characteristics	heated silage	unheated silage
% of liquefaction (given as percentage of liquid after centrifugation)	39.2	62.8
Enzyme activity ($\mu\text{mol Tyr eq/ml} \times \text{h}$)	0.7	22.0
Soluble protein (mg BSA equivalents/g of silage)	14.6	21.1
Free amino acids (mg BSA equivalents/g of silage)	0.03	1.7
TMA ($\mu\text{mol N/100 g silage}$)	61.7	70.0
Ammonia ($\mu\text{mol N/100 g silage}$)	26.0	64.0

Table II Formulation of the four artificial diets for test I and II for juvenile abalone *Haliotis fulgens*. (Dry weight basis).

Ingredients	EXPERIMENT I		EXPERIMENT II	
	Heated silage diet	Unheated silage diet	Abalone viscera silage diet	Kelp meal diet
	(HS)	(US)	(AS)	(KM)
Silage ¹	32	32	20	0
Fish meal ²	0	0	16.8	0
Soy bean meal ³ (50% protein)	5	5	10	0
Corn meal ⁴	15	15	10	0
Starch (rice)	10	10	10	0
Kelp meal ⁵	10	10	10	82
Sodium alginate ⁶	10	10	10	10
Gelatin (50 Blooms)	6	6	6	6
Vitamin mixture ⁷	2	2	2	2
Mineral mixture ⁷	5	5	5	0
Cellulose	5	5	0	0
Methionine	0.2	0.2	0.2	0

1 Mackrell kindly supplied by Tecmar, S.A. and abalone viscera kindly supplied by the fishery cooperative Bahía Tortugas, B.C.S. given as dry matter basis

2. Supplied by Productos de Ensenada, S.A.

3. Kindly supplied by the American Soybean Association

4. Mazeca, produced in Mexico

5. Kindly supplied by CRIP (Centro Regional de Investigaciones Pesqueras, Mexico)

6. Kelgin MV, kindly supplied by Kelco

7. As recommended by Hahn (1989), using Stay-C from Roche

Table III. Proximal analyses of the diets used in Experiment I and II

DIET	% Protein*	% Lipid*	% Ash*	% Water
Heated silage diet (HS)	33.1	3.8	18.2	24.1
Unheated silage diet (US)	31.9	3.3	16.1	29.6
Abalone viscera silage diet (AS)	31.2	4.7	18.9	46.6
Kelp meal diet (KM)	5.1	0.3	14.1	31.0
Fresh kelp (K)	2.0	0.1	12.0	84.0

* Are given as dry matter basis

Table IV. Growth rates of juvenile abalones (*Haliotis fulgens*) fed during 7 months with heated mackerel silage (HS), unheated silage (UM) or fresh kelp (K). Growth rates were calculated based on 26 to 32 organisms.

DIET	No. OF MONTHS	GROWTH RATE	
		$\mu\text{m/day}$	mg/day
HS	0	—	—
	1	3	3
	2	34	5
	3	46	7
	4	55	9
	5	47	6
	6	43	22
US	0	—	—
	1	2	2
	2	22	5
	3	52	8
	4	64	9
	5	55	13
	6	69	18
K	0	—	—
	1	1	1
	2	2	-2

Table V. Time-dependent differences of the mean shell length (L, mm) and mean whole-body weight (W, grams) in juvenile abalones fed during 8 weeks with abalone silage (AS), kelp meal (KM) or fresh kelp (K). After the eight week all organisms were offered the abalone diet. The Games & Howell test of the equality of means with heterogeneous variance (Sokal and Rohlf, 1984) was used in all cases. Means with the same superscript (within a given diet) indicate no significant differences at $p > 0.05$. Standard errors are indicated in brackets.

DIET	No. OF WEEKS	L [MM] (SE)	W [MG] (SE)
AS	0	8.9 ^a (0.09)	82 ^a (2.4)
	4	10.7 ^b (0.10)	147 ^b (3.9)
	8	12.1 ^c (0.10)	215 ^c (5.3)
	12	15.8 ^d (0.13)	520 ^d (13.1)
	15	18.1 ^e (0.18)	781 ^e (46.1)
KM	0	8.9 ^a (0.10)	83 ^a (2.6)
	4	9.8 ^b (0.11)	112 ^b (5.7)
	8	9.9 ^b (0.12)	116 ^b (3.5)
	12	14.2 ^c (0.15)	376 ^c (11.5)
	15	18.0 ^d (0.27)	833 ^d (69.3)
K	0	8.9 ^a (0.09)	78 ^a (2.4)
	4	9.4 ^a (0.12)	89 ^a (2.9)
	8	9.5 ^a (0.11)	93 ^a (3.2)
	12	13.1 ^b (0.)	294 ^b (9.7)
	15	16.2 ^b (0.22)	527 ^c (19.3)

Table VI. Growth rates of juvenile abalones (*Haliotis fulgens*) fed during 8 weeks with abalone viscera silage (AS), kelp meal (KM) or fresh kelp (K). The KM and K treatments were switched to an AS-based diet after the eight week. Growth rates were based on the pooled means (Zar, 1984) of four rearing containers. No container replication was used in the recovery phase of the experiment.

DIET	No. OF WEEKS	GROWTH RATE		
		$\mu\text{m/day}$	mg/day	
AS	0	—	—	
	4	64.3	2.32	
	8	35.7	2.42	
	recovery →	12	132.9	10.92
	15	111.4	12.42	
KM	0	—	—	
	4	30.0	1.04	
	8	5.71	0.18	
	recovery →	12	155.7	9.26
	15	177.1	21.71	
K	0	—	—	
	4	20.0	0.40	
	8	4.3	0.14	
	recovery →	12	148.6	7.19
	15	120.0	11.10	

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Shell length (mm) of Experiment I of abalones fed with heated and unheated mackerel silage compared to fresh kelp, its natural food.

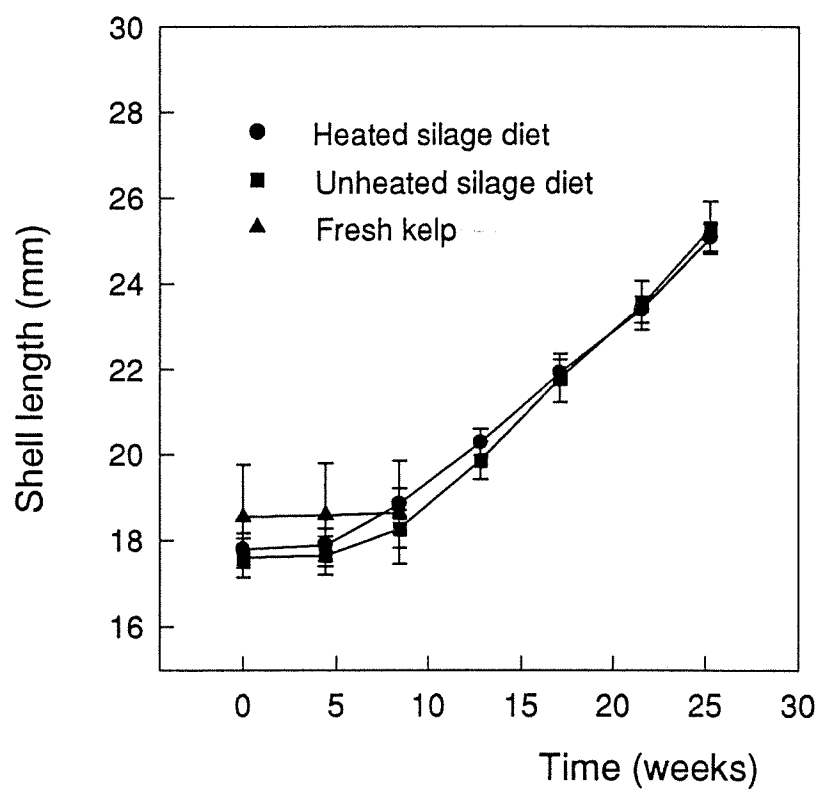
FIGURE 2. Growth rate ($\mu\text{m}/\text{day}$) of Experiment I of abalones fed with heated and unheated mackerel silage compared to fresh kelp, its natural food.

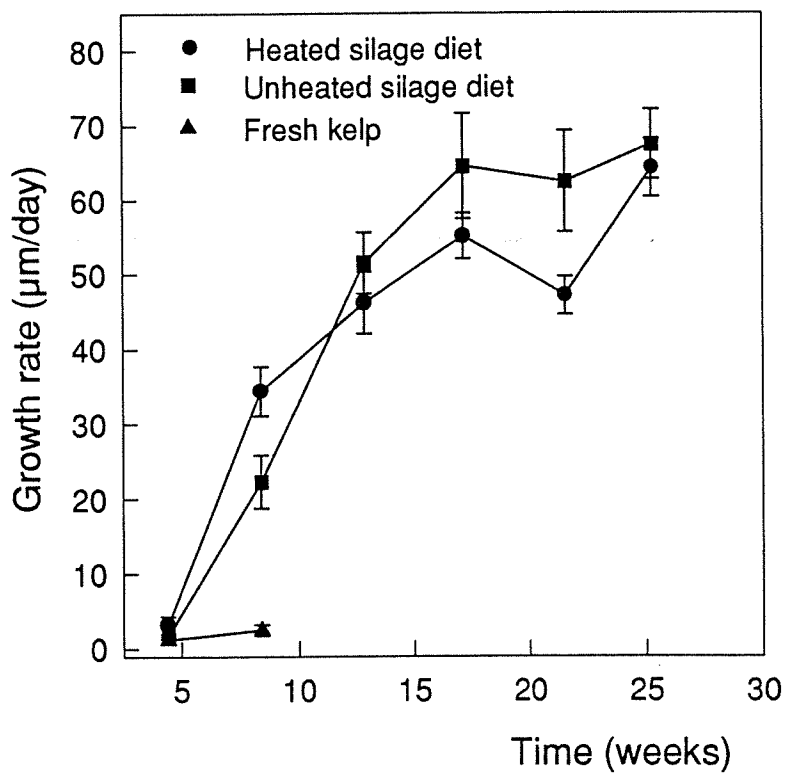
FIGURE 3. Body weight (g) of Experiment I of abalone fed with heated and unheated mackerel silage compared to fresh kelp, its natural food.

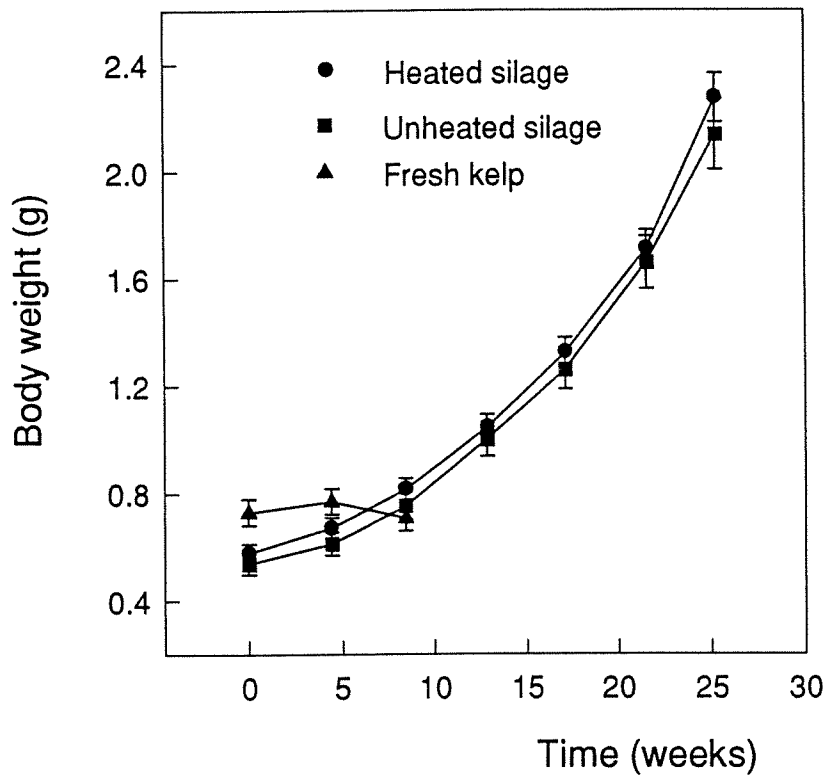
FIGURE 4. Growth rate (mg/day) of Experiment I of abalones fed with heated and unheated mackerel silage compared to fresh kelp, its natural food.

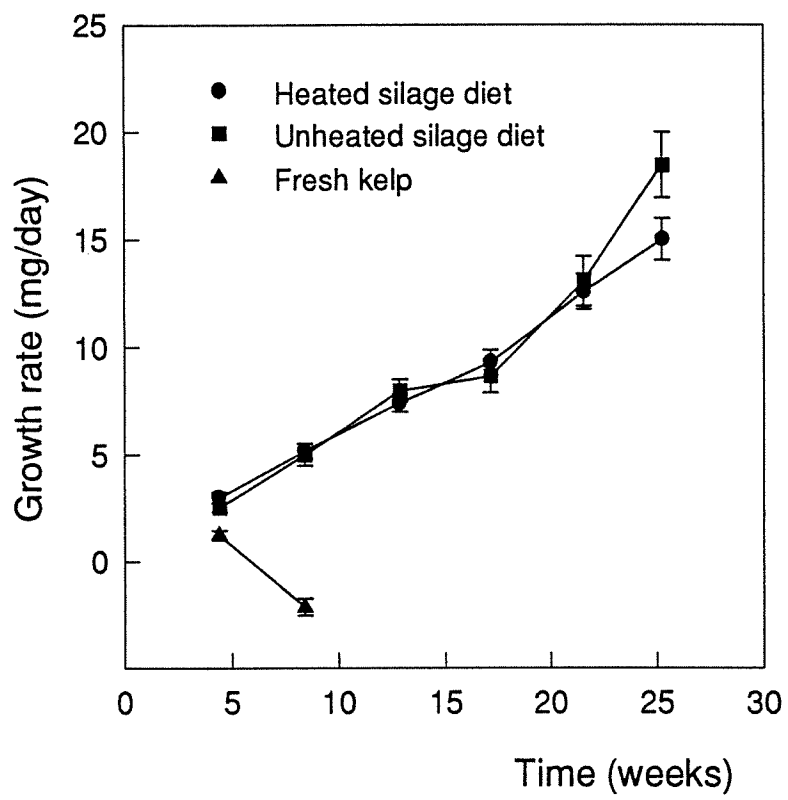
FIGURE 5. Shell length (mm) of abalones fed with heated abalone viscera silage compared to kelp meal and fresh kelp, its natural food.

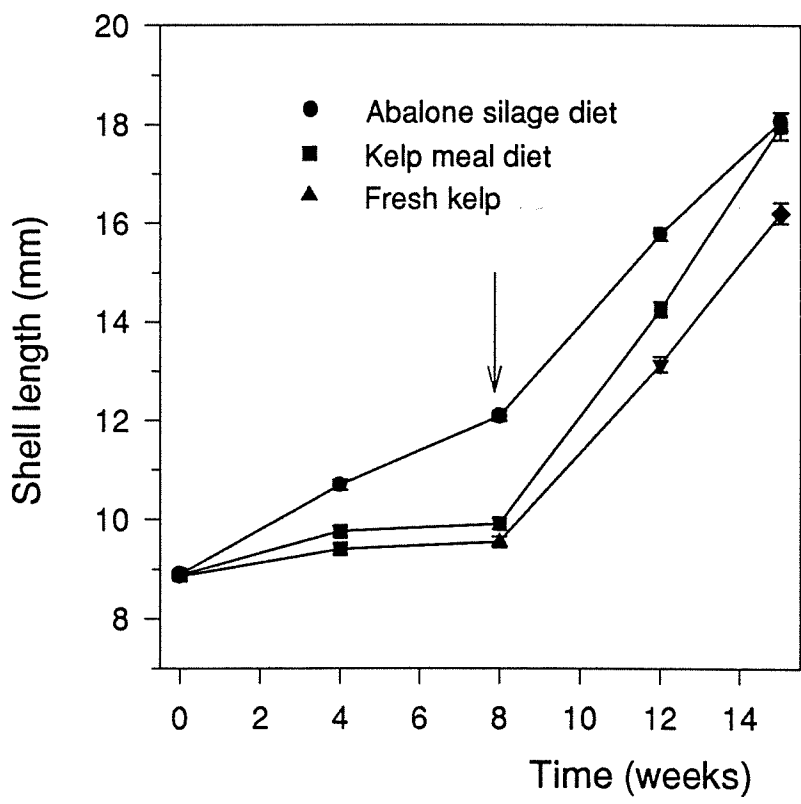
FIGURE 6. Body weight (g) of abalones fed with heated abalone viscera silage compared to kelp meal and fresh kelp, its natural food.

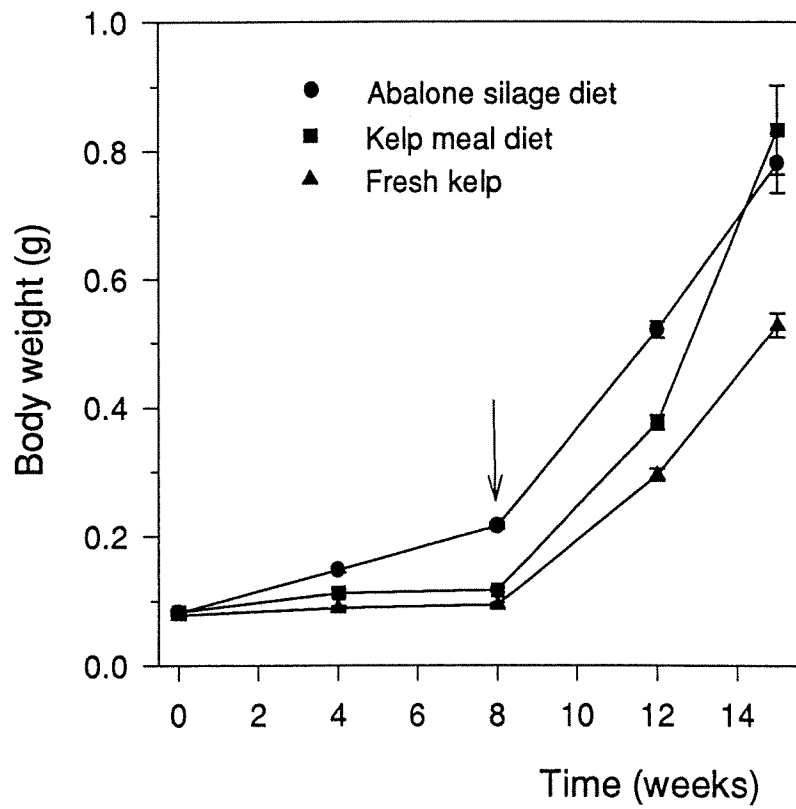












ARTICULO III

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS

DETERMINACION DE LA CALIDAD DEL ALIMENTO ELABORADO CON ENSILAJE DE PESCADO CRUDO Y COCIDO, PARA ABULONES JUVENILES DE *Haliotis fulgens*.

¹Lus M. López y Viana María Teresa²

¹Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California

A.P. 453 Ensenada 22800, Baja California, México.

²Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California

A.P. 453 Ensenada 22800, Baja California México.

RESUMEN

Con el fin de evaluar la calidad de dos dietas artificiales para abulón se estudiaron aspectos de lavado de proteína, estabilidad, consumo y eficiencia alimenticia. Dos dietas fueron utilizadas para alimentar juveniles de *Haliotis fulgens* elaboradas con ensilaje de pescado crudo y cocido (mayor y menor grado de hidrólisis respectivamente). El ensilaje de pescado crudo como fuente de proteína dio por resultado un alimento más estable, pero también, un mayor lavado de proteína soluble comparado con el ensilaje de pescado cocido. No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, obteniendo una máxima eficiencia alimenticia de 1:1.6 con el ensilaje crudo seguida por 1:1.1 con ensilaje cocido.

INTRODUCCION

El desarrollo de alimentación artificial para abulones se ha encausado en obtener los niveles óptimos de proteínas, lípidos, vitaminas, carbohidratos y otros nutrientes necesarios para su mejor

crecimiento. El éxito económico en el cultivo depende en gran parte en obtener mejores tasas de crecimiento, eficiencia de conversión del alimento y de una fuente segura de alimento (Hahn, 1989a; Gorfine y King, 1991; Uki y Watanabe, 1992).

Para que un alimento artificial sea de buena calidad debe de contener todos los requerimientos nutricionales del organismo (particularmente balance de aminoácidos), además, las características físicas del alimento deben ser las adecuadas a los hábitos alimenticios del abulón (Farmanfarmaian *et al.*, 1982). El alimento debe ser estable de tal manera que no se desintegre en el agua, para evitar la pérdida de materia seca y micronutrientes (Tacon, 1989). El abulón al alimentarse lo hace lentamente, por lo tanto requiere que el alimento permanezca estable durante varias horas (Hahn, 1989).

Hasta la fecha, se sabe con claridad que un alimento artificial, proporciona mejores tasas de crecimiento que un alimento natural (macroalga) en abulones cultivados. Pero es fácil que minerales, vitaminas y aminoácidos sean lavados del alimento antes de ser ingeridos (Viana, *et al.*, 1993a), obteniendo con ello eficiencias alimenticias menores a las esperadas.

En el presente trabajo se trató de obtener una relación entre lavado de nutrientes, estabilidad del alimento, consumo y eficiencia alimenticia para determinar la calidad del alimento.

MATERIALES Y METODOS

Condiciones experimentales

Abulones de seis meses de edad (*H. fulgens* de 13 a 22.9 mm y 23 a 103 mg) obtenidos del Laboratorio de Bahía Tortugas B.C.S., fueron acondicionados al laboratorio con un flujo de aire y agua de mar constantes a una razón de 300 ml/min. Temperatura, pH, oxígeno y contenido de amonía en el agua fueron monitoreados. Experimentos de alimentación se iniciaron después de 21 días de aclimatación en condiciones de laboratorio. Durante este período a los abulones se les ofreció alga fresca (*Macrocystis pyrifera*) como alimento. El efecto de las dietas de ensilaje de pescado crudo y cocido fue probado en cubetas plásticas de color obscuro de 20 l de capacidad con 32 organismos

marcados individualmente. Se les realizó un análisis de varianza de dos vías sin repeticiones (ANOVA) Rohlf (1987). Las dietas se suministraron durante la noche (12 horas) *ad libitum* cada día desde el mes de enero hasta julio de 1993 y el alimento remanente fue colectado. El experimento se inició con temperaturas máximas de 14 °C finalizando con 25°C. El peso corporal fue medido con una balanza electrónica (0.001 error) y la longitud de la concha con un vernier electrónico digital ($\pm 0.01\mu\text{m}$) cada cuatro semanas durante seis meses.

Lavado de proteína

El lavado de proteína fue estimado como la proteína soluble en agua a diferentes tiempos y diferentes temperaturas, utilizando el método de Lowry *et al.* (1951), dada como mg equivalentes de proteína, utilizando suero de albúmina de bovino (BSA) como estándar. Para ello se colocó alimento de peso conocido en 30 ml de agua de mar, tomando una alicuota después de 2 y 12 hs a 16, 20 y 24 °C para determinar la proteína disuelta.

Estabilidad del alimento

Estabilidad se define como la pérdida de materia seca en el agua. Esta evaluación se realizó *in situ* mediante la utilización de cubetas sin abulones en condiciones semejantes a las de los organismos en experimentación. Después de 12 h de permanencia en el agua, el alimento fue recogido para determinar el porcentaje de pérdida de materia seca a peso seco constante. Para esto, las muestras fueron secadas a 100 °C durante 24 h.

Consumo

El consumo se estimó como la diferencia del peso seco constante, entre el alimento ofrecido y el colectado menos la pérdida de estabilidad, después de permanecer 12 h en las cubetas experimentales. La cantidad de dieta suministrada fue de 1 g de alimento húmedo por cada organismo aproximadamente.

La cantidad de alimento $F(g)$ es calculada por la siguiente ecuación:

$F = (GS/100) - R$, donde:

G = dieta suministrada (en gramos)

S = porcentaje de la dieta recuperada (obtenida de los controles sin abulones)

R = dieta remanente (en gramos) después de que los abulones se alimentaron. Todo calculado en peso seco, basado en lo recomendado por Uki y Watanabe (1992).

Eficiencia de conversión alimenticia

Se calculo de la siguiente manera

$ECA = W/F$, donde:

W = gramo de peso corporal ganado

F = gramos de alimento consumido. Basado en lo recomendado por Uki y Watanabe (1992).

Análisis estadístico

A los datos de lavado de proteína se les aplicó un análisis de distribución normal de Kolmogorov-Smirnow y la prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett. Todos aquellos datos que mostraron distribución normal y homogeneidad de varianza fueron sometidos a un análisis de varianza para comparar si existían diferencias significativas entre los componentes. Posteriormente se le aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls, para comparar la medias entre cada uno de los tratamientos con una $p < 0.05$. Se utilizó el paquete de computadora de Biom (Rohlf, 1987) y Sigma-Stat para el análisis estadístico.

A la estabilidad del alimento, consumo y eficiencia alimenticia se les realizó un análisis de regresión lineal, respecto a el tiempo. Se utilizó el paquete de computadora de Sigma-Stat para el análisis estadístico.

RESULTADOS

Para el lavado de proteína se observó que, tanto a las 2 como a las 12 h el tipo de tratamiento (ensilaje crudo y cocido) y la temperatura (16, 20 y 24 °C) afectan significativamente el lavado de proteína. Mediante el análisis de comparaciones (Student-Newman-Keuls) de medias se encontró que existen diferencias significativas en ambos tratamientos siendo mayor para el ensilaje crudo (Anexo D).

El porcentaje de pérdida, o sea estabilidad, en el tratamiento con ensilaje cocido mostró gran variabilidad durante los primeros cuatro meses (enero-abril) del experimento (Fig. 1). Los máximos se presentaron en el mes de julio (30.8 %) y mínimos en el mes de abril (10.01 %). Un comportamiento similar se observó en el tratamiento con ensilaje crudo con máximos en el mes de julio (10.3 %) y mínimos en el mes de marzo (0.68 %).

Para el consumo de los tratamientos con ensilaje crudo y cocido se observó que al inicio del experimento (primera mitad) es alto y después del tercer mes empezó a disminuir (Fig. 2), con máximos de 2.2 y 6.6 mg/día (para ensilaje crudo y cocido respectivamente) en el mes de marzo.

La eficiencia alimenticia (Fig. 3), durante los cuatro primeros meses fue similar para ambos tratamientos, sin embargo a partir de mayo se registró un incremento en ambos tratamientos, con máximos para el mes de julio (1:1.6 y 1:1.1 para el alimento de ensilaje de pescado crudo y cocido respectivamente).

DISCUSION

En el lavado de proteína a través del tiempo (2 y 12 horas) y a diferentes temperaturas (16, 20 y 24 °C), se observaron diferencias significativas para ambos tratamientos (Anexo I). Esto nos indica lo importante que es, el que un alimento que va a estar sumergido en el agua tenga una estabilidad y sellado adecuados para evitar que durante las primeras horas sufra un lavado de nutrientes y consecuentemente los organismos lleguen a la desnutrición.

El porcentaje de pérdida (Fig. 1) es altamente significativo respecto al tiempo de experimentación (Anexo II, Tablas II y III) y tiende a aumentar en ambos tratamientos, siendo menor en el alimento elaborado con ensilaje crudo, a lo largo del período experimental. El aumento con el tiempo se debe probablemente al aumento en la temperatura hacia la época de verano, ya que es sabido que a altas temperaturas el alimento es menos estable y por lo tanto se desintegra en un período de tiempo más corto. Generalmente se considera que el lavado de nutrientes es un reflejo de la estabilidad (Tacon, 1989). Sin embargo, aquí puede asumirse que ocurre lo contrario, ya que se observa claramente que el alimento crudo presentó un mayor lavado de proteína soluble y fue el más estable.

Otro factor importante es el movimiento que presentan los abulones en épocas de altas temperaturas (segunda mitad del experimento) provocando con esto una desintegración mayor de los pellets, ya que los abulones se alimentan durante toda la noche utilizando su rádula y efectuando el raspado del alimento durante varias horas, por lo que resulta casi imposible recuperar el alimento remanente real.

En este caso se sabe que el ensilaje crudo posee una cantidad mayor de proteína soluble que el ensilaje cocido (Viana *et al.*, 1993b) y que esto no es un reflejo de la estabilidad del alimento.

El consumo obtenido de ambos tratamientos tiende a cambiar significativamente con el tiempo ($p < 0.001$) (Anexo II, Tablas IV y V), con valores más altos durante los primeros meses con un pico máximo en el mes de marzo para ambos tratamientos (Fig. 2). El comportamiento que se observó del consumo al paso del tiempo no se relaciona con el porcentaje de pérdida ya que a medida que uno

aumentó el otro disminuyó ($p < 0.001$) (Anexo III, Tabla VI). Un factor muy importante en la disminución del consumo a lo largo del experimento fue quizás debido a error humano (destreza en coleccionar el alimento) mismo que fue mejorando a lo largo del experimento.

Durante la segunda mitad del experimento el consumo disminuyó (Fig. 2) para ambos tratamientos, esta tendencia se mantuvo hasta el final del experimento. Un comportamiento que se esperaba ocurriera al contrario, ya que el consumo debe aumentar a medida que aumenta la temperatura, por el gasto de energía que presentan los organismos en estas épocas (meses de verano).

Si el consumo disminuye podría esperarse que la tasa de crecimiento disminuyera, si el alimento esta dando igual aporte nutricional durante todo el tiempo experimental. Sin embargo, esto no ocurrió ya que se pudo observar inclusive un aumento en la tasa de crecimiento (longitud y peso) durante el transcurso del estudio (artículo II, Fig. 2 y 4). Esto se debió probablemente a una sobreestimación del consumo en la primera parte del experimento. Si calculamos el porcentaje de consumo en relación al peso de los organismos obtenemos que los abulones consumieron de 20 a 25 % del peso total de su cuerpo. Esto no es posible, ya que se estima que el consumo de alimento artificial sea de 2 a 7 % de su peso diario en abulones (Hahn, 1989).

La eficiencia hacia finales del experimento puede considerarse mas real para ambos tratamientos, ya que los valores estimados para los consumos en dichos períodos son más confiables (de un 10 a un 4 % del peso total de su cuerpo). La máxima eficiencia obtenida fue de 1:1.6 y 1:1.1, lo cual muestra que el alimento presenta una calidad satisfactoria (Tacon, 1989).

La diferencia de eficiencia alimenticia entre el tratamiento crudo y cocido está probablemente reflejada por la estabilidad del alimento y no por la calidad en sí de los nutrientes, ya que posiblemente fue el crudo el que presentó mayor pérdida por lavado de nutrientes. En otros trabajos reportados con abulones, los experimentos son producto de tiempos cortos de alimentación (uno o dos meses), por lo que los resultados obtenidos son poco comparables o concluyentes (Uki *et al.*, 1985a y b; Uki *et al.*, 1986; Uki y Watanabe, 1992).

Las eficiencias alimenticias obtenidas en este trabajo no fueron constantes durante todo el experimento, ya que al inicio (primera mitad) el consumo registrado fue alto. El medir cuanto come exactamente un abulón en un tiempo determinado mediante la colecta de los residuos, es difícil. Esto se debe a que el mecanismo de alimentación del abulón provoca que los pellets se desintegren, lo cual, causa una sobreestimación de cuanto ha sido consumido, así mismo por error humano en la colecta de residuos. Por ello se recomienda mejorar la técnica a utilizar para medir consumo y con ello la eficiencia.

En el presente trabajo el alimento se aplicó *ad libitum* cada noche durante doce horas, a los organismos. Esto dio por resultado que los abulones al estar buscando el alimento, lo desintegraran por erosión, al roce con sus conchas o por treparse sobre los pellets para rasparlos. Probablemente deba diseñarse un experimento en cubetas con comederos y con un fotoperíodo marcado donde al haber luz el alimento sea recogido. Esto, para que los abulones en el período de obscuridad suban a comer y posteriormente en presencia de luz regresen a su guarida sin perturbar demasiado el alimento, y así, recuperar los pellets en el período de luz para obtener un consumo más exacto. El medir consumo es importante ya que minimiza costos en la formulación de dietas, se estima la calidad, además de obtener información sobre los requerimientos nutricionales.

LITERATURA CITADA

- Farmanfarmaian, A.; T. Lauterio y M. Ibe. 1982. Improvement of the establiity of comercial feed pellets for the gigant shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). *Acuaculture*. 27:29-41.
- Gorfine, H. y R. King. 1991. New food for abalone. *Austasia Aquaculture* September/October. 5(11):1-40.
- Hahn, K. 1989. Nutrition and growth of abalone. In: K. Hahn (Editor), *Handbook of Culture of abalone and other Marine Gastropods* CRC press, Boca Rato, FL. pp 135-180.
- Lowry, O.U.; N.J. Rosebrough; A.L. Farr y P.J. Randal. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Rohlf, F.J. 1987. *Biom*, a package of statistical programs to accompany the text *biometry*. State University of N.Y. al Stony Brook (Unpublished) 70 pp.
- Tacon, A.G. 1989. *Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados*. Manual de capacitación. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. FAO ed. Roma Italia. pp 288-300.
- Uki, N.; A. Kemuyana y T. Watanabe. 1985a. Development of Semipurified Test Diets for Abalone. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51(11):1825-1833.
- Uki, N.; A. Kemuyana y T. Watanabe. 1985b. Nutritional Evaluation of Several Protein Sources in Diets for Abalone *Haliotis discus hannai*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51(11):1835-1839.
- Uki, N.; A. Kemuyana y T. Watanabe. 1986. Optimum Protein Level in Diets for Abalone. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(6):1005-1012.
- Uki, N y T. Watanabe. 1992. Review of the nutritional requeriments of abalone (*Haliotis ssp.*) and developmtent of more efficient artificialdiets. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Proó (Editors), *Abalon of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford. pp 504-517.

Viana, M. T.; L.M. López y A. Salas. 1993a. Diet development for juveniles abalone, *Haliotis fulgens*, evaluation of two artificial diets and macroalgae, *Aquaculture*, 117:149-156.

Viana, M.T.;Nava y R. Solana-Sansores. 1993b. Ensilajes ácidos de pescado. Efecto de precalentamiento y de la adición de ácidos fosfórico y cítrico sobre su calidad bioquímica. *Ciencias Marinas*, 19(4):415-433.

ANEXO I

Tabla I.- Resultados del análisis de varianza y comparaciones de medias en el lavado de proteína para los tratamientos hechos a base de ensilaje de pescado crudo y cocido, a dos tiempos (2 y 12 horas) y tres diferentes temperaturas (16, 20 y 24 oC) con sus medias (X) y su desviación estandar (DS).

TRATAMIENTO	TIEMPO	T°C	X	DS	COMPARACION DE MEDIAS
E.CRUDO	2 Hr	16	46.99	0.97	24°C>20°C>16°C
		20	58.38	1.12	
		24	74.63	2.21	
	12 Hr	16	110.1	3.66	24°C>20°C>16°C
		20	138.5	3.32	
		24	147.8	0.15	
E.COCIDO	2 Hr	16	38.17	4.14	24°C>20°C>16°C
		20	52.28	0.13	
		24	62.04	0.50	
	12 Hr	16	97.37	0.12	24°C>20°C>16°C
		20	107.5	0.37	
		24	120.8	2.07	

ANEXO II

Tabla II.- Análisis de varianza de la regresión lineal del porcentaje de pérdida del alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo, respecto al tiempo. Donde la ecuación de regresión es $Y = 0.064(\text{tiempo}) + 1.068$.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F cal.	P
Regresión	1	1441.15	1441.15	211.55	< 0.001
Residuales	160	1089.96	6.81		
Total	161	2531.12			

Tabla III.- Análisis de Varianza de la regresión lineal del porcentaje de pérdida del alimento elaborado con ensilaje de pescado cocido, respecto al tiempo. Donde la ecuación de regresión es $Y = 0.121(\text{tiempo}) + 9.395$.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F cal.	P
Regresión	1	5200.81	5200.18	81.26	< 0.001
Residuales	160	10239.81	63.99		
Total	161	15440.62			

Tabla IV.- Análisis de Varianza de la regresión lineal del consumo del alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo, respecto al tiempo. Donde la ecuación de regresión es $Y = 0.012(\text{tiempo}) + 4.392$.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F cal.	P
Regresión	1	52.89	52.89	61.00	< 0.001
Residuales	160	138.73	0.86		
Totales	161	191.62			

Tabla V.- Análisis de Varianza de la regresión lineal del consumo del alimento elaborado con ensilaje de pescado cocido, respecto al tiempo. Donde la ecuación de regresión es $Y = 0.016(\text{tiempo}) + 5.923$.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F cal.	P
Regresión	1	91.69	91.69	50.87	< 0.001
Residuales	160	288.35	1.80		
Total	161	380.04			

ANEXO III

Tabla VI.- Análisis de Varianza de la regresión lineal del consumo contra porcentaje de pérdida del alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo. Donde la ecuación de regresión es $Y = 0.107(\text{tiempo}) + 3.839$.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F cal.	P
Regresión	1	29.06	29.06	28.61	< 0.001
Residuales	160	162.56	1.06		
Totales	161	191.63			

Tabla VII.- Análisis de Varianza de la regresión lineal del consumo contra porcentaje de pérdida del alimento elaborado con ensilaje de pescado cocido. Donde la ecuación de regresión es $Y = 0.054(\text{tiempo}) + 5.658$.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F cal.	P
Regresión	1	45.51	45.51	21.76	< 0.001
Residuales	160	334.53	2.09		
Totales	161	380.04			

ANEXO IV

Tabla VIII.- Análisis de Varianza de la regresión lineal del consumo contra la tasa de conversión alimenticia del alimento elaborado con ensilaje de pescado crudo. Donde la ecuación de regresión es $Y = 0.865(\text{tiempo}) + 3.812$.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F cal.	P
Regresión	1	1.91	1.90	5.75	0.074
Residuales	4	1.32	0.33		
Totales	5	3.23			

Tabla IX.- Análisis de Varianza de la regresión lineal del consumo contra la tasa de conversión alimenticia del alimento elaborado con ensilaje de pescado cocido. Donde la ecuación de regresión es $Y = 2.188(\text{tiempo}) + 5.343$.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F cal.	P
Regresión	1	4.96	4.96	4.35	0.105
Residuales	4	4.55	1.13		
Totales	5	9.15			

Figura 1.- Tasa de eficiencia de conversión alimenticia para abulones alimentados con ensilaje de pescado crudo y cocido, durante 26 semanas a partir del mes de enero de 1993.

Figura 2.- Consumo promedio (mg/día) para abulones alimentados con ensilaje de pescado crudo y cocido, durante 26 semanas a partir del mes de enero de 1993.

Figura 3.- Porcentaje de pérdida promedio mensual de los alimentos elaborados con ensilaje de pescado crudo y cocido.

