

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Marinas



RESPUESTA EN CRECIMIENTO DE JUVENILES DE *Totoaba macdonaldi* ALIMENTADOS
CON DIETAS CON DIFERENTES NIVELES DE ALMIDÓN Y LÍPIDOS, Y ADICIONADAS
CON UN PROBIÓTICO.

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Presenta:

DISRAELY GONZÁLEZ ACEVEDO

Ensenada, Baja California, México, Noviembre de 2011.

**RESPUESTA EN CRECIMIENTO DE JUVENILES DE *Totoaba macdonaldi*
ALIMENTADOS CON DIETAS CON DIFERENTES NIVELES DE ALMIDÓN Y
LÍPIDOS, Y ADICIONADAS CON UN PROBIÓTICO.**



TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

DISRAELY GONZÁLEZ ACEVEDO

Aprobada por:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lus Mercedes López Acuña", is written over a horizontal line.

Directora de tesis

Dra. Lus Mercedes López Acuña

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maricela Flores Ibarra", is written over a horizontal line.

Sinodal propietario

Dra. Maricela Flores Ibarra

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Conal David True", is written over a horizontal line.

Sinodal propietario

M.C. Conal David True

RESUMEN

Con el fin de implementar un programa de repoblamiento de *Totoaba macdonaldi*, la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California inició un proyecto que consistió en capturar reproductores silvestres a finales de 1993. Después de 15 años de investigación se obtuvieron dos ciclos reproductivos por hembra en un periodo anual mediante la manipulación de varios factores, y entre ellos la alimentación. La alimentación de *T. macdonaldi* ha sido investigada a partir de su cultivo para así poder formular mejores dietas para su reproducción en cautiverio. A diferencia de los peces herbívoros y omnívoros, los peces carnívoros como *T. macdonaldi* tienen una capacidad limitada para digerir carbohidratos complejos, la posibilidad digestiva del pez al consumir carbohidratos complejos decrece cuando se incrementa la cantidad de éstos en la dieta. El almidón es un componente importante para la elaboración comercial de dietas para peces, y es también una vía para su posible utilización y reducción de costos de los alimentos para peces carnívoros marinos. Sin embargo, los peces carnívoros como la totoaba tienen una limitada capacidad de utilizar los carbohidratos, por esto el uso de probióticos (bacterias) ha favorecido la digestión de este ingrediente, mejorando la disponibilidad de los nutrientes. Se determinó la respuesta de crecimiento de juveniles de *T. macdonaldi* al ser alimentados con dietas isoproteicas e isoenergéticas, con diferentes niveles de almidón/lípidos (5/21, 10/18, 15/15, 20/14 y 25/12%), adicionadas con un probiótico, los organismos alimentados con las dietas 10, 15, 20 y 25 no fueron diferentes en peso, longitud, tasa de conversión alimenticia y tasa de crecimiento específico de los juveniles de *T. macdonaldi*. Los peces alimentados con la dieta 10/18 obtuvieron el mayor coeficiente de digestibilidad aparente con un valor de 89.0%. La composición bioquímica, energética y el contenido de glucógeno del músculo de juveniles de *T. macdonaldi* demostró no ser afectada por la cantidad de almidón en la dieta. La composición bioquímica de los hígados presentó cambios en el contenido de proteína, lípidos, energía y glucógeno. El índice hepatosomático de juveniles de *T. macdonaldi* aumentó conforme se aumentó/disminuyó la inclusión de almidón/lípidos, ocasionando una acumulación de grasa y glucógeno en el hígado. La utilización de dietas con concentraciones de 10 a 25% de carbohidratos y adicionadas con probiótico pueden ser una alternativa para el cultivo de juveniles de *T. macdonaldi*, siempre y cuando se adicione un probiótico que ayude a la digestibilidad de los carbohidratos.

Dedicada a

A mis padres y hermanas, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A Estrella y Ali por su apoyo y ánimo que me brinda día con día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales.

ÍNDICE

	Página
Resumen.	<u>III</u>
Lista de Figuras.	<u>VIII</u>
Lista de Tablas.	<u>IX</u>
Capítulo I. Introducción general.	<u>1</u>
Capítulo II. Antecedentes.	<u>5</u>
Capítulo III. Objetivos.	<u>11</u>
Capítulo IV. Hipótesis.	<u>12</u>
Capítulo V. Materiales y Métodos.	<u>13</u>
V.1 Obtención de los organismos.	<u>13</u>
V.2 Obtención del probiótico.	<u>13</u>
V.3 Formulación y elaboración de dietas experimentales.	<u>13</u>
V.4 Análisis proximal de dietas experimentales.	<u>15</u>
V.5 Organismos y sistema de cultivo.	<u>15</u>
V.6 Métodos de muestreo.	<u>16</u>
V.7 Supervivencia.	<u>16</u>
V.8 Crecimiento.	<u>16</u>
V.8.1 Crecimiento en peso y longitud.	<u>16</u>
V.9 Análisis químico proximal.	<u>16</u>
V.9.1 Contenido de humedad.	<u>16</u>
V.9.2 Contenido de proteína total.	<u>16</u>
V.9.3 Contenido de cenizas.	<u>17</u>
V.9.4 Composición calórica.	<u>17</u>
V.9.5 Muestreo de heces.	<u>17</u>
V.10 Parámetros de crecimiento.	<u>17</u>
V.10.1 Razón de eficiencia protéica (REP)	<u>17</u>
V.10.2 Tasa de crecimiento específico (TCE).	<u>18</u>
V.10.3 Índice hepatosomático (IHS).	<u>18</u>
V.10.4 Ingestión diaria de alimento (IDA).	<u>18</u>
V.10.5 Tasa de conversión alimenticia (TCA).	<u>18</u>
V.10.6 Coeficiente de digestibilidad aparente (%) (CDA).	<u>19</u>
V.10.7 Análisis de glucógeno.	<u>19</u>
V.11 Análisis estadístico.	<u>20</u>
Capítulo VI. Resultados	<u>21</u>
VI.1 Supervivencia.	<u>21</u>

VI.2 Crecimiento.	21
VI.2.1 Crecimiento en peso y longitud.	21
VI.3 Análisis químico proximal.	23
VI.3.1 Contenido de humedad.	23
VI.3.2 Contenido de proteína total.	23
VI.3.3 Contenido de lípidos.	24
VI.3.4 Contenido de cenizas.	24
VI.3.5 Contenido de energía.	24
VI.3.6 Contenido de glucógeno.	25
VI.4 Parámetros de crecimiento.	27
VI.4.1 Razón de eficiencia proteica (REP).	27
VI.4.2 Tasa de crecimiento específico (TCE).	27
VI.4.3 Índice hepatoesomático (IHS).	27
VI.4.4 Ingestión diaria de alimento (IDA).	27
VI.4.5 Tasa de conversión alimenticia (TCA).	27
VI.4.6 Coeficiente de digestibilidad aparente (%) (CDA).	27
Capítulo VII. Discusiones.	29
Capítulo VIII. Conclusiones.	39
Capítulo IX. Referencias.	41

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.-	Representación gráfica del crecimiento en peso (A) y longitud (B), así como sus valores de desviación estandar de juveniles de <i>T. macdonaldi</i> durante 8 semanas de experimentación alimentados con dietas isoprotéicas con distintos niveles de almidón 5, 10, 15, 20 y 25 y adicionadas con un probiótico.	<u>22</u>

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I.	Definiciones y descripciones de probiótico en el tiempo (Vasiljevic y Shah, 2008).	9
Tabla II.	Formulación de dietas, energía total calculada y razón proteína: energía (% en 100 g dieta).	14
Tabla III.	Composición proximal (peso seco) de las dietas experimentales (% en 100 g dieta).	15
Tabla IV.	Análisis químico proximal de la composición corporal y contenido energético de la porción muscular, pez entero e hígado en base seca de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con dietas de diferente niveles de carbohidratos suplementados con un probiótico durante 8 semanas.	26
Tabla V.	Parámetros de crecimiento en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con dietas de diferente niveles de carbohidratos suplementados con un probiótico durante 8 semanas.	28



Capítulo I

I.1. Introducción general

Totoaba macdonaldi es un pez endémico del Golfo de California (Cisneros-Mata et al., 1997). Entre la familia *Sciaenidae* es el de mayor talla. Al llegar a edad adulta mide en promedio 2 m de longitud y pesa 135 kg (Román Rodríguez et al., 1997). La especie *T. macdonaldi* es un predador tope en la cadena alimenticia del mar de Cortez, los reproductores y los juveniles tardíos se alimentan principalmente de camarones, cangrejos y de sardinas (Cisneros-Mata et al., 1995). Los estadios tempranos de la totoaba en su hábitat natural dependen de la productividad primaria y secundaria de la parte alta del mar de Cortez (CITES, 2005). El mayor crecimiento de *T. macdonaldi* se ha observado que ocurre durante el primer y el segundo año de vida, y disminuye al sexto o séptimo año cuando el pez alcanza su primera madurez. Después de esta etapa, la curva de crecimiento alcanza una asíntota de unos 12 a 14 años (Román Rodríguez et al., 1997).

La pesca desmedida de ésta especie provocó que se catalogara en peligro crítico, una categoría antes de la extinción. La pesquería de totoaba fue tan importante que ocasionó asentamientos humanos en Puerto Peñasco, y en el Golfo de Santa Clara en Sonora y en San Felipe en Baja California. La pesca incidental de juveniles por redes de arrastre, la pesca incidental de pre-adultos con redes agalleras, la alteración antropogénica del alto Golfo de California y del delta del Río Colorado, así como, la pesca desmedida se sumaron para poner en peligro de extinción a *T. macdonaldi* (Cisneros-Mata et al., 1995).

Con el fin de implementar un programa de repoblamiento de esta especie la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California inició un proyecto que consistió en la captura de reproductores silvestres los que fueron transportados y mantenidos en el laboratorio de acuicultura de la Facultad a finales de 1993 (True et al., 1997).

Para 1999 se logró cerrar el ciclo de vida de esta especie y se alcanzaron a liberar en el Golfo de California cerca de 3,000 organismos marcados con edades entre 4 y 8 meses (Morales Ortiz, 1999).

En 2009 después de 15 años de investigar la biología del cultivo de la totoaba, por primera vez se obtuvieron dos ciclos reproductivos consecutivos por hembra en solo un año mediante la manipulación de la alimentación, las condiciones ambientales y la tipificación del período de ovulación, lo que permitió una producción de hasta 20 mil juveniles anuales (Alcocer, 2009). No obstante, en la actualidad aún se continúa trabajando para establecer una metodología para la reproducción de esta especie en cautiverio.

De igual manera, la alimentación de *T. macdonaldi* ha sido investigada a partir de su cultivo en cautiverio, (Rodríguez Gómez, 2003; López et al., 2006; Solorzano et al., 2006; Vizcaíno Pérez, 2008) determinaron la composición proximal, la composición de ácidos grasos de ejemplares silvestres y cultivados de *T. macdonaldi* de talla similar con el fin de conocer mejor los requerimientos nutricionales de esta especie amenazada, y así poder formular mejores dietas para su reproducción en cautiverio.

A nivel global la acuicultura se encuentra en expansión intensificándose y diversificándose hacia nuevas direcciones, y al incursionar en nuevas especies uno de los problemas a los que se enfrentan la acuicultura es el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de las especies potenciales de cultivo, por lo que requiere de un soporte científico y tecnológico para resolver

este problema (FAO, 2006). En la piscicultura, el crecimiento y la eficiencia alimenticia dependen de la disponibilidad del alimento, los métodos de alimentación, la frecuencia alimenticia, la duración de cada período de alimentación, la cantidad de alimento suministrado y de las características de la dieta (Gélineau et al., 1998). Para tener éxito en el cultivo de *T. macdonaldi* en cautiverio se requiere de una dieta eficiente y de bajo costo ya que sabemos que a medida que pasa el tiempo los recursos naturales son insuficientes, debido a que el cultivo de peces comerciales especialmente organismos carnívoros, tienen un fuerte impacto en las pesquerías, porque las dietas formuladas requieren como fuente principal de proteínas y de lípidos a la harina y aceite de pescado, siendo éstos los ingredientes más costosos en la dieta (Chebbaki et al., 2010). La alimentación dentro de un cultivo de peces representa hasta un 50 % de los costos variables en la mayor parte de las operaciones de la piscicultura, aunado a esto y debido al crecimiento de la industria acuícola, la demanda por harina de pescado ha forzado un aumento en el precio (Lovell, 1998). Una de las soluciones para reducir costos en el cultivo de *T. macdonaldi* será probablemente formular con ingredientes accesibles y económicos que se encuentran en el mercado, la limitante es que los organismos tienen una cierta tolerancia a dichos ingredientes, por ejemplo, al aumentar el nivel de carbohidratos en la dieta, como fuente de energía, se logra disminuir la cantidad de lípidos, sin embargo, en peces carnívoros como el *Hippoglossus hippoglossus* o la *T. macdonaldi* la inclusión de carbohidratos en niveles mayores a 10% ha mostrado un efecto negativo en su crecimiento y metabolismo (Helland et al., 1998). En general los peces carnívoros presentan una limitada capacidad para digerir dietas con alto contenido de carbohidratos complejos (Krogdahl et al., 2005). En la actualidad, existen diferentes grupos alrededor del mundo investigando la capacidad de los peces carnívoros para digerir dietas con alto contenido de carbohidratos, sin embargo para que se aumente la

digestibilidad de las dietas existe la opción de adicionar un probiótico a la dieta (Gatlin III, 2002). La adición de *Basillus sps* como probiótico ha mostrado ser eficiente con la digestibilidad de ingredientes alternativos a la harina y aceite de pescado en peces cultivados, por lo que se planteó el estudio sobre la respuesta en crecimiento de juveniles de *T. macdonaldi* al ser alimentados con dietas isoprotéicas e isocalóricas con diferentes niveles de almidón y lípidos adicionadas con un probiótico para conocer la respuesta de los organismos.

Capítulo II

II.1. Antecedentes

Para el desarrollo del cultivo de especies potenciales en la acuicultura es necesario conocer los requerimientos nutricionales de los organismos, realizar análisis de composición proximal y bioquímica de ejemplares silvestres y cultivados, lo que apoyará a formular dietas apropiadas para el crecimiento y la reproducción de los organismos en estudio (López et al., 2006). Se ha reportado que los juveniles silvestres de totoaba consumen dietas con niveles altos de proteínas y moderados contenidos de lípidos y carbohidratos (Cisneros-Mata et al., 1995), lo cual ha sido experimentado por investigaciones de nuestro grupo de trabajo.

A diferencia de los peces herbívoros y omnívoros, los peces carnívoros como *T. macdonaldi* tienen una capacidad limitada para digerir carbohidratos complejos (Krogdahl et al., 2005), unido a esto, la capacidad digestiva del pez al consumir carbohidratos complejos decrece cuando se incrementa la cantidad de éstos en la dieta. Por lo que se ha demostrado que niveles mayores al 10 % de almidón en la dieta de algunos peces carnívoros han dado como resultado una reducción en la utilización del alimento (Helland et al., 1998).

Para que la industria de la acuicultura sea rentable se hace necesario elaborar alimentos comerciales para peces carnívoros con ingredientes económicos y disponibles, y esto conlleva a la necesidad de adicionar fuentes de energía económicas como lo son las harinas de granos (soya, trigo, maíz, etc.), sin embargo, la mayoría de los granos están compuestos de factores antinutricionales que afectan la digestibilidad y absorción de nutrientes. En este contexto, se han investigado los niveles de carbohidratos en las dietas de diferentes especies de peces marinos, sobre la respuesta de los organismos, y la mayoría de estos estudios se refieren al nivel de

carbohidratos en la dieta con relación al índice hepatosomático (IHS) y al contenido de lípidos y glucógeno en el hígado (Nematipour et al., 1992; Ali et al., 2001; Francis et al., 2001; Chatzifotis et al., 2010).

Otro aspecto importante, es la medición de la digestibilidad de los nutrientes que componen una dieta, ya que ésta provee evidencia de su valor nutricional, por lo que se ha recomendado este indicador como un paso importante para evaluar su calidad (Cho et al., 1993). Se ha reportado que los valores de digestibilidad y de la actividad digestiva de las enzimas son afectados por la composición de la dieta (Couto et al., 2008), lo que resulta de gran importancia cuando el objetivo es realizar formulaciones precisas que disminuyan el costo de producción de alimentos para peces carnívoros (Sampaio-Oliveira et al., 2008), y estas formulaciones no afecten la salud de los organismos.

El almidón (parte de los carbohidratos en la dieta) es un componente abundante en ingredientes vegetales utilizados por la industria para elaborar alimentos para peces, siendo así, una fuente de energía económica para el sector acuícola. Los granos de cereal son una fuente de carbohidratos que generalmente contienen alrededor del 62-72% de almidón, siendo éste un componente importante para la fabricación de dietas de peces debido a sus propiedades de adhesión y fuente energética. Por ello, la posibilidad de proveer cantidades mayores del 10% de almidón en las dietas de los organismos, especialmente carnívoros, reduciría los costos de las dietas formuladas (Hua et al., 2009).

Investigaciones en este contexto se han reportado por Peres et al. (2002), quienes evaluaron la razón de eficiencia proteica y el coeficiente de digestibilidad al incluir almidón crudo y gelatinizado en 3 dietas para juveniles de *Dicentrarchus labrax* con 25% de almidón crudo y 25% de almidón gelatinizado (12.5% y 12.5% de almidón crudo y de almidón cocido,

respectivamente). Los autores observaron en los peces una mejor razón de eficiencia proteica y un coeficiente de digestibilidad aparente al adicionar a la dieta 25% de almidón gelatinizado.

Por otra parte, Wu et al. (2007) evaluaron durante 10 semanas el efecto sobre el crecimiento de juveniles de *Sparus latus*, al variar el contenido de almidón de maíz crudo en 5%, 10%, 20%, 26%. La dieta con 10% de almidón dio el mejor crecimiento durante las 10 semanas. El aumento de peso y la tasa de crecimiento específico para los peces alimentados con 26% de almidón de maíz crudo fueron significativamente inferiores a 10% o 20%, y la dieta con 5% fue ligeramente menor que 10% y 20%.

Enes et al. (2008) estimaron el crecimiento, eficiencia alimenticia y digestibilidad aparente en juveniles de European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) al formular dietas isoprotéicas (47% proteína) e isolipídicas (15% lípidos) con almidón de maíz pre-tratado y crudo: 10% de almidón crudo, 10% de almidón pre-tratado, 20% de almidón crudo, 20% de almidón pre-tratado, y una dieta control con 70% de proteína y 0% de almidón, Los resultados muestran que la dieta control produjo una respuesta productiva similar a la dieta con 20% de almidón, mostrando un ahorro proteico con la inclusión de este nutriente en las dietas.

Couto et al. (2008) durante 8 semanas estimaron en *Sparus aurata* el crecimiento, la conversión de alimento, la composición corporal y la actividad de determinadas enzimas claves en el metabolismo intermedio; variando el contenido de almidón en dietas formuladas que contenían 48% de proteína cruda, 12% de lípidos y 10, 20 y 30% de almidón, bajo dos diferentes temperaturas de cultivo (18 y 25°C). Los organismos que consumieron la dieta con 30% de almidón gelatinizado de las dos temperaturas de cultivo presentaron los mejores resultados de crecimiento, eficiencia alimenticia y la relación de eficiencia proteica, sin embargo en este mismo estudio la temperatura de cultivo incremento el índice hepatosomático y glucógeno en el

hígado en peces alimentados con 30% de almidón comparado con los peces alimentados con 10 y 20% de almidón. El nivel de glucosa en los organismos no se vio afectada por la temperatura del cultivo y la dieta con 10% de almidón presentó el menor nivel de glucosa.

Una vía para la posible utilización de carbohidratos y reducción de costos de los alimentos para peces carnívoros marinos es el uso de probióticos (Tabla I) que favorezcan la digestión de este ingrediente, y así mejorar la disponibilidad de los nutrientes (Trejo Escamilla, 2008) haciéndolos disponibles para el hospedero, ya que al estar presentes en el sistema no permiten la colonización de nuevas bacterias (Balcázar et al., 2006).

Tabla I.- Definiciones y descripciones de probiótico en el tiempo (Vasiljevic et al., 2008).

Año	Definición o Descripción	Fuente
1953	Los probióticos están comúnmente en alimentos vegetales como las vitaminas, sustancias aromáticas, enzimas y posiblemente otras sustancias conectadas con procesos vitales.	Kollath
1954	Los probióticos son lo contrario al antibiótico.	Vergin
1955	Efectos perjudiciales de los antibióticos pueden prevenirse con tratamiento con probióticos.	Kolb
1965	La sustancia secretada por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro.	Lilly and Stillwell
1971	Extractos de tejido que estimulan el crecimiento microbiano.	Sperti
1973	Compuestos que construyen una resistencia a infecciones en el huésped pero no inhiben el crecimiento de microorganismos in vitro.	Fujii and Cook
1974	Organismos y sustancias que contribuyen al balance de la flora intestinal.	Parker
1992	Suplemento alimenticio de microorganismos vivos que afectan benéficamente al animal huésped mejorando su balance microbiano.	Fuller
1992	Mono o mezcla de cultivo de organismos vivos viables que aplicado a animales o el hombre tiene un efecto benéfico en el huésped mediante la mejora de la propiedades de la micro flora nativa.	Havenaar and Huis int'Veld
1996	Cultivo microbiano vivo o de productos lácteos cultivados que tienen una influencia benéfica en la salud y la nutrición del huésped.	Salminen
1996	Microorganismos vivos que sí se ingieren en cantidades adecuadas, ejercen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica inherente.	Schaafsma
1999	Preparados o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del huésped	Salminen, Ouwehand, Benno and Lee
2001	Preparación o producto que contenga determinados microorganismos viables en suficiente número que alteren la micro flora (por establecimiento o colonización) en una simbiosis que beneficia tanto al hospedero como al huésped.	Schrezenmeir and de Vrese
2002	Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud en el huésped.	FAO/WHO

Respecto al uso de probióticos como apoyo en la nutrición y salud de peces existen investigaciones en las que se han incluido bacterias (*Lactobacillus rhamnosus*) inactivadas por calentamiento, atomizadas en vivo y deshidratadas al vacío, en dietas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), para determinar la respuesta inmune y el efecto de la forma de incorporación. Las bacterias atomizadas y las liofilizadas indujeron una mejor actividad fagocítica en comparación con las inactivadas por calentamiento (Panigrahi et al., 2005). Por su parte El-Dakar et al. (2007) compararon un probiótico comercial contra *Bacillus subtilis* y estimaron la sobrevivencia, crecimiento, composición proximal y costo/beneficio del alimento, en peces *Siganus rivulatus* con dietas isoenergéticas e isoprotéicas. Añadiendo 0, 1, 2, 3 y 4 g de

probiótico por cada kg de dieta. Al final del experimento obtuvieron un menor crecimiento con la dieta sin probiótico y no encontraron diferencias significativas entre los demás tratamientos. La contribución de esta investigación deja ver que la composición proximal de los peces no se vio afectada y la inclusión del probiótico redujo los costos de alimento por unidad de crecimiento.

Dentro de nuestro grupo de trabajo, existen resultados como el de Trejo Escamilla (2008) quien evaluó el desempeño de juveniles de corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) alimentados con dietas isoprotéicas e isocalóricas formuladas con 10, 14, 18 y 22% de almidón y adicionadas con probiótico. Los resultados demostraron que los mejores desempeños fueron obtenidos por los organismos que se alimentaron con la dieta más concentrada de almidón 22%. Concluyendo que el uso de dietas ricas en carbohidratos como fuente de energía y adicionadas con bacterias probióticas, ayudan al hospedero a utilizar los ingredientes y por ende los nutrientes proporcionados, obteniendo un mejor crecimiento.

De acuerdo a los antecedentes presentados, la implementación de probióticos en dietas con alto contenido de almidón, es una alternativa viable para el cultivo de peces carnívoros.

Capítulo III

III.1. Objetivos

III.1.1. Objetivo general:

Estudiar la respuesta de crecimiento de juveniles de *Totoaba macdonaldi* al ser alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón y lípidos, adicionadas con un probiótico.

III.1.2. Objetivos particulares:

- Estudiar el crecimiento, la sobrevivencia, la eficiencia de conversión alimenticia y el índice hepatosomático de juveniles de *T. macdonaldi* como respuesta al ser cultivados y alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón y lípidos adicionadas con un probiótico.
- Conocer la composición proximal y contenido de energía en las muestras de dietas formuladas, organismo completo, músculo e hígado.
- Analizar el contenido de glucógeno en hígado y músculo de los organismos.
- Conocer la digestibilidad aparente de las dietas.

Capítulo IV

IV.1.Hipótesis

IV.1.1 La utilización de almidón contenido en las diferentes dietas de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, se incrementará debido a su bio-disponibilidad por la adición de un probiótico (*Bacillus sp.*), por tanto los organismos alimentados con tratamientos de mayor contenido de almidón y menor contenido de lípidos tendrán un crecimiento mayor, en comparación, a aquellos organismos alimentados con tratamientos con bajo contenido de almidón y alto contenido de lípidos.

Capítulo V

V. Materiales y Métodos

V.1 *Obtención de los organismos*

Los juveniles de *T. macdonaldi* fueron proporcionados por la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California.

V.2 *Obtención del probiótico*

Se utilizó un probiótico (cepa bacteriana del género *Bacillus sp.*) proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Marina del CICESE a cargo del Dr. Jorge Olmos Soto y el Dr. Leonel Ochoa Solano. Las bacterias probióticas fueron aisladas y seleccionadas por Ochoa-Solano et al. (2006).

V.3 *Formulación y elaboración de dietas experimentales*

Se utilizó un total de 5 dietas isoproteicas ($52 \pm 1\%$ de proteína cruda) suplementadas con un probiótico. En la Tabla I se presenta la formulación de las 5 dietas, así como su composición proximal. Para la preparación de las dietas experimentales, los ingredientes fueron homogeneizados en una mezcladora Kitchen Aid (Hobart, Troy, OH, USA). Una vez que los ingredientes fueron homogeneizados se les agregó una parte de probiótico liofilizado, inmediatamente se mezclaron y posteriormente se les agregó el aceite de pescado, el almidón y la gelatina (previa hidratados en agua caliente), para finalmente peletizar la mezcla a un tamaño de 3 a 5 mm. Los pellets obtenidos fueron secados a una temperatura de 65 °C durante 24 h en una estufa de convección. Después de enfriados los pellets se les roció con un atomizador la otra parte de probiótico en fresco (según lo recomendado por Olmos Soto y Ochoa Solano), los cuales

se secaron por otras 6 horas. Las dietas fueron almacenadas a una temperatura de -20 °C en bolsas de plástico selladas herméticamente hasta su uso.

Tabla II: Formulación de 5 dietas experimentales para juveniles de *T. macdonaldi*.

Ingredientes	5	10	15	20	25
Harina de pescado¹	59.00	59.00	59.00	59.00	59.00
Harina de krill²	7.30	7.40	7.40	7.30	7.30
Celulosa³	9.00	7.20	4.50	1.60	0.00
Almidón⁴	5.40	10.00	15.00	20.00	24.50
Aceite de pescado⁵	8.50	6.50	4.30	2.20	0.25
Gelatina⁶	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Mezcla minerales⁷	2.00	2.00	2.00	2.00	1.80
Mezcla vitaminas⁸	2.50	2.50	2.50	2.50	2.00
Cloruro de colina	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
a-tocoferol⁹	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Ácido ascórbico	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Probiótico	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Marcador (sílice)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

1 Harina de pescado comercial.

2 Harina de krill comercial proporcionada por Skretting, Vancouver, British Columbia, Canadá.

3 Alpha cell, INC, b=Biomedicals, Alemania.

4 IRIS, USA.

5 Aceite de Menhaden, Sigma, USA.

6 Nabisco, USA.

7 Mezcla de minerales (g/kg): KH₂PO₄ (250); KI (0.2); Ca (H₂PO₄)₂(200); MgSO₄, H₂O (100); CuSO₄ 5H₂O (1); CoCl₂. H₂O (0.04); Al (OH)₃ (0.1), MnSO₄ (3); Fe₂ (SO₄)₃ (6); ZnSO₄ (5); Na₂Se₂ (0.05).

8 Mezcla de vitaminas obtenida de Skretting, Vancouver, British Columbia, Canadá.

9 INC Biomedicals, INC, Alemania.

V.4 Análisis proximal de dietas experimentales.

Tabla III: Composición proximal (peso seco) de las dietas experimentales (% en 100 g dieta).

DIETA	Proteína	Lípidos	Almidón	Ceniza	Energía (cal g ⁻¹)	Relación E/P (kcal/kg)
5	53.1	21.7	6.2	11.8	5298	10.0
10	53.1	18.9	10.6	11.4	5216	9.8
15	52.3	15.7	15.3	12.5	5061	9.7
20	51.8	14.3	20.8	12.0	5126	9.9
25	50.9	12.1	23.7	12.4	4990	9.8

V.5 Organismos y sistema de cultivo

Se cultivaron durante 69 días juveniles de *T. macdonaldi* con peso y longitud inicial promedio de 11.37 ± 0.64 g y 10.78 ± 0.04 cm. respectivamente. Los peces fueron distribuidos en 15 tanques de 65 L (3 por tratamiento) de forma aleatoria con una densidad de 30 organismos por tanque. El experimento se realizó en un sistema abierto con un recambio de agua de 1.5 L min^{-1} dentro de los tanques. Se utilizó agua de mar filtrada a través de un filtro de arena, seguido por cartuchos de 20 y 5 μ y finalmente con paso a una lámpara de luz UV. Durante el experimento se monitorearon los parámetros de: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxígeno (mg L^{-1}) y pH para mantener un intervalo en la temperatura de 23 ± 1.0 $^{\circ}\text{C}$ y 6 ± 0.5 mg L^{-1} de oxígeno disuelto y 8.2 ± 0.15 de pH; se utilizó un fotoperiodo de 12h luz: 12h oscuridad. La limpieza de los tanques se realizó dos veces al día por medio de sifóneo 20 minutos después de alimentar.

Los organismos fueron acondicionados durante 7 días con las dietas experimentales, y durante el transcurso del bioensayo se les alimento a saciedad 2 veces al día (8:00 y 16:00 horas), registrando el alimento consumido por día.

V.6 Métodos de muestreo

Al término del experimento se tomaron 3 peces por réplica para realizar el análisis de composición proximal y 4 peces por réplica para la determinación del índice hepatosomático. Para facilitar la manipulación de los animales durante los muestreos, estos fueron anestesiados con 30 mg L⁻¹ de aceite de clavo diluido en etanol a razón de 1:9, respectivamente (Agüero Grande, 2008).

V.7 Sobrevivencia

Se evaluó la sobrevivencia de juveniles de *T. macdonaldi* mediante un conteo inicial en cada tratamiento y un conteo al final del experimento.

V.8 Crecimiento

V.8.1 Crecimiento en peso y longitud

Se evaluó el crecimiento en peso (g) y longitud (cm) de los organismos mediante un total de 3 biometrías (inicial, media y final). Cada organismo fue anestesiado, medido y pesado.

V.9 Análisis químico proximal

V.9.1 Contenido de humedad

El contenido de humedad se estimó secando las muestras a 105 °C, hasta obtener peso constante (Cockerell et al., 1971).

V.9.2 Contenido de proteína total

La proteína total fue estimada con el método microKjeldahl (N x 6.25).

V.9.3Contenido de cenizas y lípidos

El contenido de cenizas se estimó de acuerdo a la metodología de la AOAC (1995) calcinando las muestras a 500°C durante 12 h. Mientras que el contenido de lípidos se estimó por el método modificado de Folch et al. (1957).

V.9.4Composición calórica

El contenido calórico total de las muestras secas de las dietas, porción muscular, pez entero e hígado, se estimó a partir de su composición proximal y con base a los valores calóricos de referencia para proteínas (5.64 kcal g⁻¹), lípidos (9.44 kcal g⁻¹), y carbohidratos (4.11 kcal g⁻¹) (Bureau et al., 2002).

V.9.5Muestreo de heces

La colecta de heces se realizó por sifóneo directo con un tubo de vidrio de 30 cm de largo sujetado a una manguera. Las colectas de heces se realizaron 30 min después de alimentar a los organismos. Las heces fueron drenadas y colocadas en frascos de plástico, posteriormente se congelaron a una temperatura de -20°C hasta realizar la determinación del coeficiente de digestibilidad aparente del alimento (CDA).

V.10Parámetros de crecimiento.

V.10.1Razón de eficiencia protéica

La razón de eficiencia proteica se determinó mediante el peso ganado entre la proteína total consumida por los organismos (Hardy et al., 2002).

$$\text{REP} = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Proteína total consumida (g)}}$$

V.10.2Tasa de crecimiento específico (TCE)

El logaritmo natural del peso inicial se restó del logaritmo natural del peso final dividiéndolo entre el número de peces y los días de experimento, para posteriormente multiplicarlo por cien.

$$TCE = [(\ln P_f - \ln P_i) * (t_2 - t_1)^{-1}] * 100$$

Dónde: P_f = peso final (g), P_i = peso inicial (g) y $t_2 - t_1$ = tiempo total (días).

V.10.3Índice hepatosomático (IHS)

Se calcula dividiendo el peso del hígado ente el peso del pez y multiplicándolo por 100.

$$IHS = \frac{\text{Peso del hígado (g)} \times 100}{\text{Peso del pez (g)}}$$

V.10.4Ingestión diaria de alimento (IDA)

La cantidad seca de alimento consumido se multiplica por 100 y divide entre la sumatoria del peso final y el peso inicial entre dos por el número de días.

$$IDA = \frac{(\text{Alimento seco consumido (g)} \times 100)}{[(\text{Peso final} + \text{peso inicial (g)})/2] \times \text{tiempo (días)}}$$

V.10.5Tasa de conversión alimenticia (TCA)

Es la división de la cantidad de alimento seco consumido entre el peso ganado de los peces.

$$TCA = \frac{\text{Alimento seco consumido (g)}}{\text{Peso ganado (g)}}$$

V.10.6 Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA)

Se determinó mediante el método de cenizas insolubles en ácido descrito por (Tejada, 1992). Se colectaron heces después de la alimentación tratando de evitar el contacto prolongado con el agua. Como sigue:

$$CDA = \frac{100 - I (\text{heces})}{I (\text{dietas})} \times 100$$

I=cantidad de indicador (sílice)

V.10.7 Análisis de glucógeno

Al término del experimento se muestrearon un total de 15 organismos después de 12 h de inanición. Los organismos fueron sacrificados con un corte rápido en la cabeza, se les extrajo el hígado y el músculo, los cuales fueron congelados de inmediato en hielo seco y almacenados a -70 °C hasta su análisis (Moreira et al., 2008). El contenido de glucógeno en hígado se estimó con la metodología de (Plummer, 1987), que consiste en la transformación del glucógeno del hígado en glucosa, la cual se cuantificó usando un kit para la determinación de glucosa de *Pointe Scientific, INC.*

$$\% \text{ Glucógeno} = \frac{\text{Glucosa (mg)} \times 0.5 \times 0.9 \times 0.001 \times 100}{\text{Peso muestra (g)}}$$

dl= decilitros de solución de muestra

0.9= factor de conversión de glucosa en glucógeno.

0.5= contenido de glucosa en dilución de muestra.

0.001= transformación de la concentración de glucosa (mg) en g.

V.11 *Análisis Estadísticos*

Se comprobaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad y homogeneidad de varianza para los datos obtenidos. Se realizaron pruebas paramétricas ANOVA de una vía y pruebas a posteriori de Tukey que mostraron diferencias significativas. Para datos no normales se utilizó una prueba no paramétrica Mann-Whitney. Las diferencias significativas fueron consideradas cuando $P \leq 0.05$.

Capítulo VI

VI. Resultados

VI.1 *Sobrevivencia*

Se evaluó la sobrevivencia de juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón adicionadas con un probiótico durante un periodo de 8 semanas, al final del periodo experimental la sobrevivencia en todos los tratamientos fue del 100%, por lo que no hubo diferencias significativas entre estos ($P>0.05$).

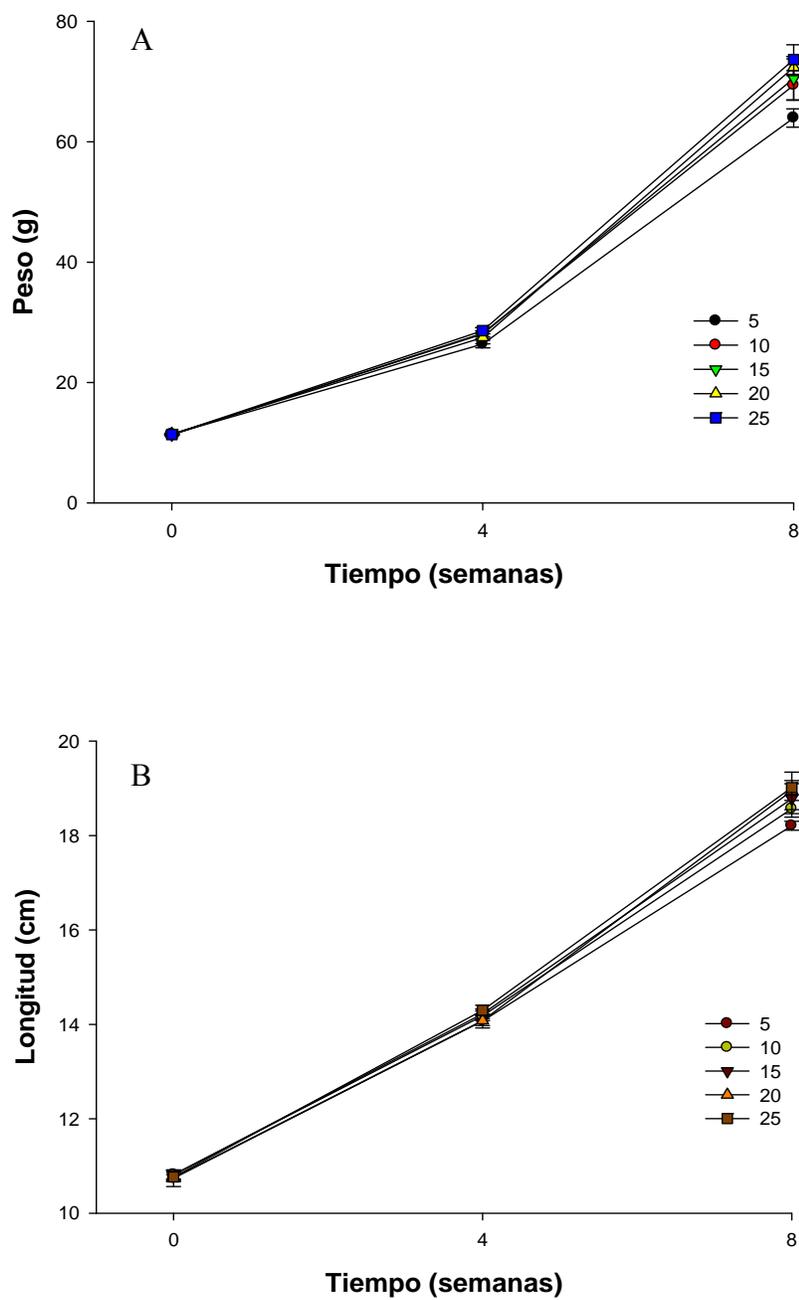
VI.2 *Crecimiento*

VI.2.1 *Crecimiento en peso y longitud*

El peso promedio y longitud inicial de los juveniles fue estadísticamente igual ($P>0.0523$) entre los cinco diferentes tratamientos con 11.37 ± 0.64 g y 10.78 ± 0.04 cm, respectivamente.

Al final del estudio, la biometría de los organismos cultivados durante 8 semanas presentó diferencias estadísticas ($P>0.0064$) en peso, las dietas 20 y 25 presentaron valores (60.92 ± 1.41 y 69.93 ± 0.15 g) significativamente mayores con respecto a la dieta 5 (52.51 ± 1.46) (Figura 1, Tabla V).

Al final del estudio, la biometría de los organismos cultivados durante 8 semanas presentó diferencias estadísticas significativas ($P>0.0282$) en longitud, donde las dietas 20 y 25 presentaron los valores (8.20 ± 0.42 y 8.25 ± 0.06 cm) más altos con respecto a la dieta 5 (7.47 ± 0.27 cm) (Figura 1, Tabla V).



[Figura 1](#). Representación gráfica del aumento en peso (A) y longitud (B) y sus valores de desviación estándar de juveniles de *Totoaba macdonaldi* durante 8 semanas de experimentación alimentados con dietas de distintos niveles de almidón 5, 10, 15, 20 y 25.

VI.3 Análisis químico proximal

VI.3.1 Contenido de humedad

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en el análisis de contenido de humedad en músculo ($P < 0.7930$), hígado ($P < 0.1164$) y pez entero ($P < 0.4897$).

La humedad en músculo presentó valores similares entre los organismos alimentados con las diferentes dietas con valores de $78.1 \pm 0.33\%$ a $79.2 \pm 0.30\%$.

En el análisis de hígado, la humedad presentó valores similares entre los organismos alimentados con las diferentes dietas con valores de $70.52 \pm 1.63\%$ a $75.50 \pm 3.40\%$.

La humedad en pez entero presentó valores similares entre los organismos alimentados con las diferentes dietas con valores de $82.62 \pm 0.00\%$ a $86.95 \pm 0.00\%$.

VI.3.2 Contenido de proteína total

No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.71$) en el contenido de proteína total entre los tratamientos en el análisis de músculo, con un rango de 83.55 ± 0.8 a 84.22 ± 0.12 (Tabla IV).

Los peces alimentados con 15% de almidón en la dieta mostraron el mayor contenido de proteína en el hígado ($P > 0.0014$) ($49.69 \pm 2.25\%$), comparado con el resto de las dietas (5, 10, 20 y 25) (Tabla IV).

El contenido protéico en pez entero presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.0091$) entre los tratamientos, con un rango de 65.86 ± 0.92 a $70.50 \pm 0.051\%$ (Tabla IV).

VI.3.3Contenido de lípidos

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en el contenido de lípidos entre los tratamientos de análisis de músculo ($P > 0.1078$), con un rango de 5.99 ± 0.29 a 6.58 ± 0.42 (Tabla IV).

En el contenido de lípidos en los hígados de los peces se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.0256$), como resultado el grupo de las dietas 5 y 10 fueron las mayores (39.78 ± 1.16 y 37.81 ± 1.16) y el grupo de las dietas 15, 20 y 25 las menores con un rango de 30.45 ± 1.00 a 27.93 ± 1 (Tabla IV).

El contenido lipídico en pez entero no presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P < 0.2032$), con un rango de 11.4 ± 0.34 a 13.3 ± 0.54 (Tabla IV).

VI.3.4Contenido de cenizas

El contenido de ceniza no varió entre los tratamientos de músculo e hígado con rangos de 7.96 ± 0.1 a 8.66 ± 0.12 y 8.16 ± 0.52 a 9.43 ± 0.73 , respectivamente (Tabla IV).

El contenido de cenizas en pez entero presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.0261$) entre los tratamientos, con mayor porcentaje encontrado en los peces alimentados con las dietas 15, 20 y 25 con un rango de 16.69 ± 0.66 a 18.18 ± 0.40 (Tabla IV).

VI.3.5Contenido de energía

El contenido de energía (cal g^{-1}) no varió entre los tratamientos en muestras de músculo y pez entero con rangos de 5356.4 ± 32.99 a 5416 ± 14.14 , y 5051.2 ± 85.06 a 5169.9 ± 54.13 , respectivamente (Tabla IV).

En el contenido de energía (cal g^{-1}) en los hígados de los peces mostraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.0400$), donde las dietas 5 y 10 fueron las mayores (6501.4 ± 32.04 y 6351.2 ± 82.52) (Tabla IV).

VI.3.6 Contenido de glucógeno

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.7398$) en el contenido de glucógeno entre los tratamientos de análisis en músculo, con un rango de 0.1 ± 0.02 a 0.1 ± 0.07 g/100g (Tabla IV).

El contenido de glucógeno en hígado presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0.5568$) entre los tratamientos, con mayor porcentaje encontrado en los peces alimentados con las dietas 10, 20 y 25 (5.8 ± 1.30 , 7.8 ± 2.41 y 8.7 ± 1.33 g/100g) Tabla IV.

Tabla IV. Análisis químico proximal, contenido energético y glucógeno de la porción muscular, hígado y pez entero en base seca de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferente niveles de carbohidratos suplementados con un probiótico durante 8 semanas.

	DIETA	%Humedad	%Proteína	%Lípidos	%Ceniza	Energía (kcal kg ⁻¹)	Glucógeno (g 100g ⁻¹)
MÚSCULO							
	5	78.6±0.28	83.80±0.33	6.58±0.42	7.96±0.10	5416.0±14.14	0.1±0.04
	10	78.6±2.39	83.67±0.25	6.55±0.24	8.12±0.27	5406.1±4.39	0.1±0.03
	15	78.5±0.19	83.97±1.10	6.12±0.12	8.34±0.41	5379.0±36.48	0.1±0.09
	20	79.2±0.30	83.55±0.80	5.99±0.29	8.56±0.53	5356.4±32.99	0.1±0.02
	25	78.1±0.33	84.22±0.12	6.30±0.19	8.66±0.12	5379.2±12.24	0.1±0.07
HÍGADO							
	5	71.72±1.02	39.77±0.34 ^b	39.78±0.81 ^a	8.53±0.52	6501.4±32.04 ^a	3.9±0.47 ^b
	10	70.86±0.60	36.64±2.70 ^b	37.81±1.16 ^a	8.16±0.52	6351.2±82.52 ^a	5.8±1.30 ^{ab}
	15	75.50±3.40	49.69±2.25 ^a	30.45±1.00 ^b	9.43±0.73	6057.0±39.36 ^b	4.3±1.32 ^b
	20	70.52±1.63	38.36±3.04 ^b	29.04±0.57 ^b	8.56±0.67	5905.4±25.54 ^{bc}	8.7±1.33 ^a
	25	70.93±0.72	39.66±2.26 ^b	27.93±1.33 ^b	9.32±0.27	5823.3±88.24 ^c	7.8±2.41 ^{ab}
PEZ ENTERO							
	5	82.72±3.77	65.86±0.92 ^b	11.44±0.69	16.21±0.55 ^b	5061.8±70.84	NC
	10	84.01±0.77	66.85±1.07 ^b	12.37±0.69	16.35±0.93 ^b	5120.6±31.04	NC
	15	82.62±0.00	67.87±1.21 ^{ab}	13.26±0.54	16.69±0.66 ^{ab}	5169.9±54.13	NC
	20	84.88±0.00	70.50±0.51 ^a	11.44±0.34	17.00±0.59 ^{ab}	5100.2±21.27	NC
	25	86.95±0.00	69.10±2.10 ^{ab}	11.83±1.88	18.18±0.40 ^a	5051.2±85.06	NC

Valores de desviación estándar y valores con diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía y prueba a *posteriori* Tukey, $\alpha=0.05$: a>b>c>d>e>), n=9. NC= No calculado.

VI.4 Parámetros de Crecimiento

VI.4.1 Razón de eficiencia protéica (REP)

Se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.002$) entre los valores de REP entre tratamientos, con tendencias a aumentar a medida que aumentó la inclusión de almidón y disminuyó la de lípidos en las dietas. El grupo de organismos alimentados con las dietas 15, 20 y 25 (2.25 ± 0.19 , 2.41 ± 0.08 y 2.59 ± 0.28) presentaron el valor más alto de REP, Tabla VI.

VI.4.2 Tasa de crecimiento específico (TCE).

Se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.006$) entre tratamientos en el análisis de la TCE. Los valores más altos fueron de 2.18 ± 0.05 y 2.23 ± 0.09 en las dietas 20 y 25 (Tabla VI).

VI.4.3 Índice hepatosomático (IHS).

Los valores obtenidos en el análisis del IHS mostraron que la dieta 15 (1.24 ± 0.12) es diferente estadísticamente ($P < 0.007$) a 20 y 25 (1.5 ± 0.01 y 1.51 ± 0.14), Tabla VI.

VI.4.4 Ingestión diaria de alimento (IDA).

Se presentaron diferencias significativas ($P < 0.001$) en la IDA entre tratamientos, con valores de hasta 1.89 ± 0.11 g día⁻¹ durante un periodo de 8 semanas (Tabla VI).

VI.4.5 Tasa de conversión alimenticia (TCA).

Se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.006$) entre tratamientos en el análisis de la TCA con valores de 1.88 ± 0.05 a 2.23 ± 0.09 , Tabla VI.

VI.4.6 Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA).

Los valores obtenidos de CDA para el alimento tuvieron un rango de 75.7 a 89.0% de digestibilidad, resultó estadísticamente superior ($P < 0.10$) la dieta 10 ($89.01 \pm 0.58\%$) con respecto del resto de los tratamientos (Tabla VI).

Tabla V. Parámetros de crecimiento en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas de diferente niveles de carbohidratos suplementados con un probiótico durante 8 semanas.

Parámetros	5	10	15	20	25
Pesos iniciales (g).	11.42±0.18	11.27±0.12	11.38±0.12	11.43±0.05	11.36±0.11
Pesos finales (g).	63.93±1.51 ^b	69.37±2.41 ^{ab}	70.50±3.64 ^a	72.35±1.39 ^a	73.64±2.46 ^a
Pesos ganados (g).	52.51±1.46 ^b	58.10±2.52 ^{ab}	59.12±3.73 ^{ab}	60.92±1.41 ^a	62.28±2.56 ^a
Longitud inicial (cm).	10.74±0.18	10.82±0.10	10.81±0.09	10.75±0.07	10.77±0.10
Longitud final (cm).	18.21±0.09 ^b	18.57±0.18 ^{ab}	18.78±0.32 ^{ab}	18.95±0.40 ^a	19.02±0.15 ^a
Longitud ganada (cm).	7.47±0.27 ^b	7.75±0.17 ^{ab}	7.97±0.29 ^{ab}	8.20±0.42 ^a	8.25±0.06 ^a
Consumo total (g org ⁻¹)	46.07±3.49 ^a	43.75±0.99 ^{ab}	42.01±1.92 ^{ab}	39.88±2.26 ^{ab}	38.97±2.24 ^b
Razón de eficiencia protéica	1.80±0.07 ^c	2.11±0.16 ^{bc}	2.25±0.19 ^{abc}	2.41±0.08 ^{ab}	2.59±0.28 ^a
Tasa de crecimiento específico (% día ⁻¹)	1.88±0.05 ^b	2.08±0.09 ^{ab}	2.12±0.13 ^{ab}	2.18±0.05 ^a	2.23±0.09 ^a
Índice Hepatosomático (%)	1.33±0.05 ^{ab}	1.35±0.11 ^{ab}	1.24±0.12 ^b	1.50±0.01 ^a	1.51±0.14 ^a
Ingestión diaria de alimento (g).	1.89±0.11 ^a	1.69±0.08 ^{ab}	1.60±0.10 ^b	1.48±0.07 ^b	1.43±0.11 ^b
Tasa de conversión alimenticia	0.95±0.04 ^b	1.12±0.09 ^{ab}	1.19±0.10 ^{ab}	1.30±0.05 ^a	1.36±0.15 ^a
Coefficiente de digestibilidad aparente (%)	81.75±1.13 ^b	89.01±0.58 ^a	83.14±1.07 ^b	75.74±1.97 ^c	79.52±2.89 ^{bc}

Valores de desviación estándar y valores con diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía y prueba a *posteriori* Tukey, $\alpha=0.05$: a>b>c>), n=9. Razón de eficiencia protéica (REP), Tasa de crecimiento específico (TCE), Índice Hepatosomático (IHS), Ingestión diaria de alimento (IDA), Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) y Tasa de conversión alimenticia (TCA).

Capítulo VII

VII. Discusiones.

Con el propósito de estudiar la respuesta de desempeño productivo de juveniles de *T. macdonaldi* se realizó un ensayo experimental, en el cual se alimentó a los juveniles con diferentes niveles de carbohidratos y lípidos como fuentes de energía, durante ocho semanas, tiempo en el cual los organismos no presentaron signos de enfermedad por consecuencia la sobrevivencia fue del 100% en todos los tratamientos. En un estudio realizado por Solorzano et al. (2006) se reporta una sobrevivencia del 100% de juveniles de *T. macdonaldi* al ser alimentados con una fórmula comercial que contenía 50.1% proteína, 15% lípidos, 10.8% cenizas y 5,199 cal g⁻¹, después de 36 días de alimentar a los organismos con raciones diarias de 1, 2, 3, 4 y 5% del peso del cuerpo por día, la sobrevivencia fue del 100%, aun con la ración diaria más baja (1%). Para la misma especie Vizcaíno Pérez (2008) obtuvo un 100% de sobrevivencia en juveniles alimentados con dietas isoprotéicas formuladas con distintos niveles de energía (4737 ±13, 5212±8, 5448 ±15 y 5658 ±12 cal g⁻¹) en un experimento que duro 8 semanas.

La aceptación de las dietas por los peces del presente estudio se dio en función de su palatabilidad, ya que los organismos sometidos a los tratamientos con menor porcentaje de almidón y mayor cantidad de aceite de pescado (dieta 5, consumo de 46.07±3.49g org⁻¹) mostraron un consumo mayor en comparación con las dietas que contenían mayor concentración de almidón y menor de aceite de pescado (dieta 25, consumo de 38.97±2.24g org⁻¹). Por tanto, se observó que a mayor inclusión de lípidos en las dietas, estas presentaron mayor atractabilidad para los organismos. El consumo total de alimento por los juveniles de *T. macdonaldi* fue

significativamente diferente entre las dietas 5 y 25, con un consumo menor por los peces alimentados con la dieta de mayor concentración de almidón (D25) cuyos peces consumieron menos gramos de alimento a lo largo del experimento, esto debido quizá a la concentración de aceites de origen marino que se le agregaron a las fórmulas, además de la inclusión de probiótico, quizá estas características ayudaron a que el alimento fuera más atractivo y por tanto más palatable para los juveniles de *T. macdonaldi*. Vizcaino Pérez (2008) sugiere que los juveniles de *T. macdonaldi* pueden ser alimentados con dietas ricas en lípidos/energía (8.4/4737, 16.1/5212, 20.1/5448 y 23.7/5658). Lo que confirma que las dietas con altos niveles de lípidos y/o energía son atractivas para los juveniles por su palatabilidad, aumentando el consumo del alimento y por consecuencia la acumulación de grasa en los tejidos de los mismos.

Se ha comprobado que los peces que son alimentados con dietas con altos contenidos de lípidos, pueden presentar alteraciones en su metabolismo y cambios en la composición proximal de los tejidos (Ruyter et al., 2000; Sargent et al., 2002). Los resultados del análisis químico proximal y contenido energético de la porción muscular de los juveniles de *T. macdonaldi* no se vieron afectados por las diferentes dietas ($P < 0.05$). En estudios previos se ha observado que el contenido proximal en el músculo es poco variable (Mathis et al., 2003; Torres Cobián, 2005; Cruz Hernández, 2007).

Por otra parte Hamid et al. (2011) al utilizar diferentes fuentes de almidón de maíz y arroz como energía en dietas para pez gato, se encontró que la concentración de proteína, lípidos y por ende la humedad en el músculo de los organismos se vieron afectados por las diferentes fuentes de carbohidratos. Trejo Escamilla (2008) encontró diferencias en el contenido de lípidos en la porción muscular de juveniles de corvina blanca, esto se lo atribuyó a los almidones ingeridos por los peces y la acción del probiótico sobre el almidón, más que a la variación en el

nivel de lípidos en la dieta, ya que los organismos que consumieron menos lípidos y más almidón en su dieta presentaron mayor contenido de grasa en el cuerpo entero, músculo e hígado de los juveniles. Los juveniles de *T. macdonaldi*, puede alimentarse con dietas que contengan de 5 a 25% de carbohidratos y de 8 a 24% de lípidos con la adición de un probiótico sin alterar su contenido químico proximal y contenido energético de la porción muscular.

En este estudio la variación del contenido de proteína en los hígados de *T. macdonaldi* parece estar directamente relacionado con la variación de la concentración de glucógeno hepático. La dieta 15 fue la única que tuvo una variación significativa en la concentración de proteína en el hígado, se ha reportado que un exceso de carbohidratos en las dietas tiene un efecto gluconeogénico en el hígado, al igual un exceso de proteína en la dieta de peces aumenta la excreción de amoníaco a través de las branquias, el exceso va al hígado y es convertido en glucógeno o en triglicéridos (Guillaume et al., 2004). Por otra parte la variación en la concentración de lípidos en el hígado y la energía estuvo en función a la inclusión de almidón/lípidos (5/21, 10/18, 15/15, 20/14 y 25/12), los peces alimentados con la dieta 5 y 10 presentaron diferencias con los valores más altos en la concentración de lípidos en el hígado y la cantidad de energía. En el mismo contexto Trejo Escamilla (2008) encontró diferencias en el contenido de lípidos en el hígado de juveniles de corvina blanca al incluir diferentes porcentajes de almidón/lípidos (10/10control, 10/10, 14/8, 18/7 y 22/5) y adicionadas con probiótico. Siendo la dieta con 22/5 (almidón/lípidos) la que mayor contenido de lípidos hepáticos acumuló, adjudicándosele probablemente a que los juveniles de corvina pudieron utilizar los almidones con ayuda de las bacterias probióticas, ya que estas transformaron los almidones en azúcares más simples y/o glucosa, y los peces los utilizaron como fuente de energía y parte de esta pudo ser almacenada en forma de grasa. Esta relación inversa entre corvina blanca y totoaba pudo deberse

a diferencias metabólicas de las especies, ya que totoaba es de aguas cálidas y corvina de aguas templadas.

Estos resultados coinciden con lo reportado en juveniles de *Paralichthys olivaceus* (Lee et al., 2005), *Atractocion nobilis* (Torres Cobián, 2005), *Cromileptes altevelis* (Williams et al., 2004) y *Dentex dentex* (Skalli et al., 2004), en quienes se utilizaron dietas con diferentes concentraciones de lípidos, concluyendo que las dietas con los niveles más altos de lípidos producen bajos contenidos de proteína en el hígado.

Al medir la cantidad de glucógeno (g/100g) en los hígados de *T. macdonaldi* se encontraron diferencias significativas en función a la inclusión almidón/lípidos de las dietas. El glucógeno del hígado también se vio afectado por la inclusión de almidones precocidos y por la acción del probiótico que quizá ayudo a digerir los almidones proporcionando glúcidos de cadena corta o una combinación de ambos por esta vía.

La composición química proximal de pez entero varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de la misma especie, dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año (Guillaume et al., 2004). Durante los periodos de ingesta de alimento el contenido de proteína en el músculo aumenta, para los peces en acuicultura como los factores son controlados hasta cierto punto, el acuicultor tiene la posibilidad de diseñar la composición del pez, seleccionando las condiciones de cultivo. Se ha visto que la composición del alimento, el ambiente, el tamaño del pez y rasgos genéticos, tienen un impacto directo en la composición y la calidad del pez (Reinitz et al., 1979). Por todo esto el análisis proximal de pez entero en el presente experimento arrojó diferencias significativas en el contenido de proteína y cenizas mostrando una tendencia ascendente para ambos, conforme se aumentó/disminuyó la cantidad de almidón/lípidos en las dietas. Resultados similares fueron

publicados para hibrid striped bass (una cruce entre corvina blanca, moronechrysops y stripedbass) (Erfanullah et al., 1998).

Los peces carnívoros en particular, utilizan la proteína de la dieta como su mayor fuente de energía, muchas de las especies marinas son eficientes obteniendo energía de lípidos y una limitada capacidad al consumir carbohidratos. En el presente estudio se ha demostrado que agregando un probiótico se eleva la capacidad de los juveniles de *T. macdonaldi* para utilizar los carbohidratos en la subsecuente obtención de energía, por otra parte se observó que no existieron diferencias entre las dietas 10, 15, 20 y 25 en crecimiento en peso y longitud ([Figura 1](#)) de juveniles de *T. macdonaldi*. Sin embargo, se ha publicado para *Hippoglossus hippoglossus* un pez marino carnívoro que la inclusión de más de 10% de glúcidos en la dieta tiene un efecto negativo en su crecimiento (Helland et al., 1998). Por otra parte, en estudios con diferentes especies de peces como: trucha arcoíris, salmón del Atlántico, anguila Europea, bacalao y en diferentes especies de carpas se han obtenido datos que demuestran que los peces carnívoros son capaces de compensar los requerimientos de energía con un mayor consumo de alimento para mantener el crecimiento cuando el almidón representa una parte importante en la dieta en lugar de los lípidos (Hemre et al., 2002).

En un estudio realizado con salmón del Atlántico (*Salmo salar L.*) se observó que al variar la relación de proteína\carbohidratos en las dietas, manteniendo una concentración constante de lípidos no se presentan diferencias significativas en el crecimiento y/o en la tasa de conversión alimenticia. Concluyendo que una dieta con mayor porcentaje de proteína puede producir un rápido crecimiento y peces de alta calidad, por lo que al incluir un mayor porcentaje de carbohidratos y disminuir la proporción de proteína en la dieta los costos de alimentación disminuyen (Hillestad et al., 2001). En un estudio similar investigaron el efecto de tres dietas

isoprotéicas con diferentes niveles de lípidos y carbohidratos (21/17, 17/24 y 13/27%, respectivamente) en juveniles de corvina (*Argyrosomus regius*) un pez carnívoro de la familia de la totoaba y con un nicho ecológico similar. Los autores concluyeron que existe un mejor crecimiento en peces alimentados con dietas con 17% de lípidos y 24% de carbohidratos, ya que con las otras combinaciones se provocó un deterioro en el crecimiento (Chatzifotis et al., 2010). En el mismo sentido se conoce que la incorporación de niveles apropiados de almidón en las dietas para peces mejora el crecimiento al mantener el metabolismo (Hemre et al., 2002). En su medio natural los peces carnívoros consumen bajos contenidos (1-10%) de carbohidratos, por lo que también se ha reportado que un nivel elevado de este nutriente genera un estrés metabólico afectando el crecimiento (Ruohonen et al., 2003).

Cuando un pez se alimenta con 1 g de alimento formulado, parte de la energía es utilizada en la digestión, la respiración, los impulsos nerviosos, el balance osmótico, la natación y otras actividades de vida. Para conocer esta relación utilizamos la tasa de conversión alimenticia que es la relación entre el alimento consumido y el peso ganado, un valor de 2 indica que el 50% del alimento es empleado para la ganancia de peso y el resto para mantenimiento. Para las dietas 5, 10, 15, 20 y 25 se obtuvo 0.95, 1.12, 1.19, 1.3 y 1.3 de tasa de conversión alimenticia, por lo que estos valores de asimilación del alimento podrían indicar las proporciones que fueron empleadas para crecimiento por los juveniles de *T. macdonaldi*. Estos resultados coinciden con Vizcaíno Pérez (2008) quien obtuvo valores similares para *T. macdonaldi*, mientras Solorzano et al. (2006) para la misma especie obtuvo valores menores en la tasa de conversión alimenticia, quien experimento con organismos de mayor talla y una formulación diferente.

Los valores de la tasa de crecimiento específico en este estudio presentaron diferencias estadísticas significativas siendo las dietas 20 y 25 diferentes a la dieta 5 mostrando una

tendencia creciente conforme se aumentó la cantidad de carbohidratos y se disminuyó la cantidad de lípidos en la dieta. La misma tendencia de la tasa de crecimiento específico lo reporto Trejo Escamilla (2008) para corvina blanca al aumentar la inclusión de almidón de 10 a 22% en la dieta, así como Enes et al. (2006) para corvina Europea al evaluar el efecto de 10 y 20% de dos tipos de almidón.

El efecto del alimento en la razón de eficiencia proteica de los juveniles de *T. macdonaldi* incrementó de 1.88 a 2.23 conforme aumentó/disminuyó la inclusión de carbohidratos/lípidos (de 5/18 a 25/9%) en la dieta. Este comportamiento coincide con lo reportado para lenguado y carpa herbívora al variar la proporción de carbohidratos/lípidos en las dietas (Mohapatra et al., 2003; Dias et al., 2004). Para la tilapia del Nilo, al evaluar la inclusión de tres probióticos diferentes, un control y 4 dietas con las mismas proporciones encontraron que no se vio reflejado un aumento en la tasa de crecimiento específico. La tasa de conversión alimenticia aumentó con la inclusión de probiótico al igual que la razón de eficiencia proteica (Abd El-Rhman et al., 2009). Para pez gato Al-Dohail et al. (2009) evaluaron 2 dietas con similar contenido proximal, una con probiótico y la otra sin probiótico, la razón de eficiencia proteica aumentó con la inclusión del probiótico, la tasa de conversión alimenticia y la tasa de crecimiento específico disminuyeron con la inclusión. El-Dakar et al. (2007) evaluaron 5 dietas con diferentes concentraciones de Biogen una mezcla de enzimas, probiótico y extractos de ginseng, obteniendo una tasa de conversión alimenticia por debajo del control y una tasa de crecimiento específico por encima del control. En el mismo contexto, Merrifield et al. (2010) en 4 dietas iguales probaron 3 diferentes combinaciones de 3 especies de probióticos, y un control sin probiótico en trucha arcoíris, la tasa de crecimiento específico no fue diferente, la tasa de conversión alimenticia disminuyó, mientras la razón de eficiencia proteica aumentó.

La digestibilidad es una forma de medir la facilidad con que el alimento es convertido en el aparato digestivo de los peces en sustancias útiles, en la formulación de dietas para organismos en cautiverio se busca una buena digestibilidad del alimento. En su medio natural *T. macdonaldi* engulle presas enteras, por lo tanto, al alimentar con formulados y en forma de pellets estamos facilitando la fragmentación de los ingredientes, modificando la secreción natural de las enzimas, los procesos de absorción y la velocidad de tránsito del alimento.

En este estudio el coeficiente de digestibilidad aparente dependió del estado fisiológico de los peces, del nivel de ingesta del alimento, de la gelificación de los almidones y de la inclusión del probiótico, permitiendo así, evaluar la capacidad de *T. macdonaldi* para retener la ración alimenticia bajo condiciones de cultivo. Los valores del coeficiente de digestibilidad aparente presentaron un rango de 89.0 a 75.7% mostrando un comportamiento sinoidal decreciente conforme aumentó la inclusión de almidón en la dieta, siendo la dieta con una inclusión de 10% de almidón la que tuvo el valor máximo de digestibilidad (89.01 ± 0.58). Gatlin III (2002) menciona que los peces carnívoros no digieren de manera natural una dieta con alto contenido de carbohidratos, por lo que el coeficiente de digestibilidad aparente disminuye con la inclusión de almidón.

Independiente de la especie de pez, la digestibilidad de los almidones está ligada, a la complejidad de la molécula glucídica aumentando la eficiencia de la digestión cuando disminuye el peso molecular, una forma de maximizar la digestibilidad del almidón es someterlo a un tratamiento hidrotérmico (gelificación) (Mohapatra et al., 2003). Algunos de los factores que pueden afectar la digestibilidad en los peces son: la edad, la talla y la temperatura.

Hillestad et al. (2001) al evaluar 3 dietas con diferentes porcentajes de proteína/carbohidratos 34/21, 39/15 y 44/10 el coeficiente de digestibilidad aparente para

almidón se redujo significativamente con la disminución de proteína. Por lo que la eficacia de la digestión es consecuencia de los procesos digestivos y por tanto de la secreción de las enzimas, de los proceso de absorción y del tránsito. La amilasa es capaz de hidrolizar los enlaces de la amilosa, fragmentos lineales de la amilopectina y el glucógeno. Esta enzima se ha encontrado en todos los peces, incluso en los carnívoros de altamar que nunca obtienen almidón en sus dietas naturales (Guillaume et al., 2004). El lenguado común, al igual que *T. macdonaldi* es predador de moluscos ricos en glucógeno, tiene una actividad amilolítica elevada y la secreción de amilasa está relacionada con la temperatura del agua. Los peces son animales ectodermos siendo su temperatura corporal prácticamente la misma que la del agua en la que viven, por esta razón su metabolismo funciona en forma óptima dentro de un rango de temperatura adecuada, aumentando la digestibilidad de los nutrientes en temperaturas cálidas (Guillaume et al., 2004).

El índice hepatosomático es especie-específico y su valor se relaciona con el almacenamiento de grasa por el peso del hígado con relación al peso del cuerpo. En peces óseos el porcentaje de índice hepatosomático, por lo general, es entre 1 y 2%. En dietas experimentales deficientes en ácidos grasos esenciales para salmón, provocó un incremento en el valor de índice hepatosomático, al remplazar gradualmente aceite de pescado por aceite de girasol en seis dietas (Bransden et al., 2003). En el mismo contexto, para el presente estudio los valores de índice hepatosomático incrementaron conforme aumentó/disminuyó la inclusión de almidón/lípidos (5/21, 10/18, 15/15, 20/14 y 25/12) en las dietas, debido principalmente a la acumulación de glucógeno en este órgano.

En algunos estudios se ha demostrado que el aumento de los niveles de carbohidratos en la dieta causa un aumento en el índice hepatosomático principalmente por una acumulación de glucógeno en el hígado (Hamre et al., 2003). Numerosos estudios han demostrado que los

organismos que son alimentados con altos niveles de energía derivados principalmente de lípidos y carbohidratos, causan un aumento en el peso del hígado por la acumulación de grasa y glucógeno, respectivamente (Erfanullah et al., 1998; Dias et al., 2004; Gao et al., 2010). En el presente estudio, los niveles de glucógeno en el hígado aumentaron a medida que aumentó el contenido de almidón en las dietas, la misma tendencia se observó con respecto a la concentración de lípidos en el hígado, ya que esta concentración aumentó al aumentar el contenido de lípidos en las dietas.

Capítulo VII

VIII. Conclusiones.

- Las concentraciones de 10/18, 15/15, 20/14 y 25/12 (carbohidratos/lípidos) no presentaron diferencias con respecto al crecimiento de juveniles de *T. macdonaldi*.
- La utilización de dietas con concentraciones mayores al 10% de carbohidratos y adicionadas con probiótico son una alternativa para el cultivo de juveniles de *T. macdonaldi*.
- Se obtuvo una sobrevivencia del 100% para todos los tratamientos en el cultivo de juveniles de *T. macdonaldi* durante un periodo de 8 semanas.
- Las dietas 25 y 20 produjeron la mejor tasa de conversión alimenticia (1.36 ± 0.15 y 1.30 ± 0.05 , respectivamente).
- La composición bioquímica y energética del músculo de juveniles de *T. macdonaldi* demostró no ser afectada por la cantidad de almidón/lípidos en la dieta.
- La concentración de lípidos en el hígado (%) de los juveniles de *T. macdonaldi* se vio afectada como respuesta al ser alimentados con dietas con niveles crecientes de almidón y adicionadas con un probiótico.

- La composición bioquímica de pez entero se vio afectada en el contenido de proteína y ceniza. Sin embargo, el contenido energético de pez entero fue similar para todos los juveniles de *T. macdonaldi*.
- Las dietas 10, 20 y 25 obtuvieron la mayor cantidad de glucógeno (5.8 ± 1.30 , 8.7 ± 1.33 y 7.8 ± 2.41 g 100g^{-1}) en el hígado en los juveniles de *T. macdonaldi*.
- El contenido de glucógeno en el músculo (g 100g^{-1}) de los juveniles de *T. macdonaldi* no varió conforme se aumentó/disminuyó la inclusión de almidón/lípidos (5/21, 10/18, 15/15, 20/14 y 25/12) en las dietas como respuesta al ser alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón adicionadas con un probiótico.
- El índice hepatosomático de juveniles de *T. macdonaldi* mostro que los tratamientos 20 y 25 fueron diferentes a 15 conforme se aumentó/disminuyó la inclusión de almidón/lípidos (20/14 y 25/12 diferentes a 15/15,) en las dietas adicionadas con probiótico.
- La dieta 10 obtuvo el mayor porcentaje de digestibilidad aparente con un valor de 89.01% para el cultivo de juveniles de *T. macdonaldi*.

Capítulo IX

IX. Referencias.

Abd El-Rhman, A. M., Y. A. E. Khattab y A. M. E. Shalaby. (2009). Micrococcus luteus and Pseudomonas species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2), 175-180.

Agüero Grande, K. A. (2008). *Uso del aceite de clavo como anestésico natural para el manejo rutinario de organismos marinos en laboratorio*. Ensenada B.C., México, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada B.C., México, pp. 36

Al-Dohail, M. A., R. Hashim y M. Aliyu-Paiko. (2009). Effects of the probiotic, Lactobacillus acidophilus, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (Clarias gariepinus, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research*, 40(14), 1642-1652.

Alcocer, O. (2009). Un logro mas... La recuperacion de la Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (pp. 6). México, D.F: Dirección general de vida silvestre, semarnat.

Ali, A. y N. A. Al-Asgah. (2001). Effect of feeding different carbohydrate to lipid ratios on the growth performance and body composition of nile tilapia (oreochromis niloticus) fingerlings. *Anim. Res.*, 50(1), 91-100.

Balcázar, J. L., O. Decamp, D. Vendrell, I. De Blas y I. Ruiz-Zarzuela. (2006). Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 18(2), 65-70.

Bransden, M. P., C. G. Carter y P. D. Nichols. (2003). Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(4), 611-625.

Bureau, D. P., S. J. Kaushik y C. Y. Cho. (2002). Bioenergetics. In J. E. Halver and R. W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition* (Third Edition ed., pp. 2-54). San Diego CA. USA.: Academic Press.

Cisneros-Mata, M. A., L. W. Botsford y J. F. Quinn. (1997). Projecting viability of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. *Ecological Applications*, 7, 968-980.

Cisneros-Mata, M. A., G. Montemayor-López y M. J. Román-Rodríguez. (1995). Life History and Conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology*, 9(4), 806-814.

Cisneros-Mata, M. A., G. Montemayor López y M. J. Román Rodríguez. (1995). Life History and Conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology*, 9(4), 806-814

CITES. (2005). Review of CITES Appendixes Based on Resolution Conf. 9.24 (Rev.) *Totoaba macdonaldi* (Mexican seabass) *Convention on international Trade in Endangered species of Wild Fauna and Flora* (Vol. AC17 Inf. 6, pp. 10). Geneva, Switzerland: Scientific Authority CITES Mexico.

Cockerell, I., B. Francis y D. Halliday (1971). Changes in nutritive value of concentrate feeding stuffs during storage. Proceedings of the conference on the development of feed resources and improvement of animal feeding methods in the CENTO region countries, London.

Couto, A., P. Enes, H. Peres y A. Oliva-Teles. (2008). Effect of water temperature and dietary starch on growth and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(1), 45-50.

Cruz Hernández, A. d. C. (2007). *Utilización de harina de pescado tratada con formaldehído para determinar el requerimiento proteico en juveniles de Corvina Blanca (Atractosion nobilis) en condiciones de cultivo*. Ensenada B.C., México, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada B.C., México, pp. 42

Chatzifotis, S., M. Panagiotidou, N. Papaioannou, M. Pavlidis, I. Nengas y C. C. Mylonas. (2010). Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture*, 307(1-2), 65-70.

Chebbaki, K., H. Akharbach, E. Talbaoui, A. Abrehouch, A. Ait ali, S. Sedki, A. Ben Bani y M. Idaomar. (2010). Effect of fish meal replacement by protein sources on the extruded and pressed diet of European sea bass juvenile (*Dicentrarchus labrax*). *Agriculture and biology Journal of North America* 1(4), 704-710.

Cho, C. Y. y S. J. Kaushik. (1993). Energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In N. A. Press (Ed.), *Nutritional energetics in fish* (Vol. 61, pp. 132-172.). Washington D.C.: World Rev.

Dias, J., R. Rueda-Jasso, S. Panserat, L. E. C. d. Conceição, E. F. Gomes y M. T. Dinis. (2004). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquaculture Research*, 35(12), 1122-1130.

El-Dakar, A. Y., S. M. Shalaby y I. P. Saoud. (2007). Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition*, 13(6), 407-412.

- Enes, P., S. Panserat, S. Kaushik y A. Oliva-Teles. (2006). Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 143(1), 89-96.
- Enes, P., S. Panserat, S. Kaushik y A. Oliva-Teles. (2008). Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 274(1), 101-108.
- Erfanullah y A. K. Jafri. (1998). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). *Aquaculture*, 161(1-4), 159-168.
- FAO. (2006). Estado mundial de la pesca y la acuicultura *Food and Agriculture Organization of United Nations*. Rome.
- Folch, J., M. Lees y G. H. S. Stanley. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Francis, G., H. P. S. Makkar y K. Becker. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3-4), 197-227.
- Gao, W., Y. J. Liu, L. X. Tian, K. S. Mai, G. Y. Liang, H. J. Yang, M. Y. Huai y W. J. Luo. (2010). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 16(3), 327-333.
- Gatlin III, D. M. (2002). Nutrition and fish health. In J. E. Halver and R. W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition* (pp. 672-699). San Diego CA. USA.: Academic Press.
- Gélineau, A., G. Corraze y T. Boujard. (1998). Effects of restricted ration, time-restricted access and reward level on voluntary food intake, growth and growth heterogeneity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on demand with self-feeders. *Aquaculture*, 167(3-4), 247-258.
- Guillaume, J. y A. S. Blanco. (2004). *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos*: Mundi-Prensa.
- Hamid, N. K. A., M. Mahayat y R. Hashim. (2011). Utilization of different carbohydrate sources and starch forms by bagrid catfish (*Mystus nemurus*) (Cuv & Val). *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e10-e18.
- Hamre, K., A. Ofsti, T. Naess, R. Nortvedt y J. C. Holm. (2003). Macronutrient composition of formulated diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) juveniles. *Aquaculture*, 227(1-4), 233-244.
- Hardy, R. W. y F. T. Barrows. (2002). Diet formulation and manufacture. In J. E. Halver and R. W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition* (pp. 824). San Diego CA. USA.: Academic Press.

Helland, S. J. y B. Grisdale-Helland. (1998). Growth, feed utilization and body composition of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in the ratio between the macronutrients. *Aquaculture*, 166(1-2), 49-56.

Hemre, G. I., T. P. Mommsen y A. Krogdahl. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8(3), 175-194.

Hillestad, M., F. Johnsen y T. Asgard. (2001). Protein to carbohydrate ratio in high-energy diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 32(7), 517-529.

Hua, K. y D. P. Bureau. (2009). A mathematical model to explain variations in estimates of starch digestibility and predict digestible starch content of salmonid fish feeds. *Aquaculture*, 294(3-4), 282-287.

Krogdahl, A., G. I. Hemre y T. P. Mommsen. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11(2), 103-122.

Lee, S. M. y K. D. Kim. (2005). Effect of various levels of lipid exchanged with dextrin at different protein level in diet on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 11(6), 435-442.

López, L. M., E. Durazo, A. Rodríguez Gómez, C. D. True y M. T. Viana. (2006). Composición proximal y perfiles de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias Marinas*, 32(002), 303-309.

Lovell, T. (1998). *Nutrition and feeding of fish*: Kluwer Academic Publishers.

Mathis, N., C. Feidt y J. Brun-Bellut. (2003). Influence of protein/energy ratio on carcass quality during the growing period of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquaculture*, 217(1-4), 453-464.

Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, G. Bradley, R. T. M. Baker y S. J. Davies. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16(5), 504-510.

Mohapatra, M., N. P. Sahu y A. Chaudhari. (2003). Utilization of gelatinized carbohydrate in diets of *Labeo rohita* fry. *Aquaculture Nutrition*, 9(3), 189-196.

Morales Ortiz, C. (1999). *Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (Totoaba macdonaldi) bajo condiciones de laboratorio*. Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada B. C. México. pp. 56

Moreira, I. S., H. Peres, A. Couto, P. Enes y A. Oliva-Teles. (2008). Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 274(1), 153-160.

- Nematipour, G. R., M. L. Brown y D. M. Gatlin. (1992). Effects of Dietary Carbohydrate: Lipid Ratio on Growth and Body Composition of Hybrid Striped Bass. *Journal of the World Aquaculture Society*, 23(2), 128-132. doi: 10.1111/j.1749-7345.1992.tb00760.x
- Ochoa-Solano, L. J. y J. Olmos-Soto. (2006). The functional property of Bacillus for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23(6), 519-525.
- Panigrahi, A., V. Kiron, J. Puangkaew, T. Kobayashi, S. Satoh y H. Sugita. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243(1-4), 241-254.
- Peres, H. y A. Oliva-Teles. (2002). Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 205(3-4), 287-299.
- Plummer, D. T. (1987). *An introduction to practical biochemistry* (Vol. 16). UK: Headington Hill Hall.
- Rodríguez Gómez, M. A. (2003). *Composición proximal y contenido de ácidos grasos en juveniles de Totoaba macdonaldi del alto Golfo de California*. Ensenada B.C., México, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada B.C., México, pp. 44
- Román Rodríguez, M. J. y M. F. Hammann. (1997). Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonaldi*, (Sciaenidae), in the upper Gulf of California. *Fishery Bulletin*, 95, 620-628.
- Ruohonen, K., J. Koskela, J. Vielma y J. Kettunen. (2003). Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): analysis of growth and nutrient utilisation in mixture model trials. *Aquaculture*, 225(1-4), 27-39.
- Ruyter, RØsjØ, Einen y Thomassen. (2000). Essential fatty acids in Atlantic salmon: time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition*, 6(2), 109-117.
- Sampaio-Oliveira, A. M. B. M. y J. E. P. Cyrino. (2008). Digestibility of plant protein-based diets by largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Aquaculture Nutrition*, 14(4), 318-323.
- Sargent, J., Tocher R. Douglas y G. Bell. (2002). The lipids. In J. E. Halver and R. W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition* (Third Edition ed.). San Diego CA. USA: Academic Press.
- Skalli, A., M. C. Hidalgo, E. Abellán, M. Arizcun y G. Cardenete. (2004). Effects of the dietary protein/lipid ratio on growth and nutrient utilization in common dentex (*Dentex dentex* L.) at different growth stages. *Aquaculture*, 235(1-4), 1-11.

Solorzano, Y., L. M. López, E. Durazo y C. D. True. (2006). Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de Totoaba macdonaldi. *Ciencias Veterinarias*, 1181-1192.

Tejada, I. (1992). Control de calidad y análisis de alimentos para animales *Sistema de Educación Continúa en Producción Animal A.C.* México, DF.

Torres Cobián, A. L. (2005). *Respuesta de juveniles de corvina blanca Atractoscion nobilis a diferentes concentraciones de lipidos en la dieta.* Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. pp. 84

Trejo Escamilla, I. (2008). *Respuesta en crecimiento de juveniles de corvina blanca (attractoscion nobilis) alimentados con dietas con diferentes niveles de almidon suplementadas con bacterias probioticas.* Ensenada B.C., México, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada B.C., México, pp. 51

True, C. D., A. S. Loera y N. C. Castro. (1997). Acquisition of Broodstock of Totoaba macdonaldi: Field Handling, Decompression, and Prophylaxis of an Endangered Species. *Progressive Fish Culturist*(59), 246-248.

Vasiljevic, T. y N. P. Shah. (2008). Probiotics--From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.

Vizcaino Pérez, E. (2008). *Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de Totoaba macdonaldi, alimentados con dietas isoprotéicas formuladas con distintos niveles de energía* Ensenada B.C., México, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada B.C., México, pp. 36

Williams, K. C., S. Irvin y M. Barclay. (2004). Polka dot grouper *Cromileptes altivelis* fingerlings require high protein and moderate lipid diets for optimal growth and nutrient retention. *Aquaculture Nutrition*, 10(2), 125-134.

Wu, X.-Y., Y.-J. Liu, L.-X. Tian, K.-S. Mai, H.-J. Yang y G.-Y. Liang. (2007). Effects of raw corn starch levels on growth, feed utilization, plasma chemical indices and enzyme activities in juvenile yellowfin seabream *Sparus latus* Houttuyn. *Aquaculture Research*, 38(12), 1330-1338.