

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL



Alimentación de la dorada con piensos sin harina de pescado

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Curso 2016 – 2017

Autor:

David del Toro Díaz

Directoras:

Ana Tomás Vidal

Silvia Martínez Llorens

Valencia, julio de 2017

ALIMENTACIÓN DE LA DORADA CON PIENSOS SIN HARINAS DE PESCADO

La acuicultura está en continuo crecimiento, sin embargo, las harinas y los aceites de pescado son un recurso que está en decadencia, es por ello que la industria se ha visto forzada a investigar materias primas alternativas para alimentar a los peces. En la actualidad se está invirtiendo tiempo y esfuerzo en la investigación de fuentes de aceites y harinas vegetales y animales, así como en los niveles óptimos que se deben incluir en la dieta de las diferentes especies de peces.

El objetivo de este trabajo es valorar el efecto de la sustitución de la harina de pescado por una mezcla de harinas animales y vegetales (harina de carne de cerdo ibérico, harina de soja, de guisante y de girasol), en el crecimiento y parámetros nutritivos de la dorada (*Sparus aurata*). Para ello, se ensayarán 5 piensos experimentales en los que la harina de pescado se sustituirá en un 75, 90 y 100%. Habrá dos dietas con el 100% de sustitución (FM 0 y FM 0+), con la diferencia que FM 0+ contendrá un 5% de alga. Se trabajará con juveniles de dorada (50g de peso inicial). Al inicio y en cada muestreo, se pesarán todos los peces para luego estimar el peso final (Pf) y la tasa de crecimiento instantáneo (TCI). Asimismo se calculará la tasa de alimentación diaria (TAD) y el índice de conversión del alimento (ICA).

Diariamente, se realizarán una serie de controles para comprobar el correcto funcionamiento del laboratorio: revisión general de la instalación, control de calidad del agua, control de crecimiento, etc.; así como la alimentación de los peces dos veces al día.

Los controles de peso se realizarán cada 4 semanas y los peces serán alimentados hasta saciedad aparente. Al inicio y final de cada experimento se sacrificarán los peces con un exceso de esencia de clavo y se realizarán los análisis químicos: macronutrientes (siguiendo la metodología descrita por la AOAC, 1990) y los aminoácidos totales (mediante cromatografía líquida de alta resolución, HPLC) de los piensos fabricados y de los peces. De cada muestra, los análisis se realizaran por triplicado.

Palabras clave: Dorada, harina de pescado, harina de cerdo ibérico, mezcla proteica vegetal, alga

Alumno: D. David del Toro Díaz

Valencia, Julio de 2017

Tutoras: Prof. Dña. Ana Tomás Vidal; Prof. Dña. Silvia Martínez Llorens

FEEDING OF GILTHEAD SEA BREAM WITH FEED WITHOUT FISHMEAL.

Aquaculture is in continuous growth, however, fishmeal and fish oils are a resource that is in decline, which is why the industry has been forced to investigate alternative raw materials to feed the fish. At present, time and effort are being invested in the research of sources of vegetable and animal oils and flours as well as the optimum levels to be included in the diet of different fish species.

The objective of this work is to evaluate the effect of substitution of fish meal for a mixture of animal and vegetable flours (Iberic pig meal, soybean meal, pea and sunflower meal), growth and nutritional parameters of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). To do this, 5 experimental feeding stuffs will be tested in which the fish meal will be replaced in 75, 90 and 100%. There will be two diets with 100% substitution (FM 0 and FM 0+); with the difference that FM 0+ will contain 5% algae. It will work with juveniles of gilthead sea bream (50g of initial weight). At the beginning and in each sampling, all the fish will be weighed and then the final weight (Fw) and the specific growth rate (SGR) will be estimated. The feed intake ratio (FI) and the feed conversion ratio (FCR) will also be calculated.

Daily, a series of controls will be carried out for the correct functioning of the laboratory: general revision of the installation, water quality control, growth control, etc., as well as feeding of the fish twice a day.

Weight checks will be performed every 4 weeks and the fish will be fed to apparent satiety. At the beginning and at the end of each experiment the fish will be sacrificed with an excess of clove oil and the chemical analyzes will be performed: macronutrients (following the methodology described by AOAC, 1990) and total amino acids (by high performance liquid chromatography, HPLC) of the manufactured feed and the fish. From each sample, all the analyses were performed in triplicate.

Key words: Gilthead sea bream, fishmeal, iberic pig meal, vegetable protein mix, alga.

ÍNDICE

I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. La acuicultura y su importancia.....	1
1.2. La dorada.....	3
1.3. Alimentación en acuicultura	4
1.4. Fuentes proteicas y lipídicas alternativas a la harina y aceite de pescado.....	4
1.4.1. Antecedentes	4
1.5. Utilización de aditivos.....	6
II. <u>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u>	7
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	8
3.1. Descripción de la instalación	8
3.1.1. Tanques	8
3.1.2. Sistema de bombeo	8
3.1.3. Sistema de depuración de agua	8
3.1.4. Sistema de canalización de agua.....	9
3.1.4.1. Canaletas.....	9
3.1.4.2. Tuberías.	9
3.1.4.3. Sistema de aireación.	9
3.1.4.4. Sistema de emergencia.....	9
IV. <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u>	10
4.1. Peces.....	10
4.2. Piensos experimentales	10
4.3. Rutina de trabajo	11
4.3.1. Revisión general de la instalación.....	11
4.3.2. Alimentación de peces	12
4.3.3. Control de calidad del agua. Parámetros físico-químicos	12
4.3.4. Control de crecimiento.....	12
4.3.5. Controles finales. Biometrías e índices biométricos	13
4.3.6 Eficiencias de retención	13
4.4. Análisis químicos	14
4.4.1. Determinación de materia seca	14

4.4.2. Determinación de cenizas	15
4.4.3. Determinación de proteína bruta	15
4.4.4. Determinación de grasa bruta	16
4.4.5. Determinación de aminoácidos	16
4.4.5.1. Determinación de aminoácidos totales	16
4.5. Análisis estadístico.....	17
V. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	18
5.1. Efecto de la sustitución de la harina de pescado sobre el crecimiento.....	18
5.2. Parámetros corporales y biométricos	20
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	24
VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción y aprovechamiento del pescado en el mundo (en millones de toneladas). Fuente: Informe SOFIA (2016).....	1
Tabla 2. Formulación y composición nutricional de los piensos experimentales	11
Tabla 3. Resultados globales de crecimiento y aprovechamiento nutritivo de las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales durante 114 días	19
Tabla 4. Composición de la carne de dorada alimentada con niveles crecientes de mezcla de proteínas animales y vegetales al final del período experimental (los datos se expresan como (% de peso húmedo))	20
Tabla 5. Índices biométricos de las doradas alimentadas con diferentes piensos experimentales durante 114 días.	20
Tabla 6. Composición de aminoácidos de las materias primas y de los piensos experimentales.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Volumen de producción de la acuicultura y de la pesca de captura. Fuente: Informe SOFIA (2014).....	2
Figura 2. Contribución relativa de la acuicultura y de la pesca de captura al consumo humano. Fuente: Informe SOFIA (2016).....	2
Figura 3. Ejemplar de dorada.	3
Figura 4. Evolución del peso medio durante el experimento en función de los piensos utilizados.	18
Figura 5. Eficiencia de retención (expresada en porcentaje) de los aminoácidos esenciales de las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales. Añado aquí VPP y VPE??	23

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La acuicultura y su importancia

Según la FAO, la acuicultura se define como “*el cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción*”. La producción de organismos acuáticos para el consumo humano data, según los archivos históricos, del año 2500 a.C. donde los egipcios ya empezaron a utilizar técnicas de pesca más avanzadas. Tras esto, no se había conocido un gran avance en la producción acuícola, hasta hace aproximadamente tres décadas, cuando se empezó a estudiar de manera más intensiva.

La producción acuícola mundial se encuentra en un periodo de auge, a pesar de que también se ha visto afectada por la gran crisis económica de los últimos años, con una tasa de crecimiento anual superior al 6%. Se pasó de una producción de 0,8 millones de toneladas producidas en 1951, a una producción de 101,1 millones de toneladas en 2014, por valor de más de 130 mil millones de euros. (Informe SOFIA 2016)

Este incremento de la producción es debido a que el pescado es un alimento muy saludable y de alta calidad, tiene un gran contenido en aminoácidos, que lo hace similar a las carnes rojas pero con una mayor digestibilidad debido al menor número de tejido conjuntivo. Se trata de animales con poca grasa, que además de calidad ya que es rica en ácidos grasos poliinsaturados. También, son una gran fuente de vitaminas A, B5, B12 y D; y de minerales como yodo, magnesio y fósforo.

Otros factores por los que la producción acuícola ha aumentado tanto en las últimas décadas, son el aumento de la población mundial y el desarrollo económico de Sudamérica y del Sudeste asiático donde la base de la alimentación es el pescado. Estas zonas demandan grandes cantidades de pescado anualmente, lo que ha provocado que se sobreexploten los caladeros y que, por lo tanto, la cantidad de peces disminuya. Es por esto que se buscan nuevas técnicas para poder abastecer la demanda mundial creciente de estos productos (Quass, 2012)

Tabla 1. Producción y aprovechamiento del pescado en el mundo (en millones de toneladas).
Fuente: Informe SOFIA (2016)

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Pesca (capturas)	90,2	90,2	89,1	93,7	91,3	92,7	93,4
Acuicultura	52,9	55,7	59	61,8	66,5	70,3	73,8
Producción total	143,1	145,9	148,1	155,5	157,8	163	167,2
Consumo humano	120,8	123,8	128	130,8	136,9	141,5	146,3
Otros usos	22,3	22,1	20,1	24,7	20,9	21,5	20,9
Población mundial	6,7	6,8	6,9	7	7,1	7,2	7,2
Suministro de peces per cápita (kg)	21,4	21,5	21,5	22,2	22,2	22,6	23,2

Como se puede observar en la Tabla 1, durante estos últimos años, tanto la producción como el consumo de pescado están en alza, aumentando en más de 20 millones de toneladas por año. Debido a las restricciones pesqueras, se observa cómo hay un estancamiento en las capturas, por lo que el aumento de la producción, se debe a la acuicultura. Esta tendencia hace pensar, que dentro de pocos años, el aporte de la acuicultura, superará al aporte por los métodos de pesca tradicionales.

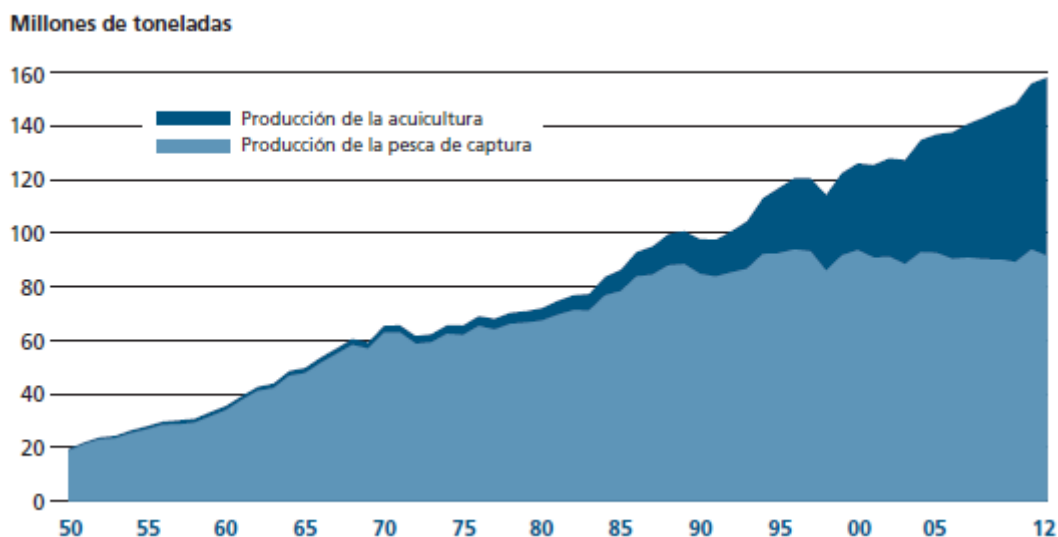


Figura 1. Volumen de producción de la acuicultura y de la pesca de captura. Fuente: Informe SOFIA (2014)

En la Figura 1 se observa, claramente, como durante los últimos 25 años el volumen de producción acuícola ha aumentado hasta constituir prácticamente el 50% de la producción total mundial. Se ve también como la pesca de captura está estabilizada, con una tendencia a disminuir su volumen productivo.

En cuanto al origen del pescado para el consumo humano, se aprecia en la Figura 2, como durante los años 50 el consumo proveniente de la acuicultura era prácticamente inexistente y, con el paso de los años, ha ido incrementando hasta llegar a 10 kg/per cápita, y así igualarse con el consumo de pesca de captura.

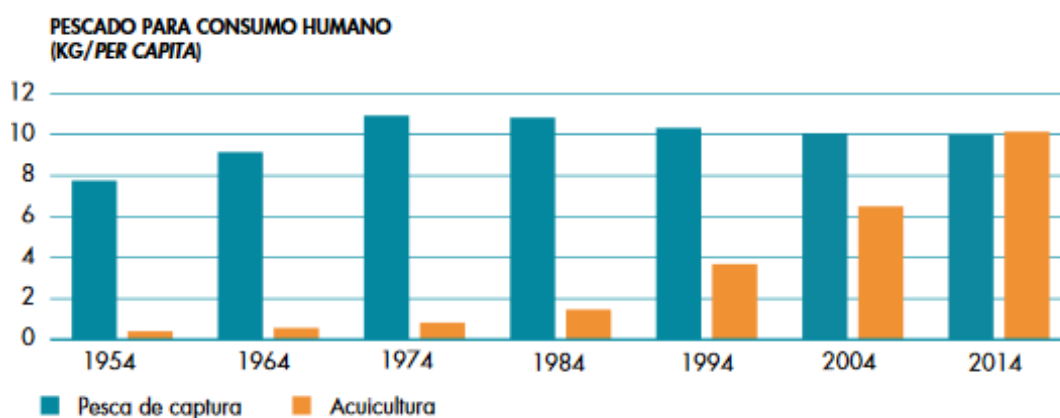


Figura 2. Contribución relativa de la acuicultura y de la pesca de captura al consumo humano. Fuente: Informe SOFIA (2016)

A nivel nacional, durante los últimos 15 años, la producción total de pescado se mantiene estable entre 1 y 1,4 millones de toneladas anuales, aproximadamente un 20% de este pescado proviene de la acuicultura.

La producción de especies marinas es muy superior a la de especies continentales, con una tasa productiva superior a las 50 mil toneladas por año. Existen diferentes especies con gran importancia en el sector, por un lado, la lubina y la dorada, con una producción de más de 20.500 toneladas y más de 15 mil toneladas en 2015 cada una; por otro lado, el rodaballo y el atún rojo, con más de 7000 y 5000 toneladas respectivamente, en 2015. (MAPAMA, 2015).

1.2. La dorada

En castellano, el nombre común de *Sparus aurata*, varía en función del lugar geográfico en el que nos encontremos, se la conoce como dorada, doirada, audara u orada. En francés se llama daurade, y en inglés se la conoce como gilthead seabream, su descripción taxonómica es la siguiente:

Reino: Metazoa

Serie: Deuterostomia

Filo: Chordata

Subfilo: Gnathostomata

Superclase: Peces

Clase: Actinopterygii

Subclase: Teleostei

Superorden: Neognathi

Orden: Perciformes

Suborden: Percoidei

Familia: Sparidae

Género: *Sparus*

Especie: *aurata*



Figura 3. Ejemplar de dorada.

La dorada (Figura 3) tiene un color gris perlado, con una mancha negra al principio de la línea lateral y que se extiende por la parte superior del opérculo. Posee un cuerpo oval, comprimido y alargado hacia la cola; una cabeza curvada y grande, con la boca en la parte baja de esta y ojos pequeños. Tiene de cuatro a seis dientes anteriores seguidos por dientes romos parecidos a los molares que se disponen entre dos y cuatro filas. Presenta además una banda dorada entre los ojos, la cual da nombre al pez. Tiene sólo una aleta dorsal, en la que se observan dos partes, una espinosa y la otra con radios blandos. La aleta caudal tiene forma de horquilla con bordes negros. Sus aletas pectorales son de gran tamaño y las ventrales poseen cinco radios blandos y una espina.

Una dorada salvaje, puede llegar a un tamaño de aproximadamente 70 centímetros y un peso que puede superar los 8 kilogramos.

Se trata de un pez que podemos encontrar sobretodo en las costas del este del océano Atlántico, en el mar Mediterráneo, en el mar Egeo y en el mar Adriático. También se puede encontrar, en menor medida en el mar del Norte, en el mar Negro y en el mar Rojo.

Se trata de una especie eurihalina, por lo que puede vivir tanto en un ambiente marino, como en aguas salobres. También es euriterma, por lo que el rango de temperaturas a las cuales puede vivir es muy amplio, siendo su límite letal más bajo de 12°C y siendo su temperatura óptima para la producción entre 20 y 24°C. Suelen encontrarse en los fondos rocosos y en praderas de posidonia, a profundidades generalmente inferiores a los 50 metros.

1.3. Alimentación en acuicultura

La industria de la fabricación de piensos tiene una importancia vital para este sector, ya que los gastos de alimentación en una granja acuícola suponen más del 50% de los gastos de producción (De Benito *et al.*, 2012). Es por esto, que desde que comenzó el auge de la acuicultura, esta industria creció a la par, pasando de una producción de 6,8 millones de toneladas de pienso en 2010, a una producción estimada de 16 millones de toneladas en 2020, lo que supone un crecimiento del 11% anual.

Inicialmente, y debido a la naturaleza carnívora de la gran mayoría de los peces que se producen en acuicultura, estos piensos estaban formulados en base a harinas y aceites de pescado, que se obtenían a partir de pescado de menor valor comercial o de subproductos de la pesca, lo que provocaba una dependencia de la acuicultura respecto a la pesca de captura, llevando al consiguiente problema medioambiental, de disminución de las poblaciones pelágicas marinas, sobreexplotación de caladeros y contaminación atmosférica debido a los gases emitidos por los barcos y la maquinaria.

El crecimiento de la producción acuícola en los últimos años ha desencadenado una demanda de harinas y aceites de pescado, si a esto se suma la disminución de la oferta de estos productos por las mayores restricciones a los barcos pesqueros y la destrucción de los caladeros por la sobrepesca, obtenemos que el precio de estos productos se ha visto multiplicado por seis en los últimos 15 años (Informe SOFIA, 2014)

1.4. Fuentes proteicas y lipídicas alternativas a la harina y aceite de pescado

A los problemas citados anteriormente, a la utilización de harinas de carne (provenientes de la ganadería terrestre) junto a harinas de pescado como principales fuentes proteicas de los piensos, se suma otro factor que fue muy importante, la aparición de la encefalopatía espongiiforme bovina en los años 90, lo que provocó la prohibición del uso de materias primas de origen animal en los piensos dirigidos a la producción de animales para consumo humano. Debido a esto, se tuvieron que buscar fuentes proteicas alternativas que no fueran de origen animal.

1.4.1. Antecedentes

Al principio, y tratando de resolver esta problemática, se realizaron ensayos de alimentación donde se buscaba sustituir parcialmente la harina de pescado por otro tipo de materias primas, sin que esto afectase a la salud ni al crecimiento de los peces.

En general en las especies carnívoras, y en concreto en la especie objeto de estudio, la dorada, una de las materias primas que más se utiliza y sobre la que más se ha estudiado, es la harina de soja. Esto es porque se trata de una fuente nutritiva de origen vegetal, y que además contiene un alto porcentaje de proteína. En estos estudios, los resultados mostraron que se podía sustituir un

40% de harina de pescado por harina de soja sin afectar al crecimiento de la dorada (Martínez-Llorens *et al.*, 2007, 2009).

En experimentos posteriores, se intentó aumentar el porcentaje de sustitución realizando mezclas de diferentes harinas vegetales, para tratar de sustituir el 100% de los derivados de pescado en los piensos para peces. Tanto cuando la harina de pescado se sustituía por una sola fuente proteica (como la soja) o por una mezcla de varias, era necesario suplementar el pienso con aminoácidos sintéticos, con el fin de paliar las deficiencias en aminoácidos esenciales, especialmente los más limitantes para la nutrición de peces (lisina y metionina).

Así, se pudo comprobar que en dorada se podía llegar a un nivel de sustitución de la harina de pescado del 60% sin que hubiesen efectos negativos sobre el crecimiento (Sánchez Lozano *et al.*, 2011).

Finalmente, se ensayaron piensos con sustitución total de materias primas de origen vegetal (Kissil y Lupatsch 2004 y Monge-Ortiz *et al.*, 2016). En el caso concreto de estos dos trabajos, el crecimiento no se vio afectado por la sustitución total de la harina de pescado, pero para ello, los piensos se formularon con altos niveles de aminoácidos sintéticos, lo que los hizo poco económicos. Además, en estas pruebas no se estudiaron las consecuencias a largo plazo que podrían tener en los animales.

Si bien, sí que se encontraron alteraciones en el intestino a partir del 64% de sustitución que provocaban una caída de los valores de digestibilidad (Martínez-Llorens *et al.*, 2012). Todas estas afecciones, se deben especialmente a los componentes anti-nutritivos (taninos, ácido fítico, lecitinas, saponinas, inhibidores de proteasas, alérgenos) que contienen las fuentes proteicas vegetales, los cuales, producen una alteración intestinal que desencadena cambios en la microbiota intestinal (Estruch *et al.*, 2015) y alteraciones en el sistema inmune (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta los problemas causados por el uso de materias primas vegetales en los piensos, sobre todo por la deficiencia de aminoácidos esenciales (cuya adición encarece el precio de los piensos) y los factores anti-nutritivos que poseen estas materias primas para los peces, se planteó incluir materias primas de origen animal, más concretamente de animales terrestres, ya que estas presentan similitudes con la harina de pescado y tienen menor contenido de factores anti-nutritivos. Debido a estas similitudes, cabría esperar que los resultados productivos mejoraran, y que los porcentajes de sustitución pudieran ser mayores. Estos estudios se retomaron en 2003, ya que la normativa europea cambió, y se permitió el uso de harinas de hemoderivados (de animales no rumiantes) en pienso para animales no rumiantes (COMMISSION REGULATION (EC) No 1234/2003) y en 2013, se permitió el uso de harinas de carne, siempre y cuando se siguiesen unos protocolos para el tratamiento de la materia (COMMISSION REGULATION (EU) No 56/2013).

Para realizar estos estudios, se utilizaron principalmente harinas de carne, huesos y sangre, de cerdo y pollo en su mayor parte, siempre procedentes de animales no rumiantes. En uno de estos estudios, se observó que con una inclusión del 5% de harina de sangre se llegaba a sustituir un 15% de harina de pescado sin que los parámetros de crecimiento se vieran afectados (Martínez-Llorens *et al.*, 2008). En experimentos posteriores también se ha observado, que una sustitución del 50% de harina de pescado podría llevarse a cabo, si se incluía en el pienso entre un 30% y un 41% de harina de carne y hueso (Nengas *et al.*, 1999; Moutinho *et al.*, 2016).

1.5. Utilización de aditivos

Con el objetivo de paliar los efectos negativos de las fuentes proteicas alternativas, actualmente, se están incluyendo aditivos que puedan favorecer la asimilación de los piensos, para que el aprovechamiento por parte de los peces sea mayor, también para mantener el equilibrio de bacterias beneficiosas para la salud intestinal o bien aportándolas mediante estos. Existe una gran variedad de estos aditivos, que pueden tener tanto origen animal como vegetal, y se clasifican en varios grupos: prebióticos, probióticos, nucleótidos,...

Uno de ellos son las microalgas marinas, que se consideran como un posible aditivo debido a sus propiedades físico-químicas y a su facilidad para ser cultivadas.

Las microalgas son microorganismos heterótrofos fotosintéticos, que se encuentran en la base de las cadenas alimentarias acuáticas por lo que es un recurso al cual, directa o indirectamente, los peces están acostumbrados a él. Estas microalgas tienen un perfil ideal de proteína, muchos aminoácidos libres, un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y son ricas en carbohidratos, minerales y vitaminas (Cerezuela, 2012).

En animales terrestres, se ha observado que la inclusión de microalgas en los piensos favorece el sistema inmune de éstos e incluso han sido capaces de reducir los daños por enfermedades gastrointestinales. Además de esto, se han estudiado ciertas macroalgas como probióticos y prebióticos en nutrición tanto humana como animal (Cerezuela, 2012).

A pesar de todo esto, no existen muchos estudios sobre la inclusión de microalgas en los piensos para peces como aditivo. En estos trabajos se observó que en pequeñas cantidades, los valores de crecimiento, eficiencia de retención y salud de los peces se veían favorecidos; mientras que con grandes aportes de estas algas se observaba lo contrario (Sáez *et al.*, 2013; Cerezuela, 2012). Esto podría deberse a ciertos factores anti-nutritivos que poseen las algas.

En el caso del alga de nuestro estudio: *Isochrysis galbana*, no se han realizado demasiados estudios previos, que determinen su eficacia como aditivo en piensos para peces. Y estos estudios, sólo se han centrado en cómo podría afectar a los peces en estado de larva (Heba *et al.*, 2014).

Justificación y Objetivos

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La producción de la dorada es una de las más importantes en la acuicultura europea, pero en los últimos años se ha visto frenada por la crisis que ha afectado a este sector y que ha producido una bajada de los ingresos en las granjas acuícolas.

Es por esto, que producir piensos comerciales con el mínimo coste, sin que estos afecten a sus datos productivos, es de vital importancia ya que la alimentación supone más de la mitad de los gastos de una explotación. Por ello, en los últimos años las investigaciones en acuicultura se centran en estudiar fuentes alternativas de la harina y el aceite de pescado, ingredientes más caros de los piensos de especies carnívoras, que no perjudiquen al crecimiento y la salud de esta especie.

En trabajos anteriores se ha demostrado, que es posible realizar una sustitución de los derivados de pescado, si bien, se debe seguir profundizando para conseguir paliar los efectos negativos que estas sustituciones tienen sobre la fisiología de los peces, debido sobre todo a los factores anti-nutritivos que poseen las harinas de origen vegetal.

Debido a estos factores, también se está estudiando la inclusión de aditivos en los piensos, que puedan ser capaces de mejorar su digestibilidad y que consigan paliar los efectos negativos de dichos factores anti-nutritivos.

Por todo ello, el objetivo principal de este estudio, es conocer la máxima sustitución de la harina de pescado por una mezcla de harinas animales y vegetales sin que se perjudique el crecimiento y los parámetros nutritivos de la dorada. De igual forma, en estudiar el efecto sobre estos mismos parámetros de un aditivo, el alga *I. galbana*, en los piensos con sustitución total.

Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción de la instalación

El experimento se realizó en el Laboratorio de Acuicultura (LAC), del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València. Este laboratorio está dividido en 3 líneas independientes, por lo que se pueden llevar a cabo 3 experimentos distintos a la vez. En nuestro caso, para realizar el experimento, utilizamos 15 de los 18 tanques que tiene la línea 2.

➤ 3.1.1. Tanques

La instalación tiene 44 m³ de agua marina para la recirculación de agua del sistema. Esta se renueva con la eliminación de agua ya gastada, por agua nueva traída del mar.

La línea 2 está compuesta de 18 tanques cilíndricos de fibra de vidrio, con una capacidad de 1750 litros por tanque. Los tanques están dispuestos en 2 filas, con acceso al sistema de circulación de agua y aire, y también al sistema de desagüe. Cada tanque cuenta con un aireador que suministra el aire necesario para los peces. Este aireador puede ser regulado de manera individualizada, en función de los requerimientos que necesite cada uno de los tanques. En cuanto al sistema de circulación de agua, a pesar de estar todos los tanques conectados a una tubería principal, cada uno tiene tuberías independientes que permiten regular el caudal.

➤ 3.1.2. Sistema de bombeo

Se trata de una línea de grandes dimensiones en circuito cerrado, por lo que es necesario recircular el agua. Para ello, el laboratorio cuenta con diferentes bombas para poder mantener el sistema en marcha. Son 3 las bombas utilizadas, todas ellas cuentan con una válvula de pie que evita la entrada de aire en el sistema, ya que podría dañar el circuito.

Las bombas son:

2 bombas de tipo 1: son las encargadas de llevar el agua del aljibe a los tanques y al biofiltro.

1 bomba de tipo 2: se encarga de llevar el agua hacia el sistema de termorregulación.

➤ 3.1.3. Sistema de depuración de agua

Debido a la recirculación del agua en el sistema, este necesita tener ciertos mecanismos para mantener el agua limpia, ya que no se puede traer constantemente agua marina. Para ello, el laboratorio cuenta con 2 filtros, que se encargan de la depuración del agua. Los filtros son, uno mecánico, y otro biológico.

Filtro mecánico:

Es un filtro de tambor rotatorio, que se encarga de eliminar las partículas sólidas de más de 70 micras. Este tipo de filtro es muy recomendable tenerlo en circuitos cerrados, debido a su gran eficacia. Se sitúa antes de la bomba, para así evitar obstrucciones en esta. El filtro recoge toda el agua que sale de los tanques, esta es conducida por las canaletas hasta una tubería que llega al interior del filtro. Este filtro se compone de una malla muy fina, que es capaz de retener todas las partículas sólidas que pudieran estar en el agua. Dispone también de un sistema de limpieza que detecta cuando la malla está obstruida, porque el nivel de agua en el interior del filtro aumenta, en ese momento el mecanismo de limpieza se activa, y el filtro gira mientras que un chorro de agua a presión limpia la malla. Todos estos residuos se recogen en un tanque de desechos.

Biofiltro:

Se trata de un sistema de filtración con ayuda de bacterias. Consiste en un depósito de 24 m³, en el cual se introducen unas biobolas, que se encargan de fijar en sus paredes las bacterias.

Las bacterias en cuestión son de 2 tipos:

Nitrosomonas: se encargan de transformar el amonio en nitritos.

Nitrobacter: oxidan los nitritos convirtiéndolos en nitratos, que son menos tóxicos para los peces.

➤ **3.1.4. Sistema de canalización de agua**

3.1.4.1. Canaletas

Las canaletas son utilizadas para llevar el agua que sale de los tanques hacia el biofiltro y el aljibe, conectan todos los tanques entre sí. Sus dimensiones son de 20x40 cm y una pendiente descendente del 0,5%.

3.1.4.2. Tuberías

Las tuberías se encargan de llevar el agua del aljibe hasta los tanques, unas bombas de propulsión llevan el caudal necesario hasta cada tanque. Por otro lado, otro sistema de tuberías lleva el agua hasta el intercambiador de placas, para su calentamiento o refrigeración estas son más pequeñas, para aumentar la presión de llegada del agua. En la instalación se utilizaron 2 tipos de materiales para las tuberías, polipropileno y polietileno, se utilizaron estos materiales ya que son capaces de soportar grandes presiones. A pesar de ello, el sistema se sobredimensionó para evitar problemas.

3.1.4.3. Sistema de aireación

El sistema de aireación se divide en dos subsistemas diferenciados:

- Bomba electrosoplante: a través de una bomba se introduce el aire en el sistema, por medio de unas gomas porosas que producen burbujas de aire de pequeño tamaño, lo que aumenta el contenido de oxígeno disuelto para que los peces puedan disponer de él. Se trata de una bomba de 2 kW de potencia.
- Sistema de oxigenación: el oxígeno se introduce directamente desde unas bombonas de oxígeno a alta presión, que se encuentran en la parte exterior de la instalación. Este es un sistema de aireación de emergencia, en caso de que el anterior sistema mencionado fallase o que se fuese la luz de la instalación.

3.1.4.4. Sistema de emergencia

Se trata de un sistema de vital importancia para la instalación, ya que si se produjese algún fallo en el sistema principal, existe una alarma conectada a los responsables del LAC, para avisar si ocurriese cualquier problema. Este sistema de emergencia se compone de 4 elementos que se accionan automáticamente en caso de fallo del sistema principal, estos elementos son:

- Generador eléctrico: encargado de suministrar energía a las bombas.
- Grupo de electroválvulas de oxígeno: encargado de suministrar el oxígeno necesario a cada tanque.
- Botellas de oxígeno: suministrar oxígeno en caso de fallo de las electroválvulas.
- Bombas electrosoplantes de reserva.

Diseño experimental

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1. Peces

Para este experimento, se adquirieron doradas con un peso medio de 50 g, a la empresa Maremar, situada en Sagunto. Los animales se recogieron de la empresa y se transportaron al laboratorio de Acuicultura de la UPV (LAC) en un arcón oxigenado. Una vez en el laboratorio, se introdujeron en los tanques de manera aleatoria, y se procedió a realizar un periodo de aclimatación de 15 días. Una vez pasado este periodo de aclimatación, se realizó el muestreo de inicio del experimento, se pesaron todos los peces y se repartieron en los tanques, a razón de 24 peces por tanque, con un peso medio al inicio del experimento de 64 g.

Una vez que se realizó la distribución, se comenzó la alimentación. Durante el periodo de aclimatación, los animales se alimentaron con su pienso comercial habitual que nos suministró la empresa.

4.2. Piensos experimentales

Para este experimento, los piensos se fabricaron mediante un proceso de cocción – extrusión en la fábrica de piensos experimentales del Departamento de Ciencia Animal de la UPV. Para ello se utilizó un extrudersemi-industrial de la casa Clextral, modelo BC45.

Se formularon 5 piensos en los que había distintos porcentajes de sustitución de harina de pescado por la mezcla de harina de cerdo ibérico y harinas vegetales.

Estos piensos son:

- FM100: Pienso control, el 100% de la proteína procedía de la harina de pescado.
- FM25: Pienso con una sustitución del 75% de harina de pescado por la mezcla de harina de cerdo ibérico y harinas vegetales.
- FM10: Pienso con un 90% de sustitución de harina de pescado por la mezcla de harina de cerdo ibérico y harinas vegetales.
- FM0: Pienso con un 100% de sustitución de harina de pescado por la mezcla de harina de cerdo ibérico y harinas vegetales.
- FM0+: Pienso con un 100% de sustitución de harina de pescado por la mezcla de harina de cerdo ibérico y harinas vegetales, y una adición de 50 gKg⁻¹ del alga *Isochrysis galbana*.

La formulación y la composición nutricional de los piensos se muestran en la Tabla 2

Tabla 2. Formulación y composición nutricional de los piensos experimentales

	Piensos ¹				
	FM100	FM25	FM10	FM0	FM0+
Materias Primas (gKg⁻¹)					
Harina de pescado	590	150	60		
Trigo	259	56	14		
Alga ²					50
Torta de Soja		171	206	220	206
Harina de guisante		101	122	129	111
Harina de girasol		101	122	129	111
Harina de carne de cerdo ibérico		237	288	328	328
Aceite de soja	96	56	50	41	41
Aceite de pescado	45	85	90	100	100
Fosfato Cálcico		28	33	38	38
Metionina		5	5	5	5
Corrector vitamínico y mineral ³	10	10	10	10	10
Composición nutricional(% Materia seca)					
Materia seca (%MS)	90,9	91,7	90,5	90,9	90,3
Proteína bruta (%PB)	47,2	46,5	47,1	47,0	46,0
Grasa bruta (%GB)	19,9	19,1	18,6	18,7	19,5
Cenizas (%C)	11,1	5,6	4,4	3,8	5,1
Carbohidratos (%CHO) ⁴	21,8	28,9	29,9	30,5	29,4

1: Diferentes piensos experimentales.

2: Alga *Isochrysis galbana*.

3: Corrector vitamínico y mineral: 25; Colina, 10; DL-a-tocoferol, 5; ascorbicacid, 5; (PO⁴)₂Ca₃, 5. Composición premezcla: acetato de retinol, 1 000 000 UI kg⁻¹; calcipherol, 500 UI kg⁻¹, DL-a-tocoferol, 10, bisulfito de sodio menadiona, 0,8; clorhidrato de tiamina, 2,3, rivo-flamina, 2,3, clorhidrato de piridoxina, 15; cianocobalamina, 25, nicotinamida, 15, ácido pantoténico, 6, ácido fólico, 0,65; biotina, 0,07; ácido ascórbico, 75, inositol, 15; betaína, 100; 12 polipéptidos.

4: Carbohidratos, CHO (%) = 100-%PB-%GB-%C.

A la hora de formular los piensos hay que cubrir las necesidades mínimas de los peces. Al sustituir la harina de pescado por la mezcla de harina de cerdo ibérico y harinas vegetales se observó un déficit de metionina, por lo que hubo que añadir 5 gKg⁻¹.

4.3. Rutina de trabajo

➤ 4.3.1. Revisión general de la instalación

Diariamente, se debían revisar todos los sistemas de la instalación para comprobar el correcto funcionamiento de ésta. Para ello, se rellenaba un estadillo de control, si todo estaba correcto, se daba por finalizada la revisión.

➤ **4.3.2. Alimentación de peces**

La alimentación se realizaba dos veces al día, excepto los domingos que no se alimentaba, y los sábados, que sólo se daba una toma. Para regular las tomas se fijó un horario.

Este horario era:

- 1º toma a las 9:00h
- 2º toma a las 17:00h

En cada toma se alimentaba hasta saciedad aparente y después de alimentar, se pesaba la cantidad de pienso que habían consumido para poder calcular la ingestión diaria.

➤ **4.3.3. Control de calidad del agua. Parámetros físico-químicos**

Durante toda la duración del experimento se realizaron controles de los parámetros físico-químicos al agua para determinar su calidad. Estos controles se realizaban 2 veces por semana.

Para realizar estos controles, se utilizaron los siguientes instrumentos:

- Test colorimétricos: Amonio, nitratos y nitritos.
- Oxímetro portátil: Temperatura y oxígeno.
- pH metro digital:pH.
- Refractómetro: Salinidad.

➤ **4.3.4. Control de crecimiento**

Los parámetros de crecimiento que se calcularon fueron:

- Tasa de crecimiento instantáneo:

$$TCI = \frac{\ln (Pf) - \ln (Pi)}{t} * 100$$

Donde:

Pf = peso medio final (g)

Pi = peso medio inicial (g)

t = tiempo (días)

- Índice de conversión del alimento:

$$ICA = \frac{Ingesta}{Bf - Bi}$$

Donde:

Bf = biomasa final

Bi = biomasa inicial

- Tasa de alimentación diaria:

$$TAD = \frac{Ingesta}{(Bf - Bi)^{\frac{t}{2}}} * 100$$

➤ **4.3.5. Controles finales. Biometrías e índices biométricos**

Para concluir el experimento, se tomaron 5 peces al azar de cada tanque para poder determinar los diferentes parámetros corporales. Los peces fueron sacrificados con una dosis letal de esencia de clavo (150 mg/l).

De cada pez se tomaron los datos del peso, de la longitud total, del peso de la canal, del peso del hígado y del peso de la grasa visceral. A partir de estos datos, se calcularon los siguientes índices biométricos:

- Factor de condición:

$$FC = \frac{\text{Peso total}}{\text{Longitud total}^3} * 100$$

- Índice viscerosomático:

$$IVS = \frac{\text{Peso total} - \text{Peso canal}}{\text{Pesototal}} * 100$$

- Índice de grasa visceral:

$$IGV = \frac{\text{Pesograsa visceral}}{\text{Pesototal}} * 100$$

- Índice hepatosomático:

$$IHS = \frac{\text{Peso hígado}}{\text{Pesototal}} * 100$$

➤ **4.3.6 Eficiencias de retención**

- Valor Productivo de la Proteína:

$$VPP = \frac{(\text{Proteína final pez} \times \text{Biomasa final (g)}) - (\text{Proteína inicial pez} \times \text{Biomasa inicial (g)})}{\text{Ingesta (g)} \times \text{Proteína pienso}} * 100$$

- Valor Productivo de los Aminoácidos:

$$VPAA = \frac{(\text{Amino ácido final pez} \times \text{Biomasa final (g)}) - (\text{Amino ácido inicial pez} \times \text{Biomasa inicial (g)})}{\text{Ingesta (g)} \times \text{Amino ácido pienso}}$$

4.4. Análisis químicos

Se realizan los análisis de las muestras por triplicado, para poder tener unos resultados fiables. Estas muestras se obtuvieron de triturar y mezclar los peces enteros, para que estas fueran lo más homogéneas posible. Dependiendo del tipo de análisis a realizar, se necesitan muestras frescas o liofilizadas. Las muestras frescas se guardaron en botes correctamente rotulados y se conservaron en frigorífico a 5°C. Para la obtención de muestras liofilizadas se coloca la muestra fresca en una placa y se introduce en un congelador a -80°C. Una vez congeladas, las placas se meten en el liofilizador, y este se encarga de extraer toda la humedad que haya en las muestras. Una vez obtenidas las muestras liofilizadas, se trituran y mezclan bien para su conservación en los correspondientes botes rotulados.

➤ 4.4.1. Determinación de materia seca

Para determinar el contenido de humedad de una muestra, se determina el contenido de materia seca de esta. Para ello, se pesa un crisol, y se pone en una estufa a 105°C durante 24 horas, tras este periodo, el crisol elimina toda la humedad que pudiera tener por lo que su peso se estabiliza. Tras sacarlo de la estufa, este se deja enfriar en un desecador durante 30 minutos aproximadamente y se pesa en una balanza de precisión de 0,0001 gramos. Introducimos 2,5 gramos de muestra fresca en el crisol, y volvemos a introducir en la estufa, para que esta se deshidrate. Pasadas 24 horas, el crisol se volverá a introducir en el desecador para enfriarse, y se pesará.

El cálculo a realizar para obtener el porcentaje de materia seca de la muestra es el siguiente:

$$\%MS = \frac{C-A}{B-A} * 100$$

Donde:

A= Peso crisol

B= Peso crisol + muestras fresca

C= Peso crisol + muestra seca

➤ **4.4.2. Determinación de cenizas**

La determinación de las cenizas se realiza tras calcinar la muestra. Para obtener las cenizas se pesa el crisol desecado con la muestra húmeda. Seguidamente, colocamos el crisol sobre una placa calefactora durante 20 minutos para que al meterlo en la mufla no genere humo, y tras esto, introducimos el crisol en la mufla a 550°C durante 5 horas.

Sacamos el crisol de la mufla, los dejamos enfriar en un desecador y pesamos.

El cálculo a realizar para obtener el porcentaje de cenizas de la muestra es el siguiente:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{D-A}{B-A} * 100$$

Donde:

A= Peso crisol

B= Peso crisol + muestra fresca

D= Peso crisol + cenizas

➤ **4.4.3. Determinación de proteína bruta**

Para determinar el contenido en proteína de una muestra utilizamos la maquina Leco CN628. Esta utiliza el método Dumas para obtener la cantidad de nitrógeno que tiene la muestra.

Para determinar esta cantidad de nitrógeno, la muestra se mezcla y se calienta con óxido de cobre en una atmosfera con dióxido de carbono. Se forman gases que son reducidos por el cobre y el nitrógeno molecular se determina por medición volumétrica.

Las mediciones se realizan introduciendo 0,25 gramos de muestra liofilizada en pequeños envoltorios de papel de aluminio que se introducen en la máquina. Los resultados de nitrógeno son proporcionados directamente por el Leco CN628.

➤ **4.4.4. Determinación de grasa bruta**

- 1) Coger el sobre con pinzas, tarar la balanza y pesar el sobre. Anotar el peso del sobre.
- 2) Coger el sobre, colocarlo sobre un papel limpio, y rotular con lápiz el número de la muestra en una esquina.
- 3) Añadir 0,5gr (menos si la cantidad de grasa es muy alta) de muestra liofilizada en el sobre, colocando el mismo sobre el tubo de plástico. NO apuntar el peso. Cerrar el sobre con la selladora, y meter la punta de la espátula para comprobar que está bien cerrado.
- 4) Colocar los sobres en la estufa durante 24h.
- 5) Sacar los sobres de la estufa, colocarlos en un desecador y dejar que enfríen (5-10 minutos).
- 6) Pesar los sobres y anotar el peso de sobre + muestra seca.
- 7) Colocar las muestras en el ANKOM
- 8) Cuando el proceso haya finalizado, colocar de nuevo los sobres en la estufa, durante 24h.
- 9) Pesar los sobres y anotar el peso de sobre + muestra desengrasada.

$$\% \text{GB} = \frac{(A-D-B)-(C-B)}{A-B} * 100$$

Donde:

A= Peso sobre + muestra húmeda

B= Peso bolsa

C= Peso bolsa + muestra sin grasa

D= Peso del agua

➤ **4.4.5. Determinación de aminoácidos**

Para medir los aminoácidos de una muestra, se deben utilizar 2 métodos. El primer método es la determinación de aminoácidos totales, y el segundo es la determinación de la metionina y cisteína previa oxidación perfórmica. Este segundo método debe realizarse, ya que con el primero, no somos capaces de determinar la cantidad de metionina y cisteína que tiene la muestra.

4.4.5.1. Determinación de aminoácidos totales

- 1) Pesar una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 25 mg de proteína bruta e introducirla en un tubo Pyrex con tapón de rosca y sello de teflón. Añadir 5 ml de HCl 6N y mezclar.
- 2) Burbujear N₂ seco en cada tubo 1 min para desplazar el aire y pesar los tubos.
- 3) Cerrar bien los tubos (comprobar que el sello de teflón está correctamente situado) y mantener en estufa o bloque calefactor a 110°C durante 23 horas, agitando de vez en cuando.
- 4) Enfriar los tubos a temperatura ambiente, pesarlos y compensar si hay disminución de peso con HCl 6N y filtrar su contenido a través de papel de filtro, empleando un embudo de vidrio y un matraz aforado de 250 ml.
- 5) Añadir 1 ml de la solución de patrón interno (50 mM de alfa-aminobutírico en HCl 0,1 N → pesar 250 mg ABA en un aforado de 50 ml y enrasar con HCl 0,1 N) al matraz de 250 ml, enrasar con agua miliQ y mezclar bien.
- 6) Filtrar con filtro de jeringa de 0,2 μm 1 ml de dicha solución y utilizar 10 μl del filtrado para derivatizar según el método del AQC.
- 7) Derivatización AQC: tomar 10 μl de muestra + 70 μl de tampón borato y agitar durante 10 seg., añadir 20 μl de AQC y agitar de nuevo.
- 8) Pinchar 5 de las muestras en el HPLC

4.4.5.2. Determinación de la metionina y cisteína previa oxidación per fórmica

- 1) Pesar lo correspondiente a 25 mg de proteína en un matraz redondo de fondo plano con tapón esmerilado y cierre metálico de 100 ml.
- 2) Preparación ácido per fórmico*: (solución extemporánea)
 - i. 1 volumen de H₂O₂ al 30%
 - ii. 9 volúmenes de ácido fórmico al 98%
- 3) Dejar reposar 1 hora en campana extractora y almacenar en refrigeración (al menos 1 hora).
- 4) Añadir 4 ml de ácido per fórmico*, un agitador magnético y cerrar el matraz.
- 5) Agitar en refrigeración durante 16 h a 4 °C.
- 6) Parar la reacción añadiendo 0,6 ml de ácido bromhídrico al 47 % y agitando durante 15 min.
- 7) Evaporar a sequedad en rotavapor.
- 8) Añadir 5 ml de HCl 6 N, burbujear N₂ seco durante 1 min, pesar los matraces e hidrolizar durante 23 horas en estufa a 110 °C.
- 9) Seguir los pasos 4-8 de la determinación de aminoácidos totales.

4.6. Análisis estadístico

Para realizar el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el programa estadístico *Statgraphics Centurion*.

Para hallar diferencias entre las variables de los distintos piensos, se realizó un análisis estadístico de varianza multivariante mediante un ANOVA simple. Se expresaron los resultados como la media más/menos el error estándar de esta, se indicó también el número de observaciones de cada análisis (n).

La inferencia se realizó con un riesgo de primera especie igual a 0,05 (intervalo de confianza del 95%).

Resultados y discusión

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Efecto de la sustitución de la harina de pescado sobre el crecimiento

La evolución del peso durante el experimento se muestra en la Figura 4, donde se observan unas curvas de crecimiento muy distintas en función del pienso ingerido. Los peces alimentados con el pienso FM0 presentaron un crecimiento inferior desde el primer mes del experimento.

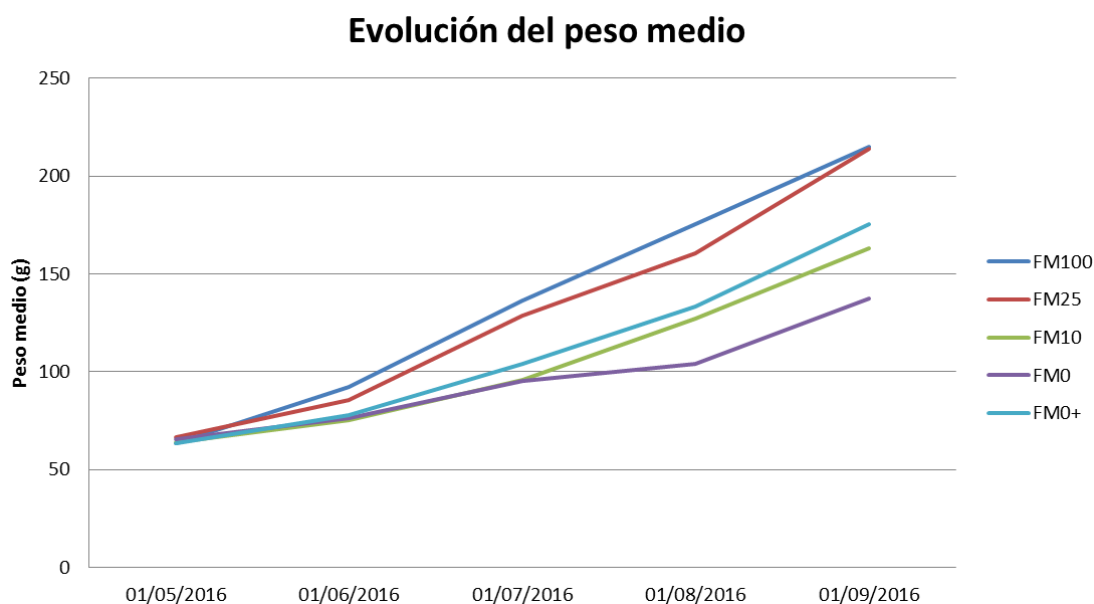


Figura 4. Evolución del peso medio durante el experimento en función de los piensos utilizados.

En cuanto a los resultados obtenidos al final del experimento, se puede observar que existen diferencias significativas en cuanto al peso medio final (Tabla 3) en función del pienso con el que se alimentaron. Los peces alimentados con los piensos FM100 y FM25 presentaron un peso final significativamente mayor (217,8 g y 208,2 g, respectivamente) que el resto de los grupos alimentados con el resto de piensos experimentales (con más de un 90% de sustitución), en los cuales el crecimiento disminuyó de manera drástica. Este detrimento del crecimiento se observó especialmente en el pienso con la sustitución total de harina de pescado, cuyo peso medio final fue significativamente menor que con el resto de piensos (134,9 g). Del mismo modo, la Tasa de Crecimiento Instantánea (TCI), sigue la misma tendencia en cuanto a resultados que el peso final. Se puede observar como el TCI disminuye conforme aumenta la sustitución de la harina de pescado en el pienso. Los peces alimentados con los piensos FM100 y FM25 obtuvieron valores significativamente más altos de TCI (1,07 % día⁻¹ y 1,03 % día⁻¹, respectivamente) que los alimentados con el resto de piensos. Contrastando estos resultados con trabajos previos llevados a cabo con doradas alimentadas con altos niveles de sustitución de harina de pescado por una mezcla de fuentes proteicas vegetales, los peces alimentados sin harina de pescado obtuvieron el mayor crecimiento (Monge-Ortiz *et al.*, 2016). Esta mejora del crecimiento puede deberse al alto contenido en aminoácidos sintéticos en los piensos sin harina de pescado. Esto, aunque resultó efectivo desde el punto de vista del crecimiento, encareció mucho el precio de estos piensos, siendo no rentable su fabricación a escala comercial, ya que resultan más caros que los piensos con un 100% de harina de pescado. Estos mejores resultados, podrían deberse

también al mayor tamaño de los peces, por lo que sus requerimientos son más bajos debido a que su crecimiento es más bajo.

Sin embargo, en otros estudios, sí se ha observado el mismo efecto negativo de la sustitución de harina de pescado por mezclas de harinas vegetales, como es el caso de Gómez-Requeni *et al.*, (2003), donde observaron que no es recomendable sustituir la harina de pescado por la mezcla ensayada debido a una falta de palatabilidad de los piensos con harinas vegetales. Sin embargo, este efecto en la falta de palatabilidad no ha sido observado en el presente experimento donde se observó una buena aceptabilidad del pienso por parte de los peces.

Si se comparan estos resultados con otros experimentos llevados a cabo con doradas alimentadas con fuentes proteicas animales en lo que a la TCI se refiere, los peces tuvieron una TCI entre 1,73 y 2,4 (% día⁻¹) considerablemente mayor que los obtenidos en el presente experimento (Martínez Llorens *et al.*, 2007 y Nengas *et al.*, 1999). Si bien, estos dos estudios se llevaron a cabo con animales en distinto estado de desarrollo, cuanto menor es el tamaño del pez mejores resultados de crecimiento tiene. Pero además, los niveles de sustitución de harina de pescado no fueron superiores al 50%. A pesar de esto, el crecimiento obtenido en la prueba ha sido adecuado y dentro de la media de crecimiento de la especie objeto de estudio.

En cuanto a la inclusión del aditivo, se puede observar que el pienso al que se le añadió el alga *I. galbana* (FM0+), obtuvo unos resultados de crecimiento (177,8 g) muy superiores a los de su homólogo sin esta alga (FM0) (134,9 g). Igualmente, los peces alimentados con el pienso FM0+ presentaron una TCI (0,89 % día⁻¹) similar a la de los peces alimentados con el pienso FM10 (0,81 % día⁻¹), y significativamente mayor que el pienso sin dicho aditivo (0,65 % día⁻¹). Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en lubina (Heba *et al.*, 2014), en los que se han utilizado algas como aditivos. Esta mejora en el crecimiento puede ser atribuible a los efectos antiinflamatorios de las algas (Cerezuela *et al.*, 2012), lo cual puede mejorar las alteraciones a nivel intestinal que provocan muchos compuestos anti-nutritivos que poseen las fuentes proteicas vegetales.

Tabla 3. Resultados globales de crecimiento y aprovechamiento nutritivo de las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales durante 114 días

	PIENSOS ¹				
	FM100	FM25	FM10	FM0	FM0+
Peso inicial	63,14	64,06	64,08	65,40	63,42
	±1,33	±1,33	±1,33	±1,33	±1,33
Peso final	217,8 ^a	208,2 ^a	163,7 ^b	134,9 ^c	177,8 ^b
	±8,6	±11,1	±8,3	±8,5	±8,5
TCI² (% día⁻¹)	1,07 ^a	1,03 ^a	0,81 ^b	0,65 ^c	0,89 ^b
	±0,04	±0,05	±0,04	±0,04	±0,04
TAD³ (g 100 g pez⁻¹ día⁻¹)	1,64	1,45	1,51	1,44	1,50
	±0,05	±0,07	±0,05	±0,05	±0,05
ICA⁴	2,03 ^c	1,92 ^c	2,52 ^{ab}	2,86 ^a	2,25 ^{bc}
	±0,10	±0,13	±0,10	±0,10	±0,10

¹Piensos: Diferentes piensos experimentales.

²TCI (% día⁻¹): Tasa de Crecimiento Instantáneo = 100 x ln(peso final/peso inicial)/días.

³TAD (g 100 g pez⁻¹ día⁻¹): Tasa de Alimentación Diaria = 100 x ingesta (g)/diferencia biomasa (g) x días.

⁴ICA: Índice de Conversión del Alimento = ingesta (g)/peso ganado (g).

Los valores presentados en la tabla son la media ± ESM, (n = 3). Superíndices con diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas con una p<0.05).

En cuanto al Índice de Conversión del Alimento (ICA) (Tabla 3), fue significativamente menor en los peces alimentados con FM100 y FM25 (2,03 y 1,92, respectivamente).

No se vieron diferencias significativas entre los distintos piensos en la Tasa de Alimentación Diaria (TAD), por lo tanto, las diferencias en cuanto a ICA se deben fundamentalmente a las diferencias de crecimiento de los peces.

5.2. Parámetros corporales y biométricos

Se analizó la composición de la carne de las doradas tanto al principio de la prueba como al final. Los resultados de la composición de la carne se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4. Composición de la carne de dorada alimentada con niveles crecientes de mezcla de proteínas animales y vegetales al final del período experimental (los datos se expresan como (% de peso húmedo))

	PIENSOS						SEM
	Inicial	FM100	FM25	FM10	FM0	FM0+	
<i>Análisis de la composición(% peso húmedo)</i>							
Humedad	66,50	66,48 ^c	68,77 ^a	68,05 ^{ab}	67,41 ^{bc}	68,81 ^a	0,32
Proteína Bruta	16,90	17,50	17,04	17,14	16,89	16,79	0,28
Grasa Bruta	12,38	12,71 ^a	11,02 ^b	11,77 ^b	13,02 ^a	11,29 ^b	0,28
Cenizas	3,30	3,17	3,04	2,84	2,79	2,92	0,14

Los valores presentados en la tabla son la media \pm ESM, (n = 3). Superíndices con diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas con una $p < 0.05$.

Sólo se hallaron diferencias significativas en cuanto a los parámetros de humedad y de grasa, donde los peces alimentados con el pienso FM0 presentaron el mayor contenido en grasa (13,02%) sin diferencias estadísticas con los peces alimentados con el pienso FM100 (12,71%). La humedad de los peces FM0 y FM100, fue la menor (67,41% y 66,48%, respectivamente), lo cual es lógico, pues estos dos valores están inversamente relacionados.

En la Tabla 5, se presentan los resultados de los parámetros biométricos de los animales:

Tabla 5. Índices biométricos de las doradas alimentadas con diferentes piensos experimentales durante 114 días.

	PIENSOS					
	FM100	FM25	FM10	FM0	FM0+	ESM
FC¹ (g cm³)	2,14 ^a	1,82 ^{bc}	1,76 ^{bc}	1,71 ^c	1,91 ^b	0,05
IVS² (%)	7,70	7,85	7,97	8,34	8,76	0,27
IHS³ (%)	1,26	1,03	1,08	1,04	1,02	0,07
IGV⁴ (%)	1,72	1,37	1,4	2,13	1,87	0,2
Valor Productivo de la Proteína (%)	20,7 $\pm 2,75$	15,46 $\pm 4,15$	12,14 $\pm 1,96$	8,59 $\pm 1,27$	12,76 $\pm 1,57$	

¹FC (g cm³): Factor de Condición = 100 x peso final/longitud³

²IVS (%): Índice viscerosomático = 100 x peso vísceras/peso final.

³IHS (%): Índice hepatosomático = 100 x peso hígado/peso final.

⁴IGV (%): Índice de grasa visceral = 100 x peso grasa visceral/peso final.

Los valores presentados en la tabla son la media \pm ESM, (n = 3). Superíndices con diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas con una $p < 0.05$.

El factor de condición (FC) muestra la relación entre el peso final del animal y la longitud de éste. Se trata de un índice que indica el estado de grosor de los peces. Como se puede observar, el factor de condición disminuye conforme se va aumentando el aporte de harinas vegetales en el pienso, siendo los peces alimentados con el pienso FM100 los que mejor condición tienen ($2,14 \text{ g cm}^{-3}$), y los alimentados con el pienso FM0 los que peor ($1,71 \text{ g cm}^{-3}$). También se observa que el pienso FM0+ obtuvo el segundo mejor resultado ($1,91 \text{ g cm}^{-3}$), lo que lleva a suponer que la inclusión del alga favorece la condición de los animales.

No se han observado diferencias significativas para el resto de parámetros biométricos, si bien, se observa que el Índice de Grasa Visceral es superior para el pienso FM0, lo que puede explicar las diferencias significativas en cuanto a composición corporal (Tabla 4). Resultados similares se han obtenido en otros trabajos, donde aun sin haber diferencias significativas se ha observado un ligero aumento de la grasa visceral de los peces, en el pienso con mayor sustitución de harina de pescado (Sánchez-Lozano *et al.*, 2011). Si bien, esto sigue la tendencia del resto de estudios realizados, donde el contenido de grasa visceral disminuía conforme se aumentaba la sustitución de harina de pescado en el pienso (Martínez-Llorens *et al.*, 2007; Martínez-Llorens *et al.*, 2012; Monge-Ortiz *et al.*, 2016). Una posible explicación a esto es el aumento de acumulación de grasa en el hígado de los peces alimentados con fuentes proteicas vegetales (Baeza *et al.*, 2014), probablemente causado por un incremento en la movilización de grasa de reserva que se va acumulando en el hígado. Esta acumulación de grasa en el hígado suele darse cuando los niveles de disponibilidad de nutrientes son bajos (Gallardo *et al.*, 2003). En el presente estudio no se puede demostrar la baja disponibilidad de grasa, pero, en otros previos se ha visto que piensos con un alto contenido en fuentes proteicas vegetales disminuye considerablemente la digestibilidad de ésta (Storebakken *et al.*, 2000).

Finalmente, se calcularon tanto la composición de los piensos como las eficiencias de retención para los aminoácidos esenciales (Figura 5). Para ello, se muestra primero la composición en aminoácidos de las dos fuentes proteicas mayoritarias de los piensos (harina de pescado y harina de cerdo ibérico) y de los diferentes piensos experimentales (Tabla 6).

Los piensos deben estar diseñados para cubrir las necesidades nutritivas de los peces, sin embargo, determinar cuantitativamente los requerimientos en aminoácidos resulta complicado, puesto que existen interacciones entre ellos. Para asegurar un aporte óptimo, los aminoácidos esenciales y no esenciales deben hallarse en una determinada relación, ya que si ciertos aminoácidos se encuentran presentes en exceso o defecto en el pienso pueden provocar un desequilibrio aminoacídico (Sánchez-Lozano *et al.*, 2011). Por ejemplo, algunos autores (Marcouli *et al.*, 2004) han demostrado que el crecimiento de las doradas puede disminuir cuando la relación entre aminoácidos esenciales y no esenciales es superior o inferior a 1,25, provocando en ambos casos baja eficiencia proteica. Como se puede observar en la Tabla 6, la relación entre aminoácidos esenciales y no esenciales (AAE/AANE) disminuye considerablemente con el aumento de la mezcla vegetal y animal. El pienso FM100 tiene una relación de 0,97, adecuada para la alimentación de la dorada, en cambio, el pienso FM0 disminuye a 0,66, lo cual se debe fundamentalmente a la disminución de todos los AAE. Igualmente Gómez-Requeni *et al.*, (2003) observaron que la eficiencia proteica disminuyó cuando las doradas fueron alimentadas con piensos con una relación AAE/AANE de 0,8 respecto a las alimentadas con una relación de 1,13. La relación entre AAE/AANE óptima en el pienso para el crecimiento debe ser similar al perfil del músculo de la dorada.

Tabla 6. Composición de aminoácidos de las materias primas y de los piensos experimentales.

	Ingredientes		Pensos experimentales				
	HP ¹	HCI ²	FM100	FM25	FM10	FM0	FM0+
<i>Aminoácidos esenciales (g 100 g⁻¹ en peso húmedo)</i>							
Arginina	5,86	4,90	2,76	2,78	2,63	2,52	2,62
Histidina	2,54	1,10	0,83	0,64	0,57	0,63	0,62
Isoleucina	3,40	2,31	1,69	1,45	1,39	1,36	1,39
Leucina	6,55	4,46	2,84	2,54	2,44	2,40	2,46
Lisina	6,01	4,12	2,55	1,89	1,92	1,89	1,73
Metionina	2,30	0,94	1,01	1,06	0,84	0,84	0,91
Fenilalanina	3,73	2,49	1,46	1,40	1,31	1,33	1,44
Treonina	3,55	1,69	1,46	1,17	1,13	1,04	1,15
Valina	3,88	3,66	1,98	1,82	1,79	1,79	1,77
<i>Aminoácidos no esenciales (g 100 g⁻¹ en peso húmedo)</i>							
Alanina	4,32	6,18	2,08	2,23	2,34	2,31	2,24
Ácido aspártico	6,97	6,28	2,97	3,38	3,53	3,52	3,24
Cisteína	0,56	0,22	0,46	0,38	0,29	0,33	0,33
Ácido glutámico	10,00	11,43	5,16	5,54	5,87	5,66	5,33
Glicina	4,26	14,30	2,25	4,02	4,16	4,23	4,35
Prolina	2,87	8,40	1,62	2,66	2,83	2,84	3,00
Serina	3,41	2,45	1,46	1,40	1,33	1,37	1,39
Tirosina	2,67	1,61	1,06	0,86	0,87	0,79	0,84
EAA³/NEAA⁴	1,07	0,50	0,97	0,72	0,66	0,66	0,68

HP¹: harina de pescado

HCI²: harina de cerdo ibérico

AAE³: aminoácidos esenciales.

AAANE⁴: aminoácidos no esenciales

Como podemos ver en la Tabla 5, se observan diferencias significativas en el Valor Productivo de la Proteína, donde el pienso FM100 obtuvo la mayor eficiencia de retención proteica (20,7%) y el pienso FM0 la menor retención (8,59%). Para los peces alimentados con este último pienso se obtuvieron además los valores más bajos para el valor productivo de todos los aminoácidos esenciales (Figura 5), lo que está relacionado con la baja ganancia de peso que obtuvieron los peces alimentados con el pienso FM0.

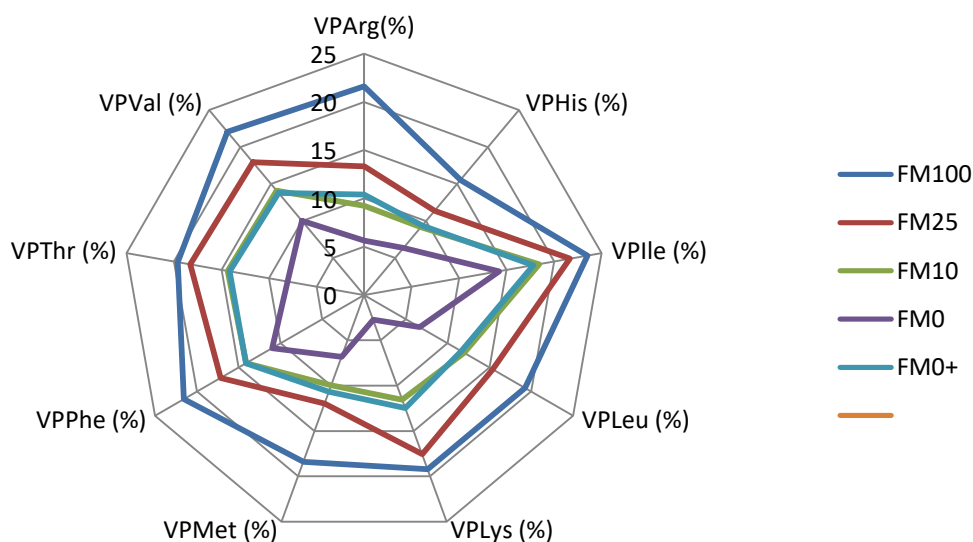


Figura 5. Eficiencia de retención (expresada en porcentaje) de los aminoácidos esenciales de las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales.

Las diferencias son significativas para todos los valores de retención en función de los piensos, y se aprecian 3 grupos diferentes para todos estos valores. Los piensos con mayor porcentaje de retención son el FM 100 y el FM 25, cuyos valores son similares a los de otros estudios realizados con anterioridad (Moutinho *et al.*, 2016). Esto muestra que se puede alcanzar una sustitución de harina de pescado de hasta un 75% según los resultados de crecimiento y de retención. En comparación, se han obtenido datos ligeramente inferiores para la retención de metionina y arginina con un valor de 18,41% y 21,62% respectivamente, mientras que en otros trabajos se obtuvieron valores próximos al 30% para ambos aminoácidos (Martínez-Llorens *et al.*, 2012), aunque esto también puede variar en función del lote de peces. Un segundo grupo lo componen los piensos FM 10 y FM 0+, con unos valores más bajos. Y por último, el pienso FM0, cuya eficiencia de retención es muy baja para todos los aminoácidos, de ahí que su crecimiento haya sido tan bajo. Este detrimento en cuanto a las eficiencias de retención puede ser debido a una menor disponibilidad de los nutrientes debido a la disminución de la digestibilidad en los piensos sin harina de pescado, lo que ya ha sido comprobado en varias especies, incluida la dorada (Lupatsch *et al.*, 1997). El aumento del contenido en fibra, que aumenta la velocidad del tracto intestinal, impide que se puedan asimilar todos los aminoácidos, este puede ser un motivo de la disminución de la digestibilidad. Otros factores que pueden provocar una bajada de la disponibilidad de aminoácidos son los tratamientos realizados sobre el pienso, ya que un tratamiento térmico reduce la disponibilidad de Lisina y Cisteína, los factores anti-nutritivos de la harina vegetal, que provocan un efecto negativo en la digestibilidad y en la absorción de los aminoácidos (Martínez-Llorens *et al.*, 2012), y los que contienen las harinas animales (alto contenido en cenizas)

En cuanto a la inclusión del aditivo, los resultados muestran que la microalga *I. galbana* aumenta considerablemente las eficiencias de retención y se observan, además, resultados muy parecidos a los obtenidos en los peces alimentados con el pienso FM10. Esto podría deberse a la mejora de la digestibilidad en el pienso con aditivo. Se ha comprobado que la adición de las microalgas puede tener un efecto antiinflamatorio, que contrarrestaría los efectos negativos de las fuentes proteicas alternativas, mejorando por lo tanto la estructura intestinal y la funcionalidad de éste (Robertson *et al.*, 2015). Por lo tanto, los piensos funcionales (que son aquellos que incluyen aditivos para mejorar alguna cualidad de estos) se presentan como una buena alternativa para disminuir la dependencia del suministro de harina de pescado, obteniendo mejores crecimientos y eficiencias de los nutrientes.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

El efecto de la sustitución, en distintas proporciones, de la harina de pescado por una mezcla de harina de carne de cerdo ibérico y harinas vegetales; con la inclusión del alga *I. galbana* como aditivo en dorada (*Sparus aurata*) ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- Se puede sustituir hasta un 75% de harina de pescado por la mezcla de harinas, sin que se observen diferencias significativas en cuanto al crecimiento y parámetros nutritivos de los peces.
- La inclusión del aditivo en el pienso con sustitución total de la harina de pescado, mejora los valores de crecimiento de los animales, por lo que la inclusión de algas como aditivo es una opción viable.

Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFIA

BAEZA-ARINO, ROSA., MARTÍNEZ-LLORENS, SILVIA., NOGALES-MERIDA, SILVIA., JOVER-CERDA, MIGUEL Y TOMÁS-VIDAL, ANA (2014). Study of liver and gut alterations in sea bream, (*Sparus aurata* L.), fed a mixture of vegetable protein concentrates Aquaculture Research, 1–12

CEREZUELA CABRERA, R. (2012). Nuevos probióticos y prebióticos para dorada (*Sparus aurata* L.).

DE BENITO, F., MAICAS, F., JAURALDE, I., MARTÍNEZ, S., MARÍN, M., Y JOVER, M. (2012). Evaluación de la rentabilidad económica de la producción de dorada (*Sparus aurata*) en jaulas marinas.

ESTRUCH, G., COLLADO, M.C., PEÑARANDA, D.S., TOMAS-VIDAL, A., JOVER CERDA, M., PÉREZ-MARTÍNEZ, G., MARTÍNEZ-LLORENS, S. (2015). Impact of Fishmeal Replacement in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) on the Gastrointestinal Microbiota Determined by Pyrosequencing the 16S rRNA Gene.

GALLARDO, M.A., SALA-RABANAL, M., IBARZ, A., PADROS, F., BLASCO, J., FERNANDEZ-BORRAS, J. y SANCHEZ J. (2003) Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 223, 15–27.

GÓMEZ-REQUENI, P., MINGARRO, M., KIRCHNER, S., CALDUCH-GINER, J. A., MEDALE, F., CORRAZE, G., PANSERAT, S., MARTÍN, S. A. M., HOULIHAN, D. F., KAUSHIK, S. J., PÉREZ-SÁNCHEZ, J., (2003). Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 220, 749-767.

HEBA S. EL-SAYED., HASSAN A.H. IBRAHIM., EHAB A. BELTAGY., HANAN M. KHAIRY. (2014). Effects of short term feeding of some marine microalgae on the microbial profile associated with *Dicentrarchus labrax* post larvae.

KISSIL, G.W., Y LUPATSCH, I. (2004). Successful replacement of fishmeal by plant proteins in diets for the gilthead seabream, *Sparus aurata* L..The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 56(3), 188-199.

LUPATSCH, I., KISSIL, G. W., SKLAN, D. y PFEFFER, E. (1997) Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, (*Sparus aurata* L.) Aquaculture Nutrition 4, 165-174.

MARCOULI, P. A., ALEXIS, M. N., ANDRIOPOULOU, A., ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J., (2004). Development of a reference diet for use in indispensable amino acid requirement studies of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. Aquaculture Nutrition 10, 335-343.

MARTÍNEZ-LLORENS, S., MOÑINO, A.V., TOMÁS, A., MOYA, V.J., PLA, M. & JOVER, M. (2007). Soybean meal as a protein source in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) diets: effects on growth and nutrient utilization. *Aquac. Res.*, 38, 82–90.

MARTÍNEZ-LLORENS, S., TOMÁS VIDAL, A., VICENTE MOÑINO, A., GÓMEZ ADER, J., PLA TORRES, M., Y JOVER CERDÁ, M. (2008). Blood and haemoglobin meal as protein sources in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effects on growth, nutritive efficiency and fillet sensory differences.

MARTÍNEZ-LLORENS, S., TOMÁS, A., JAURALDE, I., PLA, M. & JOVER, M. (2009). Optimum dietary soybean meal level for maximizing growth and nutrient utilization of on-growing gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquac. Nutr.*, 15, 320–328.

MARTÍNEZ-LLORENS, S., BAEZA-ARIÑO, R., NOGALES-MÉRIDA, S., JOVER-CERDÁ, M., Y TOMÁS-VIDAL, A. (2012). Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. *Aquaculture*, 338, 124-133.

MONGE-ORTIZ, R., MARTÍNEZ-LLORENS, S., MÁRQUEZ, L., JAVIER MOYANO, F., JOVER-CERDÁ, M., Y TOMÁS-VIDAL, A. (2016) Potential use of high levels of vegetal proteins in diets for market-sized gilthead sea bream (*Sparus aurata*), *Archives of Animal Nutrition*, 70:2, 155-172, DOI: 10.1080/1745039X.2016.1141743

MOUTINHO, S., MARTÍNEZ-LLORENS, S., TOMÁS-VIDAL, A., JOVER-CERDÁ, M., OLIVA-TELES, A., PERES, H. (2016). Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency.

NENGAS, I., ALEXIS, M., DAVIES, S. (1999). High inclusion levels of poultry meals and related byproducts in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*L.).

QUASS, M.F., FROESE, R., HERWARTZ, H., REQUATE, T., SCHMIDT, J.O., Y VOSS, R. (2012). Fishing industry borrows from natural capital at high shadow interest rates. *Ecological Economics*, 82, 45- 52.

ROBERTSON, R., GUIHÉNEUF, F., BAHAR, B., SCHMID, M., STENGEL, D., FITZGERALD, G., ROSS, R., STANTON, C., BARNATHAN, G (2015). The Anti-Inflammatory Effect of Algae-Derived Lipid Extracts on Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human THP-1 Macrophages.

SÁEZ, M.I., MARTÍNEZ, T.F., ALARCÓN, F.J., (2013). Effect of dietary inclusion of seaweeds on intestinal proteolytic activity of juvenile sea bream, *Sparus aurata*. *Int. Aquafeeds* 38–40.

SÁNCHEZ-LOZANO, N. B., MARTÍNEZ-LLORENS, S., TOMÁS-VIDAL, A., Y JOVERCERDÁ, M. (2011). Amino acid retention of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed with pea protein concentrate. *Aquaculture nutrition*, 17 (2), e604-e614.

SITJÀ-BOBADILLA, A., PEÑA-LLOPIS, S., GÓMEZ-REQUENI, P., MEDALE, F., KAUSHIK, S. Y PÉREZ-SÁNCHEZ, J. (2005). Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387-400.

STOREBAKKEN, T., REFSTIE, S., RUYTER, B., (2000A). A soy product as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Drackley, J.K. (Ed.), *Soy In Animal Nutrition*. Federation of Animal Science Societies. Savoi, IL, USA, pp. 127–170

6.1 Referencias digitales

FAO.org. (2017). Estadísticas sobre *Sparus aurata*. Visitado en julio de 2017 en <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>

MAPAMA.gob.es. (2017). Producción de *Sparus aurata*. Visitado en julio de 2017 en <http://www.mapama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/produccion-de-acuicultura/>