

D. METODOS DE EVALUACION BIOLÓGICA:

Dra. Elizabeth Cruz Suárez, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Resumen

El conocimiento de la calidad química y física de un alimento no es suficiente para valorar su nivel nutritivo; la evaluación biológica es imperativa para conocer la disponibilidad de los nutrientes en los organismos vivos. Esta evaluación puede realizarse por varios métodos: tasa de crecimiento, tasa de conversión alimenticia, eficiencia alimenticia, coeficiente aparente de utilización digestiva y glicemia o aminoacidemia postprandial. Para cualquier método es necesario un bioensayo previo; la metodología del bioensayo usada, va a determinar la confiabilidad y la facilidad de comparación de los resultados. Con el interés de unificar y difundir el uso de esta metodología en México, en el presente trabajo se presenta la pauta a seguir para realizar una evaluación biológica de una dieta o un ingrediente (para camarón). Se hace una revisión sobre las instalaciones y condiciones experimentales necesarias (circuito de abastecimiento y calidad del agua, acuarios o tanques, obra civil), sobre los animales (origen, aclimatación), el diseño experimental, el experimento tipo y el mantenimiento y controles diarios. Así mismo, se habla sobre las dietas experimentales y de control; técnicas de fabricación y distribución de alimentos; estabilidad de los alimentos y aplicabilidad, a nivel piloto y de producción, de la evaluación experimental.

1. INTRODUCCION

Para la evaluación biológica de una dieta o de un ingrediente determinado, es necesario conocer los siguientes datos: composición química (proteínas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, cenizas Ca y P; toxicidad (sustancias antinutricionales, pesticidas metales pesados); contenido energético.

Una vez determinados estos datos se puede realizar el diseño experimental de nuestro bioensayo o evaluación biológica.

El método más comúnmente usado es el que toma en cuenta el crecimiento del organismo y la tasa de conversión alimenticia promovidos por el alimento en un tiempo determinado de experimentación.

Otros métodos de evaluación biológica de alimentos, que generalmente se hacen paralelamente a la prueba de crecimiento, son la digestibilidad in vivo, la aminoacidemia y la glicemia postprandial y la concentración de ácidos nucleicos.

Para evaluaciones biológicas más finas, la determinación de la digestibilidad aparente de un ingrediente o de una dieta es posible, añadiendo únicamente a la dieta un marcador no digerible como el óxido de cromo que permita hacer el cálculo de los nutrientes que fueron absorbidos en el tracto digestivo, tomando en cuenta la composición inicial del alimento y la composición de las heces fecales, en relación con el marcador.

La aminoacidemia y la glicemia postprandial es un método de utilización relativamente reciente en organismos acuáticos, que nos da información muy valiosa sobre la disponibilidad de los nutrientes para el organismo, pues el pico de nutrientes que se presenta en la sangre justo después de una comida sólo puede corresponder a los nutrientes liberados por el alimento una vez que han pasado la barrera intestinal o digestiva y que están disponibles para diferentes vías del metabolismo, una de ellas formación de tejido y crecimiento.

Un último método relativamente sofisticado para verificar el crecimiento es el análisis de ácidos nucleicos en el carcás después de un bioensayo. Usando algunos índices como ARN/ADN se puede obtener una evaluación del tipo de crecimiento que se está promoviendo, es decir, si es por aumento del tamaño celular o si es por aumento en el número de células.

Como mencionamos anteriormente, estos métodos finos son generalmente aplicables después de un bioensayo donde se toma en cuenta el crecimiento, por ello, y tratando de unificar metodologías, vamos a definir las condiciones de un bioensayo.

2. BIOENSAYO

A) Condiciones experimentales:

Es imperativo que todas las condiciones ambientales sean iguales y constantes en todos los acuarios de tal manera que los resultados obtenidos correspondan exclusivamente a la variable en cuestión es decir a la composición del alimento.

Para lograr estas condiciones es necesario contar con una área de experimentación adecuada:

- 1) Circuito de abastecimiento de agua: se recomienda que este circuito sea abierto con suministro constante de agua en cada tanque. Eventualmente se puede hacer un circuito de recirculación de agua que sea único para todos los estanques, de tal manera que se mantenga la homogeneidad del agua. Los inconvenientes de estas instalaciones son múltiples, de ahí la importancia de la situación de la sala de zootecnia a orillas del mar, donde el suministro constante de agua no represente una limitante. La red de distribución de agua debe montarse en paralelo de tal manera que el recambio de agua se pueda regular y sea el mismo en todos los tanques.
- 2) Calidad del agua: la calidad físico-química del agua debe ser lo más constante posible.

El agua debe ser filtrada por lo menos a través de un filtro de arena para evitar la entrada de organismos que puedan com-

petir por el alimento, o que por el contrario sirvan como suplemento de la dieta.

La temperatura del agua debe ser controlada, generalmente se trabaja a la temperatura óptima de la especie. Para Penaeus vannamei y P. stylirostris una temperatura de 26-28 °C es adecuada.

La tasa de oxígeno debe ser próxima a la saturación y nunca menor de 3 ppm. La concentración de NH_3 también debe mantenerse dentro de los límites aceptados por los camarones, no mayor de 0.10 ppm. La utilización de filtros biológicos es un excelente medio de conservar a niveles adecuados estos parámetros, además de proporcionar un buen sustrato para los animales, que a partir de postlarva tienen hábitos bénticos.

3) Acuarios o tanques: los tanques de fibra de vidrio cubiertos de 'gelcoat' al interior para dejar superficies lisas son más prácticos y resistentes que los acuarios de vidrio. Además el stress causado a los animales es menor pues los acuarios de fibra de vidrio no son transparentes. La instalación de conexiones de llegada y salida de agua se facilita con este material. El tamaño y la forma de los tanques puede determinarse en función de las instalaciones y del tamaño de los organismos con los que se va experimentar.

4) Obra civil: la infraestructura de zootecnia debe montarse en una sala donde se pueda controlar la iluminación y donde se amortigüen las variaciones meteorológicas.

Se recomienda la instalación de este tipo de salas de zootecnia en instalaciones de producción donde la infraestructura de base ya se encuentre montada.

Es de suma importancia hacer una verificación de la homogeneidad de las instalaciones, para lo cual es necesario realizar una experimentación control, probando el mismo alimento en todos los acuarios. Considerando una manipulación correcta y homogénea durante el bioensayo, los incrementos en peso de los organismos no deben mostrar diferencias significativas según los diferentes acuarios, si las instalaciones no afectan los resultados.

B) Animales

Se debe conocer el origen y la historia de los animales con los que se va experimentar. Es ideal trabajar con poblaciones homogéneas provenientes no sólo del mismo lugar sino de una misma hembra. No se debe trabajar con organismos que hayan estado sujetos a experimentación previa. Eventualmente hay que dejar a los animales en condiciones de reaclimatación un tiempo determinado con el fin de eliminar efectos de larga duración que puedan quedar del experimento anterior. La disponibilidad de animales no debe ser un factor limitante.

Es necesario contar con acuarios o tanques de almacenaje de animales antes de la experimentación de tal manera que se adapten a las condiciones de laboratorio.

3) DISEÑO EXPERIMENTAL

Debido a la falta de un método práctico de marcado individual de camarones, no es posible seguir el incremento en peso de cada individuo; para determinar diferencias significativas entre tratamientos a nivel estadístico se considera el peso final de los individuos partiendo de la hipótesis de que al inicio del experimento no hay diferencia significativa en el peso de los camarones de cada lote o tratamiento. Esto hace necesario comenzar el experimento con animales de pesos muy cercanos, de tal manera que de un lote de animales disponibles sólo se utilizan los camarones de la talla media. No es recomendable utilizar las colas de los lotes.

El análisis estadístico se hace por medio de un test de homogeneidad de varianzas o test de Bartlett, seguido de un análisis de varianzas y un test de comparación de medias por el método Duncan, para determinar las diferencias y/o semejanzas significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos (alimentos).

Las hipótesis manejadas con un intervalo de confianza de 95 % son las siguientes:

H₀ Los alimentos en estudio tienen el mismo valor nutritivo y, por lo tanto, la misma capacidad de promover crecimiento

H₁ Dichos alimentos presentan diferencias en su capacidad para promover crecimiento.

El experimento o bioensayo clásico consiste en comparar la tasa de crecimiento, la tasa de conversión alimenticia y la sobrevivencia promovida por diferentes dietas, incluyendo por lo menos un control, cuando todas las condiciones ambientales son iguales.

$$\text{Tasa de Crecimiento} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \quad (\text{en gr})$$

$$\text{Tasa de Conversión Alimenticia} = \frac{\text{incremento en biomasa (gr)}}{\text{alimento consumido}}$$

$$\text{Tasa de Sobrevivencia} = \frac{\text{No. final de animales}}{\text{No. inicial de animales}} \times 100$$

4. DISTRIBUCION DE LOS ANIMALES

Antes de repartir los animales en los diferentes acuarios de experimentación, se debe hacer una preselección en función del peso, a partir de un lote mantenido en estabulación a fin de aumentar la homogeneidad de los lotes de experimentación.

Los camarones son en seguida pesados individualmente, después de un ligero secado con papel absorbente o con un trapo húmedo. Se debe utilizar una báscula con una precisión de por lo menos dos decimales (0.01 g). La repartición se hace utilizando una tabla de números aleatorios, a razón de 15 - 20 individuos según la densidad prevista en el diseño experimental.

La atribución de tratamientos a los acuarios se debe hacer igualmente aleatoriamente. Cada alimento es probado en 3 ó 4 acuarios según el número de replicados que se hayan previsto en el diseño experimental.

5. MANTENIMIENTO Y CONTROLES DIARIOS

Cada día y por cada acuario, la cantidad de alimento consumido (en % de la ración), el número de mudas, y de animales muertos son anotados en una ficha.

La ración alimenticia debe ser distribuida diariamente y los restos, heces fecales y mudas deben sifonarse cada mañana.

Los camarones deben pesarse individualmente a la mitad y al fin del experimento. La duración del experimento depende de la talla inicial de los camarones con que se este trabajando. Para juveniles de 500 mg a 10 g una duración de cuatro semanas es suficiente para encontrar diferencias significativas, sobre todo para especies que tienen un gran potencial de crecimiento como es el caso para Penaeus vannamei y P. stylirostris.

Los pesos individuales son anotados y el peso medio de los camarones es calculado para cada acuario.

6. DIETAS DE BASE SIMPLES Y COMPUESTAS; DIETA CONTROL

Los alimentos experimentales pueden ser de dos tipos:

A) Alimentos simples o puros:

Alimentos simplificados constituidos de materias primas puras, de composición química bien conocida. Este tipo de alimento permite poner en evidencia los requerimientos nutricionales de un ingrediente determinado. El estudio de los requerimientos nutricionales de la especie mejor estudiada P. japonicus ha sido posible gracias a un alimento puro a base de caseína formulado por investigadores japoneses.

El inconveniente de este tipo de alimentos es que por lo general debido a su simplicidad, no son capaces de promover un crecimiento óptimo y esto hace que cualquier ingrediente adicionado provoque una mejoría en la eficiencia del alimento.

Claro, es evidente que también cualquier efecto negativo es rápidamente reperado.

B) Alimento compuesto:

Constituido por materias primas convencionales. La diversidad de ingredientes permite promover buenos crecimientos, de manera que la adición de un ingrediente determinado nos permitira evaluar su valor nutricional en sinergia con los otros ingredientes. Así pues, un ingrediente "X" que adicionado a una dieta pura mostro incrementar el crecimiento, al adicionarlo a una dieta compuesta, puede ya no mostrar el mismo efecto ya sea porque el nutriente importante que aporta ya se encuentra en cantidad suficiente en la dieta o ya sea por la coexistencia con otros ingredientes de la dieta.

Considerando estos antecedentes en el caso de la evaluación nutricional de un ingrediente se recomienda usar los dos tipos de fórmulas para estar seguro del resultado.

C) Alimento control o testigo:

Existen dos tipos de alimento control, uno corresponde al alimento de base que se esté usando en el experimento y que servirá para evaluar el efecto de la adición de tal o cual ingrediente; el otro consiste en un alimento de alta eficiencia de calidad constante y disponible todo el tiempo. Esto puede ser un alimento fresco como mejillón, calmar, almeja etc., sólo que en este caso la composición cambia según la época del año. Otra solución es la utilización de alimentos comerciales reconocidos, que producen buenos resultados. En este caso, debido a las normas de calidad de estas industrias, sabemos que la calidad y la composición será más constante, y la dieta podrá ser evaluada con respecto a la competencia existente.

D) Técnicas de fabricación: para la fabricación de alimento en pequeñas cantidades el equipo necesario puede ser muy simple, pues la fabricación de alimento por vía húmeda con extrusión en frío permite la obtención de un alimento suficientemente estable. Este equipo consiste en un molino mecánico de cocina, una batidora con adaptación de un molino de carne, una balanza y un secador.

Otras técnicas de fabricación usadas normalmente en la industria pueden utilizarse siempre y cuando estén adaptadas a la fabricación de las pequeñas cantidades, que son necesarias para un bioensayo.

7. DISTRIBUCION DE ALIMENTOS. RACION FIJA Y ad libitum. FRECUENCIA

El racionamiento, la distribución y la frecuencia de alimentación en un bioensayo depende de varias cosas:

- A) Hábitos alimenticios de la especie: hay que distribuir los alimentos en las horas de actividad de los camarones para asegurar el consumo inmediato del alimento.
- B) Edad o talla de los camarones: los camarones postlarvas y juveniles consumen más alimento y con mayor frecuencia que los adultos, por lo que su ración debe ser mas elevada con respecto a su biomasa.
- C) Objetivo del experimento: los bioensayos, donde el objetivo es probar la capacidad atractante de un alimento, la ración debe hacerse ad libitum es decir a saciedad. Si el consumo del alimento es bueno y lo que se quiere es determinar la mejor tasa de alimentación, la experimentación con raciones fijas en función de la talla es recomendable.

Recientemente la utilización de distribuidores automáticos de alimento muy ingeniosos, permiten al investigador la evaluación del efecto de frecuencias de alimentación, que a final de cuentas es una forma de optimización de la eficiencia del alimento.