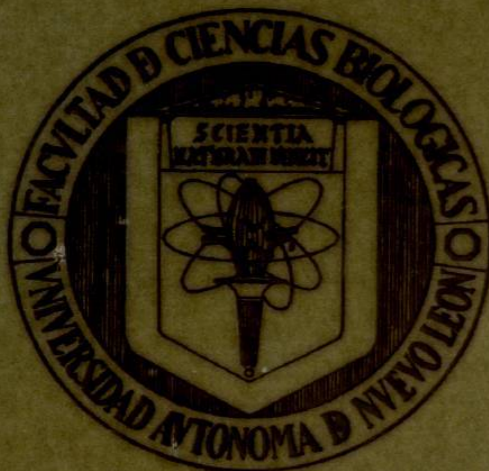


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
DIVISION DE ESTUDIO DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE HARINAS DE PESCADO CON DIFERENTE SCORE
BIOTOXICOLOGICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA
DEL CAMARON BLANCO *P. vannamei***

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el
grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en
Recursos Alimenticios y Producción Acuícola**

PRESENTA

ING. MIREYA TAPIA SALAZAR

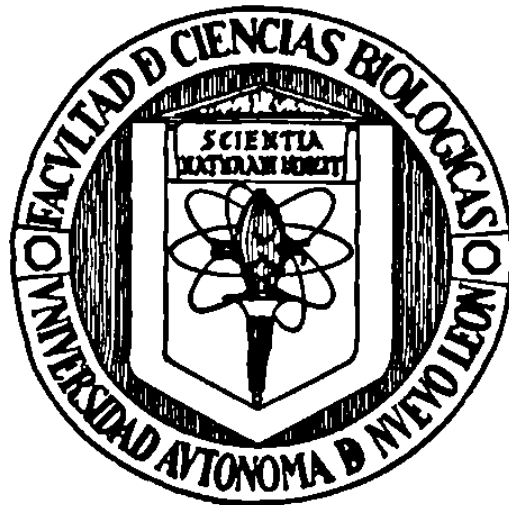
**SAN NICOLAS DE LOS GARZA , N. L.
DICIEMBRE DE 1976**

FM
SH38
E3
C. 1



1080073240

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIO DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE HARINAS DE PESCADO CON DIFERENTE SCORE
BIOTOXICOLOGICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA
DEL CAMARON BLANCO *P. vannamei***

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el
grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en
Recursos Alimenticios y Producción Acuicola**

PRESENTA

ING. MIREYA TAPIA SALAZAR

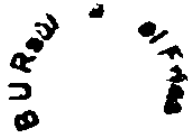
**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DE 1996**

FM
SH
T)



UAKL
FONDO
TEC

(73240)



UA
FONDO
TEC

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIO DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE HARINAS DE PESCADO CON DIFERENTE SCORE
BIOTOXICOLOGICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA
DEL CAMARON BLANCO *P. vannamei*.**

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en
Recursos Alimenticios y Producción Acuícola**

PRESENTA

ING. MIREYA TAPIA SALAZAR

H. COMISION DE TESIS

**DRA. LUCIA ELIZABETH CRUZ SUAREZ
PRESIDENTE Y DIRECTOR**

**DR. DENIS RICQUE MARIE.
SECRETARIO Y CO-DIRECTOR**

**DR. RAHIM FOROUGHBACKHCH
VOCAL**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIO DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE HARINAS DE PESCADO CON DIFERENTE SCORE
BIOTOXICOLOGICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA
DEL CAMARON BLANCO *P. vannamei*.**

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en
Recursos Alimenticios y Producción Acuícola**

PRESENTA

ING. MIREYA TAPIA SALAZAR

ASESORES EXTERNOS

DR. IAN H. PIKE

M.V.Z. MONICA GALLEGUILLOS.

EL IDEAL

El ideal no es algo que se piensa, ni siquiera que se sienta.

Es algo que se construye con pedazos que se arrancan de la propia felicidad.

Algo por lo que hay que sufrir, llorar y a caso, incluso sangrar.....

Sólo el que tienen un ideal tiene una razón para vivir.

El fracaso no existe para el que nunca se ha dado por vencido.

Fijate en la hormiga, observa sus costumbres y aprende a ser sabio.

No digas "es imposible", di solamente "no lo he intentado todavía".

NO DESISTAS

Cuando vayan mal las cosas como a veces suelen ir.

Cuando ofrezca tu camino sólo cuestas que subir.

Cuando tengas poco haber, pero mucho que pagar,
y precisas sonreír aún teniendo que llorar.

Cuando ya el dolor te agobie y no puedas ya sufrir,
descansar a caso debes; pero nunca desistir.

Tras la sombra de la vida, ya plateadas ya sombrías,
puede bien surgir el triunfo: no el fracaso que temías.

Y no es doble tu ignorancia figurarse
cuán cercano,
puede estar el bien que anheles
y que por mas que en la brega tengas
que sufrir.

¡Cuando todo este peor más
debemos insistir!

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme permitido culminar una etapa más de mi vida.

A MIS PADRES

Lazaro Tapia Escamilla † y Juana Salazar Vda de Tapia, por ser los padres mas maravillosos, haberme dado la oportunidad de elegir mi camino así como de todos sus principios, consejos y ayuda para seguir adelante. Los quiero mucho.

A MIS HERMANOS

Jose Francisco, Bernardo, Lazaro, Benito Edgardo y Eva Luz por los gratos y no tan gratos momentos que hemos pasados juntos así como del apoyo que me han brindado.

A MIS CUÑADAS

Maria del Socorro, Sebastiana y Rosalinda por su apoyo, sugerencias y los grandes momentos que hemos compartido.

A MIS SOBRINOS

Jose Francisco, Paola Selene, Pamela Ivonne. Bernardo Francisco, Miriam Grisel, Leslie Alejandra, Ramses Ali, Karina, Mirna Patricia, Carlos Alberto, Norma Yaqueline y Karen Elena, por los momentos que hemos pasados juntos y por hacerme recordar mi infancia.

A MIS TIOS

Andres, Francisca, y Angelina,

AGRADECIMIENTOS

En especial quiero dar las gracias al Dr. Denis Ricque y Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez por su apoyo, orientación, paciencia y la confianza que depositaron en mí para culminar una etapa más en mi vida profesional así como por haberme brindado su amistad durante todo este tiempo.

A Fundación Chile, por proporcionar las harinas de pescado utilizados en esta investigación.

A la M.V.Z. Mónica Galleguillos y el Dr. Ian Pike por sus consejos y sugerencias para la realización de este trabajo.

Al Dr. Ramon de Jesus Ramón Castaño por su tiempo y dedicación para el estudio de la histología en camarones realizada en este trabajo.

Al la M. C. Candelaria Gaytán por su colaboración en la realización de los cortes histológicos.

Al Dr. Rahim Foroughbackhch, por formar parte de la comisión de tesis.

Al Maestro Roberto Mercado por su asesoría en los análisis de correlación de todos los bioensayos de score realizados en este programa durante los últimos años, así como en la utilización del paquete computacional SPSS para windows.

A CONACyT por haberme otorgado la beca para la realización de la maestría.

A la Comunidad Económica Europea por su apoyo económico en el proyecto CII*CT93-030. " Determinación of some factors affecting the nutritional and biotoxicological value of fish for use in feed for shrimp culture and stabilsment of quality control norm.

A Postgrado por el apoyo económico otorgado para la presentación de este trabajo en el VII Simposium internacional de nutrición y alimentación de peces, celebrado del 11 al 15 de Agosto del presente año en College Station, Texas,USA.

A la Familia Turbino Camarena, por haberme brindado su amistad y haber abierto las puertas de su casa desde hace más de 10 años.

A Adriana Garcia por su amistad, apoyo, ayuda incondicional.

A la Maestra Graciela Díaz por sus consejos y su amistad brindada.

Así como a todos los compareños de este programa, con quienes establecí lazos de amistad mi más profundo agradecimiento:

Alma Melo del Angel, Lourdes Castillos Mata, Martha Nieto Lopez, Alejandra Rochaestrada, Pablo San Martín del Angel, José Tobías Chavana, Jesus Montemayor Leal, Carlos Aguilera, Pablo Gonzalez Valadez, Martín Conchas Camarena, Adrián Salgado Mario Pelcastre Villegas y Daniel Iruegas García.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	4
1.- Producción Mundial de Harina de Pescado	4
2.- Fabricación	5
3.- Valor Nutricional	6
4.- Parámetros de calidad	7
5.- Criterios de Calidad	7
6.- Aminas biogénicas	9
7.- Mollerrosina	10
7.1.- Efecto en peces de sustancias y/o H. P. que causan erosión de molleja en pollos	12
7.2.- Efecto del score y mollerrosina en crustáceos	13
Importancia	14
Originalidad	14
Hipótesis	14
Objetivo General	15
Objetivos particulares	15
Material y métodos	16
1.- Harinas experimentales	16
2.- Formulación y composición de las dietas experimentales	17
3.- Preparación de las dietas experimentales	18
4.- Análisis de las dietas experimentales	19
5.- Bioensayos	19
5.1.- Sala de bioensayos	19
5.2.- Parámetros químicos	20
5.3.- Camarones	20
5.4.- Parámetros de evaluación biológica	20
5.5.- Cortes histológicos	21
5.6.- Diseño experimental	21

Resultados	24
1.- Análisis de las dietas	24
2.- Parámetros de calidad del agua	25
3.- Evaluación biológica	26
3.1.- Efecto de la inclusión de 50% de H. P. de diferente score en dos tallas (0.1 y 0.17g) de camarón <i>Penaeus vannamei</i>	26
3.2.- Efecto de la inclusión de 30 % de H. P. de diferente score en camarones <i>P. vannamei</i> de 1.2g	34
3.3.- Efecto de dos niveles de inclusión (50 y 30%) contra dos P. de score extremo (0.1 y 2.3) y su interacción en <i>P. vannamei</i> de 0.17g	40
3.4.- Efecto del reemplazo creciente de una H. P. de score 0.1 (normal) por una de score 2.3 (grave) en organismos de 0.17 y 1.2g a un nivel de inclusión del 30%	41
3.5.- Efecto del reemplazo creciente (4 niveles) de una H. P. de score 0.1 (normal) por una de score 2.3 (grave) en organismos de 0.17 y 1.2g a un nivel de inclusión del 30%	48
3.6.- Digestibilidad <i>in vivo</i> de la proteína de las dietas que contienen 30% de inclusión de las H. P. experimentales	49
3.7.- Daños patológicos en los organismos debido al efecto del consumo de H. P. con diferente score.	50
Discusión	51
1.- Harinas de Pescado experimentales	51
1.2.- Parámetros de calidad en las harinas experimentales	51
2.- Dietas experimentales	53
3.- Efecto de harinas de pescado de score creciente	54
4.- Efecto de niveles crecientes de la harina de score grave	59
5.- Digestibilidad <i>in vivo</i> de las harinas experimentales	60
Conclusión	61
Recomendaciones	62
Bibliografía	63

INDICES DE TABLAS

Tabla 1.-	Países líderes en la producción de H. P	5
Tabla 2.-	Tipos de H.P. producidas en varios países	5
Tabla 3.-	Aminas biogénicas y sus productos químicos	9
Tabla 4.-	Factores que contribuyen a la aparición de erosión de molleja en pollos	11
Tabla 5.-	Análisis químico-nutricional de las H. P. experimentales	16
Tabla 6.-	Composición de las dietas experimentales 1 a 4 (50% de inclusión de la H. P.)	17
Tabla 7.-	Composición de las dietas experimentales 5 a 11 (30% de inclusión de la H. P.)	18
Tabla 8.-	Análisis proximal de las dietas 1 a 4	24
Tabla 9.-	Análisis proximal de las dietas 5 a 11	25
Tabla 10.-	Parámetros de calidad del agua	25
Tabla 11.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 1g Efecto del score biotxicológico a 50% de inclusión de H. P	26
Tabla 12.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 1g mediante la prueba de Dunnet Efecto del score biotxicológico a 50% de inclusión de H. P	26
Tabla 13.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 0.17g Efecto del score biotxicológico a 50% de inclusión de H. P	27
Tabla 14.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 0.17g mediante la prueba de Dunnet Efecto del score biotxicológico a 50% de inclusión de H. P	28
Tabla 15.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 1.2g Efecto del score biotxicológico a 30% de inclusión de H. P	34
Tabla 16.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 1.2g mediante la prueba de Dunnet Efecto del score biotxicológico a 30% de inclusión de H. P	35
Tabla 17.-	Probabilidades obtenidas del Anova bifactorial a los 56 días de bioensayo	40
Tabla 18.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 0.17g Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión	41
Tabla 19.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 0.17g mediante la prueba de Dunnet Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión	42
Tabla 20.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 1.2g Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión	43

Tabla 21.-	Resultados de la evaluación biológica en camarones de 1.2g mediante la prueba de Dunnet	43
	Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión	
Tabla 22.-	Resultados del análisis factorial de niveles crecientes de una H. P. de score grave (2.3) contra la talla de los organismos	48
Tabla 23.-	Digestibilidad aparente de la proteína de las dietas	49

INDICES DE FIGURAS

Fig. 1.-	Consumo individual en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 1 y 0.17g Efecto del score biotxicológico a 50% de inclusión de H. P.	29
Fig. 2.-	Ganancia en peso en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 1 y 0.17g Efecto del score biotxicológico a 50% de inclusión de H. P.	30
Fig. 3.-	Tasa de conversión alimenticia en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 1 y 0.17g Efecto del score biotxicológico a 50% de inclusión de H. P.	31
Fig. 4.-	Sobrevivencia en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 1 y 0.17g. Efecto del score biotxicológico a 50% de inclusión de H. P.	33
Fig. 5.-	Consumo individual <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 1.2g. Efecto del score biotxicológico a 30% de inclusión de H. P.	36
Fig. 6.-	Ganancia en peso en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 1.2g. Efecto del score biotxicológico a 30% de inclusión de H. P.	37
Fig. 7.-	Tasa de conversión alimenticia en <i>P. vannamei</i> de 1.2g Efecto del score biotxicológico a 30% de inclusión de H. P.	38
Fig. 8.-	Sobrevivencia en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 1.2g Efecto del score biotxicológico a 30% de inclusión de H. P.	39
Fig. 9.-	Consumo individual en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 0.17 y 1.2g Efecto del reemplazo de H. P.	44
Fig. 10.-	Ganancia en peso en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 0.17 y 1.2g Efecto del reemplazo de H. P.	45
Fig. 11.-	Tasa de Conversión Alimenticia en <i>P. vannamei</i> de peso inicial de 1.2g. Efecto del reemplazo	46
Fig. 12.-	Sobrevivencia en <i>Penaeus vannamei</i> de 0.17 y 1.2g Efecto del reemplazo	47
Fig. 13.-	Digestibilidad aparente de la proteína de la dieta	49

RESUMEN

La harina de pescado (H.P.) es uno de los ingredientes más importantes utilizados en la alimentación de camarón debido a que aporta una gran cantidad de nutrientes, tales como proteína, lípidos, aminoácidos y ácidos grasos esenciales, etc. Dichos nutrientes pueden dañarse durante el procesado de la materia prima, especialmente durante el almacenamiento y el secado. Cuando no se tiene un buen control del manejo, temperatura y tiempo de almacenamiento del pescado crudo se pueden formar aminas biogénicas (producto de la descomposición bacteriana) y otras sustancias que podrían afectar el crecimiento y la sobrevivencia al ser consumidas por el camarón. Por otra parte, en ciertos secadores una pequeña parte de la torta de prensa queda atrapada, y es sobrecalentada, dando origen a la síntesis de toxinas (como la mollerossina), que son responsables de la enfermedad del vómito negro en pollos, caracterizada por lesiones de la molleja (erosiones hemorrágicas). Para clasificar las H.P. en función del riesgo de generar esta enfermedad, se realiza en Fundación Chile una prueba biotóxica en pollos cuyo resultado (score) se expresa sobre una escala de 0 (harina de score normal, atóxica) a 3 (harina de score grave, tóxica).

Debido a que existe poca información sobre la calidad de la H. P. que debe ser utilizada para la alimentación del camarón blanco *Penaeus vannamei*, el presente trabajo evaluó el efecto de H. P. con diferente score biotóxico (0.1, 0.8, 1.3 y 2.3) y el efecto del reemplazo parcial de una H. P. de score normal (0.1) por una de score grave (2.3) sobre el crecimiento, la tasa de conversión alimenticia, sobrevivencia, digestibilidad *in vivo* y la histología del camarón blanco.

Se realizaron tres bioensayos con duración de 4, 8 y 6 semanas a una densidad de carga de 3, 8 y 6 organismos por acuario, con pesos iniciales de 1.0, 0.17 y 1.2g respectivamente. En la evaluación de digestibilidad *in vivo* se utilizaron organismos de 2.5g, con una densidad de 10 organismos por acuario y por triplicado para cada tratamiento. Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias por Duncan y Dunnett para determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos.

El crecimiento y la sobrevivencia en juveniles de *P. vannamei* mayores a 1g no fueron afectados por las H. P. con diferente score incluidas a un 30 ó 50%, pero el consumo y la tasa de conversión alimenticia mejoró conforme el score se incrementó. Las tasas de conversión y crecimiento también mejoraron cuando la H. P. de score grave reemplazó el 10% de la H. P. normal. No se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad aparente de las dietas evaluadas.

En camarones de 0.17g, el score no afectó el crecimiento ni la tasa de conversión, pero la sobrevivencia fue significativamente más baja con la H. P. de score mediano (1.3), caracterizada por contener altos niveles de aminas biogénicas y ácidos grasos libres.

Con el presente trabajo se confirma una toxicidad moderada, causante de mortalidad en camarones muy pequeños, en H. P. de score mediano asociado con altos niveles de aminas biogénicas y ácidos grasos libres. Sin embargo, la mollerossina u otras sustancias responsables de la mortandad en pollos no afecta negativamente el crecimiento y la tasa de conversión en camarón, demostrando que el aspecto toxicológico es independiente de la calidad nutricional de la H.P. La combinación de dos tercios de H. P. de score 0.1 (normal) con un tercio de H. P. de score 2.3 (grave) da mejores resultados que el 100% de la H. P. de score normal, cuando se incluye al 30% en dietas para camarones de 1.2g.

ABSTRACT

Fish meal (F. M.) is an important ingredient used in the feeding of shrimp because it provides a great amount of nutrients, such as protein, lipids, essential amino acids and fatty acids, etc. These nutrients could be damaged by the process of the raw material, especially during the storage and the drying. Poor control on fish handling, storage temperature and duration allows bacteria to produce biogenic amines and other substances that could affect the growth and survival in shrimp. On the other hand, in certain dryers, some part of the press cake remains caught and overheated, leading to the synthesis of toxins like gizzerosine, that are responsible of the black vomit syndrome in chickens, characterized by hemorrhagic erosions of the gizzard. In order to classify the F. M. in function of the risk of generating this illness, biotoxicological tests are carried out in one day broilers at Fundacion Chile laboratories which results expressed on a scale of 0 (normal score F. M. , atoxic) to 3 (dangerous score, toxic).

Because little information is available on the quality of F.M. for shrimp feeding , the present work evaluates the effect of F.M. with graded biotoxicological scores (0.1, 0.8, 1.3 2.3) and the effect of the partial substitution of a normal score F. M. (0.1) for one of dangerous score (2.3) on growth, feed conversion, survival, *in vivo* digestibility and histology of the white shrimp.

Three growth trials were carried out during 4, 8 and 6 weeks, at a density of 3, 8 and 6 organisms per aquarium, with initial mean weight of 1.0, 0.17 1.2g respectively. For the evaluation of *in vivo* digestibility, shrimp initial weight was 2.5g, with 10 organisms per aquarium and three replicates for each treatment. ANOVA, Duncan and Dunnet tests were realized to determine significant differences between treatments.

Growth and survival of *P. vannamei* juveniles larger than 1g were not affected by the dangerous score F.M. included a 30 or 50%, but consumption and feed conversion improved in accordance to the score. Feed conversion and growth also improved when the dangerous score F.M. was included at a 10% level in replacement of the normal F.M. Apparent digestibility was not affected by the biotoxicological score.

In 0.17g shrimp, the score did not affect growth, neither feed conversion, but survival was significantly lower with the medium score F.M. (1.3), which also contained high levels of biogenic amines and free fatty acids.

With the present work, a moderate toxicity to very small shrimps was confirmed, for F.M. where a medium score is associated with high levels of biogenic amines and free fatty acids. However, the gizzerosine and other toxic substances in chicken do not affect negatively the growth and feed conversion in shrimp, demonstrating that the toxicological aspect is independent of the nutritional quality of the F.M. The mixture of 2/3 normal score F.M.(0.1) with 1/3 dangerous score F.M. (2.3) gives better results than the normal F.M. alone, when included at a 30% level in diets for 1.2g shrimp.

INTRODUCCION

El cultivo de camarón en México, como en otros países, está cobrando un gran auge, especialmente el cultivo con camarón blanco *Penaeus vannamei*. En 1995 se produjeron en el mundo por acuicultura 712,000 Toneladas Métricas (TM), 3% menos que en 1994; algunas causas que actuaron de manera negativa sobre esta producción fueron las enfermedades virales (ejemplo Taura). De esta cantidad el Continente Americano produjo el 22% (154,000 TM); del cual Ecuador produjo el 64.9%; y México el 7.8% (Aquaculture Europe,1995). La mayoría de las granjas en América Latina son semi-intensivas, y el 80% de la producción es de la especie *Penaeus vannamei* , el 15% de *P. stylirostris* y el resto de otras especies (Rosenberry, 1994).

El alimento es uno de los principales insumos en la explotación de cualquier especie animal. Dependiendo del tipo de organismo los costos de alimentación representan del 40 al 70% del costo de producción (Almazan, 1991). Por lo tanto, para que se lleven a cabo con éxito las operaciones comerciales se requieren dietas de buena calidad que cubran los requerimientos nutricionales de las diferentes especies (Cruz-Suárez *et. al*, 1994; Pike,1994).

Debido a que la proteína es uno de los nutrientes más costosos de cualquier alimento balanceado (Pearsons,1993), la productividad en la camaronicultura se encuentra íntimamente ligada a la disponibilidad y al costo de la proteína (Cruz-Suárez, 1991). Esto se debe principalmente al hecho de que el camarón requiere alimentos con elevados contenidos de proteína, entre 30 y 65%. En especies carnívoras los niveles fluctúan entre el 55 y 65%; en cambio en especies omnívoras el requerimiento es de 35 a 50%. Para el caso de *Penaeus vannamei* los requerimientos de proteína son de 30 al 36% (Tacon,1989).

La industria de alimentos balanceados para camarón es uno de los pilares para el desarrollo de la Acuicultura. Debido al tipo de sistema de cultivo que se está empleando actualmente, los organismos cultivados dependen en gran parte del aporte de alimento peletizado. Esta industria está creciendo en forma paralela con la acuicultura y el objetivo de ésta, es obtener alimentos cada vez mejores que permitan obtener el máximo crecimiento a un menor costo (Rodriguez-Marín *et al.*,1994). Una de las limitantes para obtener alimentos de calidad constante, es la utilización de ingredientes con valor nutricional variable (Akiyama *et al*, 1990).

La H. P. representa una de las fuentes nutritivas más importantes desde el punto de vista económico y biológico para la alimentación de especies de altos requerimientos nutricionales (Castro, 1990). Además es considerada como la principal fuente de proteínas en alimentos balanceados para peces y crustáceos, ya que no se han encontrado otras fuentes de proteína que presenten las características

nutricionales que permitan sustituirla totalmente (Chavez-Sanchez, *et al.*, 1991). El nivel de inclusión de la H. P. recomendado en dietas comerciales para camarón es de 20 al 40% (Akiyama *et al.*, 1991); por lo tanto, la calidad y la disponibilidad de la H. P. son una limitante para obtener alimentos balanceados de buena calidad para estos crustáceos.

Para obtener H. P. de buena calidad es necesario tener un estricto control de la captura de la materia prima, almacenamiento y procesamiento para evitar afectar la calidad nutricional de la harina, y además disminuir la probabilidad de la producción de aminos biogénicos y otras sustancias que repercutan sobre el crecimiento y sobrevivencia de los organismos alimentados con este tipo de harinas. En México no se tiene un control sobre la calidad de la H. P., los únicos parámetros que se controlan para su venta son su composición bromatológica, digestibilidad *in vitro* y calidad microbiológica. Sin embargo existen otros indicadores de calidad como el score biotóxico (determinado en pollos) que actualmente ofrece la industria harinera en Chile, del que aún no se conoce que rango de score seleccionar para su uso en la nutrición de camarones. El presente trabajo trata de determinar el efecto de las H. P. con diferente score biotóxico sobre el crecimiento y sobrevivencia en camarón blanco *Penaeus vannamei* para con ello contribuir al establecimiento de las especificaciones de calidad de la H. P. más adecuada para la alimentación del camarón.

ANTECEDENTES

1.- PRODUCCION MUNDIAL DE HARINA DE PESCADO

En 1994 la captura mundial de pescado fue de 109.6 millones de toneladas. 74.8 millones de toneladas fueron destinadas al consumo humano y 34.7 millones de toneladas a la elaboración de harinas y aceites de pescado. De la producción de harina y aceite de pescado, el 50% es utilizado en la industria avícola, el 25% para la industria de los cerdos y 15% para acuicultura (Barlow, 1996; FAO, 1996).

Los principales productores de H. P. en el mundo, son Perú, Chile, Noruega, Estados Unidos, Islandia, Dinamarca y Sudáfrica (Tabla 1)

Tabla 1.- Países líderes en la producción de H. P. (en miles de toneladas)

País	1993	1994
Chile	1,143	1,546
Perú	1,670	2,340
Noruega	250	207
Islandia	194	167
Dinamarca	314	348
U.S.A.	318	370

Fuente: Pike, 1994

La H. P. se elabora a partir de peces enteros o de desechos, el 90% es de especies grasas, el 9% de especies magras y el 1% es a partir de ballenas y mariscos (Pike *et al.*, 1990). La composición química de estas especies varía en función de la relación entre hueso, grasa y carne magra, del área geográfica de captura y si se procesan peces enteros o subproductos de los mismos. También existen diferencias dentro de la misma especie, según la época del año en que se capture y su alimentación. Es importante tomar en cuenta estas variaciones para ajustar la maquinaria y lograr la calidad deseada del producto final. Además el nutriólogo o formulador debe conocer las variaciones en contenido de nutrientes de las H. P. para hacer los ajustes pertinentes en las matrices nutricionales que maneje. Estas diferencias se dan principalmente en componentes tales como aminoácidos, minerales y energía (Tabla 2).

Tabla 2- Tipos de H. P. producidas en varios países

País	Tipo de harina de pescado
E.U.A.	Sábalo (Menhaden), la mayoría procesada con flama directa. En el sur se procesa con vapor/aire clasificada como premium
Canadá	Arenque, procesada con vapor/aire
Perú	Anchoveta. Llama directa y vapor/aire
Sudafrica	Pilchard
Noruega e Islandia	Arenque y capelina, procesada a bajas temperaturas
Chile	Anchoveta y macarela, llama directa y vapor aire
Japón	Sardina

Fuente: Overseas Fishery Corporation Fundation, 1985

2.- FABRICACION

El pescado es un recurso altamente perecedero y su elaboración en forma de harina da lugar a un producto estable, con un elevado contenido proteico. El proceso consiste esencialmente en la separación de tres componentes principales: sólidos, aceite y agua (Windsor y Barlow, 1986).

Generalmente se prepara por el método de cocción, prensado, secado y molido. La producción de harina de pescado se efectúa eficientemente en las plantas de harinas que combinan estos procesos (Overseas Fishery Corporation Fundation, 1985).

De acuerdo a la tecnología usada y a la frescura de la materia prima empleada existen dos grandes categorías de H. P. :

- a).- **Harinas de pescado común:** también llamada FAQ (Fair Average Quality), la cual representa la mayor parte de la producción mundial. Es producida a través de tecnología industrial clásica, usando secado por llama directa u otro sistema indirecto más moderno.
- b).- **Harinas de pescado especiales:** son H. P. de primera calidad, manufacturadas bajo procedimientos industriales especiales a partir de pescado crudo muy fresco. La etapa de secado se realiza a una baja temperatura obteniendo un producto con una alta cantidad de proteínas, alta digestibilidad (>95% *in vitro*), ausencia de productos químicos tóxicos (nitrosaminas y amoníaco libre), alto porcentaje de aminoácidos esenciales, baja concentración de aminos biogénicas (histamina), alta solubilidad de la proteína, mejor palatabilidad, bajo contenido de acidez y de rancidez, baja concentración de sal y arena, menor humedad y contenido de grasa, bajo contenido microbiano y además contienen antioxidantes que garantizan que no se produzcan fenómenos de oxidación en el producto final.

3.- VALOR NUTRICIONAL

La H. P. es una fuente de proteína, energía, ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas (Barlow y Windsor, 1984) y representa una de las fuentes nutritivas más importantes en la alimentación de aves, cerdos, peces y crustáceos (Castro, 1990). Se considera que tiene un alto valor biológico, ya que es rica en aminoácidos esenciales, particularmente lisina y aminoácidos azufrados. La composición de la grasa en la H. P. difiere de la mayoría de los aceites vegetales por contener niveles de ácidos grasos de cadena larga (C20 y mayores) poli-insaturados que en su mayoría pertenecen a la familia de los ácidos linolénicos (W3) (Castro, 1990; Pike *et al*, 1990). Además aporta, selenio, calcio y fósforo, este último se encuentra completamente disponible. Por otro lado, también es una buena fuente de colina. Varios autores reportan que tiene factores desconocidos de crecimiento (Barlow y Windsor, 1984; Castro, 1990; Akiyama *et al*, 1991; Hardy y Masumoto, 1991). En general las H. P. están libres de toxinas tales como ureasas, antitripsinas, tioglucosidos, entre otros, que generalmente se presentan en fuentes proteicas de origen vegetal.

4.- PARAMETROS DE CALIDAD

Existen varios factores que afectan el valor nutricional de la H.P., básicamente son 5 puntos principales concernientes al tipo de materia prima utilizada y a las técnicas de procesamiento (Pike *et al.*, 1992; Pike,1994; Galleguillos y Romero, 1994), siendo estos:

- 1.- Tipo de materia prima: especie, pescado entero o subproductos
- 2.- Frescura de la materia prima: Esta determinada por el deterioro mediante la acción bacteriana, autólisis y oxidación .
- 3.- Temperatura de secado y tiempo de permanencia de la materia en el secador.
- 4.- Calidad de los lípidos.
- 5.- Calidad microbiológica.

5.- CRITERIOS DE CALIDAD

La calidad de la H. P. es afectada por la especie de pez utilizada para su elaboración, si esta proviene de un pescado entero ó de desechos, temperatura de proceso, tipo de secador utilizado (flama directa ó de chaquetas), frescura de la materia prima, etc. (Pike, 1994; Galleguillos y Romero,1994; Barlow y Windsor,1994; Mackinlay, 1994)

Existen algunos criterios de calidad nutricional actualmente utilizados para la selección de H. P., estos son:

- a).- *Características físicas.*- Tales como color de la harina, apariencia, tamaño de la partícula, etc.
- b).- *Calidad química:* Se basa en indicadores nutricionales tales como el contenido de humedad, proteína cruda, grasa y ceniza.
- c).- *Calidad de la proteína.*- Dentro de los puntos a considerar para la selección de la H. P., están la digestibilidad *in vitro*, superior al 90% (Castro, 1987; Cruz-Suárez *et al.*, 1995), lisina disponible con 4.9% en la H. P. ó 6.7 g/16 g N (Barlow y Windsor, 1994), contenido de aminas biogénicas totales no mayor a 2000 ppm (partes por millón); para salmón el nivel de histamina deben ser menor a 500 ppm (Pike *et al.*, 1990; Subramanyam, 1994) y frescura de la materia prima (TVN 90 mg N/100g pescado fresco; 50 mg N/100g pescado fresco para H. P. LT).

d).- Calidad de los lípidos.- Se evalúa el contenido de acidez libre, valor ácido e índice de peróxidos.

e).- Calidad Sanitaria.- Se cuantifica la cantidad de bacterias presentes en la H. P., generalmente la harina debe estar libre de *Salmonella*, *Shigella* y *Aspergillus*. La cantidad de hongos y levaduras debe ser menor a 10 ufc/g, *E. coli* menor a 3 nmp (número más probable) (Castro, 1990; Galleguillos y Romero, 1994).

f).- Calidad Biológica.- Evalúa el efecto nutricional y toxicológico de la H. P. en animales experimentales, evidenciando el efecto nutricional sobre el consumo de alimento, ganancia en peso y mortalidad de los organismos.

Actualmente la industria Chilena ofrece un nuevo criterio de selección de las harinas, consiste en clasificar las harinas de acuerdo a un score biotóxico evaluado en pollos, y tratando de establecer una correlación entre el vómito negro aviar y los posibles causantes del problema. De los resultados obtenidos se clasifica la harina de pescado y se establece el nivel máximo a incluir en los alimentos para las distintas especies (Castro, 1987; Galleguillos y Romero, 1994).

En estos bioensayos se utilizan pollos broilers de engorda de un día de edad que se alimentan un mínimo de 3 días con una dieta starter sin harina de pescado y durante 7 días con una starter que incluye un nivel muy elevado de H. P. a evaluar (40%- 50%). Terminado este período de alimentación, los pollos se sacrifican, se evalúa y se certifica la calidad biotóxica de la harina de pescado en base a la severidad de las lesiones (úlceras, necrosis, hemorragias) observadas en las mollejas de pollos. De acuerdo al tipo de lesión en la molleja y el número de pollos afectados el score se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Score} = \frac{\text{Score 2 X No. pollos afectados por el score 2} + \text{score 3 X No. pollos afectados por el score 3}}{\text{No. Total de pollos en experimentacion}}$$

El grado de severidad de las lesiones observadas y el número de pollos afectados permite clasificar a las H. P. en 4 categorías: normal, leve, mediana y grave.

a).- Harinas de pescado de toxicidad normal: No causan ningún daño o lesión en la molleja. Score 0 - 0.5

b).- Harinas de pescado de toxicidad leve: Causan lesiones histopatológicas muy leves en la molleja, caracterizadas por pequeñas úlceras, hemorragias y necrosis o bien enrojecimiento de las corrugaciones. El mercado sudafricano considera este nivel de biotoxicidad como el límite máximo aceptable para las harinas que importa. Score 0.6-1.0

- c).- *Harinas de pescado de toxicidad media*: Causan evidentes signos de lesiones histopatológicas en extensas áreas de la molleja. Score 1.1 - 1.5
- d).- *Harinas de pescado de toxicidad grave*: Causan severas y mortales lesiones histopatológicas de la molleja. Pueden incluso perforar la molleja y causar los típicos casos de vómito negro aviar. Su uso no es recomendable en alimentación animal. Score mayor a 1.5

6.- AMINAS BIOGENICAS

Las aminas biogénicas son productos químicos orgánicos provenientes de la degradación enzimática bacteriana, por la acción de la amino-descarboxilasa que cataliza la transformación de los aminoácidos en aminas biogénicas. Cuando se encuentran en altas concentraciones pueden tener efectos tóxicos o antinutricionales. Debido a que son aminas vasoactivas, producen efectos patológicos en los animales. Las aminas biogénicas comúnmente encontradas en las harinas de pescado y sus aminoácidos precursores son:

Tabla 3.- Aminas biogénicas y sus productos químicos

Aminoácido	Amina
Arginina → Ornitina	Putrescina → Espermidina → Espermina
Histidina	Histamina
Lisina	Cadaverina
Tirosina	Tiramina

Fuente: (Castro, 1990; Pike et al, 1990; Castro, 1992; Pike, 1994; Galleguillos y Romero, 1994; Garcilaso, 1992; Lehninger et al., 1989; Bohinski, 1991)

Los factores que influyen en la formación de aminas biogénicas son la carga microbiana inicial, el grado de daño del producto de la pesca, la temperatura del agua, estación del año, tipo de pesca y proceso (Galleguillos y Romero, 1994; Pike, 1994).

Las aminas biogénicas, por ser termoestables, podrían considerarse como útiles indicadores del grado de frescura de la materia prima, de la fracción soluble del pescado y del producto terminado.

Algunos autores como Zaldivar en 1992; Galleguillos en 1993 y Galleguillos y Romero en 1994 recomiendan que para evitar la formación de aminas biogénicas se debe tener un control en las siguientes etapas:

- 1.- Captura y entrega a las plantas
- 2.- Almacenamiento de la materia prima en la planta
- 3.- Manipulación y utilización de la sangre, ya que esta puede ser un factor importante para la producción de aminas biogénicas.
- 4.- Manipulación y procesamiento del concentrado de agua de cola.
- 5.- Almacenamiento del producto terminado

7.- MOLLEROSINA

El término mollerossina se relaciona con la molleja (Moll) y erosiones (eros) inducidas por un tóxico derivado de la histidina (ina) causante de la erosión en mollejas en pollos (Castro, 1990). La erosión de molleja es el resultado de la sobreproducción de ácido en el proventrículo. La regurgitación de bilis desde el ducto biliar hacia la molleja tiende a neutralizar el ácido, cualquier interferencia en la producción de bilis o flujo de bilis hacia el intestino puede producir erosión de la molleja (Rodríguez-Ríos, 1990; Castro 1987; Galleguillos y Romero, 1994).

Este síndrome se ha convertido en un problema mundial que afecta principalmente a la industria avícola, a la industria elaboradora de alimentos e inclusive a la industria elaboradora de harina de pescado. Se han reportado casos en Alemania Occidental, Australia, Brasil, Colombia, Ecuador, Estados Unidos, Holanda, Japón, México, Venezuela y Yugoslavia (Pike, 1994) relacionándose etiológicamente con el uso de ciertas H.P. desde 1968 (Rodríguez-Ríos, 1990).

La mollerossina fue identificada en 1983 por investigadores japoneses como la responsable del vómito negro aviar. Este tóxico es 10 veces más potente que la histamina en aumentar la secreción gástrica y 300 veces más potente para producir erosión en la molleja y vómito negro aviar (Castro, 1990; Rodríguez-Ríos, 1990); estimula los receptores H1 y H2 histamínicos, pero se considera que la estimulación de H2 es el responsable de la secreción ácida (Osuna, 1989). Las H.P. causantes de la erosión de molleja y vómito negro contienen la forma activa L-mollerossina (Castro, 1990).

La mollerossina (2 amino 9-4 imidazol 7 ácido azanónico) se forma al reaccionar por sobrecalentamiento la L-histidina con el radical épsilon amina de la lisina. La histidina forma parte de los aminoácidos solubles en el pescado; encontrándose por lo tanto en el extracto acuoso. Por otra parte la lisina puede permanecer unida con enlaces peptídicos a las cadenas de las proteínas del pescado; por lo tanto la lisina se mantendrá disponible para reaccionar por su radical épsilon, más no el alfa, el cual forma parte precisamente del enlace peptídico (Rodríguez-Ríos, 1990).

Existen diversas causas que pueden contribuir a la erosión de la molleja siendo la presencia de aminas biogénicas y mollerossina una de las principales ; pero también por micotoxinas de hongos, ácidos grasos polinsaturados en la dieta que no están protegidos con un nivel adecuado de vitamina E, niveles altos de cobre (200 ppm) o dietas deficientes en vitamina K (Rodríguez-Ríos,1990) (Tabla 4) .

Tabla 4.- Factores que contribuyen a la aparición de erosión de molleja en pollos.

Autores	Causas
Janssens y Germs, 1971	Exceso de vitamina E
Harry <i>et al</i> , 1975; Castro, 1990; Umemura, 1982;	Exceso de Histamina
Galleguillos, 1995; Galleguillos, 1993	No hay correlación entre histamina y erosión de molleja
Castro, 1987; Rodríguez Ríos. 1990, Díaz, 1980; Aguirre, 1981	Calentamiento de harina de pescado Tamaño de partícula y calentamiento de harina de pescado
Wessels y Post, 1989	Calentamiento de Harina de pescado + Lisina
Okazaki, 1983 ; Osuna, 1985; Morales-Barreras <i>et al</i> ,1991	Caseína + Histidina ó Histidina+ Harina de Pescado sobrecalentada
Masumura y Sugahara, 1985 Sugahara <i>et al</i> , 1987 Ito <i>et al</i> , 1988 Ito, 1988 Morales-Barreras, <i>et al</i> , 1990	Mollerossina Mollerossina sintética y ligada a proteínas Mollerossina y su afinidad por receptores de histamina Mollerossina y nivel de AMPC Mollerossina + Harina de Pescado
Janssen y Germs, 1971	La fracción grasa de la harina de pescado causa afección en los organismos

Una de las ventajas que ofrece la clasificación de las H. P. de acuerdo a su score biotóxico, es que toma en consideración todas las sustancias que puedan afectar a los organismos (pollos) que por otro criterio de calidad no pueden ser evaluados (Galleguillos, 1994).

7.1.- EFECTO EN PECES DE SUSTANCIAS Y/O HARINAS DE PESCADO QUE CAUSAN EROSION DE MOLLEJA EN POLLOS

En 1987 Watanabe *et. al.* estudiaron el efecto de la adición de histidina o histamina y α -tocoferol en harina de ballena incluida en dietas para trucha arcoiris y pollos y su relación con la aparición de erosión estomacal. Los resultados indican una anomalía del estómago de estos organismos causada por la harina de ballena sobrecalentada conteniendo histidina o histamina. En observaciones histológicas detectaron necrosis en las células de las glándulas gástricas en peces que consumieron dietas con altas concentraciones de histamina y harina de ballena sobrecalentada. El tratamiento con histamina y sin suplemento de α -tocoferol resultó en una disminución del crecimiento y scores más altos que en dietas con vitamina E.

Castro en 1991 estudió el efecto en salmón de H. P. ricas en histamina y aminas biogénicas y encontró que el salmón no experimenta evidencias de lesiones estomacales inducidas por la temperatura de procesado de la H. P. con material fresco, sobrecalentado y conteniendo niveles altos de aminas biogénicas y mollosina. Este mismo autor en 1987 encontró lesiones estomacales en trucha presentándose únicamente distensión abdominal y hemorragias.

Pike en 1994 menciona que el efecto del procesamiento de la H. P. a varias temperaturas (60, 70, 80, 90 y 110°C) afecta el crecimiento de salmón, teniéndose mejores resultados en incremento en peso a una temperatura de procesamiento de la harina a 60 y 70°C.

Fairgrieve *et al.* en 1994 realizaron un estudio de crecimiento, alimentación y desarrollo de anomalías gástricas en juveniles de trucha alimentadas con dietas que contenían H. P. de toxicidad grave para pollos; suplementaron a las dietas caseína con histamina y dos posibles potencializadores sospechosos de toxicidad con histamina, putrescina y cadaverina, concluyendo que la trucha es poco sensitiva a las H. P. que causan erosión en molleja (GE) en pollos y que no existe además una correlación entre el score y el valor nutricional de la H. P. Este estudio muestra que la distensión abdominal que se observó en los organismos alimentados con H. P. GE-positivo puede ser duplicado con la administración en la dieta de 200 mg de histamina por kilogramo de dieta.

Romero *et al.*, (1995) realizaron varios experimentos evaluando 27 muestras de H. P. provenientes de 6 plantas diferentes, identificadas en lo que respecta a lapsos entre tiempo de captura y proceso, composición proximal de la materia prima y del producto final terminado, análisis de aminas biogénicas, disponibilidad de lisina, digestibilidad *in vitro* y digestibilidad proteica *in vivo* evaluada en truchas arco iris y pruebas biotóxicas en pollos. Además 5 muestras fueron analizadas en Noruega

mediante la técnica de digestibilidad *in vivo* con mink, encontrando pobre correlación entre la digestibilidad aparente de proteína en trucha y algunos indicadores de calidad usados por la industria elaboradora de H. P.

7.2.- EFECTO DEL SCORE Y DE MOLLEROSINA EN CRUSTACEOS

Chavez et al., (1991) probaron 10 dietas experimentales en *P. vannamei* de un peso promedio de 1.95g, utilizando diversas H. P. que contribuían con el 50% de la proteína en la dieta; las harinas utilizadas fueron LT, Norseamink y Noruega con scores de 0.1, 0.2a y 0.2b respectivamente, una H. P. sin score toxicológico como control negativo y otra harina con score mediano (1.1) como control positivo; utilizaron caseína para diluir la H. P. de score 1.1. Después de tres meses de experimentación no se observaron diferencias significativas en sobrevivencia, el mayor crecimiento se obtuvo con dietas que contenían 40, 30 y 8% de caseína en combinación con H. P. de score mediano, así como con la H. P. sin score biotxicológico y LT. Además se realizaron estudios histológicos encontrando daños celulares relacionados con la inclusión de caseína en las diferentes dietas, sin embargo no es posible asegurar que sean producto de un agente tóxico o de una deficiencia o desbalance nutricional.

En 1994 Abdo de la Parra utilizó 4 H. P. en la elaboración de dietas (30% de inclusión de la harina en la dieta) para camarón blanco *Penaeus vannamei* de una talla promedio de 0.07 g, con scores de 0.1a, 0.1b, 1.1 y 1.4 respectivamente. Además suplementó DL-mollerosina sintética a la dieta que contenía harina de pescado de score 0.1 con dosis de 1, 3, 6, y 9 mg/Kg de alimento. Concluyó que las H. P. de score mayor a 1.1 y la administración de DL-mollerosina disminuyen la sobrevivencia de los organismos en un 20% y que las H. P. en dietas para camarones de esta talla deben de tener un score menor a 1.1.

En ese mismo año Cruz-Suárez *et al.* (1994), evaluaron H. P. (score 0.1, 0.9, 1.3 y 2.0) a un nivel de inclusión del 40% en dietas para camarón blanco *Penaeus vannamei* de una talla promedio de 0.26g., no afectándose la sobrevivencia, pero si el crecimiento, siendo menor con las dietas que contenían H. P. de toxicidad mediana (score 1.3) y grave (score 2.0). La tasa de conversión alimenticia fue mayor en la dieta con H. P. de score 2.0. Cabe mencionar que la harina de score 2.0 se obtuvo por sobrecalentamiento de la H.P. de score 1.3 en una estufa en laboratorio a 105°C por 5 horas, lo cual no sólo aumentó el score biotxicológico en pollos, pero también disminuyó drásticamente la digestibilidad de la proteína

IMPORTANCIA

La H. P. es uno de los principales ingredientes utilizados en la alimentación de camarón. Hasta la fecha ha sido imposible sustituirla, cuando es de buena calidad, con otra fuente que pueda suministrar a los organismos acuáticos cultivados un buen perfil de aminoácidos esenciales, una buena digestibilidad de proteína, ácidos grasos polinsaturados, etc.

La calidad de la H. P. depende de la etapa de captura, almacenamiento y procesamiento del producto, lo cual afecta el crecimiento y sobrevivencia de organismos de importancia comercial que la consumen tal como aves, cerdos y organismos acuáticos.

En lo que respecta a la alimentación en camarón es importante determinar si el uso de H. P. con diferente score biotóxicológico determinado en pollos afecta el crecimiento, la tasa de conversión y la sobrevivencia para definir si la aplicación de este criterio de calidad en la selección de H. P. para alimentos balanceados de camarón es necesaria.

ORIGINALIDAD

En la actualidad existen tres estudios sobre el efecto de la utilización de H.P. con diferente score biotóxicológico en alimentos balanceados para camarón, donde se han obtenido resultados no concluyentes. El presente trabajo trata de complementar el conocimiento sobre este tema en camarón blanco *Penaeus vannamei* utilizando dos clases de talla, 4 H. P, dos niveles de inclusión y la combinación en diferentes proporciones de harinas de score extremo.

HIPOTESIS

1.- El consumo de H.P. de score biotóxicológico mediano y grave a niveles de inclusión elevados (mayores al 30 por ciento) causa mortalidad en animales menores a 0.2g y afecta negativamente el crecimiento y la tasa de conversión alimenticia en ellos, causando en ambos casos daños histológicos; y acelera la velocidad de respuesta en el bioensayo.

2.- Las H. P. de score grave pueden usarse mezcladas con H. P. de score normal en ciertas proporciones, sin afectar el crecimiento, la tasa de conversión alimenticia y la sobrevivencia del camarón.

3.-El efecto tóxico de las H. P. es independiente de su valor nutricional.

OBJETIVO GENERAL

Confirmar el efecto del consumo de harinas de pescado con diferente score biotóxico sobre el crecimiento, sobrevivencia y tasa de conversión alimenticia de camarón blanco *Penaeus vannamei*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el efecto de la inclusión de 50 por ciento de H.P. con diferente score biotóxico (4 grados) en dos tallas de camarón *Penaeus vannamei* (1 y 0.17 g)
- 2.- Determinar el efecto nutricional de la inclusión del 30 por ciento de H.P. con diferente score biotóxico en camarones de 1.2g.
- 3.- Determinar el efecto de dos niveles de inclusión (50 y 30%) de dos harinas de score extremo (0.1 y 2.3) y su interacción en *P. vannamei* de 0.17g.
- 4.- Determinar el efecto del reemplazo creciente (4 niveles) de una H.P. de score 0.1 (normal) por una de score 2.3 (grave) en organismos de 0.17 y 1.2g a un nivel de inclusión del 30%.
- 5.- Evaluar la digestibilidad *in vivo* de la proteína de las dietas que contienen 30 por ciento de inclusión de las H.P. experimentales.
- 6.- Evaluar posibles daños histopatológicos en los organismos debido al efecto del consumo de H.P. con diferente score.

MATERIAL Y METODOS

1- HARINAS DE PESCADO EXPERIMENTALES

Se utilizaron 4 H. P. procedentes de Chile, seleccionadas y certificadas por Fundación Chile con scores biotóxicos de 0.1, 0.8, 1.3 y 2.3 respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5.- Análisis químico-nutricional de las H. P experimentales, proporcionadas por Fundación Chile (Base húmeda).

Análisis	Score 0.1	Score 0.8	Score 1.3	Score 2.3
Humedad (%)	8.4	7.9	8.6	6.5
Proteínas (%)	67.7	63.2	64.2	66.6
Grasa (%)	8.4	8.5	9.2	10.8
Ceniza (%)	15.3	20.1	17.1	15.5
Calcio (%)	3.5	4.8	3.7	4.6
Fósforo (%)	2.5	3.1	2.5	2.8
Cloruros (%)	3.1	4.5	4.7	1.7
Histamina (ppm)	253	954	1542	208
TVN mg N/100g	103	102	110	74
Acidos Grasos Libres (%)	7.8	8.9	9.3	9.6
Digestibilidad de proteína (%)	96.6	95.4	96.2	95.1
Lisina disponible (g/100g Proteína)	7.1	7.4	6.6	7.0
HPLC				
Histamina (ppm)	283	1214	1897	245
Cadaverina (ppm)	250	577	731	166
Putresina (ppm)	90	300	570	63
Tiramina (ppm)	81	186	183	46
Feniletilamina (ppm)	42	100	128	36
Presencia de vómito negro (VN)	—	—	VN	VN

2.- FORMULACION Y COMPOSICION DE LAS DIETAS

Se formularon dietas experimentales, por medio de un programa computacional mitix-2, en función de la composición bromatológica de las H.P. experimentales y de los demás ingredientes, para obtener dietas isoproteicas, isocalóricas e isolipídicas, cumpliendo los requerimientos nutricionales para camarón publicados por Akiyama *et al* (1991).

En las primeras dietas (1 a 4) la H.P. se incluyó al 50 por ciento como principal fuente de proteína, y se usó caseína y lecitina de soya para compensar las pequeñas diferencias en el contenido proteico y de grasa de las cuatro H.P. experimentales. También se incluyó celulosa para complementar el 100 por ciento de la materia seca de cada dieta (Tabla 6).

Tabla 6.- Composición de las dietas experimentales 1 a 4 (50 por ciento de inclusión de las H.P.)

Ingrediente	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Harina de Pescado score 0.1	50	-	-	-
Harina de Pescado score 0.8	-	50	-	-
Harina de Pescado score 1.3	-	-	50	-
Harina de Pescado score 2.3	-	-	-	50
Almidón de Trigo (%)	39	39	39	39
Gluten de trigo (%)	5	5	5	5
Caseina (%)	-	2.42	1.88	0.59
Celulosa (%)	2.8	0.46	1.35	3.44
Lecitina de soya (%)	2.5	2.45	2.1	1.3
Mezcla vitamiruca (%)	0.22	0.22	0.22	0.22
Inositol (%)	0.03	0.03	0.03	0.03
Colesterol (%)	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamina C (%)	0.03	0.03	0.03	0.03
Cloruro de colina al 60%	0.08	0.08	0.08	0.08
Antioxidante (%)	0.02	0.02	0.02	0.02
Total	99.98	100.01	100.01	100.01

Para las dietas 5 a 8, las harinas experimentales se analizaron bromatológicamente en el Laboratorio de Maricultura, mediante las técnicas de la A.O.A.C, (1990) y los resultados obtenidos se utilizaron en su formulación.

Se elaboró una dieta base con 30 por ciento de inclusión de la H.P. 0.1 (dieta 5) en la cual además de una menor inclusión de H.P. se le hicieron los siguientes cambios con respecto a la dieta base 1: se aumentó el gluten de trigo (aglutinante) de 5 a 8 por ciento, se reemplazó el almidón por harina de trigo (con el fin de mejorar la estabilidad de las dietas en el agua), también se adicionó harina de camarón y aceite de pescado (atractantes). En las dietas 6, 7 y 8, se incorporó la H.P. de score 2.3 a niveles de 10, 20 y 30 por ciento respectivamente, en reemplazo de la

H.P. de score 0.1, sin cambiar los otros elementos de la fórmula base, ya que las dos harinas tenían composiciones proximales similares (tabla 7).

Para las dietas 9 a 11 se consideró como fórmula de base la dieta 5 cambiando únicamente el tipo de H.P. (diferente score) al mismo porcentaje de inclusión para estas dietas.

La dieta 11 tiene la misma fórmula que la 5, pero se trata de una segunda fabricación.

Tabla 7.- Composición de las dietas experimentales 5 a 11 (30 por ciento de inclusión de la H.P.).

Ingrediente (%)	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8	Dieta 9	Dieta 10	Dieta 11
Harina de pescado de score 2.3	-	10	20	30	-	-	-
Harina de Pescado de Score 1.3	-	-	-	-	30	-	-
Harina de Pescado de score 0.8	-	-	-	-	-	30	-
Harina de Pescado de score 0.1	30	20	10	-	-	-	30
Harina de trigo	51.53	51.53	51.53	51.53	51.53	51.53	51.53
Gluten Trigo	8	8	8	8	8	8	8
Harina de camarón	6	6	6	6	6	6	6
Lecitina soya	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Aceite pescado	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
mezcla de vitaminas	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
vitamina C	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Colina	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076
Inositol	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
Antioxidante	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
Metionina	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Fosfato monobásico	1	1	1	1	1	1	1
Total	100	100	100	100	100	100	100

3.- PREPARACION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

Todos los ingredientes se molieron finamente utilizando un molino de café moulinex. Se pesaron de acuerdo a la formulación y se mezclaron en una batidora Kitchen Aid de una capacidad de 4 litros. Primeramente se mezclaron los ingredientes mayores. De la misma manera se hizo una micromezcla con los ingredientes menores a la cual fue incorporada posteriormente la macromezcla. La lecitina de soya y el aceite de pescado se adicionaron después de mezclar las harinas. Para evaluar la digestibilidad *in vivo* de las dietas 8 a 11, se separó de la mezcla total de cada dieta 300g adicionando 1% de cromo. Finalmente se añadieron 275 ml de agua. La mezcla de los ingredientes se pasó por un molino de carne para

obtener pelets de 2 mm de diámetro; los cuales se secaron a una temperatura de 100°C por 8 minutos y se conservaron en refrigeración a 4°C en recipientes herméticos.

4.- ANALISIS DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

Cada una de las dietas se analizó en el laboratorio de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas mediante los métodos de análisis proximal descritos por la AOAC (1990), para los siguientes parámetros: humedad, ceniza, extracto etéreo, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno. Se realizaron pruebas de estabilidad en cada una de las dietas mediante el método Aquacop (1978), para determinar la pérdida de materia seca después de una hora de inmersión en agua marina a 35 g/lit. La concentración de óxido de cromo en las dietas para digestibilidad (1 a 8), así como en las heces de camarón se determinó con el método de Bolín, *et al.*, 1952 modificado por Nieto-López (1995).

5.- BIOENSAYOS

5.1.- SALA DE BIOENSAYOS

La sala de zootecnia consta de 48 acuarios de fibra de vidrio de 60 X 30 X 35 cm, con un volumen de 60 litros (usados para los bioensayos con camarones de 0.17 y 1.2g), 3 tanques para preengorda de fibra de vidrio con una capacidad de 500 litros y 5 tanques de 1100 litros, de los cuales, dos son reservorios que abastecen de agua a los acuarios por gravedad y los otros reciben el agua de recirculación. Cada tanque reservorio cuenta con un contactor biológico rotatorio. Además el sistema está equipado con 2 filtros de cartucho, dos filtros de carbón activado y 2 espumadores. Para mantener la temperatura constante se cuenta con un sistema cerrado de agua dulce e intercambiador de calor en los tanques reservorios. El agua marina que se utilizó fue agua marina sintética Fritz, de la cual se preparó quincenalmente 500 litros para reemplazar lo perdido por sifoneo y fugas o recambio en acuarios experimentales.

Para el bioensayo con camarones de 1g se utilizaron acuarios pequeños de fibra de vidrio de color negro sin recirculación (20x30x20 cm, volumen 10 litros), colocándolos dentro de los tanques de preengorda para mantener la temperatura constante. Cada día, se cambió del 25 al 50% del agua de cada acuario, tirándose el agua cambiada al drenaje, para evitar una eventual contaminación del sistema con sustancias solubles como mollerosina. De esta manera, se puede considerar el sistema utilizado como abierto (no hay recirculación).

Para el bioensayo de digestibilidad aparente se utilizaron los acuarios de un volumen de 60 lt, y se uso la metodología reportada por Nieto-López (1995).

5.2.- PARAMETROS FISICO-QUIMICOS

Diariamente se registró la temperatura, salinidad y semanalmente pH, nitritos, nitratos y amonio.

5.3.- CAMARONES

La procedencia de los organismos utilizados fueron las siguientes: para organismos de 1g fue del Laboratorio de Producción de Postlarvas Génesis de Puerto Peñasco, Son., para 0.17g del Laboratorio de Producción de Postlarvas el Camarón Dorado de Cd. Obregón Son. y para organismos de 1.2g del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNor) de la Paz B. C.S.

Los camarones de 2.5g utilizados para digestibilidad fueron los mismos con que se evaluó el efecto del score de las H. P. a 30% de inclusión.

Al llegar las postlarvas al laboratorio fueron aclimatadas en los estanques de engorda y se mantuvieron bajo observación por 1 ó 2 semanas, alimentándose con la dieta de base del experimento al cual iban a ser sometidos.

5.4.- PARAMETROS DE LA EVALUACION BIOLOGICA

Se determinó durante los bioensayos, consumo de alimento, ganancia en peso, tasa de conversión alimenticia y sobrevivencia de cada tratamiento, mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Consumo Individual (g) *} = \frac{\text{Cantidad de alimento consumido por acuario (g)}}{\text{Numero de organismos por acuario}}$$

*Para calcular el consumo individual acumulado sobre un período dado, se suman los valores de consumo individual obtenidos cada día .

$$\text{Ganancia en Peso (\%)} = \frac{\text{Peso promedio final(g)} - \text{Peso promedio inicial (g)}}{\text{Peso promedio inicial (g)}} \times 100$$

$$\text{Tasa de conversión alimenticia} = \frac{\text{Cantidad de alimento consumido (g)}}{\text{Incremento en peso (g)}}$$

$$\text{Tasa de Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Número final de organismos}}{\text{Número inicial de organismos}} \times 100$$

Para determinar la digestibilidad aparente de la proteína en la dieta se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{DAPD (\%)} = 100 - 100 \left[\frac{\% \text{ Cromo en la dieta}}{\% \text{ Cromo en las heces}} \times \frac{\% \text{ Proteína en heces}}{\% \text{ Proteína en dieta}} \right]$$

5.5.- CORTES HISTOLOGICOS

Al inicio y al final de cada bioensayo se fijaron los organismos con AFA de Davidson mediante la técnica propuesta por Lightner y Bell (1988), para realizar cortes histológicos en parafina y determinar posibles daños histológicos (tinción hematóxilina-eosina). Se realizaron cortes sagitales del cefalotorax y del quinto segmento abdominal así como cortes transversales del primer y del cuarto segmento abdominal. Los cortes histológicos fueron realizados en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina UANL.

5.6.- DISEÑO EXPERIMENTAL

En el bioensayo con organismos de 1g, se utilizaron 3 organismos por acuario con 6 replicados para cada tratamiento. Se alimentaron durante 28 días con las dietas experimentales 1 a 4.

En camarones de 0.17 g se colocaron 8 organismos por acuario con 6 replicados por tratamiento. Durante 56 días los camarones fueron alimentados con las dietas experimentales 1 a 8.

En camarones de 1.2g se usaron 6 organismos por acuario con 5 replicados por tratamiento. Se alimentaron con las dietas experimentales 6 a 11 durante 42 días.

Para evaluar la digestibilidad *in vivo* de la proteína de las dietas que contenían H.P. de score creciente (dietas 8 a 11) se utilizaron organismos de un peso promedio de 2.5g , colocando 10 organismos por acuario y 3 replicados para cada tratamiento.

En los bioensayos antes descritos se utilizó un diseño completamente aleatorio.

En todos los bioensayos los animales se alimentaron *ad libitum* fijando la primera dosis al 10% de la biomasa por acuario e incrementando así la cantidad de alimento en el tiempo, con el fin de que los organismos tuvieran siempre un ligero exceso de alimento. La frecuencia de alimentación fue de dos veces al día. Diariamente se sifonearon todos los acuarios para eliminar heces y residuos de alimento, registrándose mortalidad, muda y restos de alimento. Se hicieron biometrias cada dos semanas.

Se fijaron 3 individuos por acuario al final de cada bioensayo para estudio histológico.

En la evaluación del score biotóxicológico (objetivo 1 y 2) se compararon las dietas 1 a 4 (dieta 1 como control), dietas 8 a 11 (dieta 11 como control). Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza simple. Los valores promedios fueron sometidos a pruebas de comparación múltiples de Duncan y Dunnett (Zar, 1974) para determinar diferencias a un nivel de significancia $\alpha=0.05$ aplicando el programa SPSS.

Para evaluar el efecto de dos niveles de inclusión de dos harinas de score extremo y para su interacción (objetivo 3) se realizó un análisis de varianza de dos factores de los parámetros biológicos con el siguiente arreglo.

Score	% de Inclusión	
	30	50
0.1	Dieta 1	Dieta 5
2.3	Dieta 4	Dieta 8

Para evaluar el efecto del reemplazo de una H. P. de score normal (0.1) por una de score grave (2.3) en organismos de 0.17 y 1.2g, sobre los parámetros biológicos (objetivo 4), se realizó un análisis de varianza de dos factores, utilizando el siguiente diseño:

Score	Talla (g)	
	0.17	1.2
0.1 (30%)	Dieta 5	Dieta 11(=5)
0.1 (20%) v 2.3 (10%)	Dieta 6	Dieta 6
0.1 (10%) v 2.3 (20%)	Dieta 7	Dieta 7
2.3 (30%)	Dieta 8	Dieta 8

Para determinar diferencias de digestibilidad *in vivo* entre las dietas (objetivo 5) se realizó un análisis de varianza simple y una comparación de medias por Duncan ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS

1.- ANALISIS DE LAS DIETAS

El resultado del análisis proximal de las dietas 1 a 4 fue relativamente similar en las 4 formulaciones (Tabla 8). El contenido de proteína promedio de las dietas fue de 39% con un CV (coeficiente de variación) de 0.97% y el porcentaje de lípidos promedio de 6.6% con un CV de 5%. La cantidad de fibra en las dietas varió de acuerdo a la cantidad de celulosa agregada. El contenido de energía teórico fue en promedio de 4.6 Kcal/g, considerándose como dietas isocalóricas.

Al realizar la prueba de estabilidad a las dietas, se encontraron diferencias altamente significativas entre ellas ($P < 0.01$). Las dietas 1 y 3 (con H.P. de score 0.1 y 1.3) presentaron un mayor porcentaje de lixiviación en comparación con las dietas 2 y 4. Pero en general la estabilidad de esas 4 dietas fue muy baja.

Tabla 8.- Análisis proximal de las dietas 1 a 4.

Análisis	Dieta 1 Score 0.1	Dieta 2 Score 0.8	Dieta 3 Score 1.3	Dieta 4 Score 2.3
Materia seca (°)	93.5	94.8	94.1	94
Humedad (°)	6.5	5.2	5.9	6.0
Energía bruta (Kcal/g) **	4.7	4.6	4.7	4.6
Proteína cruda (°)	39.1	39.3	39.3	38.5
Grasa cruda (%)	6.8	6.2	6.9	6.4
Carbohidratos (°)	44.8	43.5	44.2	45.7
Fibra cruda (°)	1.3	0.1	0.5	1.4
Ceniza (%)	8.1	10.9	9.1	8.0
Lixiviación (°) * n=4	45±10.6b	24±9.2a	34.1±9.2ab	22.3±6.05a

Nota: datos expresados en base seca

* Letras diferentes muestran diferencia significativa (Duncan, $\alpha = 0.05$)

** Proteínas = 5.6 Kcal/g; Carbohidratos = 4.1 Kcal/g; Lípidos 9.5 Kcal/g (Tacon, 1989)

El resultado del análisis proximal de las dietas 5 a 11 (con 30% de H.P.) fue relativamente homogéneo (Tabla 9). El contenido de proteína promedio de las dietas fue de 37.3 ± 0.6 % con un CV de 1.71%. En cuanto al contenido de lípidos el valor promedio de las 7 dietas fue de 6.2 ± 0.44 con un CV de 7.1%. El contenido de energía teórico promedio fue de 4.6 kcal/g, considerándose como dietas isocalóricas.

Al comparar la estabilidad de este grupo de dietas con las primeras 4 (donde se incluyó la H.P. al 50%) se observa que la pérdida de materia seca o el porcentaje de lixiviación disminuye considerablemente de un promedio de 31.3%±10.47 a uno de 10.1%±2.5. Cabe señalar que en los dos casos (30 y 50% de inclusión) las dietas con H.P. de score 1.3 (dietas 3 y 9) presentaron la más baja estabilidad.

Tabla 9.- Análisis proximal de las dietas 5 a 11

Análisis	Dieta 5 Score 0.1	Dieta 6 20/10	Dieta 7 10/20	Dieta 8 Score 2.3	Dieta 9 Score 1.3	Dieta 10 Score 0.8	Dieta 11 Score 0.1
Materia seca (%)	92.2	94.8	92.5	92.2	95.0	93.8	94
Humedad (%)	7.9	5.2	7.5	7.8	5.0	6.2	6.0
Energía bruta (kcal/g)**	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.5	4.5
Proteína cruda (%)	37.2	37.2	36.3	36.8	37.9	37.2	38.2
Grasa cruda (%)	5.5	6.5	6.8	6.4	6.2	6.2	5.8
E. L. N. (%)	47.7	47.4	47.8	47.6	45.9	45.6	45.1
Fibra cruda (%)	0.7	0.7	0.98	1.0	0.9	1.0	1.0
Ceniza (%)	8.9	8.2	8.1	8.2	9.1	10.1	8.9
Lixiviación (%) ^a n= 5	6.1±1.9b	11.9±5.1a	10±0.8ab	7.7±1.5b			
Lixiviación (%) ^b n=5				7.7±1.5b	13.4±1.3a	10.2±0.7b	11.2±0.7b

Nota: datos expresados en base seca

Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan, $\alpha=0.05$), (Prob ANOVA P = 0.02^a y 0.000^b).

** Proteínas = 5.6 kcal/g; Carbohidratos= 4.1 kcal/g; Lípidos 9.5 kcal/g (Tacon,1989)

2.- PARAMETROS DE CALIDAD DEL AGUA

Los parámetros de calidad de agua (Tabla 10) se mantuvieron constantes durante la realización de todos los bioensayos.

Tabla 10.- Parámetros de calidad del agua.

	Temperatura (°C)	Salinidad (g/l)	pH	Amonio (ppm)	Nitritos (ppm)	Nitratos (ppm)
Organismos de 1.0g	27.9±1.6	33.54±2.1	9.1±0.45	0.3±0.2	0.45±0.4	25±0
Organismos de 0.17g	27.3±1.2	33.6±1.3	7.75±0.3	0.3±0.2	0.24±0.12	44±0
Organismos de 1.2g	27.3±2	34.9±1.5	8.05±0.07	0.42±0	0.27±0.08	44±0

3.- EVALUACION BIOLOGICA

3.1.- EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE 50 PORCIENTO DE H.P. DE DIFERENTE SCORE EN DOS TALLAS (1 Y 0.17g) DE CAMARÓN *Penaeus vannamei*

Los resultados zootécnicos obtenidos en los bioensayos realizados para determinar el efecto de inclusión de 50% de H.P. en camarones de 1 y 0.17g se presentan en las Tablas 11, 12, 13 y 14 respectivamente.

Tabla 11- Resultados de la evaluación biológica en camarones de 1g (Efecto del score biotóxicológico a 50% de inclusión de la H.P.), n=6 (3 organismos por acuario)

Dieta	1	2	3	4	Valor F	Prob.
Score	0.1	0.8	1.3	2.3		
Peso promedio (g)						
Día 0	1.04±0.1	1.05±0.08	1.04±0.08	1.02±0.11	0.83 NS	0.83
Día 14	1.54±0.31	1.51±0.22	1.54±0.19	1.43±0.21	0.43 NS	0.43
Día 28	1.99±0.29	2.16±0.19	2.01±0.36	1.75±0.21	0.21 NS	0.21
Consumo de Alimento(g)						
14 días	1.42±0.05a	1.36±0.05b	1.44±0.03a	1.42±0.04a	4.50 **	0.01
28 días	3.55±0.24	3.03±0.092	3.59±0.17	3.39±0.16	1.63 NS	0.21
Ganancia en peso (%)						
14 días	48±13	43±14	49±12	40±11	0.71 NS	0.55
28 días	91±27	106±19	94±35	71±23	1.74 NS	0.19
Tasa de Conversión Alimenticia						
14 días	3.06±1.07	3.29±1.16	2.97±0.71	3.66±0.94	0.60 NS	0.63
28 días	4.05±1.43	3.09±.45	4.11±1.43	5.03±1.5	2.27 NS	0.11
Sobrevivencia (%)						
14 días	100±0	100±0	100±0	100±0	-	-
28 días	83±18	94±14	94±14	89±17	0.67 NS	0.58

Nota: letras diferentes muestran diferencia significativa (Duncan, $\alpha=0.05$)

NS: Diferencias no significativas, ** Diferencias altamente significativas.

Tabla 12.- Resultados de la evaluación biológica en camarones de 1g mediante la prueba de Dunnet (Zar, 1974), utilizando la dieta 1 como control. (Efecto del score biotóxicológico a 50% de inclusión de la H.P.)

Parámetro	Dieta	Promedio	qc	qt $\alpha=0.05$	Prob	Conclusión	
Ganancia en peso (%)	1	91	-	-	-	-	
	28 días	2	106	4.98	2.09	<0.01 **	2≠1
	3	94	0.89	2.38	>0.05 NS	3=1	
	4	71	6.76	2.54	<0.01 **	4≠1	
Sobrevivencia (%)	1	83	-	-	-	-	
	28 días	2	94	4.49	2.09	<0.01 **	2≠1
	3	94	4.49	2.38	<0.01 **	3≠1	
	4	89	2.45	2.54	>0.05 NS	4=1	

NS= Diferencias no significativas ($P>0.05$), * Diferencias significativas ($P<0.05$),

** Diferencias altamente significativas ($P<0.01$)

Tabla 13.-Resultados de la evaluación biológica en camarones de 0.17g
(Efecto del score biotóxico a 50% de inclusión de la H.P.), n= 6 (8 organismos por acuario)

Dieta	1	2	3	4	Valor F	Prob
Score	0.1	0.8	1.3	2.3		
Peso promedio (g)						
Día 0	0.17±0.05	0.17±0.05	0.17±0.04	0.17±0.05	0.23 NS	0.98
Día 14	0.33±0.03	0.35±0.005	0.35±0.05	0.33±0.05	0.20 NS	0.89
Día 28	0.59±0.08	0.65±0.08	0.63±0.05	0.58±0.11	0.91 NS	0.45
Día 42	1.03±0.15	1.16±0.01	1.11±0.21	1.05±0.23	0.61 NS	0.61
Día 56	1.65±0.22	1.81±0.02	1.65±0.23	1.55±0.42	0.82 NS	0.50
Consumo individual (g)						
14 días	0.28±0.02b	0.27±0.04b	0.35±0.07a	0.29±0.04b	3.90 **	0.02
28 días	1.01±0.18	0.98±0.15	1.19±0.1	1.07±0.14	2.22 NS	0.12
42 días	2.26±0.49	2.20±0.25	2.59±0.33	2.31±0.17	1.62 NS	0.21
56 días	4.38±0.56	4.56±0.86	4.78±0.98	4.51±1.02	0.19 NS	0.90
Ganancia en Peso (%)						
14 días	89± 22	99± 17	91± 36	90± 35	0.15 NS	0.93
28 días	242± 67	278± 27	246± 28	236± 70	0.79 NS	0.52
42 días	488±119	571± 61	505±112	503±140	0.64 NS	0.59
56 días	848±168	919±131	803±107	793±249	1.01 NS	0.41
Tasa Conversión Alimenticia						
14 días	1.86±0.43	1.61±0.22	2.25±0.56	1.97±0.39	2.43 NS	0.09
28 días	2.48 ±0.59	2.03±0.16	2.66±0.34	2.71±0.56	2.93 NS	0.05
42 días	2.70±0.67	2.23±0.13	2.95±0.91	2.73±0.64	0.26 NS	0.26
56 días	2.99±0.42	2.80±0.51	3.31±0.85	3.12±0.62	1.06 NS	0.39
Sobrevivencia (°)						
14 días	93±10a	94±10a	73±17b	90±15a	3.33 *	0.04
28 días	83±17a	90±12a	60±15b	73±15ab	4.88 **	0.01
42 días	77±22ab	83±10a	52±15c	63± 8bc	5.67 **	0.00
56 días	60±24	71±13	48±15	56±10	2.02 NS	0.14

Nota: letras diferentes muestran diferencia significativa (Duncan, $\alpha = 0.05$)

NS: Diferencias no significativas ($P > 0.05$), * Diferencias significativas (< 0.05), ** Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

Tabla 14.- Resultado de la evaluación biológica en camarones de 0.17g mediante la prueba de Dunnet (Zar, 1974), utilizando la dieta 1 como control.
(Efecto del score biotóxico a 50% de inclusión de la H.P.)

Dieta	Dieta	Promedio	qc	qt α 0.05	Prob	conclusión
Ganancia en Peso (%) 14 días	1	89	--	--	--	-
	2	99	3.69	2.09	<0.01 **	2≠1
	3	91	0.74	2.38	>0.05 NS	3=1
	4	90	0.37	2.54	>0.05 NS	4=1
Ganancia en Peso (%) 28 días	1	242	--	--	--	-
	2	278	7.62	2.09	<0.01 **	2≠1
	3	246	0.85	2.38	>0.05 NS	3=1
	4	236	1.27	2.54	>0.05 NS	4=1
Ganancia en Peso (%) 42 días	1	488	--	--	--	-
	2	571	14.77	2.09	<0.01 **	2≠1
	3	505	2.69	2.38	<0.05 *	3≠1
	4	503	2.38	2.54	>0.05 NS	4=1
Ganancia en Peso (%) 56 días	1	848	--	--	--	-
	2	919	9.05	2.09	<0.01**	2≠1
	3	803	5.73	2.38	<0.01 **	3≠1
	4	793	7.01	2.54	<0.01 **	4≠1

NS= Diferencias no significativas (>0.5), ** Diferencias altamente significativas ($P<0.01$)

CONSUMO

En los dos bioensayos a los 14 días se diferenció el consumo de una de las dietas experimentales, sin encontrar la misma respuesta ya que en el caso de los camarones de 1g la dieta 2 (con un score 0.8) fue la menos consumida mientras que con los camarones de 0.17g la dieta 3 (con un score 1.3) fue la más consumida. Sin embargo en los dos bioensayos a los 28 días (hasta los 56 días para los camarones de 0.17g) ya no se presentaron diferencias significativas de consumo.

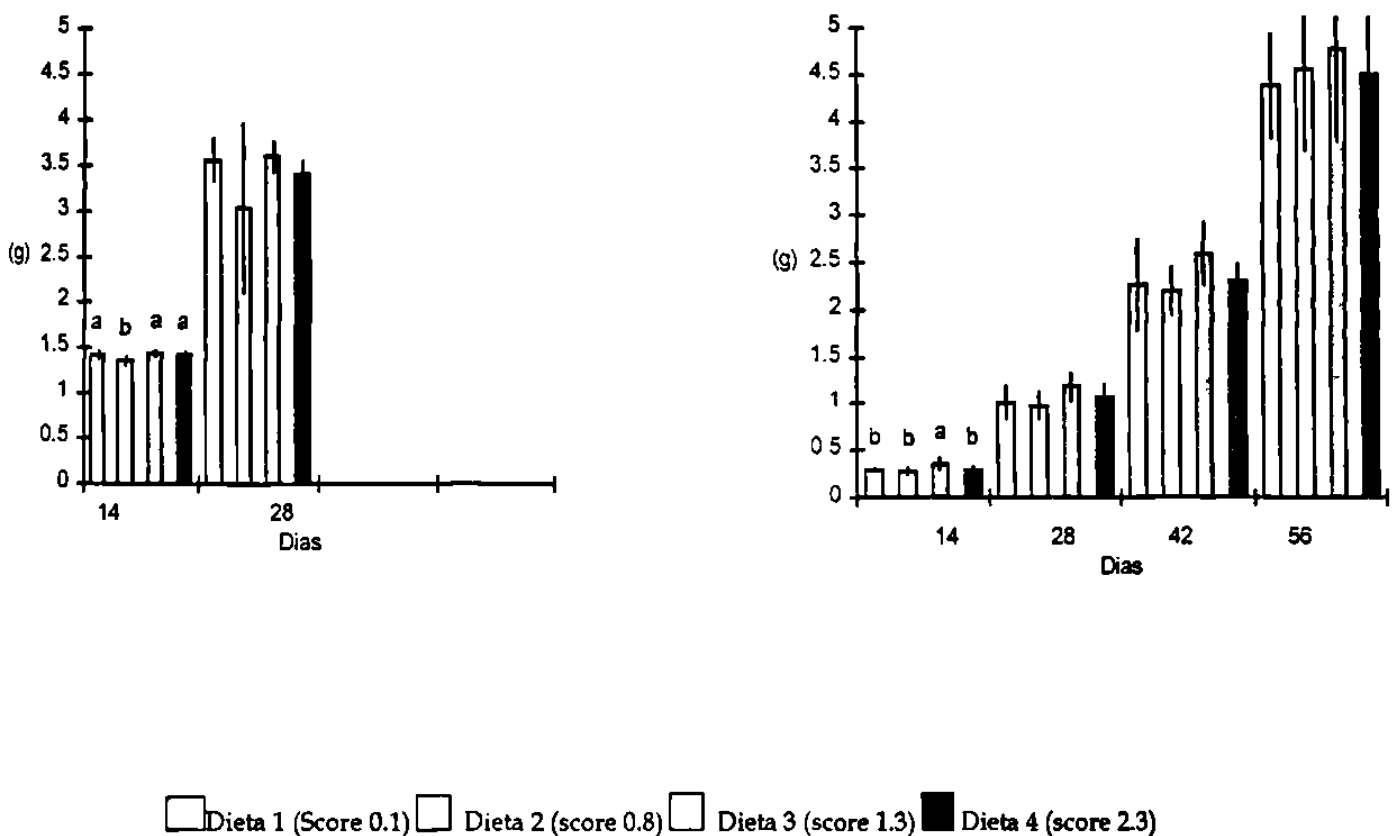
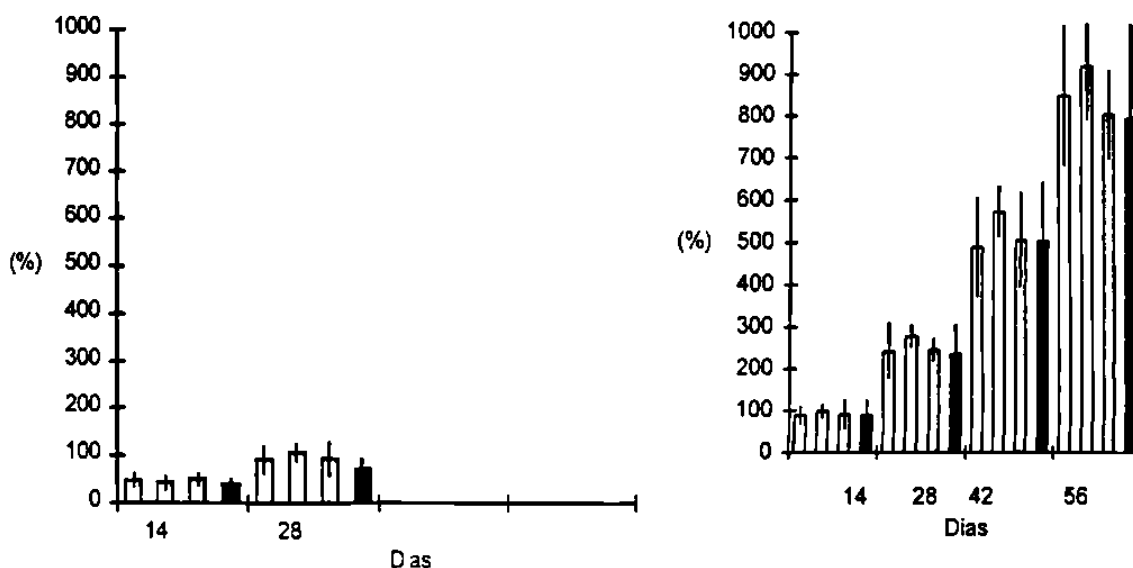


Fig. 1.- Consumo individual en *P. vannamei* de peso inicial de 1 y 0.17g

(Efecto del score biotóxico a 50% de inclusión de la H.P.)
 Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

GANANCIA EN PESO

En este parámetro biológico no se encontraron diferencias significativas entre las dietas. Sin embargo, al hacer una comparación con respecto al control (dieta 1), se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) sólo a los 28 días en camarones de 1g y a los 14, 28, 42 y 56 días en los camarones de 0.17g obteniéndose el mejor crecimiento para ambos bioensayos con la dieta 2.



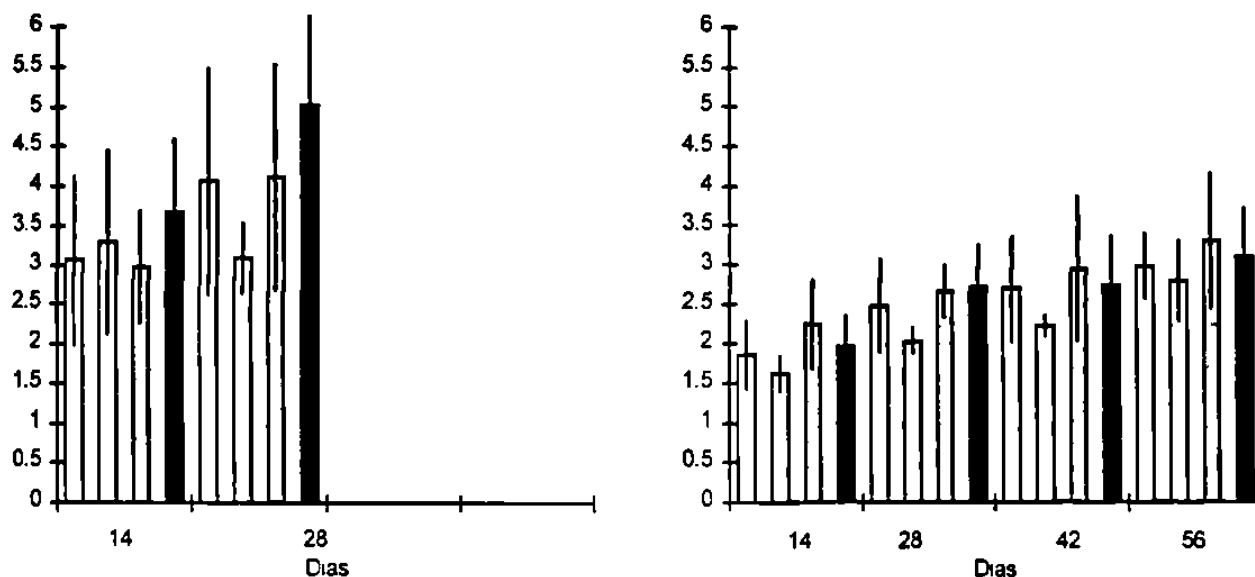
□ Dieta 1 (Score 0.1) □ Dieta 2 (score 0.8) □ Dieta 3 (score 1.3) ■ Dieta 4 (score 2.3)

Fig. 2.- Ganancia en peso en *P. vannamei* de peso inicial de 1 y 0.17g

(Efecto del score biotóxico a 50% de inclusión de la H.P.)

TASA DE CONVERSION ALIMENTICIA

Este parámetro no se vio afectado significativamente por el uso de harinas de pescado de diferente score para ninguna de las dos tallas. Pero de manera general se obtuvo una tasa de conversión relativamente mala, debido al consumo posiblemente sobreestimado por la gran lixiviación de los alimentos.



□ Dieta 1 (Score 0.1) □ Dieta 2 (score 0.8) □ Dieta 3 (score 1.3) ■ Dieta 4 (score 2.3)

Fig. 3.- Tasa de conversión alimenticia en *P. vannamei* de peso inicial de 1 y 0.17g

(Efecto del score biotóxico a 50% de inclusión de la H.P.)

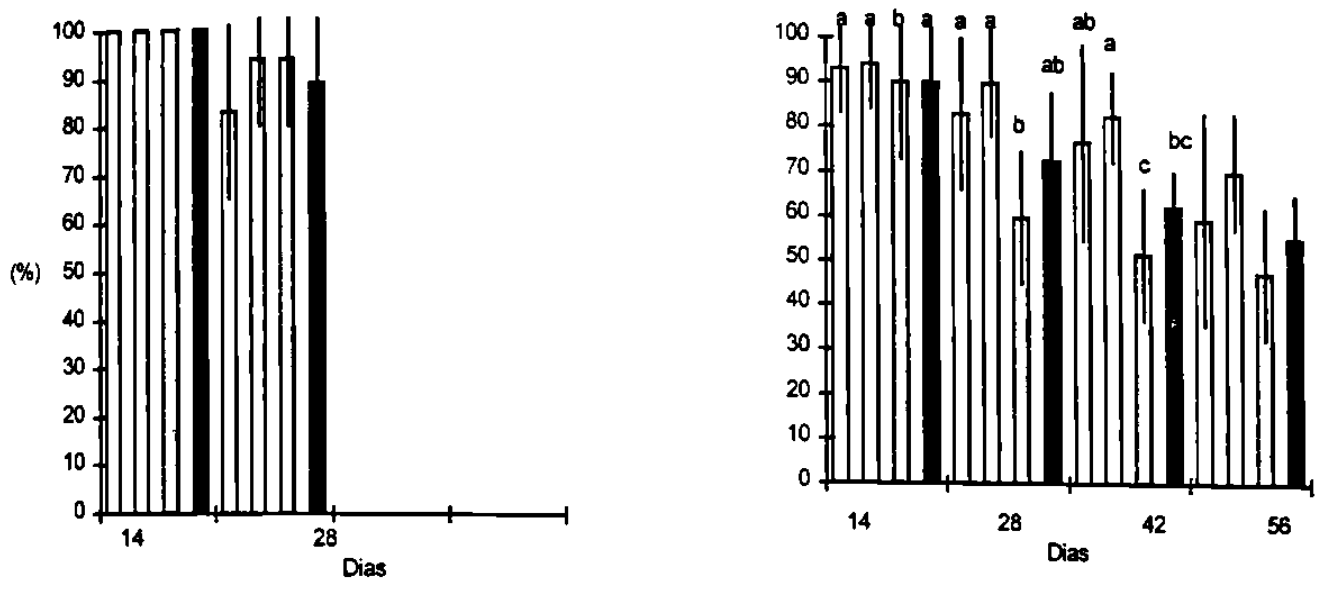
SOBREVIVENCIA

En el bioensayo con camarones de 1g no se presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) en lo que respecta a la sobrevivencia en los diferentes tratamientos a los 14 y 28 días. Sin embargo, al comparar únicamente con el control las dietas 2 y 3 (H.P. score 0.8 y 1.3) se diferenciaron presentando mejores sobrevivencias. De manera general la sobrevivencia en este bioensayo fue superior al 80%.

En el caso del bioensayo con camarones de 0.17g la sobrevivencia fue afectada por el score de las harinas encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos desde la primera biometria (14 días) hasta los 42 días de bioensayo. A los 14, 28 y 42 días, el tratamiento 3 provocó mortalidades significativas con respecto a los otros tratamientos ($P<0.05$) incrementándose la mortalidad con el tiempo.

A los 42 días de bioensayo la dieta 4 produce una mortalidad similar a la de score 1.3, del orden de 40%, diferenciándose significativamente de las dietas 1 y 2 que produjeron mortalidades del orden del 20% para este período de evaluación.

Finalmente, entre los 42 y 56 días de experimentación se presentó una mortalidad generalizada en todos los tratamientos por algún parámetro desconocido de tal manera que en este período de tiempo se perdieron las diferencias entre tratamientos que se habían confirmado en las tres primeras quincenas del bioensayo.



Dieta 1 (Score 0.1)
 Dieta 2 (score 0.8)
 Dieta 3 (score 1.3)
 Dieta 4 (score 2.3)

Fig. 4.- Supervivencia en *P. vannamei* de peso inicial de 1 y 0.17g.
 (Efecto del score biotóxico a 50% de inclusión de la H.P.)
 Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

3.2.- EFECTO DE LA INCLUSION DE 30% DE H. P. DE DIFERENTE SCORE EN CAMARONES *Penaeus vannamei* de 1.2g

Los resultados zootécnicos obtenidos en el bioensayo realizado para determinar el efecto de inclusión del 30% de H.P. en camarones de 1.2 se presentan en las Tablas 15 y 16.

Tabla 15.- Resultados de la evaluación biológica en camarones *P. vannamei* de 1.2g (Efecto del score biotóxico a 30% de inclusión de la H.P.) , n= 5 (6 organismos por acuario)

	Dieta 11	Dieta 10	Dieta 9	Dieta 8	Valor F	Prob
Score	0.1 al 30%	0.8 al 30%	1.3 al 30%	2.3 al 30%		
Peso promedio (g)						
inicial	1.25±0.15	1.25±0.14	1.26±0.13	1.25±0.14	0.32 NS	0.8064
14 días	1.97±0.09	1.91±0.09	1.97±0.17	1.88±0.10	0.56 NS	0.5620
28 días	2.28±0.11	2.26±0.10	2.36±0.16	2.26±0.25	0.44 NS	0.7256
42 días	2.40±0.16	2.46±0.12	2.57±0.13	2.59±0.27	1.33 NS	0.2970
Consumo de alimento (g)						
14 días	1.71±0.06a	1.40±0.25b	1.35±0.24bc	1.10±0.19c	7.27 **	0.0027
28 días	3.00±0.10a	2.46±0.33b	2.42±0.38b	1.99±0.26c	10.30 **	0.0005
42 días	3.93±0.14a	3.39±0.37b	3.39±0.44b	2.92±0.33b	7.44 **	0.0024
Ganancia en Peso (%)						
14 días	57±7	53±6	56±13	50±7	0.45 NS	0.7154
28 días	81±1	81±10	86±12	81±17	0.22 NS	0.8772
42 días	91±11	97±13	103±9	108±19	1.38 NS	0.2835
Tasa conversión alimenticia						
14 días	2.42±0.30a	2.11±0.26ab	1.92±0.23b	1.76±0.31b	5.20 **	0.0106
28 días	2.96±0.29a	2.45±0.20b	2.11±0.08bc	2.03±0.36c	12.57 **	0.0002
42 días	3.47±0.35a	2.82±0.32b	2.59±0.14b	2.21±0.28c	17.36 **	0.0000
Sobrevivencia						
14 días	100	100	100	97±7	-	-
28 días	100	100	100	97±7	-	-
42 días	100	100	100	97±7	-	-

Nota: letras diferentes muestran diferencias significativa (Duncan, P<0.05)

NS= Diferencias no significativas (P>0.05), ** Diferencias altamente significativas (P<0.01)

Tabla 16.- Resultado de la evaluación biológica en camarones de 1.2g, mediante la prueba de Dunnet, utilizando la dieta 11 como control.
(Efecto del score biotóxico a 30% de inclusión de la H.P.)

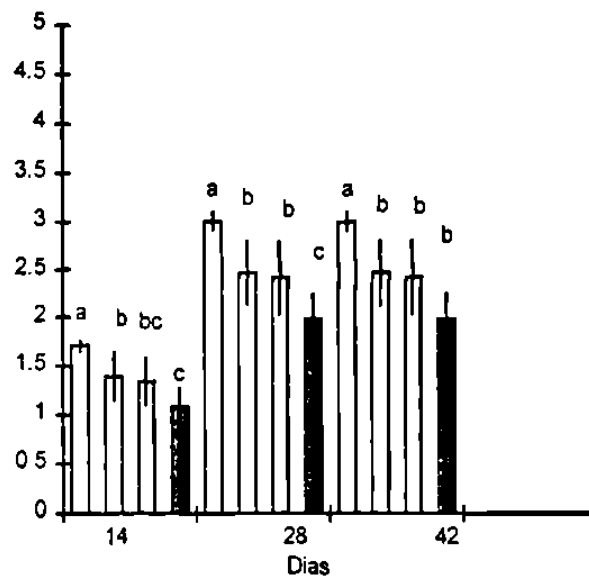
Dieta	Dieta	Promedio	qc	qt α 0.05	Prob	conclusión
Ganancia en Peso (%) 14 días	11	57	-	--	-	-
	10	53	2.39	2.12	<0.05	10≠11
	9	56	0.59	2.42	>0.05 NS	9= 11
	8	50	4.19	2.59	<0.01	8≠11
Ganancia en Peso (%) 28 días	11	81	-	-	-	-
	10	81	0	2.12	>0.05 NS	10=11
	9	86	7.93	2.42	<0.01	9≠11
	8	81	0	2.59	>0.05 NS	8=11
Ganancia en Peso (%) 42 días	11	91	-	-	-	-
	10	97	2.87	2.12	<0.05 *	10≠11
	9	103	5.74	2.42	<0.01 **	9≠11
	8	108	8.13	2.59	<0.01 **	8≠11

NS= Diferencias no significativas ($P>0.05$), * Diferencias significativas ($P<0.05$); ** Diferencias altamente significativas ($P<0.01$).

CONSUMO DE ALIMENTO

Desde la primera quincena y hasta los 42 días que duró el bioensayo, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las dietas evaluadas, siendo la dieta 11 (H. P. score 0.1) la más consumida, las dietas 10 y 9 medianamente consumidas y la dieta 8 la menos consumida.

Cabe señalar que en este caso el consumo fue estimado de una manera más precisa debido a que la estabilidad de las dietas fue significativamente mejor que cuando se evaluaron las H. P. a un 50% de inclusión (lo cual puede explicar por que en este caso encontramos diferencias de consumo a diferencia de los bioensayos anteriores).



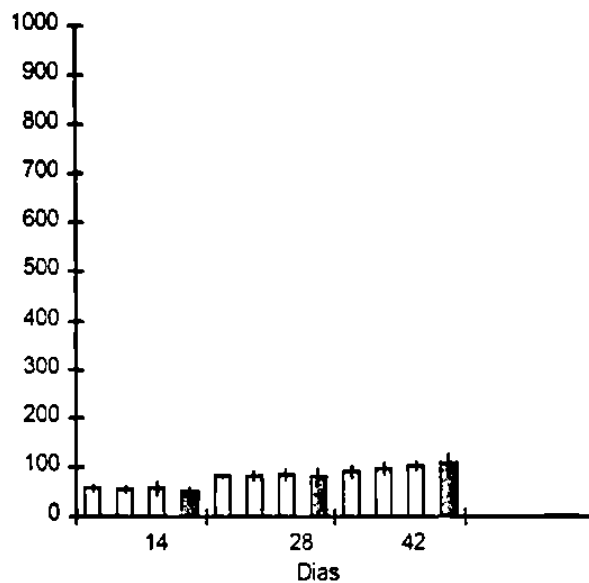
□ Dieta 11 (Score 0.1) □ Dieta 10 (score 0.8) □ Dieta 9 (score 1.3) ■ Dieta 8 (score 2.3)

Fig. 5.- Consumo individual *P. vannamei* de peso inicial de 1.2g.

(Efecto del score biotóxico a 30% de inclusión de la H.P.)
Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

GANANCIA EN PESO

Durante la realización del bioensayo no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) de ganancia en peso entre las dietas evaluadas. Sin embargo, al comparar la dieta control (dieta 11) desde los 14 días se detectan diferencias significativas ($P < 0.05$), dando mejores crecimientos la dieta 10 y el peor crecimiento la dieta 8 en comparación con el control. A los 28 días la dieta 9 y a los 42 días la dieta 8 presentaron mejores resultados que el control; mientras mayor es el score mayor es el crecimiento no habiendo continuidad en la respuesta.



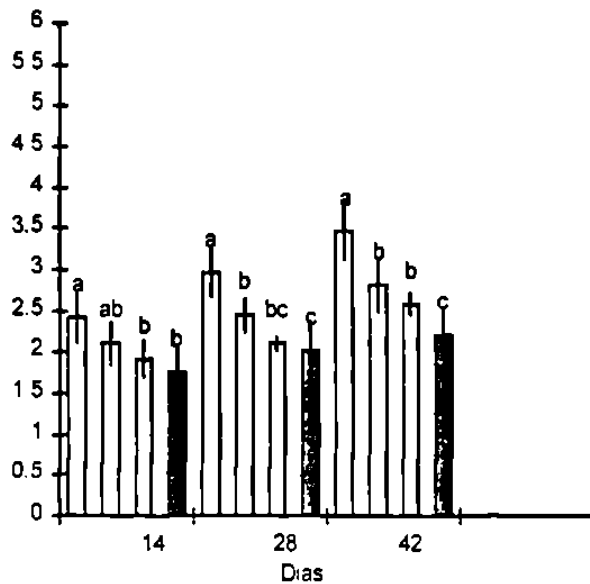
□ Dieta 11 (Score 0.1) □ Dieta 10 (score 0.8) □ Dieta 9 (score 1.3) ■ Dieta 8 (score 2.3)

Fig. 6.- Ganancia en peso en *P. vannamei* de peso inicial de 1.2g.

(Efecto del score biotóxico a 30% de inclusión de la H.P.)

TASA DE CONVERSION ALIMENTICIA

Desde el inicio hasta el final del bioensayo, se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con las dietas evaluadas; de manera general, a mayor score se obtuvo mejor tasa de conversión. Este resultado refleja el comportamiento de consumo que presentaron los animales ante las diferentes dietas, ya que el incremento en peso de los animales no varió significativamente.



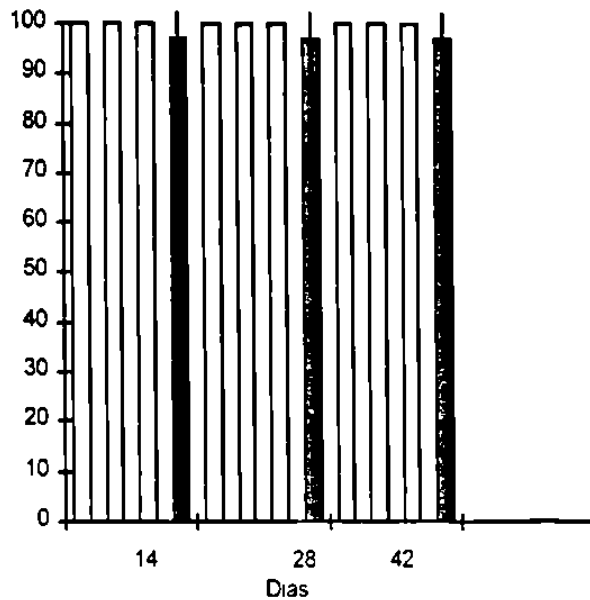
□ Dieta 11 (Score 0.1) □ Dieta 10 (score 0.8) □ Dieta 9 (score 1.3) ■ Dieta 8 (score 2.3)

Fig. 7.- Tasa de conversión alimenticia en *P. vannamei* de 1.2g

(Efecto del score biotóxico a 30% de inclusión de la H.P.)
Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

SOBREVIVENCIA

Las dietas conteniendo 30% de H. P. de diferente score no afectaron la sobrevivencia de los organismos que las consumieron, como se observa en la figura 8.



□ Dieta 11 (Score 0.1) □ Dieta 10 (score 0.8) □ Dieta 9 (score 1.3) ■ Dieta 8 (score 2.3)

Fig. 8.- Sobrevivencia en *P. vannamei* de peso inicial de 1.2g
(Efecto del score biotxicológico a 30% de inclusión de la H.P.)

3.3.- EFECTO DE DOS NIVELES DE INCLUSION (50 Y 30%) CONTRA DOS HARINAS DE SCORE EXTREMO (0.1 Y 2.3) Y SU INTERACCIÓN EN *P. vannamei* DE 0.17g

Después de realizar un análisis factorial para cada biometria (14, 28, 42 y 56 días), se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) a 56 días de bioensayo sólo en los parámetros de consumo y tasa de conversión, habiendo un mayor consumo y tasa de conversión a mayor porcentaje de inclusión sin importar el score de las harinas (Tabla 17).

Tabla 17.- Probabilidades obtenidas del anova bifactorial a los 56 días de bioensayo

	Consumo(g)	Ganancia en Peso (%)	TCA	Sobrevivencia(%)
Score	0.456	0.433	0.574	0.562
% inclusión	0.034	0.722	0.016	0.562
Interacción	0.244	0.974	0.216	0.907

3.4.- EFECTO DEL REEMPLAZO CRECIENTE DE UNA H.P. DE SCORE 0.1 (NORMAL) POR UNA DE SCORE 2.3 (GRAVE) EN ORGANISMOS DE 0.17 Y 1.2g A UN NIVEL DE INCLUSION DEL 30

Los resultados zootécnicos obtenidos en los bioensayos realizados para determinar este objetivo se presentan en las Tablas 18, 19, 20 y 21.

Tabla 18.- Resultado de la evaluación biológica en camarones de 0.17g.
(Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión), n= 6 (8 organismos por acuario)

Dieta	5	6	7	8	Valor F	Prob.
Score	0.1 (30%)	0.1(20%) 2.3 (10%)	0.1(10%) 2.3 (20%)	2.3 (30%)		
Peso promedio (g)						
Día 0	0.17±.05	0.17±.05	0.17±.05	0.17±.05	0.22 NS	0.98
Día 14	0.34±.02	0.33±.04	0.33±.04	0.32±.03	0.34 NS	0.79
Día 28	0.60±.04	0.58±.07	0.52±.09	0.57±.06	1.67 NS	0.20
Día 42	1.10±.09	1.06±.09	0.93±.21	0.98±.11	1.59 NS	0.22
Día 56	1.67±.07	1.67±.15	1.55±.39	1.51±.08	0.79 NS	0.52
Consumo de alimento (g)						
14 días	0.28±.03	0.27±.02	0.28±.04	0.27±.02	0.27 NS	0.84
28 días	1.06±.23	0.95±.12	0.97±.10	0.99±.14	0.58 NS	0.63
42 días	2.32±.56	2.04±.26	2.07±.49	2.14±.23	0.52 NS	0.67
56 días	4.05±.45	4.45±1.38	3.66±.82	3.44±0.48	1.30 NS	0.31
Ganancia en Peso (%)						
14 días	87±9	90± 17	87± 18	83± 13	0.20 NS	0.89
28 días	234±15	231± 42	197± 49	225± 5	0.29 NS	0.29
42 días	506± 47	505± 84	426±116	459± 76	1.25 NS	0.32
56 días	824± 52	860±140	774±212	764± 55	0.61 NS	0.61
Tasa Conversión Alimenticia						
14 días	1.78±.28	1.76±.34	1.87±.34	1.92±.48	0.24 NS	0.86
28 días	2.51±.55	2.40±.49	3.01±.93	2.55±.50	1.04 NS	0.34
42 días	2.55±.72	2.33±.25	2.83±.57	2.69±.36	1.06 NS	0.38
56 días	2.71±.36	2.96±.78	2.78±.67	2.57±.32	0.42 NS	0.74
Sobrevivencia (%)						
14 días	94± 7	94± 7	89±15	92±10	0.23 NS	0.87
28 días	77±18	88± 8	75±16	69±13	1.76 NS	0.18
42 días	71±25	79±10	65±22	56±15	1.60 NS	0.22
56 días	56±27	63±18	54±20	50±21	0.34 NS	0.59

NS= Diferencias no significativas

Tabla 19.- Resultado de la evaluación biológica en camarones de 0.17g, mediante la prueba de Dunnet, utilizando la dieta 5 como control.
(Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión)

Dieta	Dieta	Promedio	qc	qt α 0.05	Prob	conclusión
Ganancia en Peso (%) 28 días	5	234	--	--	--	-
	6	231	13.42	2.09	<0.01**	6≠5
	7	197	178.89	2.38	<0.01**	7≠5
	8	225	40.25	2.54	<0.01**	8≠5
Ganancia en Peso (%) 42 días	5	506	--	--	--	-
	6	505	0.25	2.09	>0.05 NS	6=5
	7	426	20.21	2.38	<0.01**	7≠5
	8	459	11.87	2.54	<0.01**	8≠5
Ganancia en Peso (%) 56 días	5	824	--	--	--	-
	6	860	8.24	2.09	<0.01**	6≠5
	7	774	10.96	2.38	<0.01**	7≠5
	8	764	13.16	2.54	<0.01**	8≠5
Sobrevivencia (%) 14 días	5	94	--	--	--	-
	6	94	0	2.09	>0.05 NS	6=5
	7	89	3.31	2.38	<0.01**	7≠5
	8	92	1.33	2.54	>0.05 NS	8=5
Sobrevivencia (%) 42 días	5	71	--	--	--	-
	6	79	2.77	2.09	<0.05 *	6≠5
	7	65	2.08	2.38	>0.05 NS	7=5
	8	56	5.20	2.54	<0.01**	8≠5
Sobrevivencia (%) 56 días	5	56	--	--	--	-
	6	63	2.22	2.09	<0.05 *	6≠5
	7	54	0.61	2.38	>0.05 NS	7=5
	8	50	1.83	2.54	>0.05 NS	8=5

NS= Diferencias no significativas ($P > 0.05$), * Diferencias Significativas ($P < 0.05$),
** Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

Tabla 20.- Resultados de la evaluación biológica en camarones *P. vannamei* de 1.2 g. (Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión), n= 5 (6 organismos por acuario)

	Dieta 11	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8	Valor F	Prob
Score	0.1 (30 °)	0.1(20 °) 2.3 (10%)	0.1(10 °) 2.3 (20 °)	2.3 (30%)		
Peso promedio (g)						
inicial	1.25±0.15	1.25±0.13	1.24±0.13	1.25±0.14	0.16 NS	0.9165
14 días	1.97±0.09	1.91±0.08	1.80±0.12	1.88±0.10	2.44 NS	0.1041
28 días	2.27±0.11	2.41±10	2.19±0.12	2.26±0.24	1.75 NS	0.1956
42 días	2.40±0.16	2.79±0.16	2.55±0.14	2.59±0.12	3.37 NS	0.0328
consumo de alimento (g)						
14 días	1.71±0.06a	1.33±0.12b	1.08±0.13c	1.10±0.19c	21.30 **	0.0000
28 días	3.00±.10a	2.45±0.17b	2.00±0.21c	1.99±0.25c	30.34 **	0.0000
42 días	3.94±0.14a	3.44±0.18b	2.97±0.21c	2.92±0.15c	22.09 **	0.0000
Ganancia en Peso (%)						
14 días	57±7	54±7	45±10	45±10	1.75 NS	0.1956
28 días	81±10	93±10	76±11	81±17	1.67 NS	0.2121
42 días	91±11b	124±12a	105±10ab	108±19ab	4.89 **	0.00134
Tasa conversión alimenticia						
14 días	2.42±0.30a	2.00±0.22ab	1.99±0.39ab	1.76±0.31b	3.90 **	0.0207
28 días	2.96±0.29a	2.12±0.18b	2.13±0.16b	2.03±0.36b	14.05 **	0.0001
42 días	3.47±0.35a	2.24±0.21b	2.29±0.28b	2.21±0.28b	22.89 **	0.0000
Sobrevivencia						
14 días	100	100	100	97±7	--	--
28 días	100	100	100	97±7	--	--
42 días	100	100	100	97±7	--	--

Nota: letras diferentes muestran diferencias significativas (P<0.05)

NS= Diferencias no significativas (P>0.05), ** Diferencias altamente significativas (P<0.01).

Tabla 21.- Resultado de la evaluación biológica en camarones de 1.2g, mediante la prueba de Dunnet, utilizando la dieta 11 como control. (Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión)

Dieta	Dieta	Promedio	qc	qt α 0.05	Prob	conclusión
Ganancia en Peso (%) 14 días	11	57	--	--	--	-
	6	54	1.79	2.12	>0.05 NS	6=11
	7	45	7.18	2.42	<0.01 **	7≠11
	8	45	7.18	2.59	<0.01 **	8≠11
Ganancia en Peso (%) 28 días	11	81	--	--	--	-
	6	93	6	2.12	<0.01 **	6≠11
	7	76	2.50	2.42	<0.05 *	7≠11
	8	81	0	2.59	>0.05 NS	8=11

NS Diferencias no significativas (P>0.05), * Diferencias significativas (P<0.05),

** Diferencias altamente significativas (P<0.01).

CONSUMO DE ALIMENTO

En los dos bioensayos con camarones de 0.17 y 1.2g el consumo de alimento disminuyó con el reemplazo de la H. P. 0.1 por la H. P. de score grave. Se presentó el mayor consumo con la H. P. de score 0.1, siendo las diferencias significativas ($P < 0.05$) sólo en el caso de los camarones de 1.2g en las tres biometrías realizadas.

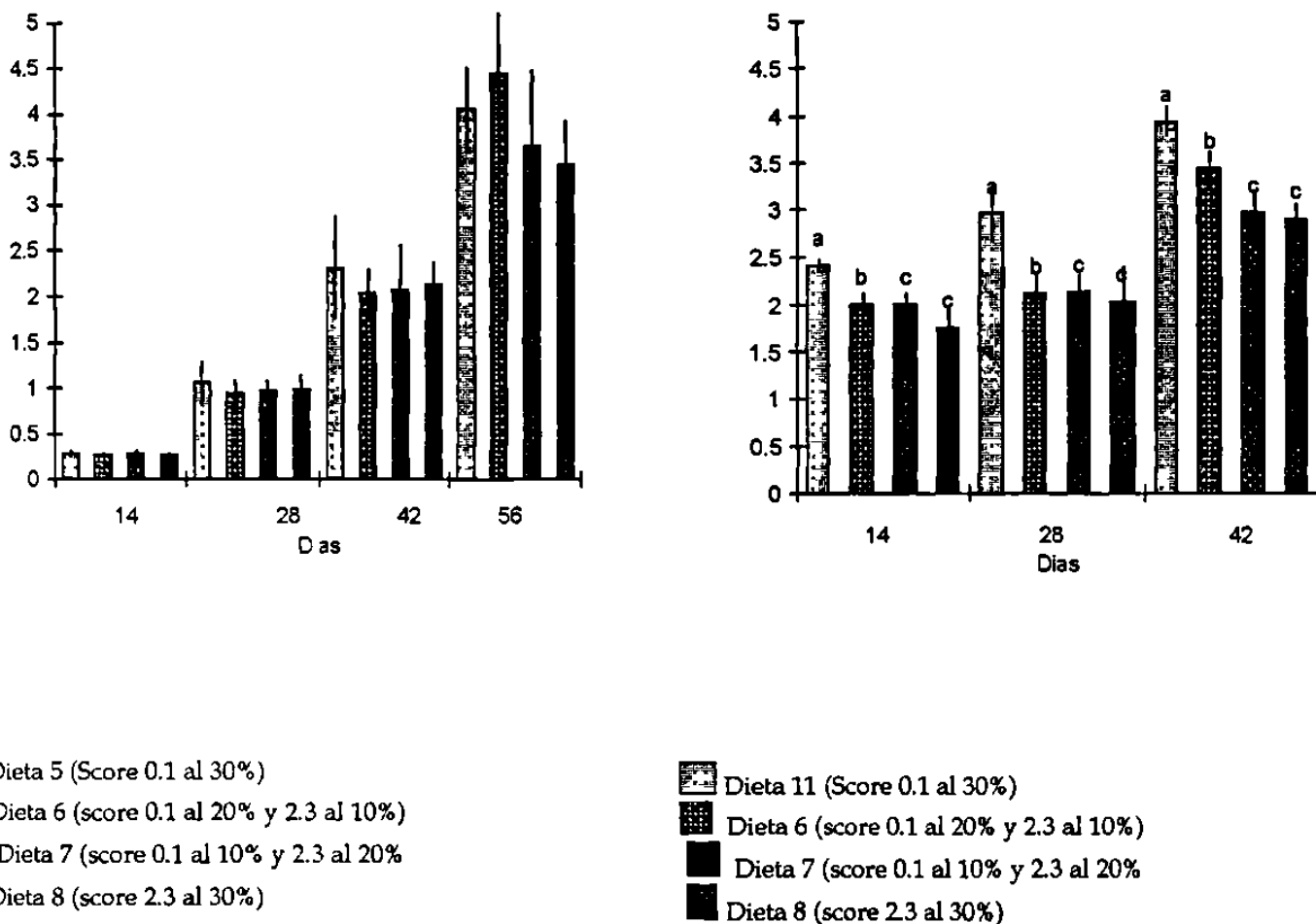


Fig. 9.- Consumo individual en *P. vannamei* de peso inicial de 0.17 y 1.2g

(Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión)

Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

GANANCIA EN PESO.

En organismos de 0.17 g no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos y para el caso de los organismos de 1.2g las diferencias solo fueron significativas ($P < 0.05$) a los 42 días de bioensayo. Sin embargo, al comparar los tratamientos con el control se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$), siendo la dieta 6 (2/3 de H.P. de score 0.1 y 1/3 de H.P. de score 2.3) la que prentó el mejor crecimiento para las dos clases de talla.

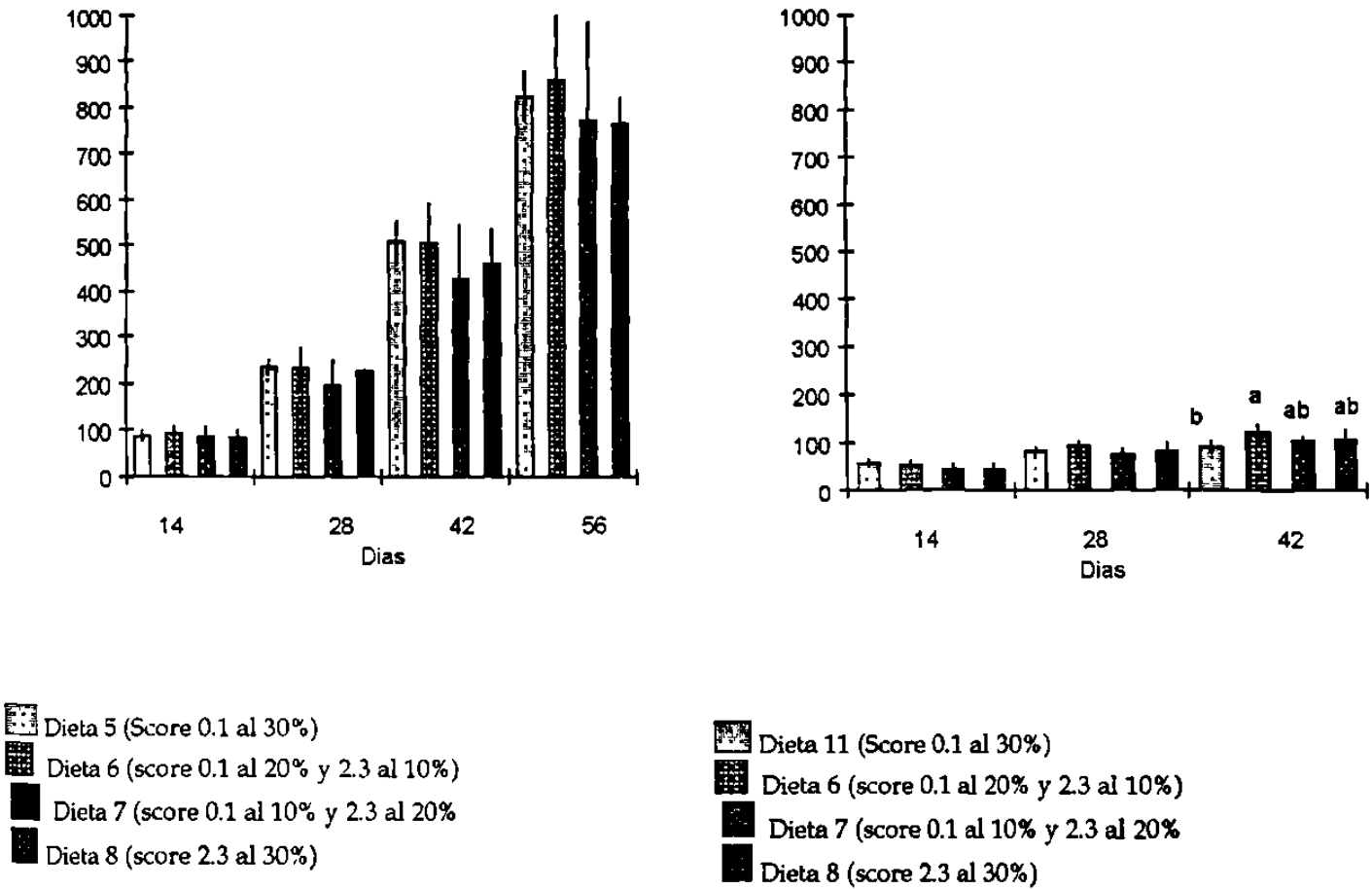


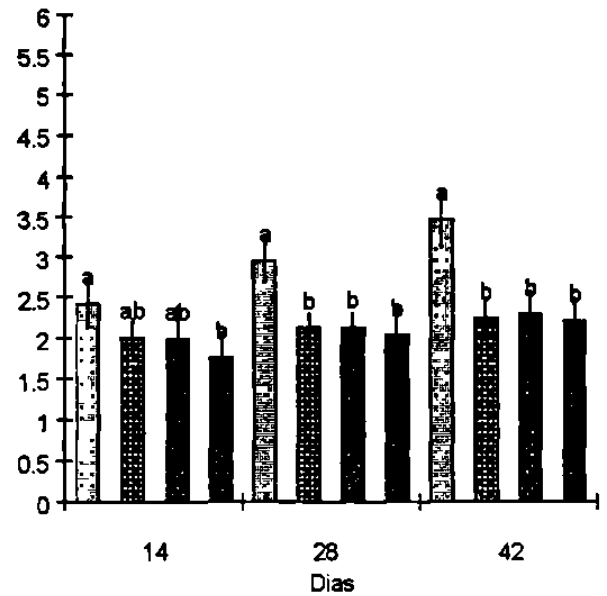
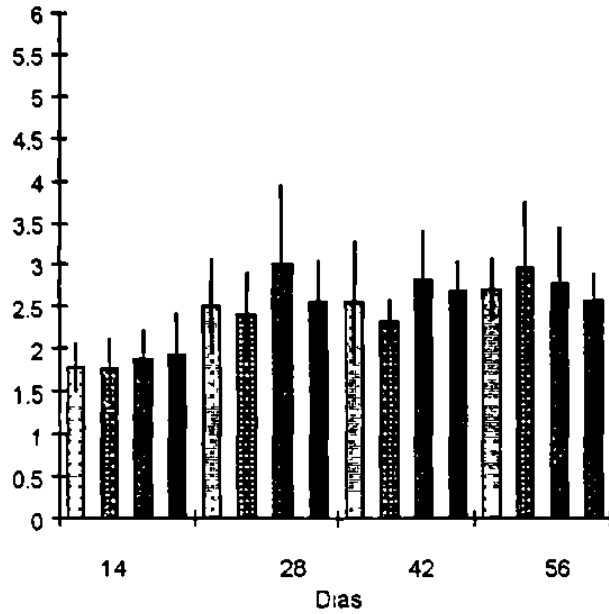
Fig. 10.- Ganancia en peso en *P. vannamei* de peso inicial de 0.17 y 1.2g

(Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión)

Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

TASA DE CONVERSION ALIMENTICIA

En organismos de 0.17g la tasa de conversión alimenticia no se afectó significativamente ($P > 0.05$) con el reemplazo de H. P. normal por harina grave, pero en el caso de los organismos de 1.2g la dieta con 30% de harina normal se diferenció significativamente ($P < 0.05$) de las otras por su mayor tasa de conversión como consecuencia de su mayor consumo.



- Dieta 5 (Score 0.1 al 30%)
- Dieta 6 (score 0.1 al 20% y 2.3 al 10%)
- Dieta 7 (score 0.1 al 10% y 2.3 al 20%)
- Dieta 8 (score 2.3 al 30%)

- Dieta 11 (Score 0.1 al 30%)
- Dieta 6 (score 0.1 al 20% y 2.3 al 10%)
- Dieta 7 (score 0.1 al 10% y 2.3 al 20%)
- Dieta 8 (score 2.3 al 30%)

Fig. 11.- Tasa de Conversión Alimenticia en *P. vannamei* de peso inicial de 0.17 y 1.2g. (Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión)

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

SOBREVIVENCIA

Los camarones utilizados para el bioensayo de organismos pequeños pertenecían al mismo lote de organismos 0.17g con que se evaluó el efecto del score biotóxico, obteniéndose también de manera general una sobrevivencia baja al final del experimento.

Para el caso de los organismos de 0.17g no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos, pero al compararlas con el control ($P < 0.05$) a los 14, 42 y 56 días obtenemos que la dieta 6 presenta la mejor sobrevivencia y la dieta 8 el valor más bajo.

En el caso de los organismos de 1.2g no se presentaron diferencias entre las dietas evaluadas durante los 14, 28 y 42 días de experimentación. Habiéndose obtenido de una manera general una excelente sobrevivencia mayor al 97% con todos los tratamientos

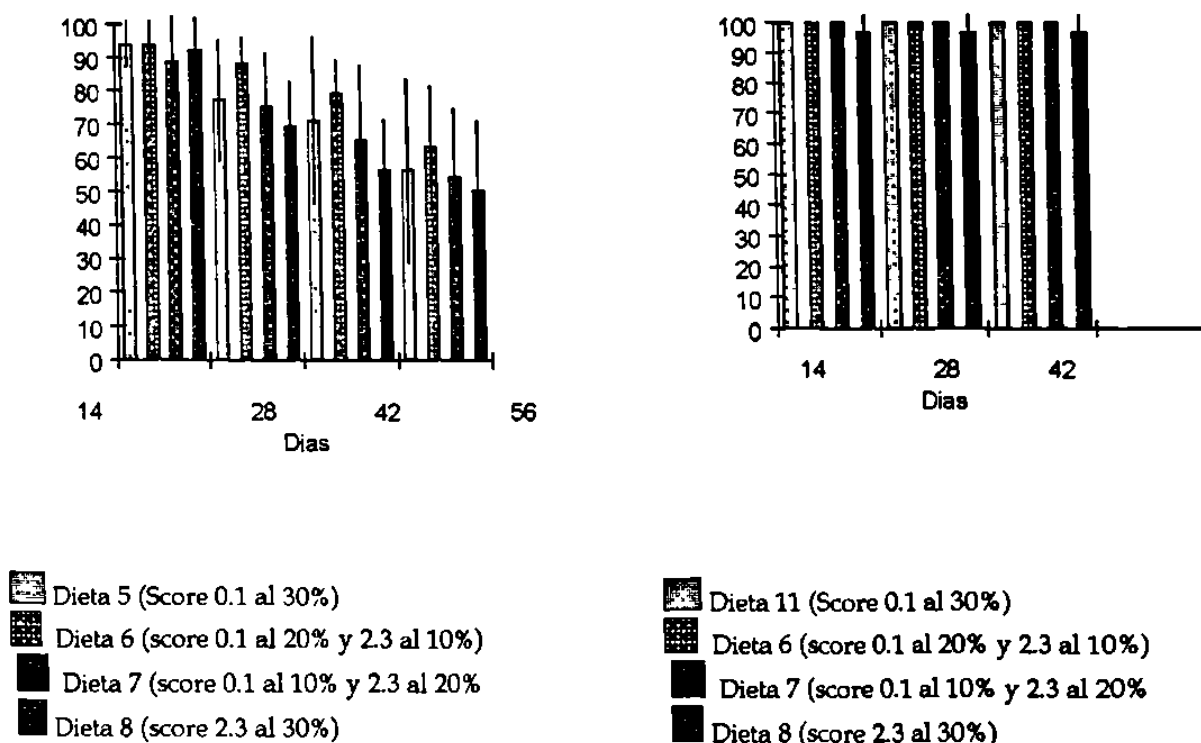


Fig. 12.- Sobrevivencia en *Penaeus vannamei* de 0.17 y 1.2g

(Efecto del reemplazo de H. P. a 30% de inclusión)

3.5.- EFECTO DEL REEMPLAZO CRECIENTE (4 NIVELES) DE UNA H.P. DE SCORE 0.1 (NORMAL) POR UNA DE SCORE 2.3 (GRAVE) EN ORGANISMOS DE 0.17 Y 1.2g A UN NIVEL DE INCLUSIÓN DEL 30%.

Al realizar el análisis factorial se encontraron diferencias significativas en los parámetros biológicos evaluados (Tabla 22).

El consumo individual se dio en función de la talla de los organismos, lo cual es lógico ya que los organismos grandes consumen más que los chicos, en valor absoluto. Por otro lado a mayor inclusión de harina de score grave el consumo disminuyó ($P < 0.05$).

La tasa de conversión alimenticia, ganancia en peso y sobrevivencia no se vieron afectadas por el nivel creciente de la harina de score grave, estos parámetros fueron afectados únicamente en función de la talla de los organismos: a menor talla menor TCA, mayor tasa de crecimiento y mayor mortalidad.

Tabla 22.- Resultados del análisis factorial de niveles crecientes de una harina de pescado de score grave (2.3) contra la talla de los organismos

Parámetro	Factor	14 días		28 días		42 días	
		F	Prob.	F	Prob	F	Prob
Consumo individual (g)	Talla	1272 **	0.000	675**	0.000	128.8 **	0.000
	Reemplazo	24.9 **	0.000	23.8 **	0.000	7.4 **	0.001
	Interacción	24.5 **	0.000	17.7 **	0.000	3.7 **	0.019
Tasa de conversión alimenticia	Talla	4.2 *	0.046	4.1*	0.05	0.13 NS	0.720
	Reemplazo	1.2 NS	0.309	2.1 NS	0.11	2.7 **	0.002
	Interacción	2.5 NS	0.071	3.3 **	0.029	6.9 **	0.001
Ganancia en peso (%)	Talla	81.5 **	0.000	231.3 **	0.000	362.9 **	0.000
	Reemplazo	0.58 NS	0.626	1.6 NS	0.195	1.1 NS	0.337
	Interacción	0.45 NS	0.713	0.67 NS	0.574	1.0 NS	0.366
Sobrevivencia (%)	Talla	8.3 **	0.006	44.1 **	0.000	53.5 **	0.000
	Reemplazo	0.34 NS	0.796	1.8 NS	0.154	1.6 NS	0.194
	Interacción	0.24 NS	0.867	1.0 NS	0.396	0.96 NS	0.419

NS= Diferencias no significativas ($P > 0.05$), * Diferencias significativas ($P < 0.05$), ** Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

3.6.- DIGESTIBILIDAD *IN VIVO* DE LA PROTEÍNA DE LAS DIETAS QUE CONTIENEN 30 PORCIENTO DE INCLUSIÓN DE LAS H.P. EXPERIMENTALES

No se encontraron diferencias significativas ($P=0.24$) en digestibilidad aparente de la proteína de los tratamientos (Tabla 23).

Tabla 23.- Digestibilidad aparente de la proteína en las dietas (DAPD)

Dieta	Score	% DAPD	Valor de F	Prob.
8	2.3	85.4±1.3	1.72	0.24
9	1.3	81.4±5.7		
10	0.8	85.3±2.1		
11	0.1	80.5±2.8		

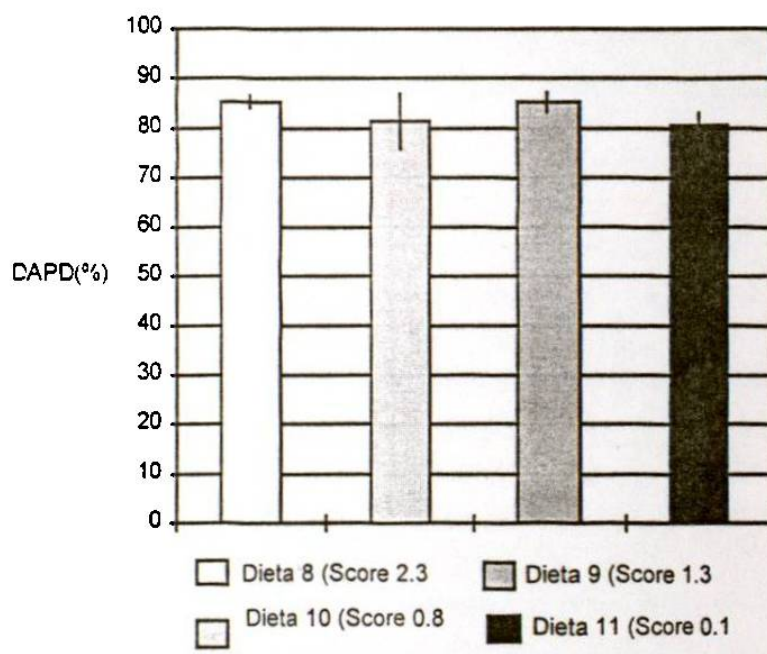


Fig. 13.- Digestibilidad aparente de la proteína de la dieta DAPD

3.7.- DAÑOS HISTOPATOLOGICOS EN LOS ORGANISMOS DEBIDO AL CONSUMO DE H.P. CON DIFERENTE SCORE

No se encontraron lesiones cuya presencia sea ligada a los tratamientos, esporádicamente se encontraron granulomas melanizados en el tejido intersticial interorgano en la región del cefalotórax e infiltraciones hemocíticas en el tejido intersticial alrededor del estómago y presunción de cuerpos de inclusión de origen viral (IHHN) en el tejido nervioso. La confirmación de la presencia de virus IHHN por medio de sondas de hibridación molecular no se realizó.

DISCUSION

1.- HARINAS DE PESCADO EXPERIMENTALES

1.1.- PARAMETROS DE CALIDAD EN LAS HARINAS EXPERIMENTALES

Las harinas experimentales fueron seleccionadas de acuerdo a su score biotóxico, evaluado en pollos; sin embargo, estas harinas no provienen del mismo lote de pescado, ni de las mismas plantas procesadoras, por lo que algunos parámetros de calidad varían de manera importante. A continuación se analizan las variaciones detectadas en las harinas experimentales.

Humedad

Varios autores (Galleguillos Y Romero, 1994; CIA Pesquera San Pedro, 1992), mencionan que valores bajos de humedad indican un tratamiento térmico excesivo, repercutiendo sobre la calidad nutricional de la harina, reflejándose en una disminución de la digestibilidad de los nutrientes (Cía Pesquera San Pedro, 1992). Los valores de humedad de las harinas experimentales fueron mayores al 6.5%, por lo que podríamos decir "a priori" con respecto a este criterio que las harinas no fueron sobrecalentadas.

Proteína

El porcentaje de proteína presenta una variación del 4% entre las harinas, siendo la harina de score normal (0.1) con el mayor valor (67.7%), y la harina de score leve (0.8) con el más bajo (63.2%); este rango es parecido a los reportados en diferentes harinas chilenas usadas para evaluar el score biotóxico en camarón (set I 64-68.7% y set II 65.3-67.5% proteína respectivamente) (Abdo de la Parra, 1994; Nieto-López, 1995). En este aspecto es importante remarcar que el origen y proceso que siguieron las harinas experimentales no es el mismo ya que se trata de lotes de harinas producidas comercialmente en Chile y su selección se basó exclusivamente en el score biotóxico que presentaban. Por lo tanto, las diferencias en proteína pueden deberse a factores tales como especie, materia prima, época del año y proceso.

Lisina Disponible

Los valores de lisina disponible fueron mayores al 6.6 g/100g de proteína, siendo la H. P. de score mediano (1.3) la que presentó el menor valor. Se observa que estos parámetros de calidad de las harinas, no siguen una correlación con la clasificación por score. Los valores de lisina disponible en H. P. oscilan entre 5.8 a 7.9 g/16g N (Pike, 1990; Barlow y Windsor, 1994). De acuerdo a estos valores de lisina disponible, las H. P. experimentales fueron procesadas a una temperatura adecuada.

Digestibilidad in vitro de la proteína

Los valores recomendados por varios investigadores (Abdo de la Parra, *et al.*, 1993; Akiyama, 1993; Pike, 1994; Galleguillos y Romero, 1994) para digestibilidad *in vitro* con pepsina para H. P. de buena calidad (Torry modificado) deben ser superiores al 90%. Al analizar los resultados de digestibilidad *in vitro*, todos los valores son mayores al 90%, por lo que con esto confirmamos que las H.P. no fueron sobrecalentadas. En este caso no existe una correlación con la clasificación por score.

Ceniza

Se observan contenidos más altos en ceniza en las harinas de score 0.8 y 1.3 (20.1 y 17.1% respectivamente) que en las harinas de score 0.1 y 2.3 (15.3 y 15.5% respectivamente). Estas variaciones podrían indicar que las harinas fueron elaboradas a partir de diferentes especies y/o de subproductos de pescado (Karl Marius Lillevik, 1996; comunicación personal).

Contenido de grasa y ácidos grasos libres

En contraste con los índices de calidad anteriores, el contenido de grasa y ácidos grasos libres se incrementa con el score. Estos últimos indican el grado de hidrólisis enzimática de la grasa de la materia prima utilizada para la elaboración de las harinas de buena calidad. Hardy y Masumoto (1991), mencionan que las H.P. no deben contener más de 4.5% de ácidos grasos libres, aunque otros autores (Castro, 1989 y Galleguillos, 1993) mencionan que la acidez puede llegar hasta valores del 20% y seguir siendo consideradas como de buena calidad.

Como ya se mencionó anteriormente, las diferencias en grasa podrían ser debidas a lotes de pescado de diferente origen, pero es evidente que mientras mayor sea el contenido de grasa, mayor será la probabilidad de oxidación.

TVN

El TVN en la H. P. fue menor en la harina de score grave (2.3), sin embargo, no mostrando ninguna relación con el score, estos valores de TVN no reflejan el grado de frescura del producto final, lo que miden son sustancias volátiles, las cuales se pueden perder durante el secado de la materia prima. Como indicadores de frescura de la materia prima se debe usar el TVN de la materia prima y/o el contenido de aminos biogénicas en el caso de la harina.

Aminas biogénicas

La concentración de aminos biogénicas, en especial la histamina fue mayor en la harina de pescado de score mediano (1.3) por el contrario la harina de score más alto (2.3) presentó los niveles más bajos de aminos biogénicas, no observándose una relación entre aminos y score. Estos resultados concuerdan con los reportados por Galleguillos (1993) y Castro (1989) quienes mencionan que no existe una correlación entre la concentraciones de aminos biogénicas, en especial la histamina, y el puntaje de la erosión en mollejas en pollos.

2.- DIETAS EXPERIMENTALES

La composición proximal de los grupos de dietas experimentales que se compararon (30 y 50% de H. P.) fue homogénea. Sin embargo, el nivel de inclusión de la H.P. afectó la estabilidad de los alimentos en el agua.

La inclusión de 50% de H. P., aunada al hecho de eliminar otras fuentes de proteína (gluten de trigo) para no aumentar el contenido proteico de las dietas, produjo una mala estabilidad de las dietas. Al interior de este grupo, las dietas con H. P. de score 0.1 y 1.3 presentaron mayor lixiviación que las otras dos dietas.

El grupo de dietas con 30% de H. P. presentó una lixiviación tres veces menor. La dieta con H. P. de score 1.3 volvió a ser la menos estable. Esto podría relacionarse a un mayor contenido de solubles de pescado en esa H. P.

3.- EFECTO DE HARINAS DE PESCADO DE SCORE CRECIENTE

CONSUMO

En organismos de 1 y 0.17g no se encontraron diferencias en consumo de alimento por efecto del score de las H.P. incluídas al 50%, esto posiblemente se debió a que presentaban una alta lixiviación sobrestimándose el alimento consumido. Estos resultados concuerdan con los reportados por Abdo de la Parra (1994) quien evaluó en organismos pequeños de *P. vannamei* (0.066 g) H. P. de diferente score biotxicológico, no encontrando efecto del score sobre el consumo de alimento. En el caso de un menor porcentaje de inclusión (30%) los alimentos fueron más estables y al evaluar en organismos de 1.2 g, se encontraron diferencias significativas, presentando el mayor consumo los organismos que se alimentaron con la H. P. de score normal (0.1); posiblemente debido a un efecto de frescura de la materia prima con que se elaboró la harina. Abdo de la Parra, *et al.*, 1993; Aquacop *et al.*, 1996 y Ricque *et al.*, 1996, evaluaron el efecto de la frescura de la materia prima en varias especies de peneidos; para el caso de *P. vannamei*, el consumo del alimento fue mayor cuando la H.P. estaba elaborada con la materia prima muy fresca.

Resultados contradictorios u opuestos se han reportado para trucha (Fairgrieve, 1994; Cowey y Cho, 1992) en donde el consumo de alimento se incrementa con dietas que contienen cantidades considerables de aminas biogénicas, tales como la putresina y cadaverina, sustancias que normalmente deben estar ausentes en la materia prima fresca.

Así mismo, existen varios autores (Harpaz *et al.*, 1988; Cowey y Cho, 1992; Costero y Meyers; 1993; Fairgrieve *et al.*, 1994; Montemayor, 1995) que mencionan que las aminas biogénicas, algunos aminoácidos y otros compuestos funcionan como atractantes. Para el caso específico del langostino, la adición de 0.2% de putrescina ó cadaverina provoca que el alimento sea más atractivo y esto da por resultado que sea consumido en un menor tiempo.

GANANCIA EN PESO

Score biotóxico

En organismos grandes (>1g) y pequeños (0.17g), no se observaron diferencias en ganancia en peso por efecto del score; esto concuerda por lo reportado por Abdo de la Parra (1994) y Cruz et al. (1995) al evaluar en *P. vannamei* de 0.06g y 0.26g harinas de diferente score biotóxico.

Frescura de la Materia Prima

Diversos autores mencionan un efecto negativo en los organismos alimentados con H.P. elaboradas a partir de materia prima de fresca alterada. Aquacop et al. (1996) y Abdo de la Parra, et al. (1993) evaluaron H.P. con diferente frescura de la materia prima en varias especies de *Penaeus*; para el caso de *P. vannamei* mayor a 1g no encontraron diferencias significativas en crecimiento, pero en organismos menores a 1g el crecimiento disminuye conforme se incrementa la descomposición de la materia prima. En truchas (Pike, 1994) el crecimiento se ve afectado negativamente conforme aumenta la descomposición de la materia prima.

Temperatura de Secado de la Harina de Pescado

Uno de los factores ligados directamente a la calidad de harina de pescado, es la temperatura de secado. Existen diversos estudios sobre la variación de la calidad de la H. P. con respecto a tipo de secador y temperatura de secado. En salmones se ha reportado (Pike, 1994) que la tasa de crecimiento disminuye cuando las harinas de pescado son secadas a un temperatura de 80°C. Para el caso de camarón *Penaeus vannamei*, Abdo de la Parra en 1994 elaboro una harina de pescado de score grave a partir de una harina de score mediano, sobrecalentando esta última harina a 105°C por 5 horas, como resultado se obtuvo una menor digestibilidad de la harina de pescado, un mayor consumo en alimento y un menor crecimiento, pero la sobrevivencia no fue afectada.

Efecto promotor de Crecimiento

Varios autores (Watanabe, et al.,1987; Cowey y Cho, 1992; Galleguillos y Romero,1994; Bakker, 1994; Cruz-Suárez, et al, 1995; Montemayor, 1995) mencionan un efecto promotor de crecimiento en diferentes organismos por la

presencia de aminas biogénicas a una concentración determinada en el alimento. Cuando estos valores son sobrepasados se observan efectos negativos, tales como la intolerancia al alimento, hipersensibilidad, daño intestinal, mortalidad, flacidez y distensión abdominal etc.

En pollos se han reportado datos positivos de las aminas biogénicas (putrescina, histamina) como promotores de crecimiento (Smith, 1989; Galleguillos, 1995), encontrando que a una dosis de 0.2% de putrescina se incrementa la ganancia en peso y que a una dosis mayor a 0.8% es tóxica. En el caso de la histamina, una dosis mayor a 350 ppm afecta significativamente el crecimiento.

Para truchas se han obtenido resultados opuestos; Watanabe, *et al.*, (1987) menciona que el crecimiento en trucha se ve favorecido por la adición de 70 mg de histamina en la dieta. En cambio Fairgrieve, *et al.*, (1994) y Cowey y Cho (1992) mencionan que adicionar cadaverina y putrescina en las dietas no afecta la ganancia en peso de estos organismos.

En el caso del camarón, Cruz-Suárez, *et al.*, (1995) reportan un mayor crecimiento de las H. P. de score leve, observándose un efecto promotor de crecimiento en H. P. que contienen niveles bajos de aminas biogénicas (histamina de 1084 a 2377, cadaverina de 338 a 577 y putrescina de 109 a 300 ppm); en cambio, en organismos pequeños, las H. P. con niveles altos de aminas biogénicas causan mortandad (histamina de 1542 a 4840, cadaverina de 731 a 4040 y putrescina de 570 a 1760 ppm).

Una de las explicaciones del efecto promotor de crecimiento en varios organismos (pollos, truchas, prerumiantes, etc), es que estas sustancias actúan de manera indirecta en el metabolismo de los organismos; por ejemplo, la putrescina incrementa la permeabilidad intestinal y facilita el flujo de nutrientes, es esencial para el crecimiento celular y se cree que tiene un papel importante en la síntesis de DNA, RNA y proteínas; pero afecta la actividad de ciertas enzimas (Cowey and Cho, 1992; Bakker, 1994; Ricque *et al.*, 1996 en prensa; Mendoza-Alfaro, *et al.*, 1996).

TASA DE CONVERSION ALIMENTICIA

En organismos pequeños (0.17g), no se observaron diferencias entre los tratamientos evaluados. Estos resultados corresponden a lo reportado por Abdo de la Parra (1994) en donde concluyó que el score biotóxico de las H. P. no afecta la tasa de conversión alimenticia. Esto mismo se observó en truchas (Fairgrieve, *et al.*, 1994) cuando se evaluó el efecto de la adición de cadaverina y putrescina en H.P. atóxicas y tóxicas para pollos.

En organismos grandes (1.0 g) no se encontraron diferencias significativas debido a la mala estabilidad del alimento; al volver a evaluar estas harinas en organismos de la misma talla (1.2g) a un porcentaje menor de inclusión (30%) se encontraron diferencias entre los tratamientos, disminuyendo la tasa de conversión conforme se incrementa el score. Un efecto contrario fue observado por Cruz-Suárez, *et. al* (1995) con una harina de pescado de score 1.3, la cual presento una tasa de conversión ligeramente más alta que con harinas de score leve y mediano (diferencia no significativa).

Estos resultados en diferentes experimentos nos hacen pensar que el score no tiene relación con la tasa de conversión en camarón.

El único incremento importante (significativo) en tasa de conversión fue obtenido por Cruz-Suárez, *et al.*, (1995) con la misma H. P. de score 1.3, sobrecalentada a 105 °C por 5 horas; en este último caso se entiende que la tasa de conversión se incrementó en razón del daño que sufrió la proteína al estar expuesta a altas temperaturas. Al contrario, en procesos comerciales, la torta de prensa en su mayoría generalmente no sufre sobrecalentamiento; sólo algunas partículas quedan atrapadas incrementándose el tiempo de permanencia en el secador, siendo el sitio de formación de toxinas responsables del score biotóxico en pollos, por lo tanto la mayoría de la torta de prensa no sufre una disminución de su digestibilidad aún cuando algunas partículas sobrecalentadas son suficientes para conferir toxicidad a la harina (Pike,1995, comunicación personal).

Tampoco existe una correlación entre la tasa de conversión alimenticia y la cantidad de aminas biogénicas: al comparar la tasa de conversión de las dietas que contienen H. P. de score 0.1 y 2.3, las cuales tienen niveles semejantes de aminas biogénicas y en poca cantidad, vemos que la primera tiene una tasa de conversión alta y la segunda la tasa de conversión más baja. Al contrario, Abdo de la Parra (1994) encontró una tasa de conversión alta con la dieta que contenía H. P. de score 1.3, con alto nivel de aminas biogénicas.

Estos resultados se oponen a los obtenidos en truchas y salmónidos, en donde concentraciones elevadas de aminas biogénicas disminuyen la tasa de conversión alimenticia (Cowey y Cho, 1992; Pike, 1994).

SOBREVIVENCIA

En organismos grandes (>1g), no se observaron diferencias significativas por efecto del score en sobrevivencia, esto concuerda por lo reportado por Cruz-Suárez, et al (1995), en donde evaluaron H.P. con diferente score sobre juveniles de *P. vannamei* (0.27g), no encontrando diferencias en sobrevivencia. Esto mismo se observa en trucha (Fairgrieve, et al., 1994) en donde no encuentran un efecto tóxico de la cadaverina y putrescina adicionadas en H.P. tóxicas y atóxicas en pollos.

Esta respuesta se observa al evaluar el efecto de frescura en varias especies de peneidos con organismos de más de 1g (Abdo de la Parra, et al., 1993; Ricque et al., 1996; Aquacop et a., 1996) en donde no encuentran un efecto de toxicidad por pérdida de frescura de la materia prima utilizada para elaborar H.P.

Los organismos pequeños (0.17g) resultaron ser los más afectados en sobrevivencia; a pesar de que se obtuvieron en general bajos porcentajes de sobrevivencia de todos los tratamientos, la mayor mortalidad se presentó con la dieta 3 que contenía la H.P. de score mediano (1.3), la cual se caracterizaba por tener una mayor cantidad de aminos biogénicos y acidez (ver tabla 5). Estos resultados concuerdan con los reportados por Abdo de la Parra (1994), quien encontró la mayor mortalidad en organismos alimentados con H.P. de score mediano que contenía altas cantidades de aminos biogénicos y acidez, así como con la adición de mollerossina sintética en el alimento. Es posible que exista una interacción de histamina y acidez, en que esta última pudiera potencializar el efecto tóxico en organismos pequeños.

Unos de los puntos importantes a los que se le pudiera atribuir la mayor mortalidad en organismo pequeños, es que estos tal vez no tengan un sistema detoxificador de aminos bien desarrollado. En el caso de peces, pollos y mamíferos, se ha reportado que cuentan con un sistema de enzimas detoxificantes tal como la mono-amino-oxidasa (MAO) y la di-amino-oxidasa (DAO) que son las encargadas de degradar las sustancias tóxicas en compuestos inofensivos para los organismos. Además otra posibilidad sería la insuficiente capacidad de las "enzimas intestinales" MAO/DAO y la alta cantidad de aminos biogénicos consumidas (Bakker, 1994).

Otra explicación de la toxicidad de las harinas con altos niveles de aminos biogénicos y ácidos grasos libres, es que pudieran existir otros compuestos dentro de la harina que actúen negativamente en la sobrevivencia de los organismos: endotoxinas bacterianas, las cuales bien podrían producirse al mismo tiempo que

las aminas biogénicas y ácidos grasos libres (es decir cuando el pescado pierde su frescura y es el sitio de un desarrollo bacteriano intenso) durante el almacenamiento, antes de iniciar el proceso de cocción de la materia prima.

4.- EFECTO DE NIVELES CRECIENTES DE LA HARINA DE SCORE GRAVE

En organismos de 0.17 g y mayores a 1 g, el consumo y la tasa de conversión alimenticia disminuyen conforme se incrementa el porcentaje de inclusión de la harina de pescado de score 2.3. Una de las posibles causas sería en una mayor frescura de la materia prima que fue utilizada para fabricar las harinas de score 0.1.

La tasa de crecimiento se ve mejorada con un 10% de inclusión de la harina de score grave (1/3 de H.P. de score 2.3, 2/3 de H. P. de score 0.1). Con este mismo tratamiento la sobrevivencia en organismos grandes no es afectada por el efecto del reemplazo, pero en organismos de talla pequeña la sobrevivencia se ve mejorada con respecto al control en un 10%.

La explicación de estas mejoras podría ser que se diluyen los factores negativos de las harinas puras y se complementen más beneficios. Es conocido en la práctica comercial el efecto benéfico de las mezclas de H. P. de buena calidad en lugar de una sola (Kurmalý, 1995.)

5.- DIGESTIBILIDAD IN VIVO DE LAS HARINAS EXPERIMENTALES

Los resultados del análisis de digestibilidad *in vivo* muestran diferencias no significativas entre las dietas evaluadas ($P= 0.24$), confirmando los resultados de Nieto-López (1994), en cuanto a la ausencia de la relación entre el score biotóxicológico y la digestibilidad en camarón (Cruz-Suárez *et al.*, 1995).

Cabe mencionar que en un experimento previamente mencionado (Cruz-Suárez, *et. al*, 1995), en donde se usó una H.P. de score 1.3 calentada en una estufa a 105 °C por 5 horas, se obtuvo una reducción significativa de la digestibilidad *in vivo* en camarones de 1g así como en crecimiento y tasa de conversión alimenticia, demostrando de esta manera que los camarones son sensibles a una deterioración de la calidad de la proteína cuando esta es sometida a un exceso de temperatura. Esta misma harina sobrecalentada fue sometida a una prueba biotóxica en pollos, y obtuvo un score de 2.0, pero en camarones de 0.26g no demostró ningún efecto tóxico (el efecto nutricional en camarón fue independiente del aspecto tóxico).

Varios autores (Anderson *et al*, 1992, 1993 y 1995; Nakazagwa *et al.*, 1994 y Romero, *et. al.*, 1996) han tratado de correlacionar la digestibilidad *in vivo* en salmones, evaluando diversos parámetros de calidad (tipo de secador, contenido de aminos biogénicos, TVN, score biotóxicológico, etc) no encontrando correlación alguna entre los resultados obtenidos.

Es interesante observar que las pruebas de crecimiento y digestibilidad *in vivo* en camarón permiten distinguir las propiedades tóxicas de las harinas de alto score de sus calidades nutricionales, lo que no es posible en pollos, cuya digestión es afectada directamente por los factores del score biotóxicológico: el exceso de secreción ácida provocada por los tóxicos presentes en estas harinas merma la digestión, la salud y el crecimiento de los pollos, aún cuando la proteína de estas harinas sea de muy buena calidad.

CONCLUSIONES

1.- El score biotxicológico no es un buen indicador de calidad para selección de H. P. a utilizar en la elaboración de alimentos para camarón, ya que no se encontró correlación alguna entre éste y los resultados obtenidos durante el presente trabajo, esto debido a que otras variables en la composición de las H.P. están interfiriendo y parecen tener un efecto mayor que la variable en estudio.

2.- Las H. P. comerciales evaluadas en este estudio presentan variaciones importantes no correlacionadas con el score biotxicológico, especialmente en parámetros químicos de calidad ligados al grado de frescura de la materia prima, como son:

- Contenido de aminas biogénicas
- Ácidos grasos Libres

Las principales variaciones observadas en este trabajo, en la respuesta de los camarones parecen ligadas a la frescura de la materia prima:

- En organismos mayores a 1g, se obtuvieron mejores resultados en tasa de conversión con la H. P. de score grave (2.3), principalmente en razón del menor consumo, en comparación con la H. P. de score 0.1, lo cual también podría estar ligado a una mayor frescura de la materia prima.

- En los camarones pequeños (0.17g) se produce mortalidad con H. P. que contienen altos valores de aminas biogénicas (histamina 1080, cadaverina 577 y putrescina 300 ppm) y niveles altos de ácidos grasos libres (9.3%), mientras los organismos mayores a 1g no son afectados.

3.- Con el reemplazo parcial de una harina de score normal (0.1) por una de score grave (2.3), se obtienen mejores resultados lo que confirma una práctica aparentemente establecida a nivel comercial en Asia.

4.- Al parecer las H.P. que provocan erosión de la molleja en pollos no causan daños histológicos en camarón.

RECOMENDACIONES

- 1.- Evaluar H.P. elaboradas a partir de materia prima en descomposición con el objeto de evaluar el efecto tóxico de las aminos biogénicas y endotoxinas de origen bacteriano presentes en la H. P. pescado sobre organismos muy jóvenes, de 0.1 a 0.2g.
- 2.- Evaluar por separado y en combinación aminos biogénicas puras (histamina, cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, etc) adicionadas en dietas para camarón.
- 3.- Evaluar el efecto attractante y promotor de crecimiento de las aminos biogénicas en camarón.
- 4.- Evaluar toxinas de origen bacteriano originadas por la pérdida de frescura de la materia prima, y que posiblemente disminuyan la sobrevivencia de organismos pequeños.
- 5.- Confirmar daños celulares por efecto de las aminos biogénicas y/o toxinas presentes en las harinas de pescado.
- 6.- Determinar si los camarones cuentan con enzimas detoxificantes para aminos biogénicas, endotoxinas y otras sustancias tóxicas, tal como Mono- amino-oxidasa (DMA) y di-amino-oxidasa (DAO), etc presentes en otros organismos.

BIBLIOGRAFIA

- Abdo-delaParra, Ma.I., Cruz-Suárez, L.E. y Ricque-M., D.,1993. Especificaciones de harina y aceites de pescado para la nutrición animal acuícola. In: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D. y Mendoza-Alfaro R. (Eds), Memorias del primer simposium internacional de nutrición y tecnología de alimentos para acuicultura, Asociación Americana de Soya, pp 243-256.
- Abdo-dela Parra, Ma:I., Cruz-Suárez, L.E., Ricque, D., Pike I. and Alanis G., 1993. Effect of freshness of raw material on nutritional value of different fish meal used in shrimp nutrition. In: From discovery to commercialization. Abstracts World Aquaculture '93, Torremolinos, Spain, May 26-28,1993, pp104.
- Abdo-delaParra, Ma.I., 1994. Estudio de algunos parámetros de calidad de harinas de pescado utilizadas en la nutrición de camarón blanco *P. vannamei*. Tesis de maestría, FCB/UANL, México, 114pp.
- Aguirre, S., 1981. Identificación de factores de la harina de pescado causantes del vómito negro aviar. Tesis de licenciatura, Facultad de Agronomía, Universidad Pontificia Católica, Santiago de Chile, 80pp.
- Almazan-delaRosa, J.,1991. Aspectos sobre la alimentación en granjas acuícolas de peces y crustáceos. Memorias del curso taller, Tópicos sobre nutrición y alimentación animal, Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM, México, Editado por Amena, pp 97-108.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G. and Lawrence, A.L., 1990. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. American soybean asociation, MCP 15/1/89, Vol 3. AQ 18 1990/7/8/50pp.
- Akiyama, D.W., Dominy, W.G. and Lawrence, A.L.,1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. Revised. In: Akiyama, D. W. and Tan, R., proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition, Workshop, Thailand and Indonesia, American soybean asociation, pp 80-97.
- Akiyama, T., Pedrazoli A. y Yaguachi, M., 1993. Requerimientos de la proteína en dietas artificiales para juveniles de *Penaeus vannamei*. In: Memorias del primer congreso ecuatoriano de acuicultura, pp 53-58.

- Anderson, S., Lall, P.D.M., Anderson, M. and Chandrasoma, J., 1992. Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for Atlantic Salmon (*Salmo salar*) reared in sea water. *Aquaculture*, 108: 111-124.
- Anderson S., Lall, S.P., Anderson, D.M. and Mc Niven M. A., 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. *Aquaculture*, 115: 305-325.
- Anderson S., Lall, S.P., Anderson D. M. and Mc Niven M. A., 1995. Availability of amino acids from various fish meal fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 138: 291-301.
- A.O.A.C. Official methods Analysis, 1990. 12th Ed. Association of Official Analytical Chemist. Elliam Horritz Ed. Washington, D.C. 684pp.
- Aquacop, 1978. Study on nutritional requirements and growth of *Penaeus merguensis* in tanks by means of purified and artificial diets. *Proceedings, World Mariculture Society*, 9:225-234.
- Aquacop, Cuzon, G., Pike, I. and Cousin M., 1996. Comparison of fish meal quality on growth response with three species of shrimp *Penaeus monodon*, *P. stylirostris*, *P. vannamei*. Abstracts, World Aquaculture '96, Bangkok, Thailand January 29-February 2, 1996. pp19.
- Aquaculture Europe*.1995. *International News*, 20(2) December.
- Bakker, N.P.M., 1994. Biogenic amines threat in high protein feed. *Feed mix, the international Journal on Feed nutrition and Technology*. 2(1):7-11.
- Barlow, S.M. y Windsor, L., 1984. Subproductos de pesquería. IAFMM. Boletín Técnico No. 19, CSR, Handbook of nutritional Supplements, II:253-272.
- Barlow, S.M. y Windsor, L.,1994. Subproductos de Pesquerías. In: L. E. Cruz-Suárez y D. Ricque (Eds) *Memorias del seminario internacional sobre calidad de harina de pescado en nutrición animal acuícola y pecuaria*. FCB/UANL, México, 176pp.
- Barlow, S.M.,1996. *Fishing News International*. 35(3) March.
- Bolin, D.W., King, R. P. and Klosterman, E.W.,1952. A simplified method for the determination of chromic oxide (Cr_2O_3) when used as a index substance. *Science*. 116(3023):634-635.

- Bohinski, R.C.,1991. Metabolismo de los aminoácidos y nucleótidos. Bioquímica. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, 5ta edición, 737pp.
- Castro, C. E., 1987. Criterios de calidad nutricional y biotxicologica para harina de pescado. Fundación Chile, 10pp.
- Castro, C.E., 1989. Parámetros de calidad y capacidad inductora de erosión de molleja y vómito negro de harinas de pescado en Chile. Publicación inédita Fundación Chile.
- Castro, C.E., 1990. Harina de Pescado: Utilización y principales problemas asociados a su uso en distintas especies. Servicios alimenticios mejorados. Simposium metionina-harina de pescado, Ixtapa, Zihuatanejo, Méx., 43pp.
- Castro, C.E., 1991. A research proposal for the evaluation of the possible toxicological effects in salmon feeding of the biogenic amine and gizzerosine content found in fishmeal causatives of the gizzerd erosion and black vomit in chicks. Fundación Chile,12pp.
- Castro, C.E.,1992. Chilean Fish meal quality. In: L. E. Cruz-Suárez y D. Ricque (Eds.), Memorias del seminario internacional sobre calidad de harinas de pescado en nutrición animal acuícola y pecuaria, 176pp.
- Cía. Pesquera San Pedro. 1992. Manual de Harinas de Pescado, Santiago de Chile, 50pp.
- Costero M. C. y S. P. Meyers. 1993. Evaluation of chemoreception by *Penaeus vannamei* under experimental condition. The progressive fish cultist. 47(1), 59-61.
- Cowey, C.B. and Cho, C. Y., 1992. Failure of dietary putresine to enhance the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can J. Fish Aquat. Sci, 94:2496-2473.
- Cruz-Suárez, L.E., 1991. Nutrición y alimentación del camarón. In: Memorias del curso taller, Tópicos sobre nutrición y alimentacón animal, Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM, Editado por AMENA, 33-41.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque, D., Abdo-delaParra, Ma:I.,1994. Evaluación de Harinas de Pescado con diferente score biotóxicologico sobre el crecimiento y la sobrevivencia de camarón blanco *Penaeus vannamei*. Reporte para Fundación Chile.

- Cruz-Suárez, L.E., Ricque, D., Abdo-delaParra Ma.I., Tapia-Salazar, M. y Nieto-López, M., 1995. Índices de calidad de harinas de pescado y su efecto en la producción de camarón. *Revista Acuicultura del Ecuador*, 12:12-30.
- Chavez-Sanchez, C., Martinez-Palacios, C., Olvera-Novoa, M.A. y Reyes Vazquez, C., 1991. El vómito negro un problema factible en acuicultura. In: *Memorias del curso taller. tópicos sobre nutrición y alimentación acuícola*, Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM, Mex., Editado por AMENA, pp 78-83.
- Díaz, S., 1980. Efecto de diversos factores de la harina de pescado sobre la presentación del vómito negro aviar. Tesis de licenciatura. Universidad Pontificia Católica de Chile. Facultad de Agronomía. Santiago de Chile, 130 pp.
- Fairgrieve W. T., Meyers. M.S., Hardy, R.W., and Dong, F.M., 1994. Gastric abnormalities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amine supplemented diets or chicken gizzard-erosion-positive fish meal. *Aquaculture*, 127. 219-232.
- FAO. 1996. *Fishing News International*. May. vol 35 No. 5.
- Galleguillos M. 1993. Aminas biogénicas nuevos indicadores químicos utilizados como criterios de la calidad de las harinas de pescado. FAO I. Curso regional de capacitación en control de la calidad de insumos y dietas acuícolas para Latinoamérica. Santiago de Chile, 8pp.
- Galleguillos, M. y Romero, J.J., 1994. A quality parameter for fish meal: The biotoxicological score. *Abstracts, Aquaculture*. 124:359-363.
- Galleguillos. M., y Romero, J.J., 1996. Control y certificación de la calidad de harina de pescado para el mercado local y de exportación. Fundación Chile. In: Mendoza, Cruz-Suárez y Ricque (Eds.). *Memorias del segundo simposium internacional de nutrición acuícola*, 7-9 de noviembre de 1994. Monterrey, N.L., México. pp 367-372.
- Galleguillos, M., 1995. Efectos de la histamina sobre el score biotoxicológico (inédito). Fundación Chile. 8pp.
- Garcilaso, M., 1992. Metabolismo de los aminoácidos. *Manual de bioquímica metabólica*. UNISON. Cap XI, 181pp.

- Hardy, R. W. and Masumoto, T., 1991. Specifications for marine by-products for aquaculture. In : D. Akiyama and R. Tan Thailand (Editors). Proceeding of the aquaculture feed processing and nutrition workshop, Indonesia, pp 99-108.
- Harpaz, S., Kahan, D., Galun, R. and Moore, I., 1988. Responses of fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* to chemical attractants. *Journal of Chemical Ecology*. 13(9).
- Harry, G., Tucker, J. F. and Laursen-Jones A. P., 1975. The role of histamine and fish meal in the incidence of gizzard erosion and proventricular abnormalities. *B. Poultry Sci.* 16:69-78.
- Ito H., Noguchi, T. and Natio, H., 1987. Fluorimetric determination of gizzerosine, a histamine H₂-receptor agonist discovered in feedstuffs, employing high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 151:28-31.
- Ito H., Terao, H., Noguchi, T. and Natio, H., 1988. Gizzerosine raises the intracellular cyclic adenosine-3'-5' monophosphate level in isolated chicken proventriculus. *Poultry Science*, 67: 1290-1294.
- Janssen, W. y Germs A.C., 1971. La erosión de la molleja (Vómito negro) el sabor de la carne de pollo de mesa (broiler) y la vitamina E. *Symposium en Hindsgavly Castle, Dinamarca*, 15pp.
- Nakazawa, J.C., Castro, C.R., Yokoyama M. and Kanazawa, A., 1994. Biological evaluation of fish meal produced in Chile. *Aquaculture, Abstracts* 124: 359-363.
- Lightner D. V and Bell, T. A., 1988. *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 114pp.
- Lehninger, A.L., Calvet, P.F. and Bozal, F.S., 1989. Catabolismo y producción de energía del enlace fosfato y biosíntesis y utilización de la energía del enlace fosfato. *Bioquímica*. Editorial OMEGA. Segunda edición. Parte 2 y 3, 369-630.
- Mackinlay D. 1994. High performance fish. *Proceedings of an international fish physiology simposium*. University of British in Vancouver, Canada. QL.639.M15, pp. 387-393.
- Masumura, T. and Sugahara, M., 1985. The effect of gizzerosine, a recently discovered compound in overheated fish meal, on the gastric acid secretion in chicken. *Poultry Science*, 64:356-361.

- Mendoza-Alfaro, R., 1996. Utilización de métodos inmunológicos en el estudio de la nutrición de los organismos acuáticos. In: R. Mendoza, L. E. Cruz-Suárez y D. Ricque (Eds), Memorias del segundo simposium internacional de nutrición acuícola. 7-9 de Noviembre de 1994. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mex, pp 129-156.
- Mendoza-Alfaro, R., Montemayor, J., Verde, J. y Aguilera, C., 1996. Quimioatracción en Crustáceos: Papel de moléculas homólogas. In: L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque y R. Mendoza (compiladores) Tercer simposium internacional de nutrición acuícola. FCB/UANL, Monterrey Nuevo Leon México. 11-13 de Noviembre.
- Montemayor, L. J., 1995. Uso de feromonas y aminas biogénicas como atrayentes en alimentación para langostino *Macrobrachium rosenbergii*. Tesis de maestría. FCB/UANL, 97pp.
- Morales-Barrera, E., Avila-Gonzalez, E. y Lopez-Cuello C., 1991. Evaluación del contenido de mollerossina en dos harinas de pescado mexicanas y su efecto en la presentación de vómito negro en pollo. Vet. Mex. XXII:2:151-158.
- Morales-Barrera, E., Avila-Gonzalez, E. y Flores-Caballero, E., 1991. Efecto en pollo de engorda de la adición de cimetidina a dietas con una harina de pescado causante de vómito negro. Vet. Mex, XXII:2:143-149.
- Nakazawa, J.C., Castro, C.R., Yokoyama M. and Kanazawa, A., 1994. Biological evaluation of fish meal produced in Chile. Aquaculture, Abstracts 124: 359-363.
- Nieto-Lopez, M. 1995. Efecto de las diferencias en el procesamiento de las harinas de pescado y la toxicidad de las mismas, sobre la digestibilidad aparente en el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei* Boone), en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura. FCB/UANL, 98pp.
- Okazaki, T., Noguchi, T., Igarashi, K., Sakagami, Y., Seto, H., Mori, K., Naito, T., Masumura and Sugahara, M., 1983. Gizzerosine, a new toxic substance in fish meal, causes severe gizzard erosion in chicks. Agric. Biol. Chem, 47:2949-2952.
- Osuna, O. 1985. Vómito negro, modelos experimentales y concentración de histidina en harina de pescado. Avicultura profesional, 2(4):143-146.
- Osuna, O. 1989. Concentraciones límites, formación, absorción y tratamientos de mollerossina en el vómito negro. Avicultura profesional, 16(14):149-151.

- Overseas Fishery Corporation Foundation, 1985. Harina de pescado y aceite de pescado. Procesamiento de productos pesqueros II,350-267.
- Pearsons, C.M., 1993. Ventajas de utilizar valores de digestibilidad en la formulación de alimentos para aves. In: memorias del seminario técnico sobre la nutrición acuícola. Editado por Degussa Mex. S. A. y pos Asociación Americana de Soya, 25 de Marzo, Monterrey Nuevo León Mex, pp 13-25.
- Pike, I.H., Gurid Andersdóttir and Mundheim, H., 1990. The role of fish meals in diets for salmonids. Memorias del seminario Internacional sobre calidad de Harinas de pescado en Nutrición Animal Acuícola y Pecuaria. I. Compilado de documentos Harinas y Aceites de pescado en Nutrición Animal. Compiladores Cruz-Suárez L.E. y Denis Ricque.FCB/UANL,México,Noviembre de 1992, 1-176.
- Pike, I.H. and Hardy, R., 1992. Shrimp feed ingredients quality standards. I.A.F.M.M.I. In: L. E. Cruz-Suárez y D. Ricque (Compiladores) . Compilado de documentos Harinas y Aceites de pescado en Nutrición Animal.FCB/UANL,Noviembre de 1992,176pp.
- Pike, I. H.,1994. Productos marinos para acuicultura: el futuro. In: R. Mendoza, L. E: Cruz-Suárez y D. Ricque Memorias del segundo simposium internacional de nutrición acuícola. Edits.,7-9 de Noviembre de 1994, Monterrey, FCB/UANL, pp191-204.
- Ricque D., Cruz-Suárez, L. E., Abdo-delaParra, Ma.I., Pike.Freshness, en prensa.
- Rodríguez-Marín, M.F., Gonzales-Villalobos, J. y Ahumada- Cervantes, C.,1994. Estudio de la digestibilidad de dietas para camarón blanco *Penaeus vannamei* utilizando la planta halófito *Salicornia europea*. In: R. Mendoza, L. E: Cruz-Suárez y D. Ricque memorias del segundo simposium internacional de nutrición acuícola, 7-9 de Noviembre de 1994, Monterrey, FCB/UANL, pp 219-230.
- Rodríguez-Rios, H.1990. Efecto de tratamientos térmicos en Harina de pescado Chilenas y su insidencia en el vómito negro en pollos de engorda en un período de 0 a 4 semanas. Tesis. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de México. 68pp.

- Romero, J.J., Castro C.E., Díaz, A.M., Reveco, M. and Zaldivar, J., 1995. Evaluation of methods to certify the premium quality of Chilean fish meals. *Aquaculture*, 124 :351-358
- Rosenberry, B., 1994. *World Shrimp Farming*. Published by *Aquaculture Digest*, San Diego, CA U.S.A. 69 pp.
- Smith, S., 1989. Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine metabolism. *PSEBM*, 94:332-336
- Subramanyam, M., 1996. Calidad de Ingredientes en la producción y el rendimiento de alimentos para acuicultura. In: R. Mendoza, L. E. Cruz-Suárez y D. Ricque, *memorias del segundo simposium internacional de nutrición acuícola*, , 7-9 de Noviembre de 1994, Monterrey. FCB/UANL, pp 243-281.
- Sugahara, M. Hattori, T. and Nakayima T. 1987. Relationship between growth rate and gastric on secretion gizzerosine administration to broilers chick. *Agric&Biol Chem*, 51:3423-3424.
- Tacon, A., 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. *Manual de Capacitación. Aquila II Documento de Campo. Proyecto No. 4. Proyecto GCP/RLA/102/ITA, Brasilia, Brasil.* 572 pp.
- Umemura, Y., 1982. *Natl. Inst. Anim. Health Quart, (Japan)*, 21:52-60.
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Satah, S., Toyama, K. and Okuzumi M., 1987. Effect of dietary histidine or histamine on growth and development of stomach erosion in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkishi*, 53(7):1207-1214.
- Windsor, M. y Barlow, S., 1986. *Introducción a los subproductos de pesquerías*. Editorial Acribia. Primera edición, 484pp.
- Wessels, J. P. H. and Post, B.J., 1989. Effect of heat treatment of fish meals, fines and the addition of lysine as related to gizzard erosion in chickens. *J. Sci Food Agric*, 46: 393-406.
- Zaldivar, J., 1992. *Criterios de clasificación de Harinas de Pescado*. *Corpesca, Chile*, pp 43-47.
- Zar, J.H., 1974. *Biostatistical Analysis*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., .620pp.

