

Capítulo 4:

Resultados

4.1. EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PROTEÍNAS POR CARBOHIDRATOS.

El objetivo del presente experimento fue determinar el efecto que tiene la sustitución parcial de las proteínas por carbohidratos en la dieta como fuente de energía, sobre la excreción de amonio, el balance de nitrógeno y la utilización de las proteínas y el alimento (a través de la NPU, la PER y la FER, ecuaciones 3.10, 3.12 y 3.13). Además, con el objetivo de evaluar el efecto de la talla sobre estos parámetros, realizamos dos mediciones durante el experimento, la primera al final del periodo de 0-45 días (peso de las doradas de 13.32 ± 0.28 grs) y la segunda al final del periodo 46-93 días (talla de 29.23 ± 1.13 grs).

4.1.1. Condiciones experimentales.

Se adquirieron aproximadamente 250 juveniles con un peso inicial de 2.52 ± 0.17 grs, provenientes de la granja reproductora de TINAMENOR (Pesués, Cantabria, España). Los peces fueron transportados por vía aérea dentro de bolsas de plástico con 5 litros de agua de mar y oxígeno inyectado, a una densidad aproximada de 80 peces por bolsa; las condiciones ambientales de transporte fueron de una salinidad de 32 psu, 14.3°C y un pH de 7.9. A su llegada a Barcelona la temperatura del agua fue de 17°C .

En la figura 4-1 se muestran las condiciones experimentales para cada uno de los tratamientos, los cuales se realizaron por triplicado en acuarios de 260 litros de capacidad. La composición de las dietas utilizadas para cada tratamiento de este experimento se pueden ver la tabla III.I (dietas NOR-1, NOR-3, NOR-4 y NOR-6). Las dietas tuvieron igual contenido de grasa (14.4-15.5%) y una proporción variable de proteínas y carbohidratos (figura 4-1), manteniendo un valor calórico aproximado de 5300 kcal/kg de peso seco.

Las raciones de alimento aportadas fueron ajustadas por debajo del límite de la saciedad de los peces, siendo equivalentes al 5% del peso total por acuario, y fueron divididas en dos alimentaciones diarias (09:30 y 15:30 hrs). Para ajustar la ración del alimento, los peces fueron pesados cada 14 días durante el experimento.

4.1.2. Diseño de muestreo.

La descripción del diseño de muestreo para este experimento se representa en la tabla IV.I, siendo variable la duración de cada uno de los periodos de incubación (6, 4.5 y 13.5 horas). Para completar el muestreo hicieron falta 12 días distribuidos en tres semanas, tal como se describe a continuación:

Durante el primer día se tomaron muestras en uno de los acuarios de cada tratamiento para el periodo comprendido entre las 09:30 y las 15:30 hrs. Para el segundo día se tomaron muestras en el periodo entre las 15:30 y las 20:00 hrs en los mismos acuarios, y finalmente, el tercer día se muestreó el periodo de tiempo entre las 20:00 hrs y las 09:30 hrs del día siguiente, también para los mismos acuarios.

Este procedimiento se repitió la siguiente semana para la segunda de las réplicas en cada tratamiento y la réplica restante se muestreó en una tercera semana de la misma forma que las anteriores.

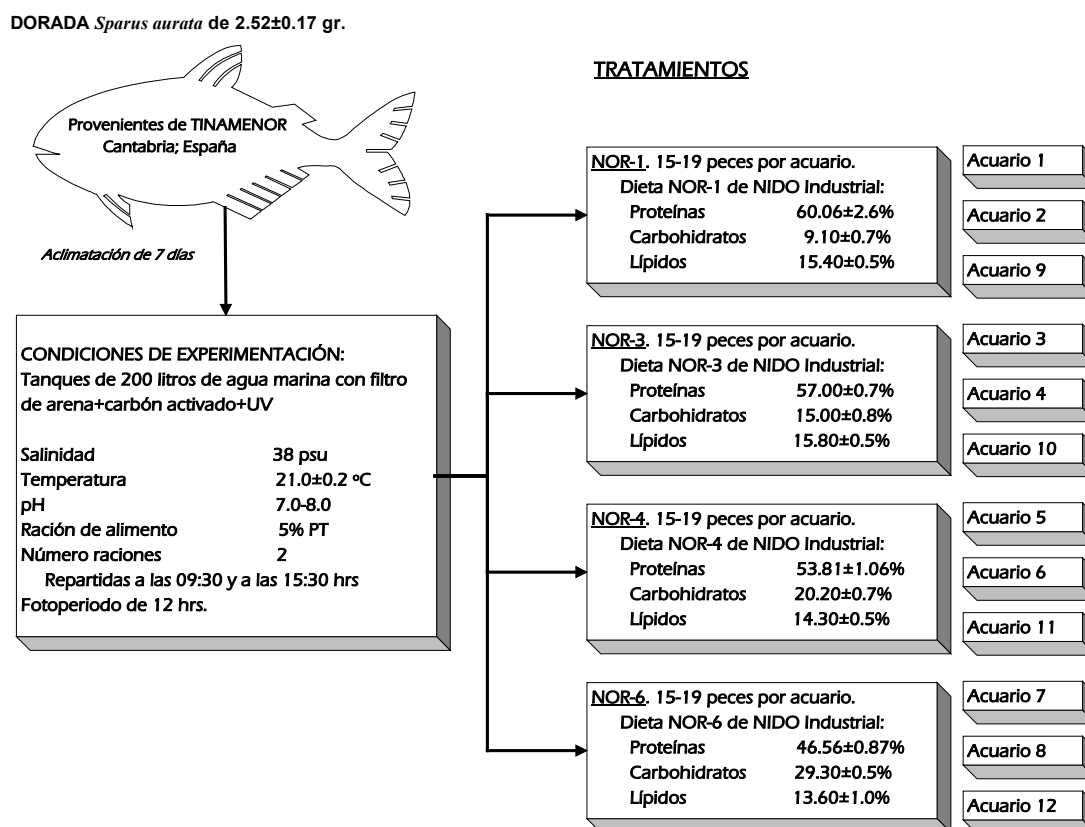
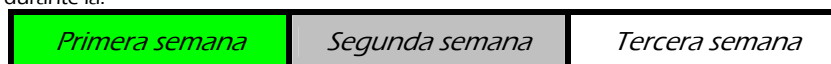


Figura 4-1. Modelo para el experimento *E1*, mostrando las condiciones de cultivo y las dietas utilizadas. Datos de composición provenientes del análisis en laboratorio.

Tabla IV.I. Diseño de muestreo para el amonio de los distintos tratamientos y duración de los periodos de incubación.

TRATAMIENTOS →	NOR-1			NOR-3			NOR-4			NOR-6		
ACUARIOS →	A1	A2	A9	A3	A4	A10	A5	A6	A11	A7	A8	A12
1er Día 09:30-15:30 hrs	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2º Día 15:30-20:30 hrs	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3º-4º Día 20:30-09:30 hrs	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Acuarios muestreados durante la:



4.1.3. Excreción de amonio.

En la tabla IV.II y la figura 4-2 se presentan las tasas de excreción de amonio total (AT) para juveniles de dorada de 13.32 grs y 29.23 grs en $\text{mg N-NH}_4^+/\text{kg pez.hora}$. Para ambas tallas, las tasas de excreción fueron significativamente mayores durante los periodos de luz (entre las 09:30 y las 20:00 hrs), es decir, cuando los peces se mantienen más activos. También en ambos casos las máximas tasas de excreción fueron para los tratamientos donde los peces se alimentaron con las dietas de mayor valor proteico ($P < 0.001$), siendo menores en los peces alimentados con las dietas de menor contenido proteico.

La excreción de amonio nocturna en relación con la excreción diurna significó una fracción más importante en los peces alimentados con dietas de alto contenido proteico, disminuyendo de acuerdo a la reducción del nivel proteico en la dieta proporcionada a los juveniles, independientemente de la talla. Para las doradas alimentadas con la dieta de mayor contenido de proteínas la excreción nocturna de amonio significó alrededor del 55-65% de su excreción diurna, mientras que dicha proporción se redujo hasta el 35-40% para aquellas alimentadas con el menor nivel de proteínas.

Como se ha visto, las tasas de excreción de amonio, diario y por periodo ($\text{mg N-NH}_4^+/\text{kg pez.hora}$ y $\text{mg N-NH}_4^+/\text{kg pez.día}$), tienen una dependencia de la composición del alimento, presentando un incremento lineal de acuerdo al aumento del nivel de proteínas de la dieta (ver figura 4-3), excepto para las dietas intermedias, las cuales no observaron diferencias estadísticas entre sí (NOR-1 > NOR-3 = NOR-4 > NOR-6). La correlación positiva encontrada entre el nivel proteico en la dieta y las tasas de excreción de amonio demuestra que el contenido proteico en las dietas y el nivel de sustitución de estas por carbohidratos, afecta la excreción de nitrógeno y por tanto, de la utilización de las proteínas por la dorada.

Por otro lado, para determinar si hay un efecto combinado de la dieta y la talla del pez sobre la excreción total diaria de amonio, se aplicó un ANOVA de 2 factores. Este análisis confirmó que la talla del pez en combinación con la composición de las dietas, si presenta un efecto sobre las tasas diarias de excreción de amonio (tabla IV.II), siendo mayor la excreción de amonio diario para las doradas de mayor talla y para las doradas alimentadas con la dieta que contenía el nivel más alto de proteínas.

Al representar las tasas de excreción respecto al nivel proteico de la dieta para las doradas de ambas tallas (figura 4-3), se encontró una diferencia significativa para la pendiente de las rectas entre las doradas de 13 grs y 29 grs, reflejando un efecto de la talla del pez sobre la tasa de excreción diaria de amonio, lo cual respalda lo anterior. Los peces de 29 grs presentaron mayores tasas de excreción de amonio que los juveniles de 13 grs en todos los tratamientos, excepto para la dieta de menor contenido proteico y mayor nivel de carbohidratos (NOR-6), para la cual no se observaron diferencias significativas. La excreción de amonio total diario de los peces de 13 grs, significó solo entre un 71-86% de la excreción diaria de los peces de 29 grs, dependiendo esta fracción del nivel proteico de la dieta suministrada.

Tabla IV.II. Excreción de nitrógeno en forma de amonio (mg N-NH₄⁺/kg pez.hora y mg N-NH₄⁺/kg pez.día) para dos tallas de doradas *Sparus aurata*. Las dietas aportadas contienen distintos niveles de proteínas y carbohidratos.

TRATAMIENTO	NOR-1 60.0% Proteínas 9.1% Carbohidratos	NOR-3 57.0% Proteínas 15.0% Carbohidratos	NOR-4 53.8% Proteínas 20.2% Carbohidratos	NOR-6 46.56% Proteínas 29.3% Carbohidratos
PERIODOS	<i>Peces de</i>	<i>13.32±0.28 grs</i>	<i>(0-45 días)</i>	
09:30-15:30	28.21±1.72 ^{va}	* 24.47±2.79^{uva}	23.88±2.35 ^{ua}	* 21.04±3.42^{ua}
15:30-20:00	* 28.54±0.58^{va}	23.18±1.13 ^{ua}	* 25.46±3.09^{uva}	17.23±6.32 ^{ua}
20:00-09:30	15.45±1.91 ^{wb}	11.29±0.66 ^{vb}	9.93±1.63 ^{vb}	7.18±0.18 ^{ub}
TOTAL	* 506.23±27.5^{wx}	* 403.57±14.2^{vx}	* 391.84±8.4^{vx}	* 300.79±13.6^{ux}

PERIODOS	<i>Peces de</i>	<i>29.23±1.13 grs</i>	<i>(45-93 días)</i>	
09:30-15:30	33.54±0.85 ^{wa}	* 28.88±2.23^{va}	21.78±4.16 ^{ua}	15.50±4.14 ^{ua}
15:30-20:00	* 37.52±1.63^{wb}	27.28±4.20 ^{va}	* 27.21±2.32^{va}	* 19.72±2.31^{ua}
20:00-09:30	25.11±1.90 ^{wc}	12.96±0.62 ^{vb}	15.00±1.49 ^{vb}	8.47±1.48 ^{ub}
TOTAL	* 708.99±18.0^{wy}	* 470.95±27.5^{vy}	* 455.60±17.8^{vy}	* 296.07±16.5^{ux}

Efecto	ANOVA	
	gl	P
Dieta	3	<0.01
Talla	1	<0.01
Dieta x Talla	3	0.005

Valores presentados como promedio ± error estándar.

Los tratamientos que no presentan diferencias significativas ($P>0.05$) se representan con letras comunes en cada línea (u, v, w). Las tasas de excreción que no presentan diferencias significativas debidas a la talla del pez se representan en cada columna con las letras comunes (x, y) y para aquellas debidas a los intervalos de tiempo se representan con las letras comunes (a, b, c, d, e, f).

* La fracción de amonio no ionizado (ANI) correspondiente es del 3.21% del amonio: Los mayores valores de excreción diaria y la excreción diaria total han sido marcado con "negritas".

Máximo peces 13.32 grs (de NOR-1 a NOR-6): 0.961, 0.878, 0.916 y 0.785 mg N-ANI/kg pez.hora. Total: 16.25, 12.95, 12.58 y 9.65 mg N-ANI/kg pez.día.

Máximo peces 29.23 grs (de NOR-1 a NOR-6): 1.257, 1.010, 0.948 y 0.707 mg N-ANI/kg pez.hora. Total: 22.76, 15.12, 14.62 y 9.50 mg N-ANI/kg pez.día.

En base a las condiciones de cultivo (salinidad, pH y temperatura), la fracción de amonio en su forma no ionizada (amoníaco o ANI) correspondió al 3.21% de la excreción de amonio. Se encontraron máximos de amoníaco entre 0.785-0.961 mg N-ANI/kg pez.hora para los peces de 13.32 grs y entre 0.707-1.257 mg N-ANI/kg pez.hora para los peces de 29.13 grs. En ambos casos las máximas tasas de excreción de amoníaco se presentaron para los peces alimentados con las dietas de mayor contenido proteico.

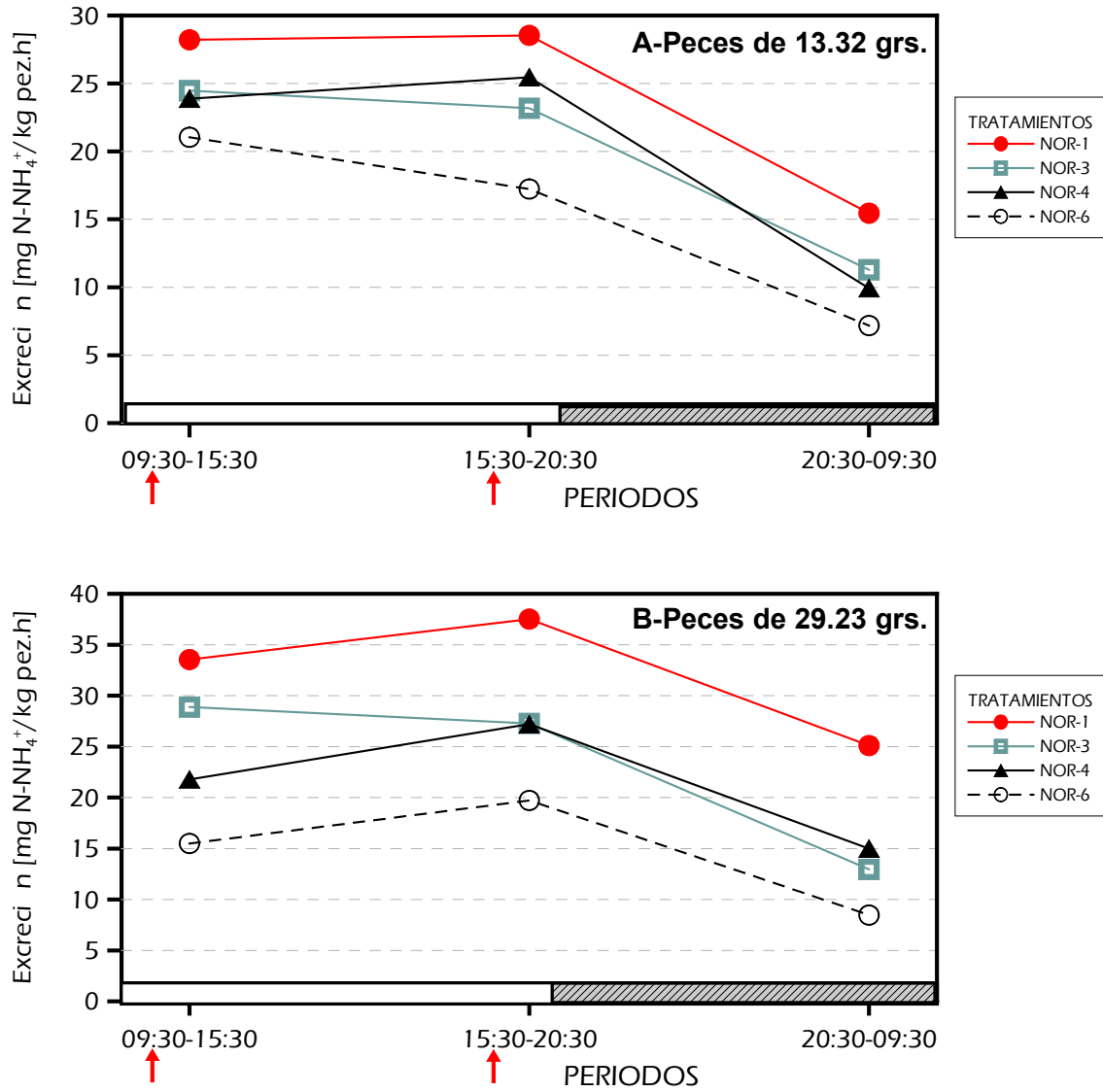


Figura 4-2. Tasas promedio de excreción de amonio para cada intervalo de muestreo. Se presentan resultados para juveniles de dorada *Sparus aurata* de dos tallas: A. 13.32 grs y B. 29.23 grs. Las flechas indican las horas de la alimentación y la franjas inferior del gráfico representan el fotoperiodo.

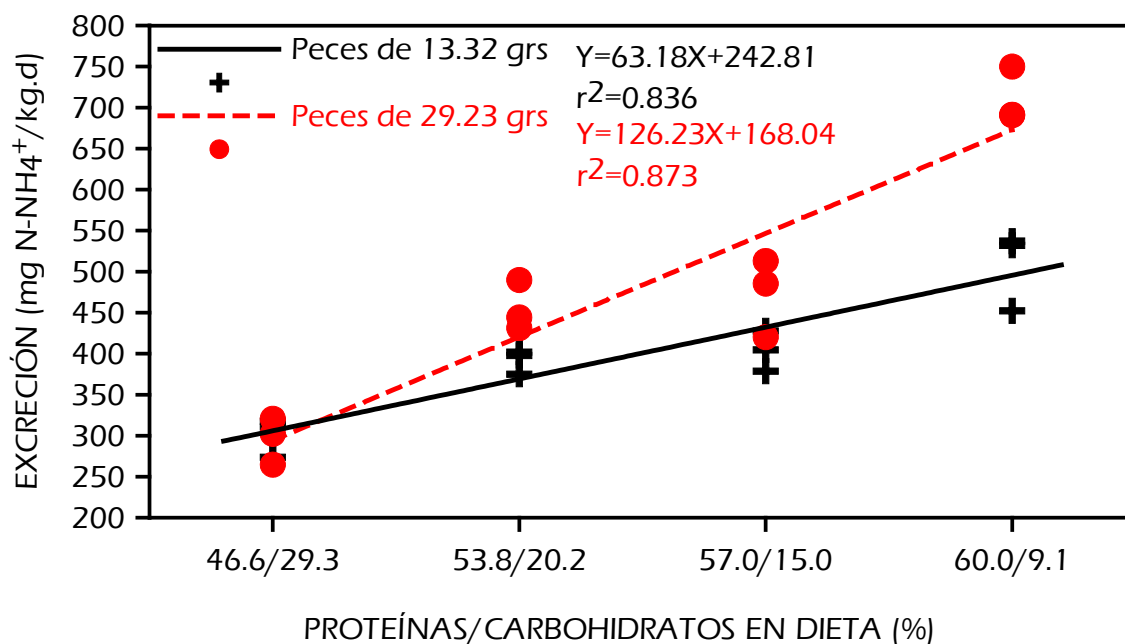


Figura 4-3. Relación entre los niveles promedio de excreción de amonio por día y el nivel de proteínas/carbohidratos en la dieta, para las dos tallas de juveniles probadas.

4.1.4. Balance de nitrógeno y nitrógeno total excretado.

Composición del alimento.

En las tablas IV.III y IV.V se presentan los resultados de la utilización del nitrógeno dietario ingerido por las doradas de dos tallas (13 y 29 grs).

Las dietas presentaron valores altos de digestibilidad de las proteínas, encontrándose entre el 85.8% y el 91.2%. Los peces que presentaron un porcentaje menor de retención proteica fueron aquellos alimentados con la dieta que contenía el nivel mas alto de proteínas (60.0%) y el menor contenido de carbohidratos (9.1%), no se encontraron diferencias significativas para la asimilación de nitrógeno entre los peces alimentados con el resto de las dietas.

Una de las fracciones importantes en el balance de nitrógeno fue el nitrógeno total excretado, el cual significó entre el 53% y el 63% del nitrógeno ingerido para las doradas de 13 gramos y entre el 58% y el 76% para los peces de 29 gramos (tablas IV.IV y IV.VI). En ambos casos, la excreción total de nitrógeno fue significativamente mas alto para los peces alimentados con la dieta de mayor contenido proteico, y menor para los peces alimentados con menos proteínas.

Por otro lado, se observaron diferencias entre los componentes del balance de nitrógeno relacionadas a la composición del alimento, es decir, que tanto la retención de nitrógeno, el nitrógeno fecal, el nitrógeno excretado en forma de amonio y el nitrógeno residual se vieron afectados por la composición de la dieta. La mayor producción de nitrógeno por vía fecal la presentaron los peces alimentados con menores niveles de proteínas y mayor cantidad de carbohidratos (alrededor del 14% del nitrógeno ingerido).

Tabla IV.III. Balance de la utilización del nitrógeno en juveniles de dorada *Sparus aurata* de 13.32 grs. Tasas en grs N/kg pez.día.

DIETA	N Ingerido	N Asimilado	N Fecal	N Retenido	NT Excretado	AT Excretado	N Residual
NOR-1	2.883±0.001 ^d	2.629±0.035 ^d	0.254±0.004 ^a	0.792±0.016 ^b	1.837±0.003 ^d	0.506±0.027 ^c	1.331±0.008 ^d
NOR-3	2.736±0.005 ^c	2.449±0.047 ^c	0.287±0.002 ^b	0.848±0.011 ^c	1.601±0.006 ^c	0.404±0.014 ^b	1.197±0.011 ^c
NOR-4	2.583±0.003 ^b	2.330±0.044 ^b	0.253±0.001 ^a	0.839±0.005 ^c	1.491±0.002 ^b	0.392±0.008 ^b	1.099±0.002 ^b
NOR-6	2.235±0.001 ^c	1.918±0.017 ^a	0.317±0.003 ^c	0.719±0.008 ^a	1.199±0.001 ^a	0.301±0.014 ^a	0.898±0.012 ^a

Los coeficientes que no presentan diferencias significativas entre ellos debido al nivel de proteínas en las dietas, se representan en cada columna con las letras comunes (a, b, c, d) o la ausencia de ellas.

La tasa de alimentación fue del 5% del PT.

Tabla IV.IV. Balance de la utilización del nitrógeno en juveniles de dorada *Sparus aurata* de 13.32 grs. Datos referidos en porcentaje del N ingerido.

DIETA	N Ingerido	ADC _N [†]	N Fecal	NPU	NT Excretado	AT Excretado	N Residual
NOR-1	100	91.2±1.3 ^b	8.79±0.011 ^a	27.49±1.31 ^a	63.71±1.31 ^c	17.56±1.10 ^c	46.15±0.005 ^d
NOR-3	100	89.5±1.8 ^b	10.50±0.001 ^c	31.01±0.56 ^b	58.49±0.69 ^b	14.75±0.47 ^b	43.74±0.026 ^c
NOR-4	100	90.2±1.6 ^b	9.85±0.092 ^b	32.50±1.08 ^b	57.70±1.08 ^b	15.17±0.37 ^b	42.53±0.015 ^b
NOR-6	100	85.8±0.6 ^a	14.20±0.001 ^d	32.17±0.65 ^b	53.63±0.65 ^a	13.46±0.50 ^a	40.17±0.005 ^a

Los coeficientes que no presentan diferencias significativas entre ellos debido al nivel de proteínas en las dietas, se representan en cada columna con las letras comunes (a, b, c, d) o la ausencia de ellas.

[†] La ADC_N se calculó a partir de las heces obtenidas del intestino posterior de algunos peces (ver sección 3.6.1)

Tabla IV.V. Balance de la utilización del nitrógeno en juveniles de dorada *Sparus aurata* de 29.23 grs. Tasas en grs N/kg pez.día.

DIETA	N Ingerido	N Asimilado	N Fecal	N Retenido	NT Excretado	AT Excretado	N Residual
NOR-1	1.922±0.002 ^d	1.753±0.023 ^c	0.169±0.001 ^a	0.382±0.025 ^b	1.371±0.003 ^c	0.709±0.018 ^c	0.662±0.001 ^b
NOR-3	1.824±0.001 ^c	1.632±0.313 ^{bc}	0.191±0.001 ^b	0.257±0.019 ^a	1.375±0.006 ^d	0.471±0.027 ^b	0.904±0.001 ^c
NOR-4	1.722±0.001 ^b	1.553±0.029 ^b	0.169±0.002 ^a	0.429±0.005 ^c	1.124±0.002 ^b	0.456±0.018 ^b	0.668±0.016 ^b
NOR-6	1.490±0.001 ^a	1.278±0.011 ^a	0.212±0.001 ^c	0.399±0.033 ^{bc}	0.879±0.001 ^a	0.296±0.016 ^a	0.583±0.029 ^a

Los coeficientes que no presentan diferencias significativas entre ellos debido al nivel de proteínas en las dietas, se representan en cada columna con las letras comunes (a, b, c, d) o la ausencia de ellas.

La tasa de alimentación fue del 5% del PT.

Tabla IV.VI. Balance de la utilización del nitrógeno en juveniles de dorada *Sparus aurata* de 29.23 grs. Datos referidos en porcentaje del N ingerido.

DIETA	N Ingerido	ADC _N ¹	N Fecal	NPU	NT Excretado	AT Excretado	N Residual
NOR-1	100	91.2±1.3 ^b	8.79±0.011 ^a	19.84±1.12 ^b	71.36±1.31 ^c	36.89±0.29 ^c	34.47±0.034 ^a
NOR-3	100	89.5±1.8 ^b	10.50±0.001 ^c	14.09±0.18 ^a	75.41±0.69 ^d	25.82±1.29 ^b	49.59±0.021 ^c
NOR-4	100	90.2±1.6 ^b	9.85±0.092 ^b	24.89±0.40 ^c	65.31±1.08 ^b	26.46±0.46 ^b	38.85±0.093 ^b
NOR-6	100	85.8±0.6 ^a	14.20±0.001 ^d	26.81±1.47 ^c	58.99±0.65 ^a	19.87±0.57 ^a	39.12±0.173 ^b

Los coeficientes que no presentan diferencias significativas entre ellos debido al nivel de proteínas en las dietas, se representan en cada columna con las letras comunes (a, b, c, d) o la ausencia de ellas.

¹ La ADC_N se calculó a partir de las heces obtenidas del intestino posterior de algunos peces (ver sección 3.6.1)

Este experimento mostró que el alimento con mayor nivel de proteínas (60%) y menor de carbohidratos (9.10%), da lugar a un mínimo de retención proteica. Sin embargo, los peces alimentados con niveles proteicos inferiores a 54% y de carbohidratos mayores a 20%, presentaron mayores niveles de retención proteica (ver figuras 4-4 y 4-5). De igual manera, la producción de nitrógeno fecal fue afectada significativamente por la composición del alimento, siendo mayor para los peces alimentados con la dieta de menor contenido proteico y mayor nivel de carbohidratos. Por otra parte, la excreción de amonio de los peces alimentados con las distintas dietas presentó un comportamiento inverso, independientemente de la talla, es decir, que los peces alimentados con altos niveles de proteínas excretan significativamente mayores cantidades de amonio, disminuyendo de acuerdo a la reducción del contenido de proteínas en la dieta.

El nitrógeno residual presentó un patrón relacionado a la composición del alimento solo para los peces de 13 gramos, reduciéndose de acuerdo al decremento en el contenido de carbohidratos en las dietas. Sin embargo, para ambas tallas, esta fracción fue mayoritaria en el balance de nitrógeno de los distintos tratamientos. Para los peces de 13 grs, la retención de nitrógeno significó el segundo mayor componente del balance para todos los tratamientos, mientras que en aquellos de 29 grs el segundo mayor componente del balance dependió directamente de la composición del alimento, siendo muy importante la excreción de amonio, aunque para los peces alimentados con un nivel proteico del 46.56% y 29.3% de carbohidratos, fue más importante la retención proteica. En todos los casos, el nitrógeno fecal significó el componente menor en el balance de nitrógeno.

Efecto de la talla.

Como se mencionó anteriormente, la talla de los peces afecta significativamente la excreción de nitrógeno. Se observó que tanto la excreción total de nitrógeno como la excreción de AT fueron mayores en los peces de 29 grs que en los de 13 grs, para todos los tratamientos. Mientras que la excreción total de nitrógeno para los peces de 29 grs significó entre el 58% y el 76% del nitrógeno ingerido, para los peces de 13 grs significó menos del 64% para todos los tratamientos. La excreción de AT significó entre el 19.9-36.9% y el 13.5-17.6% del nitrógeno ingerido, para los peces de 29 grs y 13 grs, respectivamente.

La retención de proteínas fue mayor en los peces alimentados con niveles proteicos menores a 53.8%. Sin embargo, el aprovechamiento de las proteínas dietarias fue mayor para los peces de 13 grs (figuras 4-4 y 4-5), lo que se traduce en una reducción en la excreción de amonio. Mientras que para los peces de menor talla, la retención proteica significa el segundo mayor componente dentro del balance de nitrógeno, para los peces de 29 grs este lugar lo ocupa la excreción de amonio, excepto para los peces alimentados con una proporción de proteínas/carbohidratos del 53.8%/20.2% (dieta NOR-4).

El nivel de nitrógeno fecal fue igual para ambas tallas debido a que se calculó a partir de la diferencia entre el nitrógeno ingerido y la digestibilidad del nitrógeno dietario. Debido a lo anterior, no se pudo determinar un efecto de la talla del pez sobre el N fecal.

Por otro lado, aunque el nitrógeno residual es el mayor componente del balance para los peces de ambas tallas, el porcentaje de este en las doradas de 13 grs es mayor que en las doradas de 29 grs (ver figuras 4-4 y 4-5).

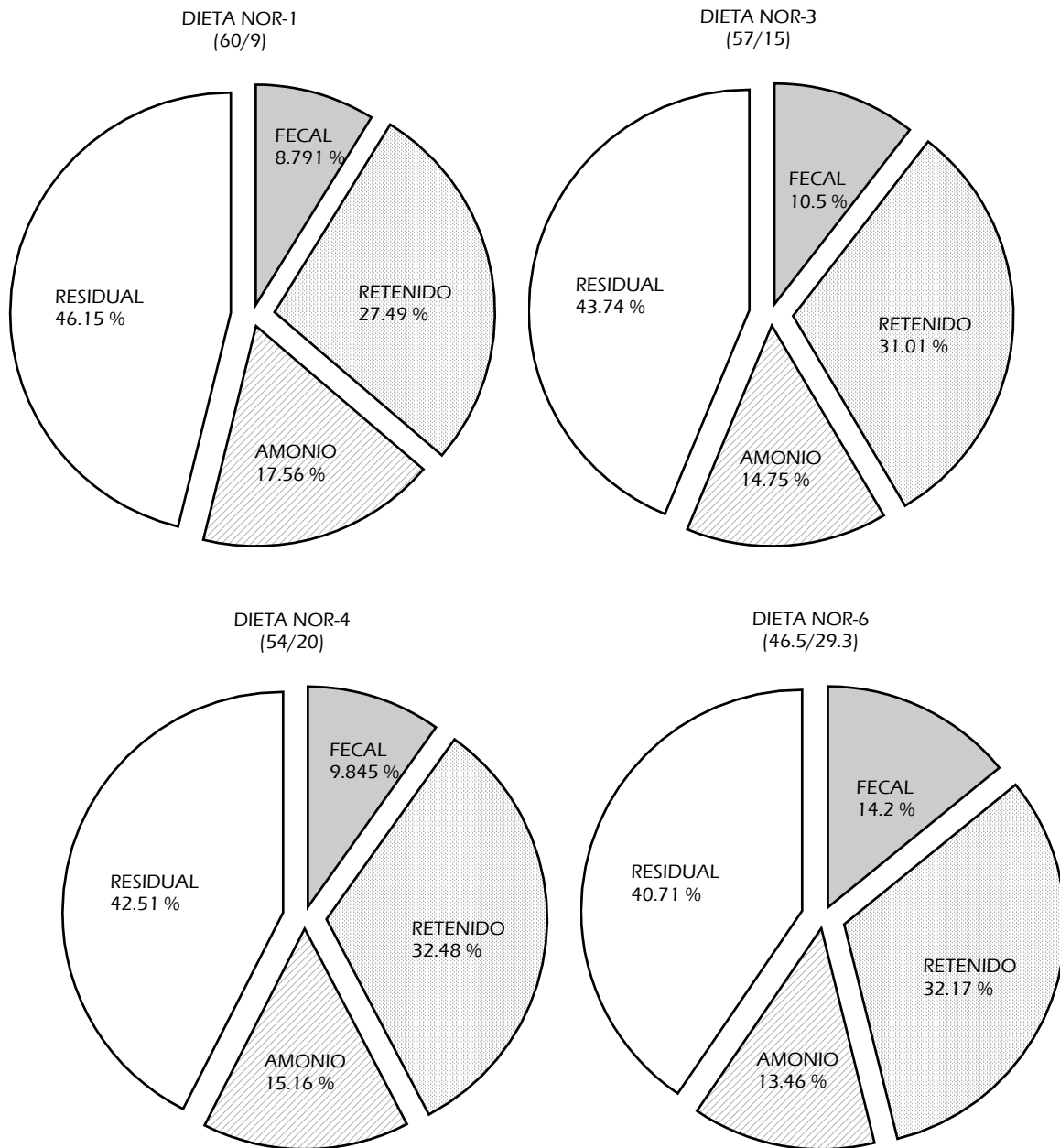


Figura 4-4. Balance de nitrógeno referido al nitrógeno ingerido para doradas de 13.32 gramos alimentadas con distintas proporciones proteínas/carbohidratos en las dietas.

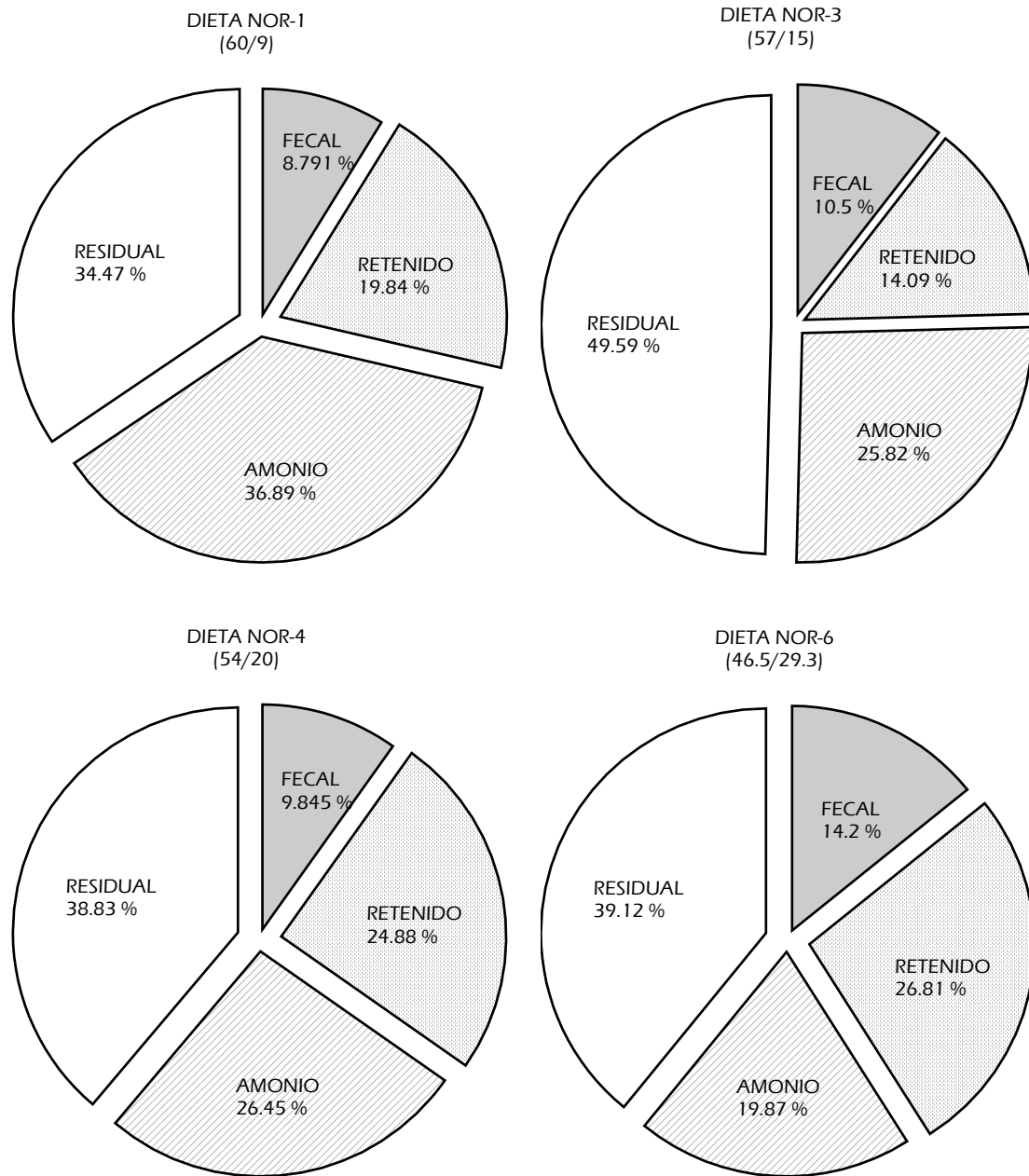


Figura 4-5. Balance de nitrógeno referido al nitrógeno ingerido para doradas de 29.23 gramos alimentadas con distintas proporciones proteínas/carbohidratos en las dietas.

4.1.5. Utilización de las proteínas y otros parámetros relacionados al crecimiento.

En la figura 4-6 se presentan los resultados de la retención proteica (NPU), la eficiencia de utilización de las proteínas (PER) y la eficiencia de utilización del alimento (FER), para los juveniles de dorada de 13 grs y 29 grs. Ya se mencionó el efecto combinado que la composición de la dieta y la talla del pez presentaron sobre la retención proteica. La retención de proteínas fue significativamente mayor para los peces alimentados con las dos dietas de menor contenido proteico (46.56-53.8%) y mayor contenido de carbohidratos (20.2-29.3%).

Los peces de menor talla retuvieron mejor las proteínas del alimento ($P < 0.01$), significando la retención de proteínas para las doradas de 29 grs, solo el 82.5% de la retención proteica encontrada para las doradas de 13 grs. Mientras que los peces pequeños utilizaron el 32.5% de las proteínas ingeridas para el crecimiento como máximo, los peces de 29 grs utilizaron solo el 26.81% de las proteínas ingeridas con este fin.

Por otro lado, el incremento en el nivel de los carbohidratos en las dietas por encima de 20%, y por tanto, la reducción del nivel proteico por debajo al 53.8% del alimento mejoró la utilización de las proteínas (PER).

La variabilidad de la utilización proteica se reflejó también en la eficiencia de utilización del alimento (FER). Las doradas alimentadas con un nivel bajo de proteínas utilizaron mejor el alimento, no encontrando diferencias significativas entre los demás tratamientos. De manera general, los peces alimentados con una dieta de un contenido proteico mayor al 57% y un contenido bajo de carbohidratos (<15%), utilizaron mejor el alimento. En cuanto a la talla, los peces de 13 grs utilizaron significativamente mejor el alimento que los peces de 29 grs.

En base a lo anterior, los peces de menor tamaño fueron más eficientes que los peces de 29 grs para utilizar el alimento, sin embargo utilizaron con menor eficiencia las proteínas dietarias. De igual manera, la composición de la dieta influyó sobre estos parámetros (NPU, PER y FER), siendo mayores para los peces que fueron alimentados con la dieta donde el nivel de carbohidratos fue mayor al 20% de la dieta y el nivel de proteínas menor al 54% (ver figura 4-6), lo cual demuestra un efecto combinado de la dieta y la talla del pez ($P < 0.01$) afectando las dietas con niveles extremos de proteínas y carbohidratos.

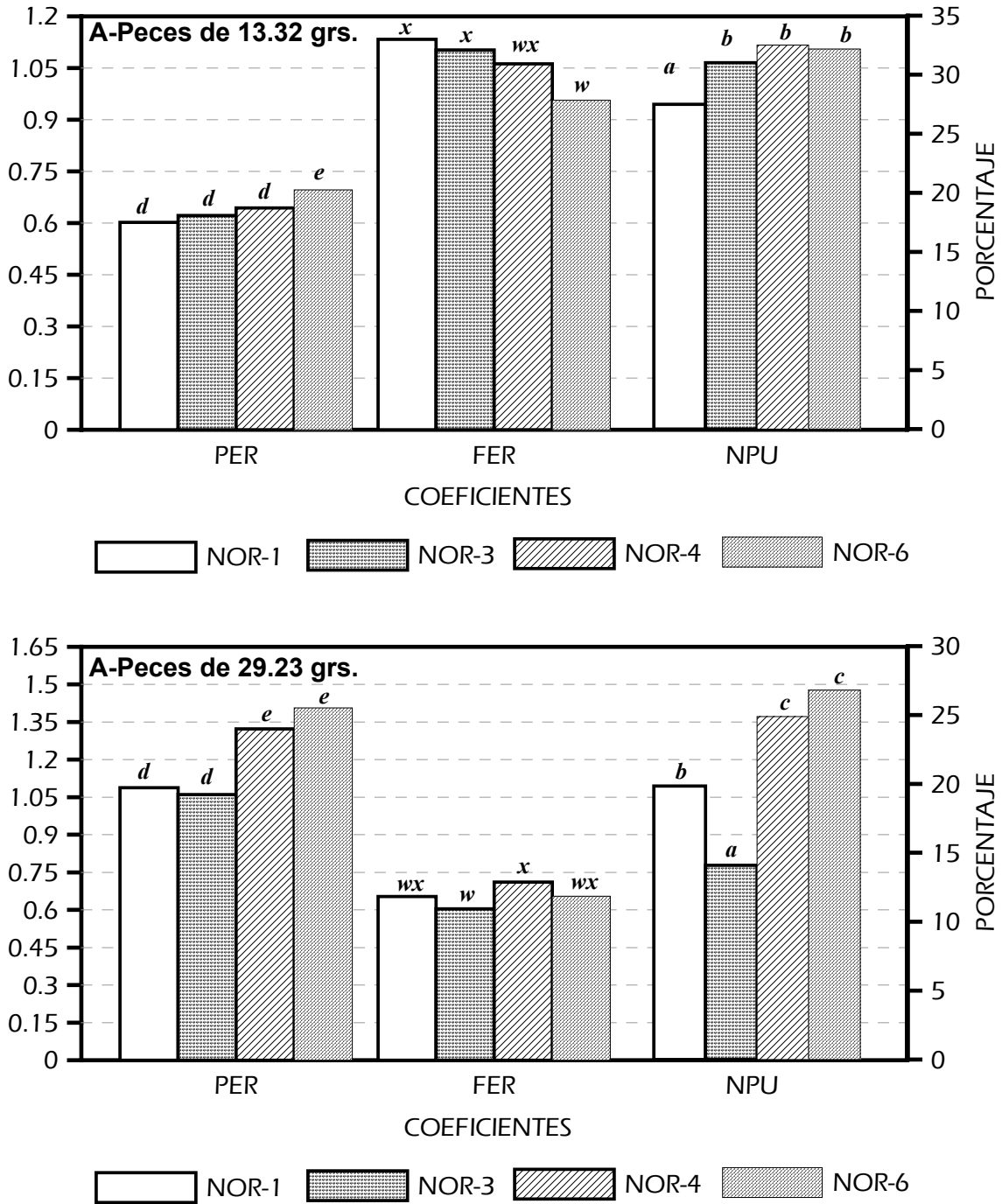


Figura 4-6. Eficiencia de retención de las proteínas (PER), eficiencia de utilización del alimento (FER) y porcentaje de retención proteica (NPU) para juveniles de dorada *Sparus aurata* de dos tallas: A. 13.32 grs y B. 29.23 grs y alimentadas con dietas de distinta proporción proteínas/carbohidratos. Los tratamientos que no presentan diferencia significativa entre ellos se representan con las letras comunes *d, e, f*, para la PER; *w, x, y*, para la FER; y *a, b, c*, para la NPU.

4.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL TAMAÑO DE LA RACIÓN.

Este experimento tiene como objetivo observar el efecto de la temperatura de cultivo y el tamaño de la ración de alimento sobre algunos factores relacionados a la utilización del nitrógeno en juveniles de la dorada *Sparus aurata*. Los factores evaluados fueron la excreción de amonio (AT) y el balance de nitrógeno, como en el experimento anterior.

4.2.1. Condiciones experimentales.

De la misma forma que en el experimento previo, los peces experimentales se adquirieron en la granja reproductora TINAMENOR (Pesués, Cantabria, España), las condiciones de transporte fueron descritas anteriormente. Se utilizaron 270 juveniles de dorada *Sparus aurata* con un peso entre 4-6 grs. Estos peces se distribuyeron al azar en 12 acuarios de 260 litros de capacidad (1.25 m de largo, 0.4 m de ancho y 0.5 m de alto) con una densidad de 14-15 peces/acuario, manteniéndolos en aclimatación durante 14 días.

En la figura 4-7 se presentan las condiciones experimentales para cada tratamiento. Después del periodo de aclimatación se comenzó el experimento, constando este de cuatro tratamientos por triplicado. 6 acuarios se mantuvieron en una cámara isotérmica a $15\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ y otros 6 en otra cámara isotérmica a $25\pm 0.2^{\circ}\text{C}$. En cada una de las temperaturas de mantenimiento se probaron dos raciones de alimento, siendo en cada caso una ración de alimento cercana a saciedad (ración alta) y otra de la mitad (ración baja). Las raciones para 15°C fueron de 1.5% y 3.0% del peso total del pez (PT) y para 25°C de 3.0% y 6.0% del PT, distribuidas en dos comidas (09:30 y 16:30 hrs). Durante el experimento los peces fueron pesados cada 7-8 días para ajustar las raciones. En ambas cámaras el ciclo de luz-oscuridad fue de 12:12 horas y la salinidad de los acuarios se mantuvieron alrededor de 38 psu.

Debido a que con la dieta NOR-4 (53.6% de proteínas, 20.2% de carbohidratos y 14.3% de grasas, con un valor energético aproximado de 5252 kcal/kg de peso seco) se obtuvieron los mejores resultados en el experimento anterior, fue elegida para el presente experimento. Los detalles de la composición fueron descritos en la tabla III.I.

4.2.2. Diseño de muestreo.

Antes del muestreo, los acuarios fueron limpiados y nivelados a 200 litros. En la tabla IV.VII se describe la distribución de la toma de muestras y las incubaciones. Durante el día se utilizaron periodos de incubación de 2 horas y durante la noche los periodos se ampliaron a 4 horas. El muestreo tuvo una duración de doce días distribuidos en tres semanas consecutivas, tal como se describe a continuación:

El primer día se tomaron muestras cada 2 horas para una de las réplicas de cada uno de los tratamientos entre las 08:00 y las 14:00 hrs. En el segundo día se tomaron muestras cada 2 horas entre las 14:00 y las 20:00 hrs para los mismos acuarios; y el tercer día se tomaron las muestras del periodo nocturno para los mismos acuarios, por periodos de 4 horas entre las 20:00 hrs y las 08:00 hrs del día siguiente.

Este procedimiento se repitió la siguiente semana para otra de las réplicas de cada tratamiento y la réplica restante se muestreó en una tercera semana de la misma forma.

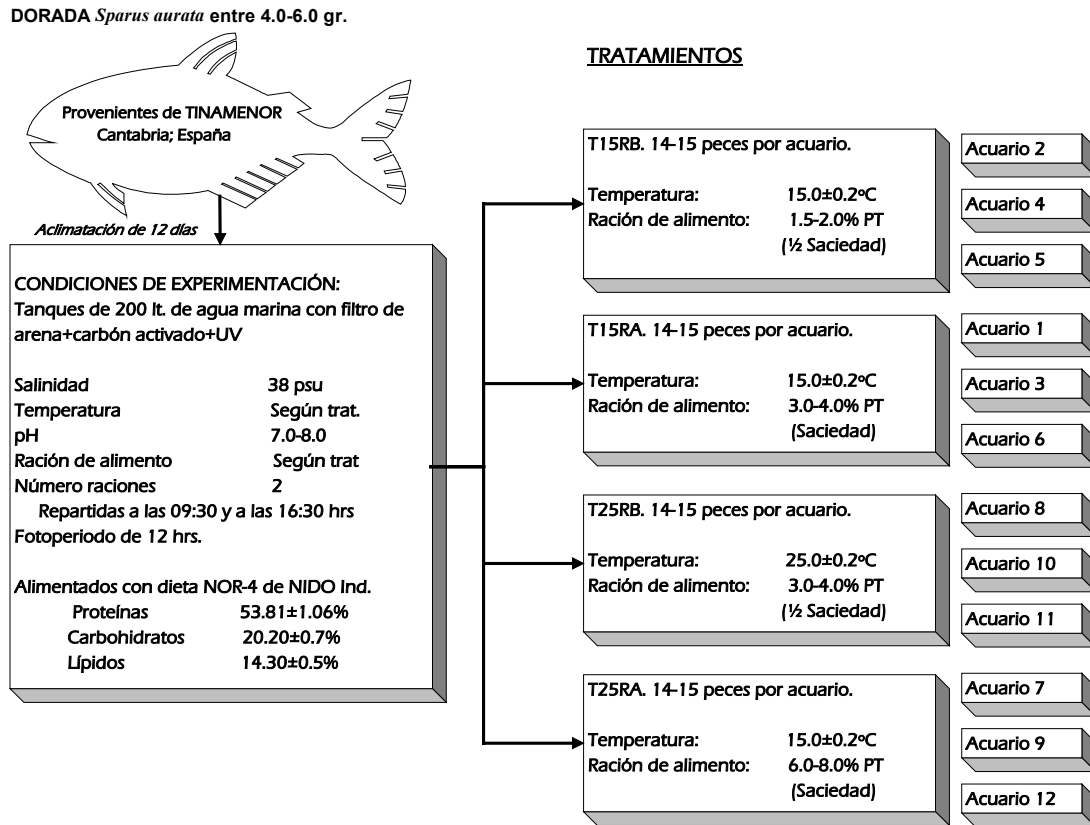
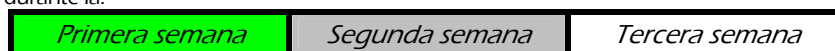


Figura 4-7. Modelo para el experimento E2, mostrando las condiciones de cultivo, los niveles de alimentación (saciedad y ½ saciedad) utilizados para 2 temperaturas (15°C y 25°C). Datos de la composición de la dieta provenientes del análisis de laboratorio.

Tabla IV.VII. Diseño de muestreo para el amonio de los distintos tratamientos y duración de los periodos de incubación.

TRATAMIENTOS →	T15a			T15b			T25a			T25b		
ACUARIOS →	A1	A3	A6	A2	A4	A5	A7	A9	A12	A8	A10	A11
1er Día 08:00-10:00 hrs												
10:00-12:00 hrs												
12:00-14:00 hrs												
2º Día 14:00-16:00 hrs												
16:00-18:00 hrs												
18:00-20:00 hrs												
3º-4º Día 20:00-00:00 hrs												
00:00-04:00 hrs												
04:00-08:00 hrs												

Acuarios muestreados durante la:



4.2.3. Excreción de amonio.

La evolución de las tasas de excreción de amonio durante el día presentó un patrón similar para todos los tratamientos (figura 4-8 y tabla IV.VIII). Las mayores tasas se presentaron durante el día, reduciéndose significativamente por la noche. En algunos casos se presentaron dos picos de excreción de amonio, estando relacionados con la alimentación. El primer pico se presentó aproximadamente 4.5 horas después de la primera alimentación. El segundo pico se presentó solo para los peces alimentados con la ración deficiente (½ saciedad). Durante los periodos nocturnos, las tasas de excreción de amonio fueron más altas de lo esperado, presentándose un pico nocturno significativo de excreción de amonio.

Tabla IV.VIII. Excreción de nitrógeno en forma de amonio (mg N-NH₄⁺/kg pez.hora y total como N-NH₄⁺/kg pez.día) de juveniles de dorada para dos temperaturas y alimentadas con distintos niveles de alimento.

TRATAMIENTOS	15°C		25°C	
	½ Saciedad (1.5% PT)	Saciedad (3.0% PT)	½ Saciedad (3.0% PT)	Saciedad (6.0% PT)
08:00-10:00	7.68±0.28 ^a	18.84±2.94 ^c	11.03±3.64 ^{ab}	15.02±2.24 ^{bc}
10:00-12:00	8.64±3.36 ^a	14.60±0.28 ^b	35.77±2.66 ^c	40.42±4.48 ^c
12:00-14:00	25.06±0.56 ^a	*30.44±11.35 ^{ab}	*43.05±5.32 ^b	*47.96±10.51 ^b
14:00-16:00	*28.79±7.14 ^a	23.65±8.69 ^a	18.52±5.46 ^a	45.62±4.34 ^b
16:00-18:00	13.21±11.07 ^a	24.74±4.90 ^a	35.64±3.22 ^b	38.70±6.72 ^b
18:00-20:00	22.25±9.67 ^{ab}	14.28±9.53 ^a	28.10±3.92 ^b	32.77±9.25 ^b
20:00-00:00	11.42±1.12 ^a	14.32±3.78 ^{ab}	16.64±2.10 ^{bc}	22.70±5.04 ^c
00:00-04:00	*12.61±2.10 ^a	*17.86±0.70 ^b	11.64±2.52 ^a	*30.86±5.60 ^c
04:00-08:00	5.38±1.54 ^b	6.29±6.16 ^{abc}	4.30±0.84 ^a	9.86±0.70 ^c
TOTAL	*328.95±22.28^a	*406.99±34.04^b	*474.52±9.25^c	*694.62±55.90^d

Valores presentados como promedio ± error estándar.

Los tratamientos que no presentan diferencias significativas ($P>0.05$) se representan con letras comunes en cada línea (a, b, c, d).

* La fracción de amonio no ionizado (ANI) correspondiente es del 2.07% del amonio para 15°C, y del 4.28% para 25°C: Tanto los máximos de excreción diurna como la excreción total diaria de amonio han sido marcados con "negritas".

Máximo 15°C (RB y RA, respectivamente): 0.744 y 0.96 mg N-ANI/kg pez.hora. Total: 5.6 y 6.86 mg N-ANI/kg pez.día.

Máximo 25°C (RB y RA, respectivamente): 2.07 y 2.5 mg N-ANI/kg pez.hora. Total: 17.51 y 24.23 mg N-ANI/kg pez.día.

Efecto de la temperatura sobre la excreción de amonio.

El comportamiento de las tasas de excreción diurnas fue característico para cada temperatura de cultivo, siendo más variable en aquellos peces mantenidos a 15°C, la única similitud con los peces mantenidos a 25°C fue que las tasas de excreción altas se presentaron durante el día y las menores durante la noche. Por otro lado, las tasas promedio de excreción fueron significativamente mayores para los peces mantenidos con la temperatura más alta (25°C) comparando cada periodo (ver figura 4-8).

En los peces mantenidos a 25°C, las tasas de excreción se incrementaron de manera importante después de la primera alimentación, alcanzando el primer pico para el periodo de 12:00-14:00 hrs (2.5-4.5 horas postprandial). En el caso de los peces mantenidos a 15°C, la

aparición del primer pico de excreción se retrasó dos horas más (14:00-16:00 hrs; 4.5-6.5 horas postprandial), debido a que el incremento posterior a la alimentación fue más lento que para los peces mantenidos a 25°C.

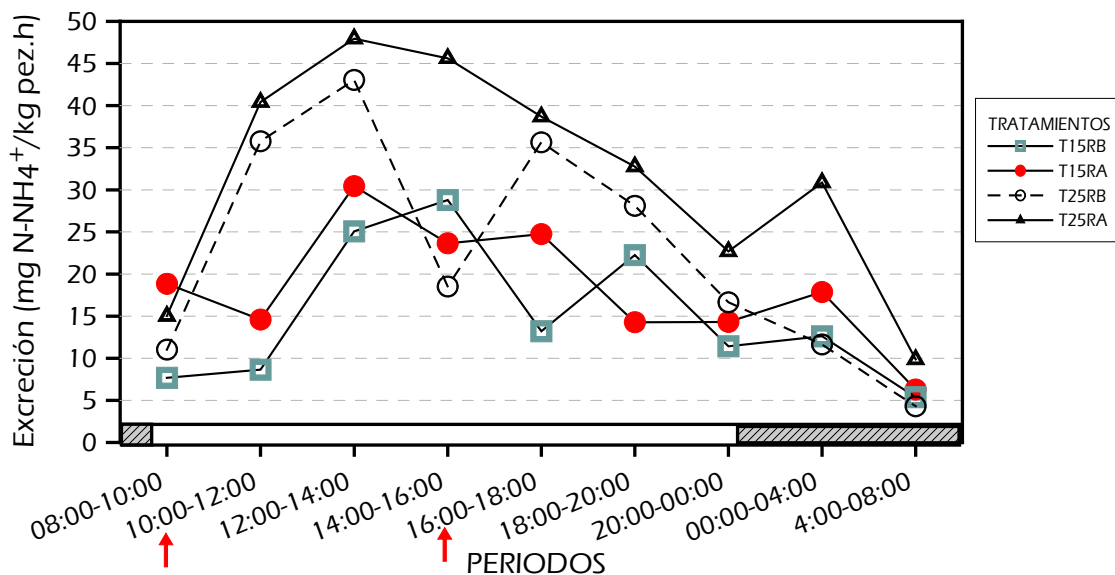


Figura 4-8. Tasas promedio de excreción de amonio por intervalos de tiempo de juveniles de dorada *Sparus aurata* mantenidas bajo dos temperaturas y dos niveles de ración alimenticia. Las flechas indican las horas a las que se les proporcionó el alimento y la franjas inferior del gráfico representan el fotoperíodo.

Como puede observarse en la tabla IV.VIII, el pico máximo que presentaron los peces alimentados a saciedad fue significativamente mayor en aquellos que fueron mantenidos a una temperatura más alta. La tasa máxima de excreción en los peces mantenidos a 15°C significó solo el 54.5% de la observada para los peces mantenidos a 25°C (30.44 contra 47.96 mg N-NH₄⁺/kg pez.hora, respectivamente). Para estos tratamientos la excreción diaria de amonio fue afectada también por la temperatura, siendo un 14.2% más alta para los peces mantenidos a 25°C (474.52 mg N-NH₄⁺/kg pez.día) que para los mantenidos a 15°C (406.99 mg N-NH₄⁺/kg pez.día).

Efecto del nivel de ración sobre la excreción de amonio.

En la figura 4-8 se presentan las tasas de excreción de amonio para peces mantenidos a 15°C y 25°C y, alimentados para cada temperatura, a saciedad y a una ración de alimento deficiente (1/2 saciedad). El efecto del nivel de alimentación sobre la excreción fue significativo durante los periodos de tiempo para ambas temperaturas; es decir, que en general las mayores tasas de excreción de amonio se presentaron en los peces alimentados a saciedad, independientemente de la temperatura. Lo anterior se percibió inclusive en los promedios nocturnos de excreción. Otra característica diferencial entre los tratamientos fue que la excreción de amonio en los peces alimentados a saciedad presentó solo un pico máximo de excreción, mientras que para los peces alimentados a 1/2 saciedad presentó dos picos. En ambos casos los picos de excreción estuvieron relacionados con los periodos de alimentación.

El nivel de alimentación también afectó significativamente la excreción diaria de amonio (ver tabla IV.VIII), siendo mayor para los peces alimentados a saciedad en cada una de las temperaturas probadas. Esta diferencia significó entre 20 y 30%.

El amoniaco (ANI) excretado significó el 2.07% de la excreción total de amonio para los peces mantenidos a una temperatura de 15°C, y el 4.28% para los peces mantenidos a 25°C. De esta manera, observamos máximos entre 0.744-0.96 mg N-ANI/kg pez.hora y entre 2.07-2.25 mg N-ANI/kg pez.hora para 15°C y 25°C, respectivamente (ver tabla IV.VIII). De la misma forma, encontramos que la excreción total diaria se presentó en un rango de 5.6-6.86 mg N-ANI/kg pez.día, para los tratamientos a 15°C; y entre 17.51-24.24 mg N-ANI/kg pez.día, para los tratamientos realizados a 25°C. En todos los casos, los mayores niveles de amoniaco se presentaron para los peces alimentados a saciedad y en los peces mantenidos a la temperatura más alta (25°C).

4.2.4. Balance de nitrógeno y nitrógeno total excretado.

En las tablas IV.IX y IV.X se presentan los resultados del balance de nitrógeno. En general, tuvieron más peso la retención de nitrógeno y el N residual. El nitrógeno fecal y la excreción de amonio fueron fracciones significativamente minoritarias.

Efecto de la temperatura sobre el balance de nitrógeno.

Las doradas alimentadas a saciedad utilizaron mejor las proteínas dietarias para el crecimiento cuando fueron mantenidas a una temperatura mayor (25°C) y presentaron menores porcentajes en la pérdida del nitrógeno a través de las heces y de la excreción de nitrógeno total. La excreción de amonio fue afectada por la temperatura, pero en menor grado que cuando cambia el nivel de alimentación. La fracción de N residual se redujo del 74% del N ingerido para los peces mantenidos a 15°C, al 65% en aquellos mantenidos a 25°C, siempre que fueron alimentadas a saciedad.

En cuanto a las doradas con una alimentación deficiente (alimentadas a ½ saciedad), la temperatura no afectó la retención proteica, significando esta alrededor del 30% del nitrógeno ingerido a través de la dieta (tabla IV.X). Bajo este nivel de alimentación la temperatura tampoco afectó a la excreción total de nitrógeno. Sin embargo, la excreción de amonio fue significativamente menor cuando los peces mantenidos a 25°C, comparado con los peces mantenidos a 15°C. De la misma manera, el contenido de nitrógeno en las heces fue mayor para los peces del primer tratamiento (25°C). En el caso del nitrógeno residual, este representó alrededor del 60% del nitrógeno ingerido, sin presentar efecto alguno por la temperatura de mantenimiento.

Cuando comparamos solo el nivel de alimentación del 3.0% del PT, la temperatura de mantenimiento no presentó efecto sobre la producción de nitrógeno fecal, como se observa en la tabla IV.X. Sin embargo, los peces mantenidos a 25°C, presentaron un significativo incremento en el nivel de retención de nitrógeno para crecimiento, en relación a aquellos mantenidos a 15°C. De los peces alimentados al 3% del PT, aquellos que fueron mantenidos a 25°C utilizaron un 31% del nitrógeno ingerido para crecimiento, mientras que aquellos mantenidos a 15°C utilizaron solo un 16.6% del nitrógeno ingerido para este fin. La temperatura ejerció un efecto sobre el metabolismo de las doradas, incrementándose la excreción diaria de amonio de acuerdo al aumento de la temperatura de 15°C a 25°C.

Como hemos visto, la fracción residual fue la mayoritaria dentro del balance de nitrógeno para todos los tratamientos (figura 4-9), llegando a significar hasta el 74.1% del nitrógeno ingerido.

Efecto del nivel de la ración sobre el balance de nitrógeno.

Las doradas alimentadas a saciedad presentaron una menor utilización de las proteínas dietarias para el crecimiento, con una retención proteica máxima del 27% del nitrógeno ingerido (ver figura 4-9), siendo aún menor en aquellas mantenidas a 15°C (16.5%). Las doradas alimentadas deficientemente (½ saciedad), presentaron una retención proteica de alrededor del 30% del nitrógeno ingerido, independientemente de la temperatura.

En cuanto a la excreción de nitrógeno, los peces alimentados a saciedad excretaron una menor cantidad de amonio, mientras que la excreción total de nitrógeno se incrementó en estos peces, frente a aquellos que fueron alimentados con un nivel deficiente de alimento. La proporción de nitrógeno excretado en forma de amonio, representó entre el 13.45% y el 25.48% del nitrógeno ingerido.

La producción fecal presentó un comportamiento inverso en cada temperatura probada; pues mientras que esta se incrementó cuando los peces fueron alimentados a saciedad para un mantenimiento a 15°C, esta fracción se redujo en el mismo caso para los peces mantenidos a una temperatura de 25°C. Esta fracción representó entre el 6.7-8.2% del nitrógeno ingerido (tabla IV.X).

La fracción residual fue menor cuando los peces fueron alimentados con una ración deficiente, independientemente de la temperatura. Esto representa que la mayor parte del nitrógeno ingerido se pierde por formas distintas a los componentes tomados en cuenta para este balance.

Se puede observar que la mayor proporción de nitrógeno se encuentra en las fracciones de nitrógeno residual y la retención de nitrógeno, seguidas por el amonio excretado, mientras que el nitrógeno fecal constituyó una fracción minoritaria.

Tabla IV.IX. Balance de la utilización del nitrógeno en juveniles de la dorada *Sparus aurata*. Tasas en grs N/kg pez.día.

TRATAMIENTO	N Ingerido	N Asimilado	N Fecal	N Retenido	NT Excretado	AT Excretado	N Residual
T15RB (½ saciedad)	1.291±0.003 ^a	1.205±0.023 ^a	0.0865±0.001 ^a	0.385±0.010 ^a	0.820±0.003 ^a	0.329±0.022 ^a	0.491±0.01 ^a
T15RA (saciedad)	2.577±0.011 ^b	2.366±0.010 ^b	0.211±0.003 ^b	0.427±0.019 ^b	1.939±0.009 ^c	0.407±0.034 ^b	1.532 ±0.08 ^c
T25RB (½ saciedad)	2.581±0.004 ^b	2.369±0.029 ^b	0.212±0.003 ^b	0.780±0.005 ^c	1.589±0.003 ^b	0.474±0.009 ^c	1.115±0.16 ^b
T25RA (saciedad)	5.166±0.001 ^c	4.811±0.026 ^c	0.355±0.026 ^c	1.391 ±0.033 ^d	3.420±0.001 ^d	0.695±0.056 ^d	2.725±0.26 ^d

Los coeficientes que no presentan diferencias significativas entre ellos debido a la temperatura y la ración de alimento, se representan en cada columna con las letras comunes (a, b, c, d) o la ausencia de ellas.

La tasa de alimentación fue de 1.5%, 3.0%, 3.0% y 6.0% del PT, para cada tratamiento, respectivamente.

Tabla IV.X. Balance de la utilización del nitrógeno en juveniles de dorada *Sparus aurata* mantenidos a dos temperaturas y con diferentes niveles de alimentación. Datos referidos en porcentaje del N ingerido.

TRATAMIENTO	N Ingerido	ADC _N ¹	N Fecal	NPU	NT Excretado	AT Excretado	N Residual
T15RB (½ saciedad)	100	93.30±0.10 ^b	6.70±0.07 ^a	29.78±0.70 ^c	63.52±1.31 ^a	25.48±1.7 ^c	38.04±7.7 ^a
T15RA (saciedad)	100	91.80±0.16 ^a	8.20±0.12 ^b	16.59±0.73 ^a	75.21±0.69 ^c	15.79±1.32 ^a	59.42±3.10 ^c
T25RB (½ saciedad)	100	91.80±0.10 ^a	8.20±0.12 ^b	30.99±0.19 ^c	60.81±1.08 ^a	18.36±0.35 ^b	42.45±6.20 ^a
T25RA (saciedad)	100	93.13±0.61 ^b	6.87±0.50 ^a	26.92±0.64 ^b	66.21±0.65 ^b	13.45±1.08 ^a	52.76±5.030 ^b

Los coeficientes que no presentan diferencias significativas entre ellos debido a la temperatura y la ración de alimento, se representan en cada columna con las letras comunes (a, b, c, d) o la ausencia de ellas.

¹ La ADC_N se calculó a partir de las heces obtenidas del intestino posterior de algunos peces (ver sección 3.6.1)

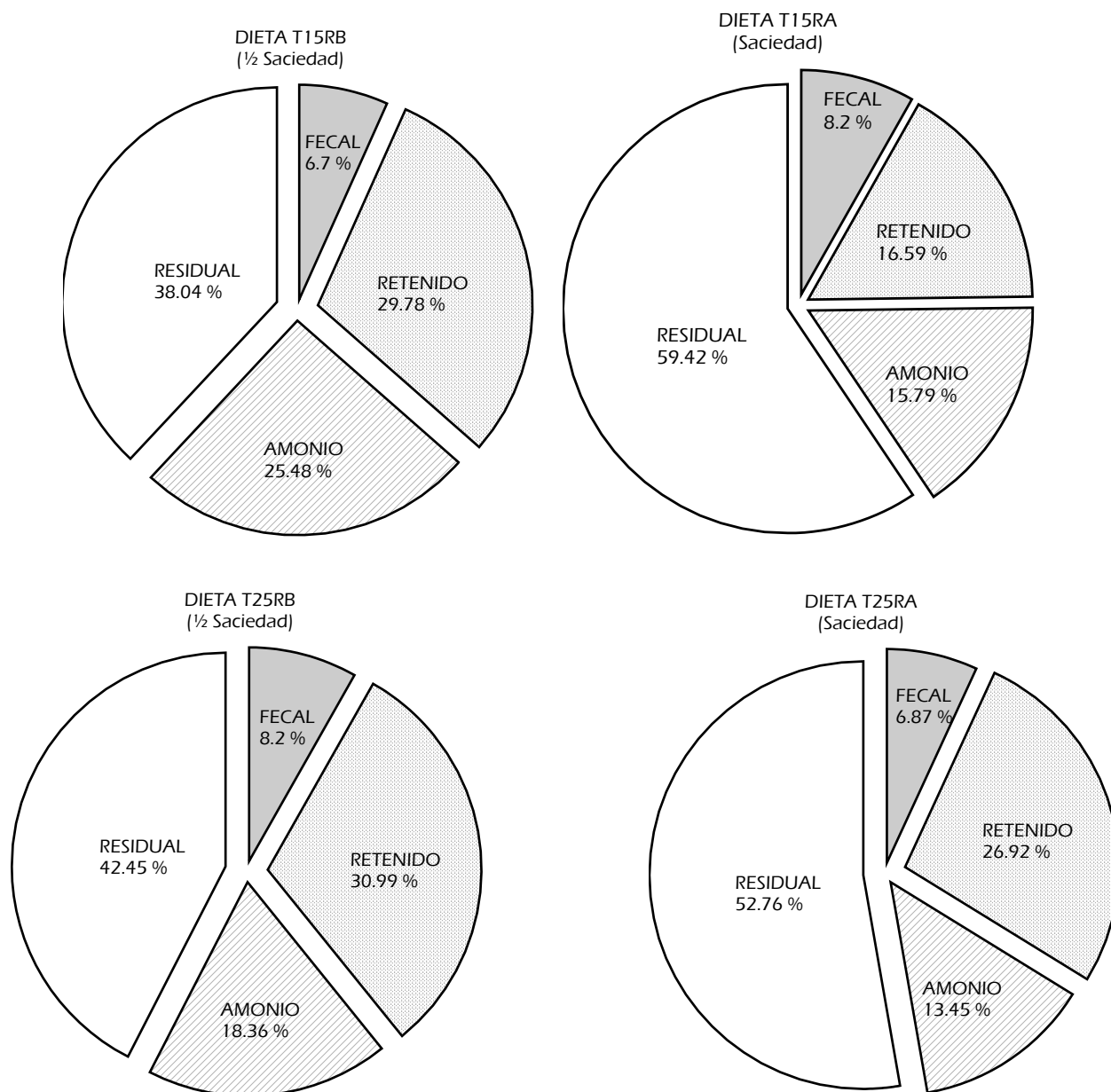


Figura 4-9. Balance de nitrógeno referido al nitrógeno ingerido para doradas mantenidas a dos temperaturas (15°C y 25°C) y alimentadas con distintos niveles de ración.

4.2.5. Utilización de las proteínas y otros parámetros relacionados al crecimiento.

Otros índices de la utilización de las proteínas (PER) y el alimento (FER) han sido utilizados para respaldar el balance de nitrógeno, el comportamiento de estos para cada uno de los tratamientos se presenta en la figura 4-10.

La eficiencia de utilización de las proteínas (PER) fue afectada significativamente por la temperatura de cultivo y el nivel de alimentación, siendo estas mejor utilizadas por los peces mantenidos a 25°C, para ambos niveles de alimentación.

Además, cuando los peces fueron alimentados a saciedad, la eficiencia de utilización de las proteínas se redujo, siendo mejor utilizadas cuando se les alimentó con una ración deficiente, independientemente de la temperatura. La utilización del alimento se comportó de acuerdo a este mismo patrón, siendo significativamente mayor en los peces mantenidos a 25°C y también en aquellos peces que fueron alimentados con una ración deficiente, excepto en los peces mantenidos a 25°C. Para los peces alimentados con la misma ración (3% del PT), no se encontraron diferencias significativas relacionadas con la temperatura de estabulación.

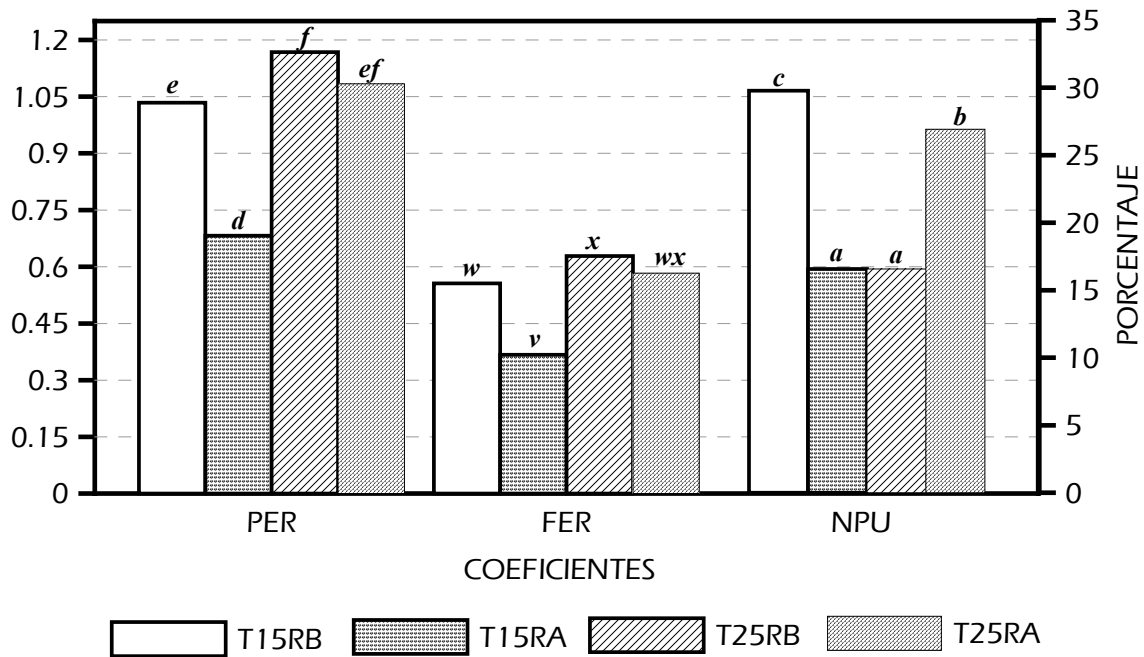


Figura 4-10. Eficiencia de retención de las proteínas (PER), eficiencia de utilización del alimento (FER) y porcentaje de retención proteica (NPU) para juveniles de dorada *Sparus aurata* mantenidas a dos temperaturas y alimentadas con diferentes niveles de ración. Los tratamientos que no presentan diferencia significativa entre ellos se representan con las letras comunes *d, e, f*, para la PER; *v, w, x*, para la FER y *a, b, c*, para la NPU.

4.3. EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ÓXIDO CRÓMICO EN LAS DIETAS.

El presente experimento se realizó para determinar si la inclusión de Cr_2O_3 en las dietas, a distintos niveles, presenta un efecto sobre la excreción de amonio, el balance de nitrógeno y la utilización del alimento y las proteínas para juveniles de la dorada *Sparus aurata*.

4.3.1. Condiciones experimentales.

Se obtuvieron 250 juveniles de dorada *Sparus aurata* en la granja piscícola de AQUADELT, S. A. (San Carles de la Rápita, Tarragona, España), con un peso de 18.79 ± 0.89 grs. Los peces fueron transportados a Barcelona en bidones de plástico con capacidad de 50 l (con agua de mar hasta el 60% de su capacidad volumétrica); al mismo tiempo se les aprovisionó de continua oxigenación con un tanque de oxígeno comprimido y, en caso de emergencia, con compresores de aire con baterías. La densidad durante el transporte fue de 10-20 peces por bidón.

En la figura 4-11 se describe el modelo experimental. Al llegar a las instalaciones, los peces se distribuyeron al azar en 12 acuarios de 260 litros de capacidad con una densidad aproximada de 22 peces por acuario. Los acuarios se mantuvieron en cámaras isotérmicas a una temperatura de $21 \pm 0.2^\circ\text{C}$ y un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, quedando los peces por un periodo de aclimatación de 14 días.

Los acuarios réplica de los tratamientos se distribuyeron de forma aleatoria en ambas cámaras. La oxigenación, el sistema de flujo de agua y sistema de filtrado se controlaron de la misma manera que en los experimentos precedentes (figura 3-1). Se trabajó con agua de mar natural de una salinidad de 38 psu.

Los peces fueron alimentados diariamente (entre las 09:30-10:00 hrs) a un nivel de alimentación de 2% del PT, con una dieta cuya composición nutricional fue de 50% de proteínas, 25% de carbohidratos y 10% de lípidos. Esta dieta tuvo un valor energético aproximado de 485 kcal/gr de peso seco (detalles de la composición en tabla III.I). A la dieta se le agregó un nivel variable de Cr_2O_3 , y la diferencia fue sustituida por una cantidad equivalente de almidón. Los niveles de inclusión de Cr_2O_3 en el alimento fueron de 0, 5, 10 y 20 gr/kg, por lo que las dietas fueron denominadas como D0, D5, D10 y D20, respectivamente. Durante el experimento los peces fueron pesados cada 11 días para ajustar la ración de alimento.

4.3.2. Diseño de muestreo.

Una vez que los peces estuvieron adaptados al medio de cultivo, se llevaron a cabo las incubaciones de amonio, que se efectuaron según se detalla en la tabla IV.XI. Un día antes del muestreo los acuarios fueron limpiados y puestos a un nivel de 200 litros, la alimentación fue interrumpida, aunque durante el día de muestreo las doradas fueron alimentadas con normalidad.

Con el objetivo de describir con mayor precisión el comportamiento de la excreción de amonio durante el día, se realizaron incubaciones por periodos de 1 hora de duración entre las 09:00 hrs y las 20:00 hrs; y por otro lado, la noche fue tomada como un solo periodo

(20:00 hrs día 1-09:00 hrs día 2). El muestreo se desarrolló a lo largo de 12 días, los cuales se distribuyeron en tres semanas, de la forma en que se explica a continuación:

El primer día se tomaron muestras cada hora para uno de los acuarios en cada tratamiento; entre las 09:00 hrs y las 14:00 hrs. En el segundo día se tomaron muestras cada hora entre las 14:00 y las 20:00 hrs para los mismos acuarios; y el tercer día se muestreó a las 20:00 hrs y a las 10:00 hrs del día siguiente como un solo periodo de tiempo, también para los mismos acuarios.

Este procedimiento se repitió la siguiente semana para otra de las réplicas de cada tratamiento y la réplica restante se muestreó en una tercera semana de la misma manera.

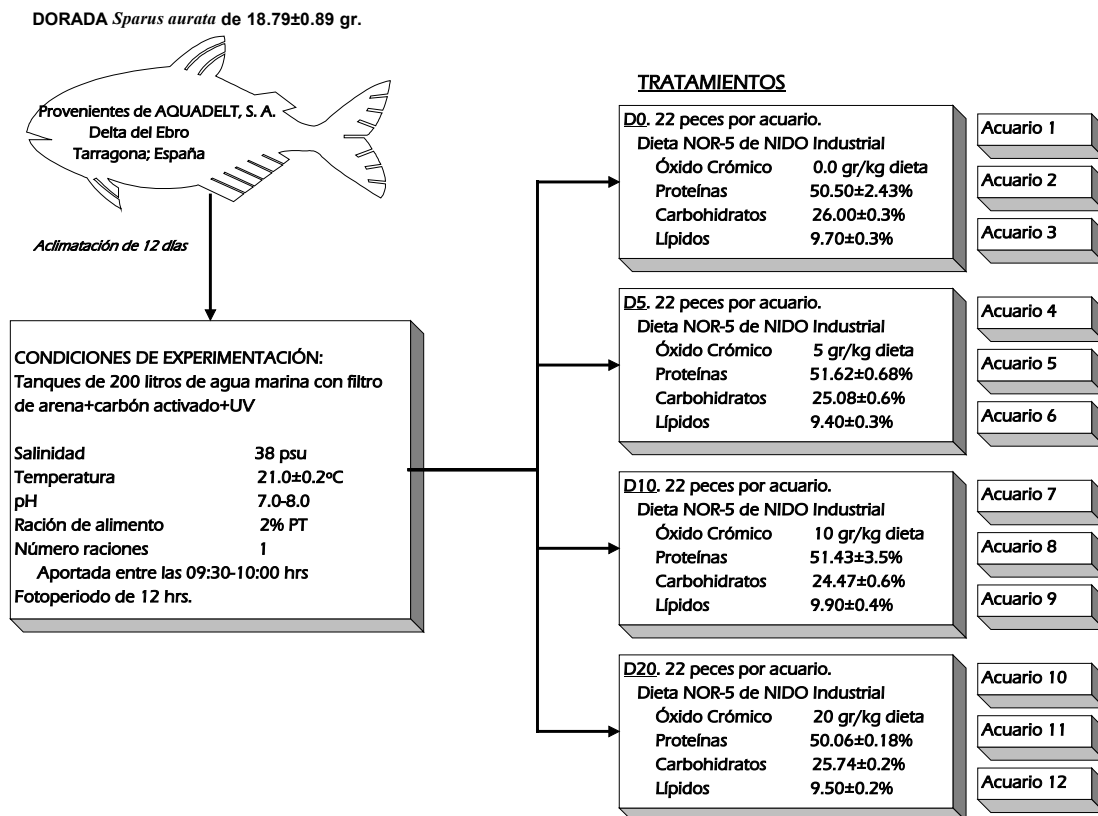


Figura 4-11. Modelo para el experimento E3, mostrando las condiciones de cultivo y los distintos niveles de Cr₂O₃ en las dietas valoradas. Los datos de composición para las dietas que se presentan provienen de los análisis realizados por nuestro equipo de trabajo.

Tabla IV.XI. Toma de muestras de amonio para los distintos tratamientos.

TRATAMIENTOS →	D0			D5			D10			D20		
ACUARIOS →	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1er Día 09:00-10:00 hrs												
10:00-11:00 hrs												
11:00-12:00 hrs												
12:00-13:00 hrs												
13:00-14:00 hrs												
2º Día 14:00-15:00 hrs												
15:00-16:00 hrs												
16:00-17:00 hrs												
17:00-18:00 hrs												
18:00-19:00 hrs												
19:00-20:00 hrs												
3º-4º Día 20:00-10:00												

Acuarios muestreados durante la:



4.3.3. Excreción de amonio.

Los datos de la excreción de nitrógeno en forma de amonio (AT) de las doradas alimentadas con diferentes niveles de Cr_2O_3 en la dieta, se presentan en la tabla IV.XII y la figura 4-12. El comportamiento de la tasa de excreción de amonio presentó durante el día el mismo patrón que ya hemos descrito para los experimentos anteriores, con un incremento postprandial hasta alcanzar el primer máximo A_{max} hacia el periodo entre las 14:00-16:00 hrs. A partir de este momento, las tasas de excreción se redujeron de manera continua en los siguientes periodos de medición, hasta incrementarse de nuevo y alcanzar un segundo pico en el periodo 19:00-20:00 hrs. Este segundo pico fue mucho más pequeño que el primero, significando esta reducción de entre un 10-31%, dependiendo del tratamiento. Después del segundo pico, la excreción se redujo durante la noche hasta alcanzar los niveles base de excreción presentes en el periodo previo a la alimentación en el día anterior.

El primer pico A_{max} se presentó para las doradas alimentadas con la dieta sin cromo durante el periodo 14:00-15:00 hrs (4.5-5.5 horas después de la alimentación) y entre las 15:00-16:00 hrs (4.5-6.5 horas postprandial) para los peces alimentados con cromo en las dietas.

Los peces alimentados con la dieta sin cromo presentan un pico de máxima excreción mas alto que el de los peces alimentados con las dietas que contenían cromo. Sin embargo, la diferencia solo fue significativa entre la dieta sin cromo y la dieta con 1% de cromo (D10).

Se pudo observar un efecto de la inclusión de Cr_2O_3 en el alimento sobre las tasas de excreción de amonio por día, siendo menor la excreción de amonio para los peces alimentados con las dietas que contenían cromo, aunque no se encontraron diferencias significativas entre estas.

Tabla IV.XII. Excreción promedio de nitrógeno en forma de amonio (en mg N-NH₄⁺/kg pez.hora y total como mg N-NH₄⁺/kg pez.día) para cada una de las dietas con distinto contenido de Cr₂O₃ (0, 5, 10 y 20 gr/kg alimento).

TRATAMIENTOS	D0	D5	D10	D20
PERIODOS				
09:30-10:00	11.84±3.78 ^a	10.21±3.03 ^{ab}	15.48±0.59 ^a	11.24±2.01 ^{ab}
10:00-11:00	9.36±1.01 ^{ab}	8.77±2.08 ^{ab}	10.31±0.5 ^a	7.40±1.15 ^{ab}
11:00-12:00	24.88±2.65 ^a	18.51±1.15 ^b	19.09±0.89 ^b	21.82±2.16 ^{ab}
12:00-13:00	25.12±2.76 ^a	26.11±1.25 ^a	23.96±1.25 ^a	25.52±1.22 ^a
13:00-14:00	36.15±2.43 ^a	26.50±1.30 ^b	27.67±3.0 ^b	30.59±3.18 ^{ab}
14:00-15:00	*37.99±2.90^a	32.15±4.37 ^{ab}	*33.51±1.16^b	*35.50±1.30^{ab}
15:00-16:00	34.29±2.33 ^a	*33.90±3.20^a	32.73±2.21 ^a	30.78±2.13 ^a
16:00-17:00	35.46±2.21 ^a	31.86±2.38 ^{ab}	30.63±1.63 ^b	32.85±2.07 ^{ab}
17:00-18:00	23.96±1.22 ^a	21.24±2.66 ^a	23.01±1.51 ^a	22.02±1.14 ^a
18:00-19:00	28.25±2.15	20.26±3.0 ^a	20.48±1.30 ^a	19.91±1.09 ^a
19:00-20:00	*31.56±5.97^a	*23.38±4.32^a	*28.80±5.50^a	*31.79±5.97^a
20:00-10:00	15.12±2.91 ^a	9.38±2.14 ^b	9.94±0.98 ^b	10.58±2.35 ^{ab}
TOTAL	*510.51±28.4^a	*384.29±19.3^b	*404.80±11.6^b	*416.81±17.7^b

Los valores de la excreción total que no presentan efectos significativos ($P>0.05$) debidos al nivel de cromo en la dieta, se representan con letras comunes (a, b, c, d) por línea. Los valores presentados como promedio de los datos ± error estándar.

* La fracción de amoníaco (ANI) correspondiente es del 3.21% del amonio: Las máximas tasas de excreción diaria y la excreción total diaria de amonio han sido marcados con "negritas".

Máximo (de D0 a D20): 1.313, 1.191, 1.122 y 1.212 mg N-ANI/kg pez.hora. Total: 16.38, 12.33, 12.99 y 13.38 mg N-ANI/kg pez.día.

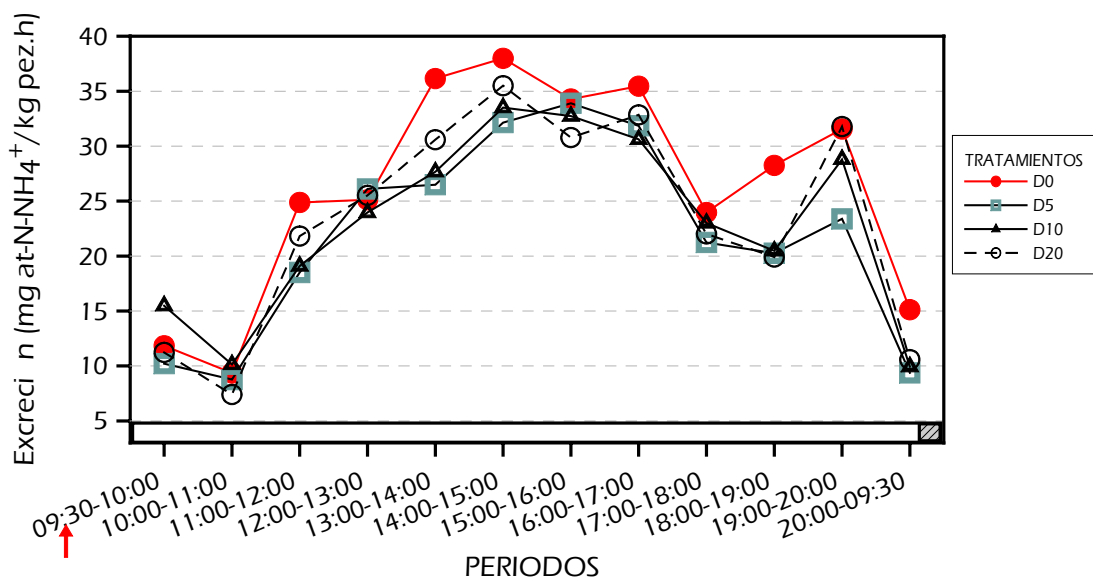


Figura 4-12. Tasas promedio de excreción de amonio por intervalo de tiempo (mg N-NH₄⁺/kg pez.hora) para cada nivel de cromo en las dietas. La flecha indica la hora de alimentación y la franjas inferior del gráfico representan el fotoperiodo.

El amoníaco (ANI) se comportó de la misma forma que la excreción de amonio. El amoníaco significó el 3.21% del amonio excretado, encontrando los mayores picos de excreción de amoníaco para los peces alimentados con la dieta sin cromo (1.313 mg N-ANI/kg pez.hora), y reduciéndose de acuerdo con la disminución del nivel de Cr_2O_3 en las dietas aportadas (2.0%=1.212, 1.0%=1.122, y 0.5%=1.191 mg N-ANI/kg pez.hora). La producción diaria de ANI presentó el mismo patrón que los picos de excreción de amonio (BLANCO>D20>D10>D10).

4.3.4. Balance de nitrógeno y nitrógeno total excretado.

En las tablas IV.XIII y IV.XIV, y figura 4-13 representamos la utilización del nitrógeno ingerido por los peces de los distintos tratamientos. Los principales destinos del nitrógeno fueron la excreción en forma de amonio (23.1-31.5%) y la retención con fines de crecimiento (25.6-30.2%). La proporción de N fecal tuvo menor peso (7.7-10.3%) y la fracción de nitrógeno perdido por otras vías (nitrógeno residual) representó entre el 28.6-37.4% del nitrógeno ingerido. La inclusión de Cr_2O_3 en el alimento redujo significativamente la excreción de amonio en comparación a la excreción que presentaron los peces alimentados con la dieta sin cromo. En los peces alimentados con las dietas con cromo, la excreción de amonio se incrementó conforme el nivel de cromo en la dieta aumentó.

Por otro lado, la producción de nitrógeno fecal y la retención de nitrógeno fueron afectados significativamente solo en los peces alimentados con la dieta que contenía el nivel más bajo de Cr_2O_3 (0.5%).

4.3.5. Utilización de las proteínas y otros parámetros relacionados al crecimiento.

Los índices para valorar la eficiencia de utilización de las proteínas (NPU y PER) y del alimento (FER) presentaron un patrón similar que está relacionado al nivel de inclusión de Cr_2O_3 en las dietas utilizadas en los distintos tratamientos (ver figura 4-14). Los peces alimentados con la dieta de menor contenido de cromo (0.5%) presentaron menores niveles de utilización de las proteínas y utilización del alimento con respecto al BLANCO y el resto de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas para los índices entre los peces alimentados con la dieta BLANCO y las dietas con mayor contenido de cromo (1.0% y 2.0%).

Tabla IV.XIII. Balance de la utilización del nitrógeno para juveniles de dorada *Sparus aurata* alimentados con dietas de distinto nivel de Cr₂O₃. Tasas en grs N/kg pez.día.

TRATAMIENTO	N Ingerido	N Asimilado	N Fecal	N Retenido	NT Excretado	AT Excretado	N Residual
D0	1.61±0.011 ^a	1.455±0.010 ^a	0.167±0.011 ^b	0.479±0.013 ^b	0.976±0.018 ^{ab}	0.5105±0.028 ^c	0.465±0.026 ^a
D5	1.66±0.010 ^a	1.532±0.021 ^c	0.128±0.013 ^a	0.424±0.019 ^a	1.108±0.021 ^c	0.3843±0.019 ^a	0.724 ±0.023 ^d
D10	1.64±0.014 ^a	1.487±0.019 ^b	0.152±0.011 ^{ab}	0.470±0.015 ^b	1.017±0.012 ^b	0.4048±0.012 ^b	0.612±0.016 ^c
D20	1.62±0.013 ^a	1.464±0.023 ^b	0.136±0.013 ^a	0.484 ±0.011 ^b	0.980±0.012 ^a	0.4168±0.018 ^{ab}	0.563±0.022 ^b

Los coeficientes que no presentan diferencias significativas entre ellos debido al nivel de Cr₂O₃ en las dietas, se representan en cada columna con las letras comunes (a, b, c, d). Los peces fueron alimentados a una ración del 2% del PT.

Tabla IV.XIV. Balance de la utilización del nitrógeno para juveniles de dorada *Sparus aurata* alimentados con dietas de distinto nivel de Cr₂O₃. Datos referidos en porcentaje del N ingerido.

TRATAMIENTO	N Ingerido	ADC _N ¹	N Fecal	NPU	NT Excretado	AT Excretado	N Residual
D0	100	89.70±0.90 ^a	10.30±0.46 ^c	29.59±0.19 ^c	60.11±0.40 ^b	31.51±1.74 ^c	28.60±0.37 ^a
D5	100	92.30±0.40 ^c	7.70±0.28 ^a	25.56±0.54 ^a	66.74±0.76 ^d	23.15±1.14 ^a	43.59±0.18 ^d
D10	100	90.70±0.70 ^{ab}	9.30±0.36 ^b	28.66±0.75 ^b	62.04±0.32 ^c	24.69±0.73 ^{ab}	37.35±0.11 ^c
D20	100	91.50±0.70 ^{bc}	8.50±0.38 ^b	30.25±0.86 ^{bc}	61.25±0.22 ^a	26.35±1.11 ^b	34.90±0.12 ^b

Los coeficientes que no presentan diferencias significativas entre ellos debido al nivel de Cr₂O₃ en las dietas, se representan en cada columna con las letras comunes (a, b, c, d). Los peces fueron alimentados a una ración del 2% del PT.

¹ La ADC_N se calculó a partir de las heces obtenidas del intestino posterior de algunos peces (ver sección 3.6.1)

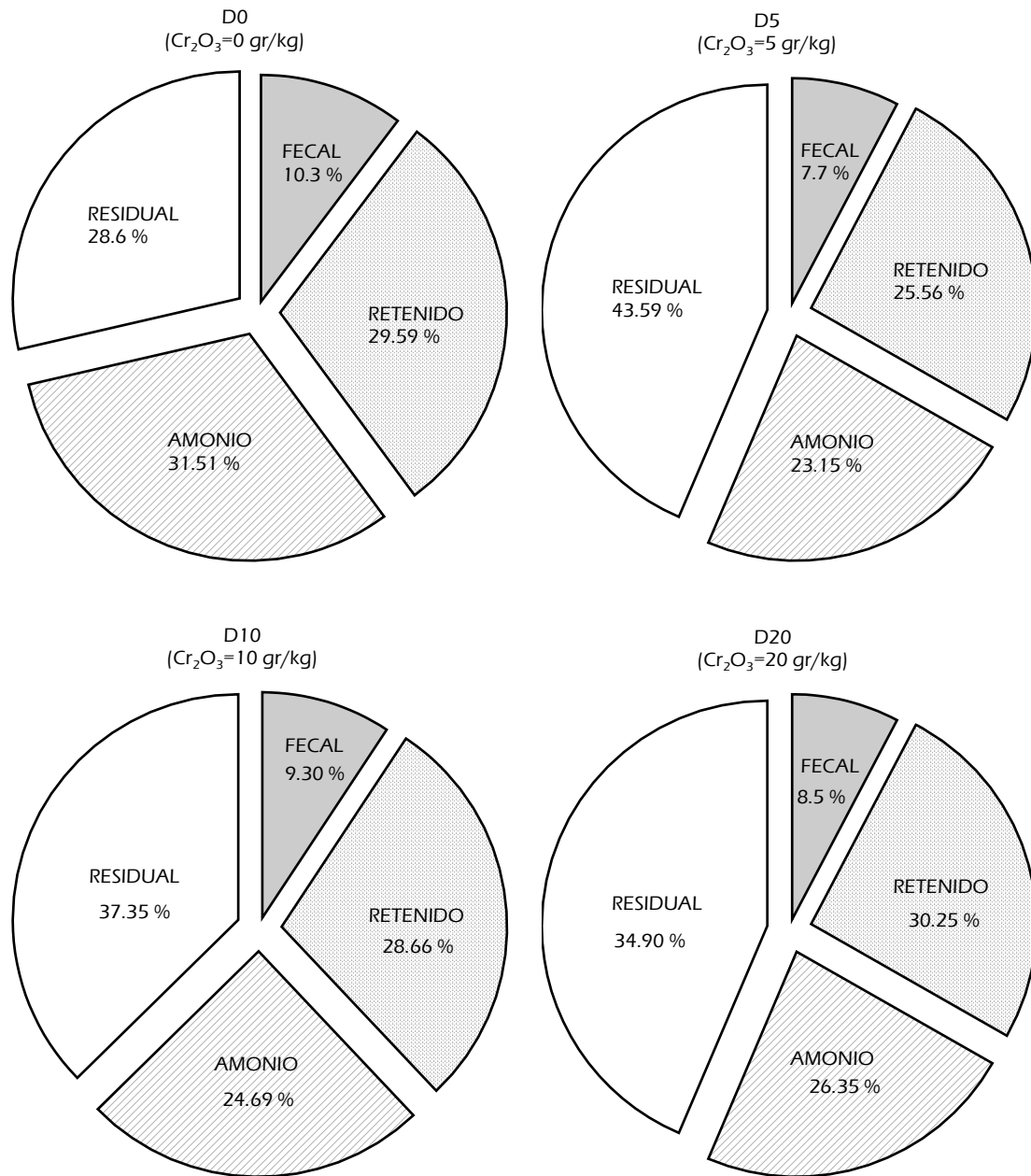


Figura 4-13. Balance de nitrógeno referido al nitrógeno ingerido para doradas alimentadas con distintos niveles de Cr₂O₃ en las dietas.

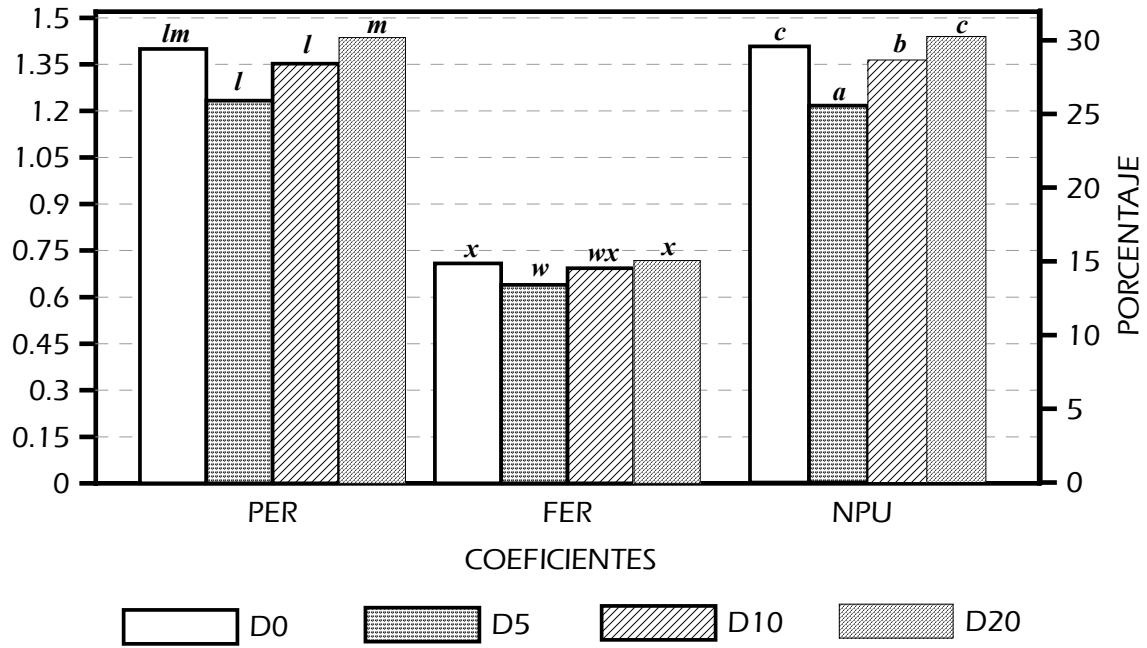


Figura 4-14. Eficiencia de utilización de las proteínas (PER), eficiencia de utilización del alimento (FER) y porcentaje de retención proteica (NPU) para juveniles de dorada *Sparus aurata* alimentadas con diferentes niveles de Cr_2O_3 en la dieta. Los tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos se representan con las letras comunes *l, m*, para la PER; *w, x*, para la FER; y *a, b, c*, para la NPU.

4.4. EXCRECIÓN DE NITRÓGENO NO AMONICAL.

En base a que la fracción de nitrógeno no explicada (nitrógeno residual) fue significativa dentro del balance de nitrógeno en los experimentos previos (E1 y E2), se realizó este experimento. Por lo anterior, el objetivo principal para este experimento fue incluir el análisis de otras formas nitrogenadas distintas a las medidas para los anteriores experimentos (tabla IV.XVII), los cuales comúnmente no se indican en los trabajos publicados, a excepción de la urea. La única forma proveniente de la excreción es la urea; las demás fracciones de nitrógeno corresponden a restos de alimento no ingerido (N particulado), las heces (N fecal, N particulado y aminoácidos libres) y otras formas disueltas (NO_3 y NO_2) que probablemente derivan de la oxidación del amonio excretado, aunque también pueden provenir de las heces o restos del alimento que no fue ingerido. El objetivo fue determinar si estas otras formas de nitrógeno pueden responder a la fracción de nitrógeno residual y, de ser así, que porcentaje significan cada una de estos componentes dentro del balance.

4.4.1. Condiciones experimentales.

Se adquirieron aproximadamente 60 juveniles de dorada *Sparus aurata* de 100-130 grs en de la granja AQUADELT, S. A. (San Carles de la Rápita, Tarragona, España); el transporte se realizó bajo las mismas condiciones descritas para los juveniles del experimento E3. Al llegar a Barcelona, los peces se distribuyeron en 6 acuarios de 260 litros de capacidad (figura 4-15), con agua de mar natural a una salinidad de 38 psu. Los acuarios se mantuvieron dentro de una cámara isotérmica a una temperatura de $16 \pm 0.2^\circ\text{C}$ y con un ciclo de luz-oscuridad de 9:15 horas. Los peces quedaron bajo estas condiciones por un periodo de 20 días para aclimatación. La densidad de organismos fue de 8-9 peces por acuario con un peso inicial de 134.13 ± 6.1 grs. El sistema de bombeo y filtrado de agua se describió en el apartado 3.2.2 (ver figura 3-1).

El modelo experimental se representa en la figura 4-15, utilizando 6 réplicas. En este experimento se utilizó la dieta comercial denominada DIBAO Extruded, con un contenido proteico aproximado del 47% y un 17% de grasa (ver tabla III.II para detalles de composición). Se aportó una ración de alimento equivalente al 1% del PT, la cual se administró cada día entre las 09:30-10:00 hrs.

4.4.2. Diseño de muestreo.

Como solo necesitamos conocer los valores por día de las distintas fracciones de nitrógeno medidas, los periodos de incubación diurnos se realizaron con una duración de 4 horas (ver tabla IV.XV) y se tomaron las horas nocturnas como un solo periodo, entre las 20:00-08:00 hrs (duración de 12 horas). Un día antes del muestreo se interrumpió la alimentación, pero el día de muestreo se alimentó a las doradas con normalidad. Los acuarios se limpiaron y nivelaron a 200 litros. El muestreo de los acuarios se realizó en 5 días, de la forma que se explica a continuación:

Todos los acuarios fueron muestreados simultáneamente para cada intervalo de tiempo, al principio y al final del periodo.

El primer día se tomaron las muestras para el periodo comprendido entre las 08:00 y las 12:00 hrs. El segundo día se tomaron muestras para el

periodo entre las 12:00-16:00. El tercer día se tomaron las muestras para el periodo entre las 16:00-20:00 hrs; y finalmente el cuarto día se tomaron las muestras nocturnas, entre las 20:00-08:00 hrs del día siguiente. Cada una de las muestras fue separada en diferentes partes para análisis de las distintas fracciones de nitrógeno, el tratamiento de la muestra para cada forma de nitrógeno se describió en los apartados 3.2.3 y 3.3.

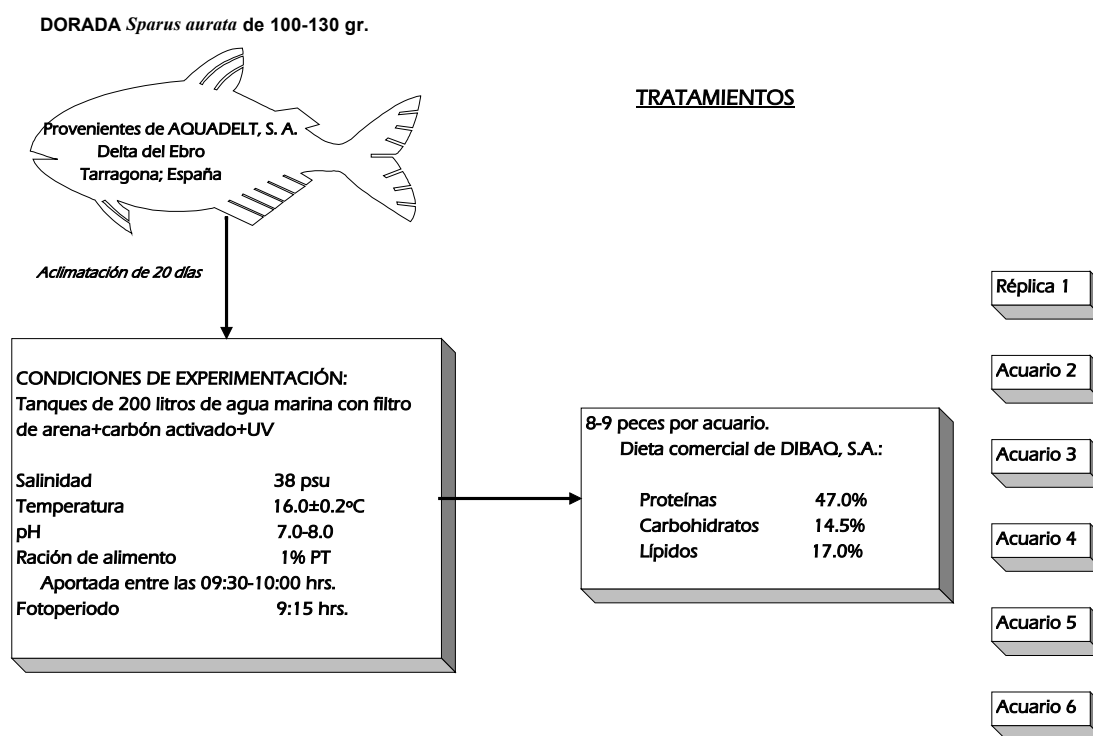


Figura 4-15. Modelo para el experimento *E4*, mostrando las condiciones de cultivo y características de la dieta aportada (datos del fabricante).

Tabla IV.XV. Toma de muestras para los distintos tratamientos en el experimento *E4*.

TRATAMIENTO →	BALANCE DE NITRÓGENO					
ACUARIOS →	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1er Día 08:00-12:00 hrs						
2º Día 12:00-16:00 hrs						
3er Día 16:00-20:00 hrs						
4º-5º Día 20:00-08:00 hrs						

4.4.3. Diferentes formas de nitrógeno.

Excreción de amonio y urea.

Las tasas de excreción de amonio (AT) y urea presentaron un comportamiento similar durante el día (figura 4-16). A partir del momento en el que los peces fueron alimentados (09:30-10:00 hrs), se incrementaron los niveles de excreción, alcanzando el pico máximo A_{max} de una manera escalonada. De esta manera, la tasa de excreción de amonio alcanzó primero el A_{max} durante el periodo 12:00-16:00 hrs, y la tasa de excreción de urea alcanzó el máximo durante el periodo 16:00-20:00 hrs; entre 2.5 y 6.5 horas después de la alimentación en el caso del amonio y entre 6.5 y 10.5 horas postprandial en el caso de la urea. La excreción de estos dos compuestos fue significativamente menor durante el periodo nocturno que en los periodos diurnos. Las máximas tasas de excreción que presentaron fueron de 8.79 mg N-NH₄⁺/kg pez.hora y 1.536 mg N-urea/kg pez.hora.

Por otra parte, el nitrógeno excretado al día por estas vías fue de 116.28 mg N-NH₄⁺/kg pez.día y de 16.72 mg N-urea/kg pez.día, significando la urea un 12.6% de la excreción total de nitrógeno y el amonio un 87.4%.

Por otro lado, la fracción de amonio no ionizado (amoníaco) significó el 2.23% del amonio total. De esta manera encontramos que la tasa máxima de excreción de amoniaco fue de 0.196 mg N-ANI/kg pez.hora, y la producción diaria de 2.59 mg N-ANI/kg pez.día (tabla IV.XVI).

Nitratos y nitritos (NO₃ y NO₂).

El nitrógeno disuelto en forma de nitratos presentó los valores máximos durante el día (5.39 mg N-NO₃/kg pez.hora), mientras que los nitritos presentaron el pico máximo durante el periodo nocturno (0.054 mg N-NO₂/kg pez.hora). La producción diaria de ambas formas de nitrógeno disuelto fue de 66.59 mg N-NO₃/kg pez.día para los NO₃, mientras que para los NO₂ fue solo del 0.89 mg N-NO₂/kg pez.día (ver tabla IV.XVI).

Aminoácidos libres (AA).

La variación diurna de los aminoácidos libres describió un pico máximo de 20.36 mg N-AA/kg pez.hora hacia el periodo de 16:00-20:00 hrs (entre 8.5-12.5 horas postprandial, ver tabla IV.XVI). Durante la noche se alcanzaron los valores más bajos de AA. La producción diaria de esta fracción fue mayor que el nitrógeno excretado en forma de amonio, siendo de 156.48 mg N-AA/kg pez.día. En cuanto al nitrógeno fecal, la producción diaria de este componente fue de 111.3 mg N_{fecal}/kg pez.día.

Nitrógeno particulado.

La fracción de nitrógeno particulado proviene de la combinación de los restos de alimento no ingerido y restos de heces. Esta fracción de nitrógeno presentó un patrón diurno como el resto de los componentes, alcanzando un pico para el periodo entre las 12:00-16:00 hrs (entre 2.5-6.5 horas postprandial). La producción diaria de nitrógeno particulado fue de 276.66 mg N_{particulado}/kg pez.día y representó el 14.8% del nitrógeno ingerido (tabla IV.XVII).

Tabla IV.XVI. Nitrógeno medido en los acuarios en mg N/kg pez.hora.

PERIODO	Nitrógeno Medido en el Agua de Acuarios				
	AMONIO	UREA	NO ₃ + NO ₂	AMINOÁCIDOS	N PARTICULADO
08:00-12:00	4.65±1.25 ^{ab}	0.62±0.15 ^b	5.29±0.43 ^c	3.30±0.56 ^b	0.0±0.0 ^a
12:00-16:00	*8.79±0.62 ^c	1.06±0.19 ^c	5.40±1.33 ^c	9.24±1.2 ^c	27.80±2.8 ^d
16:00-20:00	5.46±0.53 ^b	1.54±0.13 ^d	0.36±0.12 ^a	20.63±3.6 ^d	22.42±1.6 ^c
20:00-08:00	3.39±0.33 ^a	0.32±0.10 ^a	1.96±0.34 ^b	1.93±0.44 ^a	6.314±0.8 ^b
TOTAL mg N/kg pez/día	*116.28	16.72	67.48	156.48	276.662

Experimento realizado con juveniles de doradas de 134.13 ± 6.1 grs de peso inicial durante 31 días.

* La fracción de amonio no ionizado (ANI) correspondiente es del 2.23% del amonio: Máximo 0.196 mg N-ANI/kg pez.hora, Total 2.59 mg N-ANI/kg pez.día.

Tabla IV.XVII. Balance de la utilización del nitrógeno en juveniles de dorada *Sparus aurata* alimentados con la dieta DIBAQ Extruded.

Fraciones de N ⇒	Ingerido	Fecal ¹	Retenido	AMONIO◀	UREA◀	NO ₃ +NO ₂	AA ²	Diferencia
(grs N/kg pez.día) ⇒	752±27	111.3±4.0	275.4±21	116.3±4.0	16.7±3.0	67.48±5.02	156.5±4.0	8.32±2.5
(Porcentaje) ⇒	100	14.80±0.005	36.62±0.28	15.46±0.05	2.22±0.11	8.97±0.19	20.81±0.05	1.11±0.03
			100	42.29±0.014	6.06±0.011			51.71±0.009

◀AT+N-UREA= 133 mg N/9 días, por tanto, 87.4% corresponden al amonio y 12.6% a la urea.

Estas fracciones provienen de: ¹ los restos de heces en el acuario y, ² tanto del alimento no ingerido como de los restos de heces.

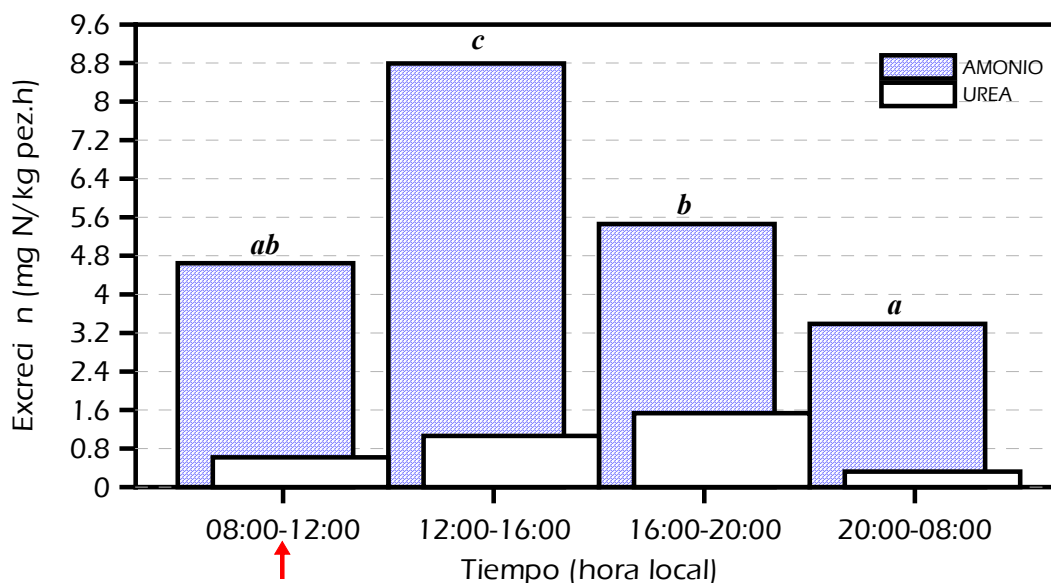


Figura 4-16. Tasa de excreción de amonio y urea. La flecha indica el momento de la alimentación (09:00-09:30 hrs).

4.4.4. Balance de nitrógeno y nitrógeno total excretado.

En el balance de nitrógeno (tabla IV.XVII y figura 4-17) se presentan el N retenido, el N excretado (amonio y urea), el N particulado (nitrógeno fecal y aminoácidos) y otras formas disueltas ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2$).

Como puede observarse, la fracción más importante del balance de nitrógeno fue representada por el nitrógeno retenido, lo cual se tradujo en una eficiencia de retención proteica del 36.24%. Otras fracciones de importancia correspondieron al nitrógeno en forma de aminoácidos libres y péptidos (20.59%), el N excretado (amonio+urea=17.5%) y el N fecal (14.65%). Las fracciones minoritarias del balance fueron las formas disueltas de urea y $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$, significando en conjunto alrededor del 11% del N ingerido.

Tomando en cuenta los componentes nitrogenados medidos, la fracción de nitrógeno residual (aquel que no fue recuperados en las muestras analizadas) fue mínimo, significando solo el 1.11% del N ingerido.

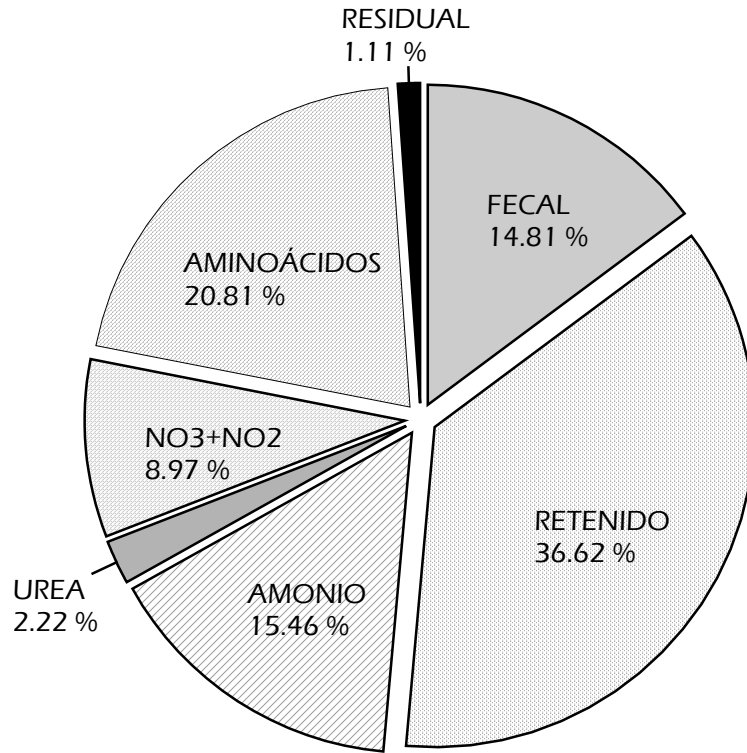


Figura 4-17. Balance de nitrógeno para juveniles de la dorada *Sparus aurata* alimentados con la dieta DIBAQ.