

Capítulo 5:

Discusiones

5.1. EXCRECIÓN DE AMONIO

Cuando nos referimos a especies cultivadas en granjas piscícolas, algunos autores dicen que el comportamiento de los niveles diarios de excreción de amonio se encuentra fuertemente influido por la alimentación (Muir, 1982; en Kelly *et al.*, 1994) y que estacionalmente se relacionan a otros aspectos del medio y/o estado en el desarrollo del pez, tales como la temperatura del agua, longitud del día y crecimiento del pez (Fivelstad *et al.*, 1990); el control de los aspectos anteriores es muy importante debido a la propiedad acumulativa del amonio excretado (Ramnarine *et al.*, 1987), factor que afecta el óptimo desarrollo de los peces. Desde los estudios realizados por Brett y Zala (1975) se ha observado que el pico de máxima excreción durante el día está relacionado a la alimentación del pez, aunque otros autores encuentran que algunos de los máximos que se presentan durante el día, están relacionados a la duración del fotoperiodo (Rychly y Marina, 1977; en Porter *et al.*, 1987), y la frecuencia de alimentación (Ramnarine *et al.*, 1987).

5.1.1. Patrón nictimeral de la excreción de amonio.

El presente trabajo hace énfasis en la magnitud de las tasas de excreción de amonio total (amonio+amoniaco o $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$), las cuales presentan un comportamiento nictimeral similar al indicado con anterioridad para la mayoría de las especies de teleósteos estudiadas (Brett y Zala, 1975; Porter *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1994), incluyendo a la dorada (Dosdat *et al.*, 1996; Lupatsch *et al.*, 1998). Esto significa que, cuando se alimenta a los peces una sola vez por día, las tasas de excreción se incrementan después del periodo de alimentación hasta alcanzar un pico máximo (A_{max}) a partir de una línea base. Después de este pico, las tasas de excreción se reducen hasta volver al nivel inicial en las últimas horas del día y permanecer sin cambios durante la noche. Por otro lado, se observó un ligero incremento de la excreción de amonio previo a la primera alimentación del día.

Existen trabajos sobre la dorada *Sparus aurata* en los que el comportamiento de la excreción de amonio se asocia al metabolismo del pez. Las mayores tasas de excreción de amonio encontradas en nuestro trabajo para la dorada fueron diurnas, presentando amplitudes que variaron entre 9 y 48 mg N- NH_4^+ /kg pez.hora para peces de 10-30 grs, y entre 3 y 9 mg N- NH_4^+ /kg pez.hora para peces de 120 grs. La actividad de la dorada estuvo controlada por las horas de luz (fotoperiodo), el nivel y frecuencia de la alimentación, la composición del alimento (nivel proteico), la temperatura y la talla del pez (Porter *et al.*, 1987; Robaina *et al.*, 1995; Dosdat *et al.*, 1996). El efecto de la luz sobre la excreción de amonio sugiere que este factor actúa como un inductor en el incremento de la tasa metabólica de la dorada al comienzo del día, según hemos observado en nuestro trabajo, además de otros trabajos como el de Guinea y Fernández (1991) y el de Requena y col. (1997), quienes encontraron este mismo comportamiento para las tasas de consumo de O_2 . Otros autores respaldan esta conclusión con el comportamiento de las tasas de excreción de amonio en la dorada (Echevarría *et al.*, 1993). Echevarría y col. (1993), mencionan que probablemente en los peces se presenten también dos tipos de oscilación, como se ha demostrado para los mamíferos: el primero relacionado con la luz (ciclos de oscuridad), y el segundo controlado por los periodos de alimentación y ayuno. Estos autores dicen que la excreción de amonio en la dorada parece estar controlada por un oscilador de este último tipo, es decir, que la alimentación del pez cada día a la misma hora lleva a una anticipación del comportamiento en el pez, con incremento de la excreción antes de la comida.

5.1.2. Tasas de excreción de amonio.

De forma general, se ha encontrado para la dorada que cuando son alimentadas con una ración entre el 0.5-1.0% del peso total con dietas de un nivel proteico del 50-55% (5-15% de carbohidratos), el amonio diario producido por excreción es alrededor de 400 mg N-NH₄⁺/kg pez.día para juveniles de 10-15 grs (Dosdat *et al.*, 1996), ligeramente menor para juveniles entre 30-40 grs, 365-380 mg N-NH₄⁺/kg pez.día (Porter *et al.*, 1987; Robaina *et al.*, 1995); y de 100-110 mg N-NH₄⁺/kg pez.día para doradas de 100-150 grs de peso (Dosdat *et al.*, 1996). Los resultados de los autores mencionados fueron similares a los encontrados en nuestro trabajo, pues las tasas diarias de excreción que encontramos fueron de 400-450 y de 116 mg N-NH₄⁺/kg pez.día para peces menores que 30 grs y 120-150 grs de peso, respectivamente. De la misma manera, las tasas de excreción coinciden con los niveles encontrados para otros teleósteos como la lubina *Dicentrarchus labrax* (Ballestrazzi *et al.*, 1996; Dosdat *et al.*, 1996), los salmónidos *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta* (Dosdat *et al.*, 1996) y *O. nerka* (Brett y Zala, 1975), y el bacalao *Gadus morhua* (Lied y Braaten, 1984), entre otros (Rychly, 1980; Brauge *et al.*, 1995; Robaina *et al.*, 1999). Se presentan diferencias interespecíficas relacionadas con el metabolismo de actividad de los peces. Por ejemplo, los peces planos como los lenguados *Pleuronectes flessus* (Carter *et al.*, 1998), *P. platessa* (Jobling, 1981a), *Rhombosolea tapirina* (Verbeeten *et al.*, 1999), y el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Burel *et al.*, 1996; Dosdat *et al.*, 1996) presentan niveles de excreción amoniaca que pueden ser hasta un 40-50% menores a los teleósteos mencionados. Estas diferencias se explican por el bajo nivel de actividad que presentan los peces planos durante el día, pues parte del tiempo se mantienen en el fondo y solo cuando se alimentan nadan en la columna de agua. Esta característica hace que el metabolismo energético sea más eficiente en los peces planos en términos de retención proteica, reduciendo la excreción de nitrógeno (Lied y Braaten, 1984; Dosdat *et al.*, 1996).

Como hemos visto, las tasas de excreción dependen de la talla del pez y de su comportamiento se dispara durante las horas de luz. Pero esto se ve alterado en todos los teleósteos por otros factores relacionados con el nivel de alimentación, la composición del alimento (nivel proteico y relación proteínas/carbohidratos), el manejo de la alimentación y la temperatura de cultivo, entre otros.

Efecto de la talla del pez.

En algunos estudios se han utilizado diferentes niveles de alimentación para la dorada, mismos que dependen de la talla del pez (Porter *et al.*, 1987; Calderer y Cardona, 1993; Dosdat *et al.*, 1996). En la tabla V.I se presentan los requerimientos de alimentación recomendados por Porter y col. (1987) y Calderer y Cardona (1993) para la dorada mantenida a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento (25-26°C). Se puede ver que la relación entre el peso del pez y el nivel de alimentación es inversa.

Efecto de la composición de la dieta.

En nuestro caso, encontramos que la excreción de amonio de la dorada disminuyó cuando el nivel proteico de la dieta se redujo y el nivel de carbohidratos se incrementó. Las doradas alimentadas con la dieta de menor valor proteico (45-46% del peso de la dieta) y mayor nivel de carbohidratos (30-31% del peso total de la dieta) presentaron las menores tasas de excreción de amonio, significando alrededor de 300 mg N-NH₄⁺/kg pez.día (ver tabla IV.II).

Tabla V.I. Nivel de alimentación diaria para la dorada *Sparus aurata*, en porcentaje de la biomasa total, para diferentes tallas y diferentes temperaturas de cultivo.

Fase de Desarrollo	Peso (grs)	Temperatura de Cultivo	
		24°C ¹	20-26°C ²
Larvaria	<1	—	6.0-8.0
Preengorde	1-5	4.0-5.0	3.5-6.0
Preengorde-Engorde	5-20	—	3.0-4.5
Engorde	20-40	2.0-2.5	2.2-3.5
Engorde	90	1.4-2.0	—

Nota: ¹ Porter *et al.*, (1987), ² Calderer y Cardona (1993).

Existen pocos trabajos sobre la relación entre la excreción nitrogenada de los espáridos y la composición de la dieta; además, la variabilidad de las condiciones de alimentación y mantenimiento de dichos estudios hace más difícil su comparación (ver tabla A-I en anexo). Los requerimientos proteicos encontrados en nuestro trabajo para la dorada coinciden con los descritos anteriormente por algunos autores para esta especie (Kaushik, 1997; Oliva-Teles, 2000), siendo del 45-46% de la dieta. Como el incremento de la ración lleva asociado un aumento del nivel de ingesta proteica por el pez (Cho y Lovell, 2002), las tasas de excreción de amonio se elevan también. Esto se encontró para las doradas de nuestro trabajo cuando fueron alimentadas a saciedad.

El nivel de excreción de amonio dependió más del contenido proteico en la dieta que del nivel de carbohidratos, pues el metabolismo de los carbohidratos se encuentra relacionado directamente con el metabolismo energético del pez, de hecho, significan la principal fuente de sustrato para la producción de energía en la respiración. El aumento en el nivel de carbohidratos dietarios a costa de las proteínas se reflejó en un incremento tanto de la retención proteica como del crecimiento (Serra, 1999; Narbaiza, tesis doctoral en preparación), lo cual ya discutiremos en el apartado 5.4.

Efecto del régimen de alimentación.

Las tasas de excreción de amonio no se vieron alteradas por el número de raciones de alimento, encontrando que este parámetro solo afecta al comportamiento de los picos máximos de excreción, lo cual trataremos en el apartado siguiente. En cuanto a las tasas de excreción diaria en nuestros experimentos, las doradas con una talla de 30-45 grs y alimentadas con una dieta que contiene entre un 50-54% de proteínas y entre 20-25% de carbohidratos, presentaron entre 455 y 510 mg N-NH₄⁺/kg pez.día, para los peces alimentados 2 y 1 veces al día, respectivamente. Esta diferencia en el nivel de excreción está marcada por un efecto del tamaño de la ración alimenticia (0.5% y 2.0% del peso total, respectivamente). Ya se conoce que las principales variables ambientales que controlan la eficiencia de utilización de nitrógeno son la temperatura y la disponibilidad de alimento (Wood, 2001). Además, el nivel de excreción de amonio es estimulado mayormente en el pez por la alimentación, al igual que la acción dinámica específica (SDA), por lo cual se refleja también en el consumo de oxígeno. La revisión realizada por Wood (2001) determina que el incremento de la ración incrementa la excreción de amonio, lo cual es acompañado por una reducción en la absorción de nitrógeno y un mejor crecimiento. Lo anterior fue encontrado en el presente trabajo y respaldados por los datos de crecimiento de Narbaiza (*op. cit.*). Esto se debe a que se incrementan los costes de producción del amonio y la energía es redistribuida tomando como principal prioridad el crecimiento, sacrificando la síntesis de proteínas corporales (Jobling, 1981a; Wood, 2001).

Efecto de la temperatura de cultivo.

En cuanto al efecto de la temperatura de cultivo sobre la excreción de amonio en nuestro trabajo (para doradas de 5-10 grs alimentadas con una ración del 3-4% del peso total), los peces mantenidos a 25°C presentaron tasas de excreción hasta un 40% más altas que los peces mantenidos a 15°C (30.44 contra 43.05 mg N-NH₄⁺/kg pez.día, respectivamente). Se conoce el efecto que tiene la temperatura sobre el metabolismo de los peces, la cual incrementa los costes de mantenimiento de las funciones corporales, acelera el crecimiento y aumenta las demandas energéticas asociadas con la actividad del pez (Jobling, 1994). Algunos trabajos han demostrado que la excreción de nitrógeno residual es altamente sensitiva a la temperatura, incluso mucho más que el consumo de oxígeno (Wood, 2001). Esto se ha observado para algunos espáridos como la dorada *Sparus aurata*, en la cual el incremento de la temperatura de cultivo provocó un incremento en el consumo de oxígeno (Guinea y Fernández, 1997; Requena *et al.*, 1997), y provocando en el pargo japonés *Chrysophrys major*, un incremento de la tasa de excreción diaria de amonio (Woo, 1990).

Por otro lado, se observó para el lenguado *Pleuronectes platessa* (talla de 5-90 grs), que las tasas de excreción de amonio se incrementan con el aumento de la temperatura de cultivo (Jobling, 1981a). Para el caso del rodaballo *Scophthalmus maximus*, la relación entre la tasa de excreción nitrogenada y la temperatura también fue positiva, encontrándose que la tasa diaria de excreción de amonio para los peces mantenidos a 8°C fue un 30% menor que para los peces mantenidos a 20°C.

Por otro lado, se ha encontrado que la excreción nitrogenada de los peces de mares fríos y templados, no difieren en la naturaleza de las principales formas excretadas (amonio y urea) y si difieren en el nivel de estos. De esta manera, el pez antártico *Harpagifer antarcticus*, excreta alrededor del 82% y 13% de la excreción total nitrogenada en forma de amonio y urea, respectivamente. Además, este pez presentó tasas de excreción de amonio que son entre 10-69% menores que otras especies de teleósteos no polares, lo cual se debe al decremento de las tasas metabólicas de rutina provocado por la menor temperatura de las aguas donde vive este pez (Boyce, 1999). Lo anterior coincide con nuestros resultados, pues el incremento de la temperatura de 15°C a 25°C en las doradas alimentadas con el 3-4% del peso corporal, provocó que las tasas de excreción diaria de amonio aumentasen en un 16.5% (ver tabla IV.VIII).

En otros estudios se enfatiza el efecto que presenta la temperatura sobre el metabolismo de la glucosa, el crecimiento y la utilización de las proteínas en los teleósteos (Woo, 1990; Hidalgo y Alliot, 1988; Peres y Oliva-Teles, 1999), lo cual se analizará más adelante (apartado 5.7). Por otra parte, el incremento de la temperatura, aumenta los requerimientos energéticos, que como ya hemos visto, reflejándose en un aumento del nivel de alimentación (Wood, 2001)(tabla V.I).

5.1.3. Niveles máximos de excreción (A_{max}).

Retraso en los picos de excreción (A_{max}).

En los peces se ha estudiado el efecto de la alimentación y la temperatura sobre la tasa metabólica, lo cual ha sido medido a través de indicadores como el consumo de oxígeno (Guinea y Fernández, 1991 y 1997; Lauff y Wood, 1996; Lyytikäinen y Jobling, 1998) y la excreción de amonio (Brett y Zala, 1975; Jobling, 1981a, 1994; Dosdat *et al.*, 1996; Lyytikäinen y Jobling, 1998).

El tiempo que tardó en aparecer el A_{max} en nuestro trabajo (doradas mantenidas a 21°C con un peso entre 7-15 grs y aquellas mantenidas a 25°C con un peso entre 5-150 grs) fue de alrededor de 4.5 horas después de la alimentación, lo cual no fue alterado por ningún parámetro relacionado a la composición del alimento (proporción proteínas/carbohidratos o inclusión de Cr_2O_3) o variación de la talla del pez. Sin embargo, el A_{max} se retrasó cuando las doradas fueron mantenidas a una temperatura de 15°C, y cuando fueron alimentadas con una ración por debajo del 1.5% del peso/día (1/2 saciedad), en ambos casos el A_{max} se presentó hasta 6.5 horas postprandial. A este respecto, [Dosdat y col. \(1996\)](#) encontraron que la aparición del A_{max} se retrasa en doradas de 100 grs alimentadas a una ración del 0.45% del peso/día y mantenidas a 16°C. Bajo estas condiciones, el A_{max} apareció entre 8-9 horas después de la alimentación.

En algunos trabajos, las tasas de consumo de oxígeno en la lisa *Mugil saliens* y la dorada *Sparus aurata* a lo largo del día, presentaron una relación con la temperatura y el nivel de alimentación ([Guinea y Fernández, 1991, 1997](#)). En estos trabajos se encontró para los peces mantenidos a 20°C y 21°C (lisa y dorada, respectivamente), que la tasa máxima de consumo de oxígeno R_{max} aparece entre 2 y 4 horas antes que en aquellos mantenidos a 15°C y 16°C (*idem*). Para el caso de la dorada, y aunque [Guinea y Fernández](#) no discutieron la relación entre el nivel de alimentación y el tiempo en el que aparece el R_{max} , sin embargo se puede apreciar en sus resultados, que el incremento del nivel de alimentación de 0.47% a 1.74% del peso/día, redujo el tiempo de la aparición del R_{max} . Los resultados de los trabajos explicados anteriormente sustentan también el efecto de la temperatura y el nivel de ración sobre el retraso de los picos de excreción de amonio A_{max} . Sobre esto, algunos autores han especificado que la temperatura óptima para el crecimiento de la dorada se encuentra entre 25-26°C, además estiman que la ración de alimento adecuada para la dorada durante el preengorde (<10 grs) es entre 3.5-8% del peso/día, y durante el engorde (>15 grs) entre 2.2-4.5% del peso/día ([Calderer y Cardona, 1993](#); [García-Alcázar et al., 1994](#)). Lo anterior sugiere que la ración utilizada por [Dosdat y col. \(1996\)](#) fue deficiente.

Lo anterior hace pensar que para los distintos casos de nuestro trabajo descritos anteriormente, la utilización de una temperatura menor a la óptima para el crecimiento de la dorada y el uso de una ración alimenticia menor a la óptima, son la causa del retraso encontrado de la A_{max} , al igual que en los trabajos mencionados.

Duración de los picos de excreción (A_{max}).

En nuestro trabajo se presentaron dos picos de excreción cuando el alimento (contenido proteico aproximado 54%) fue dividido en dos raciones al día (09:30 y 16:30 hrs). A este respecto, [Robaina y col. \(1995\)](#), trabajaron con doradas de 70 grs que fueron alimentadas con un nivel proteico del 55% del alimento. Estos autores encontraron que cuando las doradas fueron alimentadas a saciedad y el alimento se dividió en dos raciones durante el día (09:00 y 15:00 hrs), las tasas de excreción de amonio presentaron dos picos. De igual manera, [Dosdat y colaboradores \(1996\)](#) encontraron que las tasas de excreción de amonio de juveniles de dorada (10 grs) presentaron 2 picos de excreción de amonio cuando el alimento (55% de proteínas) se dividió en dos raciones (10:00 y 16:30 hrs); mientras que en los peces de 100 grs, en los que el alimento fue aportado en una sola ración, solo se presentó un solo pico de excreción A_{max} . Para ambos casos, el segundo pico fue mayor que el primero, de manera inversa a nuestros resultados. Las diferencias encontradas entre los peces de diferentes especies (trucha, lubina, rodaballo, anguila y salmón) alimentados una vez al día ([García-Gallego, 1993](#); [Kelly et al., 1994](#); [Burel et al., 1996](#); [Lyytikäinen y Jobling, 1998](#); [Leung et al., 1999](#); [Verbeeten et al., 1999](#)) y aquellos a los que el alimento se les administró dos veces al día ([Rychly, 1980](#); [Brauge et al., 1995](#); [Dosdat et al., 1996](#)); respalda la aseveración de que la

distribución del alimento durante el día está relacionado con el patrón nictimeral de la excreción de amonio.

Por otra parte, en los resultados del experimento en el que evaluamos el efecto de la temperatura y el nivel de alimentación, se presentaron dos picos de excreción a lo largo del día. Este comportamiento fue encubierto cuando las doradas fueron alimentadas a saciedad, para ambas temperaturas probadas, observándose un solo pico de excreción A_{max} , el cual presentó una duración de hasta 10 horas, frente a las 4-5 horas que dura el primer pico en los peces alimentados a $\frac{1}{2}$ saciedad (T25RB y T15RB). Sin embargo, para todos los casos, las tasas de excreción vuelven al nivel base del que partieron antes de la primera alimentación (figura 4-8). Por otro lado, [Echevarría y col. \(1993\)](#) encontraron que las doradas alimentadas una sola vez al día presentaron dos picos de excreción de amonio, el primero relacionado con la alimentación y el segundo con las funciones digestivas. Parece ser que la duración del pico de excreción de amonio está relacionada con la temperatura, la ingesta de proteínas (nivel de ración y nivel proteico en la dieta) y el incremento metabólico durante la digestión. Por su parte, [Burel y col. \(1996\)](#), al trabajar con juveniles de rodaballo *Scophthalmus maximus*, encontraron que la duración de los picos postprandial de excreción de amonio se relacionó con la disminución de la temperatura y con el incremento de los niveles proteicos en el alimento, siendo menor el efecto provocado por la temperatura de cultivo. Por otra parte, la duración del pulso de excreción de amonio en el lenguado *Rhombosolea tapirina*, fue afectada por el nivel de alimentación, siendo mayor para los juveniles alimentados con el 3% del peso total, comparado con los alimentados al 1% y 2% del peso total ([Verbeeten et al., 1999](#)). En base a lo anterior, queda de manifiesto la relación de la ingesta proteica y la temperatura con la duración de los pulsos de excreción de amonio en los peces, lo cual explica el encubrimiento del comportamiento bifásico en las doradas alimentadas en exceso y mantenidas a 25°C, como un efecto combinado de la temperatura y el nivel de ingesta proteica (debido al nivel de alimentación).

Incremento de la excreción de amonio debido al manejo del cultivo.

En relación al incremento de las tasas de excreción de amonio previo al periodo de alimentación encontrado en nuestro trabajo, y asociado al momento en que las lucen se encienden dentro de las cámaras de cultivo, algunos autores encontraron resultados similares. [Echevarría y col. \(1993\)](#) y [Guinea y Fernández \(1997\)](#) trabajaron con doradas de 280 grs y <100 grs, respectivamente. Para el primer trabajo, una parte de los peces fue alimentada cada día y otra parte de estos fue sujeta a un periodo de ayuno. En ambos casos se encontró un incremento en las tasas de excreción de amonio previo al periodo de alimentación, este incremento se relacionó al momento en el que se encendieron las luces dentro de la cámara. una relación entre el primer pulso de excreción de amonio y el periodo de alimentación. Incluso, en el caso de las doradas mantenidas bajo ayuno, el A_{max} siguió presentándose 2 días después de haber sido alimentadas. Por su parte, [Guinea y Fernández](#) trabajaron con 2 tratamientos, en uno las doradas fueron alimentadas cada día y en el otro las alimentaron cada 2 días. Las tasas de respiración (un parámetro para medir el metabolismo en peces con el cual está relacionada la excreción de amonio) presentaron un pequeño incremento previo a la alimentación, asociado al momento en que las luces se encendieron. Este ligero aumento en el consumo de oxígeno se presentó también para el segundo tratamiento, incluso, el día en el que las doradas no fueron alimentadas. Con respecto a lo anterior, los autores explican que los ritmos metabólicos (*i.e.* excreción de amonio y respiración) están controlados por factores asociados a la alimentación (ingesta proteica y procesos digestivos después de la alimentación) y a la gestión y mantenimiento de los cultivos como el fotoperiodo, la temperatura, limpieza de los acuarios, entre otros; los cuales provocan el incremento en el metabolismo del pez (reflejado en el aumento de la actividad).

Para la gestión de un cultivo comercial hay que tomar en cuenta también que la temperatura acelera el metabolismo de los peces, provocando un aumento de la síntesis de proteínas durante el crecimiento, un incremento en la desaminación de los aminoácidos, además de funcionar como un catalizador de los procesos mecánicos y bioquímicos de la alimentación (Jobling, 1994). Lo anterior se refleja en la variabilidad de las tasas de consumo de oxígeno y la excreción de amonio, ya que estas presentaron un similar comportamiento. Esto quiere decir que el comportamiento de la excreción de amonio puede predecirse en base a su respuesta ante la mayoría de los ritmos metabólicos bajo determinadas condiciones de alimentación y mantenimiento.

El incremento de las tasas de excreción de la dorada en nuestro trabajo coincide claramente con el incremento en la actividad del pez asociado al inicio del fotoperiodo; lo cual es también corroborado por los resultados de los trabajos referidos (Echevarría *et al.*, 1993; Guinea y Fernández, 1997), y determinan el manejo del cultivo como uno de los factores que influyen sobre el metabolismo de la dorada. Estos resultados son de suma importancia en la gestión de cultivos comerciales, pues el fotoperiodo, aunque las bacterias nitrificantes no necesitan luz para llevar a cabo sus actividades, si es importante para los organismos que pueden absorber los residuos provenientes de la excreción y la respiración de los peces (NH_4^+ y CO_2) y que afectan al cultivo y las comunidades del medio receptor de las aguas que provienen de las piscifactorías.

Además, dentro de un medio de cultivo extensivo, el incremento diurno en la actividad de los peces aunado a la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) limitando los niveles de oxígeno en el medio para un cultivo que presente una oxigenación o circulación deficiente. Estos niveles de oxígeno son compensados por la actividad del fitoplancton (fotosíntesis), sin el cual el medio sería deficiente de O_2 . El oxígeno limita la eficacia de la nitrificación llevada a cabo por las bacterias (*Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp.), por lo cual la gestión del cultivo para predecir y controlar la emisión de residuos al medio cobra relevante importancia ante este factor.

5.2. NITRÓGENO FECAL Y OTRAS FORMAS NITROGENADAS DISTINTAS AL AMONIO.

Debido a que las técnicas de análisis del amonio y la urea son fáciles de realizar y económicos, en los estudios de peces no se miden otras formas de nitrógeno excretadas para el balance de nitrógeno. Menciona Wood (2001) que hay pocos estudios que miden la excreción del nitrógeno total, y que además estos se encuentran en literatura poco actualizada. Además, esta excreción de nitrógeno total es comparada solamente con la suma del amonio y la urea, permaneciendo sin identificar las formas en las que el nitrógeno está presente. Los pocos resultados de este tipo discrepan mucho entre sí, encontrando que entre el 23-31% de la excreción nitrogenada no es contabilizada para la carpa, entre el 13-19% para la anchoveta y entre el 23-32% para los salmónidos (diversos autores en Wood, 2001). A pesar de la variabilidad de los resultados, esta diferencia entre el nitrógeno total y amonio+urea tienden a ser grandes (hasta el doble de la suma amonio+urea). El primer paso a seguir es identificar la forma en que se pierde el nitrógeno no medido; a partir de esto podremos responder a las dudas sobre el peso que tienen estas formas en la pérdida de nitrógeno y que papel juegan cada una en el metabolismo del pez. Este fue uno de los objetivos del presente trabajo. Como se ha reportado que las fracciones medidas en algunos trabajos de la creatina, creatinina, trimetilamina, óxido de trimetilamina (diversos autores en Wood, 2001) y ácido úrico (Wright, 1995) respondieron solo a pequeños porcentajes del nitrógeno no medido tradicionalmente, nos centramos en otras formas, que son tratadas por separado a continuación.

5.2.1. Urea.

La urea no fue medida en los primeros experimentos realizados debido a que esta no fue detectada por el método utilizado, sin embargo y con la finalidad de saber la composición de la excreción nitrogenada y conocer el peso que la fracción de urea tiene dentro del mismo, se diseñó un experimento específico para este fin, con una carga alta de biomasa en los acuarios y con análisis de las tasas de excreción de urea.

Encontramos que las tasas de excreción de urea presentaron el mismo comportamiento que hemos descrito para el amonio, es decir, que las mayores tasas de excreción se presentan durante el día después de la alimentación y bajan en las últimas horas del día, permaneciendo en niveles mínimos durante la noche. La excreción de urea fue de 16.72 mg N-urea/kg pez.día, significando el 2.22% del nitrógeno ingerido (12.6% de UREA+NH₄⁺). Las mayores tasas de excreción (U_{max}) se presentaron para el periodo entre las 16:00-20:00 hrs (aproximadamente 6 horas después de la alimentación). Esta U_{max} significó 3.3 veces el nivel de excreción endógena de la urea (el nivel base de excreción durante la noche, ver tabla IV.XVI).

Como ya se ha mencionado, la importancia que tiene la urea es que representa la segunda forma nitrogenada de excreción, y aunque en estudios anteriores se subestimó la magnitud de esta (5-15% del nitrógeno total excretado; Wood, 1958 y Vellas *et al.*, 1970; en Dosdat *et al.*, 1996), otros autores han encontrado que la urea significa entre el 13% y el 46% de la excreción nitrogenada total (Brett y Zala, 1975; Sayer y Davenport, 1987; Dosdat *et al.*, 1996; Boyce, 1999). Lo anterior coincide con el peso que tuvo la excreción de urea en nuestro trabajo, entre el 12.6% de la excreción nitrogenada para doradas de 120-150 grs de peso. También son similares las tasas de excreción de urea que presentó la dorada en el trabajo de Dosdat y col. (1996) quienes obtuvieron una tasa de 14.9 mg N-urea/kg pez.día. Esta última tasa es menor a la que presentaron otras especies de peces como la lubina, el rodaballo y algunos salmónidos en el mismo trabajo. Para el caso de la dorada, estos mismos autores

encontraron que las tasas de excreción también están relacionadas al fotoperiodo, siendo mayor durante el día; sin embargo, la frecuencia de alimentación no tuvo relación con la excreción de urea pues independientemente del número de veces en que se alimentó a los peces (1 ó 2 raciones), solo se presenta un pico de excreción. Por otro lado, para la excreción de urea se encontraron diferencias interespecíficas, pues para el rodaballo se encontró solo un pico de excreción durante las horas de oscuridad; en el caso de los salmónidos no se presentó ningún pico de excreción evidente. La excreción de urea no presentó relación con la alimentación ni se encontró afectada por este parámetro (Brett y Zala, 1975).

Durante nuestros experimentos no pudimos medir la excreción de urea cuando trabajamos con doradas menores a 30 grs de peso. Anteriormente Porter y col. (1987) no detectaron niveles de urea en los acuarios donde mantuvieron doradas de entre 3-90 grs. Sin embargo, Dosdat y col. (1996) en su trabajo si pudieron medir el nivel de urea para doradas de 10 grs de peso. Esta variabilidad de resultados se debió principalmente a la baja sensibilidad del método utilizado y a la baja carga de biomasa utilizada, pues mientras que en la mayoría de nuestros experimentos y en el trabajo de Porter y colaboradores se utilizaron cargas menores a 2 grs de peces/litro; para el experimento E4 (para el cual si se detectaron niveles de urea) utilizamos cargas entre 17.2-44.3 grs de peces/litro, de la misma manera que en el trabajo de Dosdat y col. Es evidente que se necesitan cargas altas de biomasa en los acuarios para que los niveles de urea en el medio sean acordes a la sensibilidad del método utilizado. No se observan diferencias entre los niveles de urea detectados en nuestro experimento y los reportados por Dosdat para la dorada. Una carga de 2.2 grs/litro es suficiente para poder medir la excreción de urea.

5.2.2. Aminas primarias (aminoácidos).

Debido a que el amonio total y la urea son los principales compuestos nitrogenados solubles, en pocos estudios se han medido otros compuestos residuales como son las aminas primarias. En los cultivos comerciales, sin embargo, algunos de estos productos finales pueden aportar cantidades importantes de nitrógeno bajo circunstancias especiales como el exceso de proteínas en la dieta, un alto nivel de alimentación y temperaturas elevadas (Boyce, 1999); tal es el caso para nuestro experimento, en el que encontramos que la tasa de producción de nitrógeno en forma de aminoácidos fue de 156.48 mg N/kg pez.día, significando el 20.81% del N total medido en el agua de los acuarios; valor que es significativamente mayor que los reportados anteriormente por otros autores (Prosser, 1971; Cockcroft y Du Preez, 1989, 1990; ambos citados por Boyce, 1999) para espáridos del Atlántico y Mediterráneo (herreras *Lithognathus lithognathus* y *L. mormyrus*, respectivamente), quienes estimaron valores entre el 2-11% del nitrógeno ingerido. Al no poder calcular el coeficiente de digestibilidad del nitrógeno en el alimento, pensamos que tales diferencias entre nuestro trabajo y los mencionados, pueden deberse a una sobreestimación de los valores de los aminoácidos, pues una de las fases primarias del análisis de las muestras se realizó una digestión ácida, la cual rompe los restos de proteínas y péptidos que no han sido catabolizados y retenidos en el pez (residuos de alimento). Estos restos son reducidos a aminoácidos por la digestión, incrementando la cantidad de aminoácidos medidos en las muestras. Esta conclusión se fortalece con la baja detección de aminoácidos libres en las muestras a las que no se les realiza una digestión previa (datos no publicados de previas pruebas de análisis). Otra fuente de esta sobreestimación se debe a que en nuestro trabajo, la forma de análisis no diferencia a los aminoácidos provenientes de las heces, de los aminoácidos que provienen del alimento que no fue ingerido.

Según Ramseyer y Garling (1998), el nitrógeno liberado proviene de muy diversas fuentes, tales como las proteínas dietarias no digeridas y no absorbidas por el metabolismo del pez, restos de células epiteliales, aminoácidos absorbidos en cantidades mayores a las que el pez

puede utilizar y productos metabólicos degradados. Aunque no hay que descartar que este “despilfarro” de proteínas pueda suceder en cultivos comerciales de la dorada durante periodos de estrés que tengan su origen en las condiciones ambientales, alimenticias o relacionado al ciclo de vida de la especie. Para otras especies se ha encontrado una alta variación en los datos de excreción de aminos primarias (Boyce, 1999; y otros autores citados en el mismo trabajo), lo cual hace pensar que su valoración estará relacionada más a patrones de aprovechamiento del alimento tanto en la fracción no absorbida (péptidos, proteínas y aminoácidos residuales en las heces) como en el alimento no ingerido (provocado por manejo, estrés, estado de madurez, etc), que a procesos fisiológicos del pez, tal y como hemos determinado para nuestro experimento.

Por lo anterior, podemos concluir que la mayor parte del nitrógeno “residual” encontrado en nuestro trabajo fue en forma de proteínas y péptidos o aminos primarias. Desgraciadamente el origen del nitrógeno en forma de aminos primarias no pudo ser separado, englobando como aminoácidos al nitrógeno medido en el medio acuoso, el cual proviene de restos de alimento no ingerido o alimento no absorbido (restos de heces). Como los altos niveles de aminoácidos medidos en nuestro trabajo reflejan el despilfarro de las proteínas dietarias, el control de la utilización de las mismas se relacionó en gran medida a factores de manejo de los peces que a procesos fisiológicos naturales del pez.

5.2.3. Nitratos+Nitritos.

Encontramos que la fracción que contiene a los nitratos y nitritos (NO_3+NO_2) fue mayor que la correspondiente al nitrógeno en forma de urea (8.97% contra 2.22%). Esta forma nitrogenada proviene tanto del nitrógeno fecal como del alimento que no fue ingerido. Ambas fuentes liberan nitrógeno en forma disuelta y parte de estas son en forma de nitratos y nitritos. La importancia de este resultado radica en que generalmente esta significativa fracción nitrogenada no es valorada en los estudios que tienen el objetivo de valorar el balance de nitrógeno (Porter *et al.*, 1987; Sayer y Davenport, 1987; Dosdat *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 1998). Por otro lado, Dosdat y col. (1996) encontraron que el nitrógeno soluble proveniente de las heces representan una fracción notablemente mayor en la dorada (52-78%) que en otros teleósteos como la lubina (24-42%), el rodaballo (24-27%) y la trucha (12-26%). Tomando en nuestro trabajo a los NO_3+NO_2 como la fracción de nitrógeno soluble que proviene de las heces, lo anterior coincide con nuestros resultados (ver tabla V.VII), en los cuales esta fracción significó alrededor del 60% del nitrógeno fecal, aunque hay que hacer notar que esta no es la única fuente. Dosdat y col. (1996) explican que otra fuente para esta liberación de nitrógeno fue el alimento no ingerido. Esta pérdida nitrogenada explicaría las bajas digestibilidades proteicas encontradas por estos autores. La forma en que la dorada, como pez carnívoro, lleva a cabo el rompimiento del *pellet*, provoca una liberación al medio acuoso de pequeñas partículas de alimento, lo cual pudo influenciar la digestibilidad de las proteínas. Esto lleva a un detrimento en la transformación de los aminoácidos libres a energía a través de la desaminación. En nuestro caso no pudimos determinar la digestibilidad del nitrógeno, sin embargo, pensamos que los NO_3+NO_2 provienen del lavado tanto de las heces como del alimento no ingerido. Otra fuente a tomar en cuenta para los NO_3+NO_2 es la nitrificación que realizan las bacterias, transformando el amonio en nitritos y nitratos.

Otro de los aspectos de interés es que, aunque no son una especie químicamente tóxica, los NO_2+NO_3 , como compuestos nitrogenados, intervienen en el enriquecimiento del medio, pudiendo alcanzar niveles de eutrofización. En este caso, la pareja NO_3+NO_2 significan una fracción importante (casi 2/3 de la fracción amoniacal) que, junto con el amonio ejercen un aporte importante en las aguas residuales de las piscifactorías, y dependiendo del cuerpo receptor, puede significar un efecto nocivo (eutrofización, soportar florecimientos algales, entre otros). Por otra parte y debido a que hay zonas en las que el nitrógeno es el elemento

limitante para llevar a cabo la producción primaria, los nitratos y los nitritos ayudan a incrementar la productividad de estas áreas que sostienen la cadena trófica, cubriendo inclusive las deficiencias de N en la zona costera (Parsons *et al.*, 1977; Howarth *et al.*, 2000).

En resumen, la dorada pierde una importante fracción del nitrógeno ingerido en forma de nitratos y nitritos, los cuales provienen tanto de las heces como del alimento que la dorada no llega a ingerir, además de la oxidación del amonio que llevan a cabo las bacterias nitrificantes.

5.2.4. Nitrógeno fecal.

Entre el 6.5-15% del nitrógeno ingerido fue perdido antes de haber sido metabolizado por la dorada en nuestro trabajo, lo cual se reflejó en el contenido de nitrógeno en las heces. La fracción de nitrógeno fecal fue afectada por el nivel de ingesta de proteínas y por la temperatura del cultivo. A diferencia de la digestibilidad de las proteínas (ADC_N), el nitrógeno perdido a través de las heces fue afectado por la inclusión de cromo en las dietas, siendo menor la fracción correspondiente al nitrógeno fecal para las doradas alimentadas con las dietas que contenían Cr_2O_3 .

Fernández y colaboradores (1999) al trabajar con doradas alimentadas con una dieta de un contenido del 50% de proteínas, 10% de lípidos y 25% de carbohidratos y distintos niveles de Cr_2O_3 (0.5, 1.0 y 2.0%), no encontraron efecto sobre la digestibilidad de los nutrientes debido a la inclusión de Cr_2O_3 ; por lo tanto, no encontraron diferencias en el nivel de nitrógeno contenido en las heces. Por su parte, Tacon y Rodrigues (1986) encuentran una mayor digestibilidad de las proteínas para la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) cuando fue alimentada con la dieta de mayor contenido de Cr_2O_3 (2.0%); por lo que concluyen que niveles de Cr_2O_3 por debajo del 1% de la dieta puede ser utilizado como marcador para los trabajos de digestibilidad en esta especie. En otro trabajo con la tilapia híbrida *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*, Shiao y Liang (1995) incorporaron niveles de Cr_2O_3 de 0.5 y 2.0% de la dieta y encontraron que la digestibilidad de las proteínas se incrementó cuando la inclusión de Cr_2O_3 fue del 0.5% de la dieta, frente a la dieta con el mayor nivel (2.0%). Este efecto dependió del tipo de carbohidratos presentes en la dieta, pues fue más evidente cuando se utilizó a la glucosa como fuente de carbohidratos, en lugar del almidón. A pesar de la variabilidad en los resultados, parece ser que la inclusión de cromo en las dietas y su efecto sobre la utilización proteica, depende del nivel y tipo de carbohidratos encontrados en la dieta debido a que el cromo (+3) está considerado como un mineral esencial para el metabolismo de los lípidos y la glucosa (Maher, 1999).

Para la dorada, Requena y col. (1997) encontraron bajas digestibilidades para el nitrógeno (83-86.6%) al ser alimentadas con una dieta de niveles proteicos del 42%, 12% de lípidos y 19% de carbohidratos. Observaron que la digestibilidad de las proteínas no fue afectada por la temperatura. Esto también se ha encontrado en nuestro experimento, en el cual no observamos diferencias para el nitrógeno fecal de las doradas mantenidas a 15°C y 25°C. Por otro lado, nosotros obtuvimos digestibilidades proteicas notablemente mayores (91.8%) que Requena y colaboradores, lo cual pueda deberse a la composición de las dietas, pues las dietas utilizadas en nuestro trabajo contenían un nivel superior de proteínas que las de estos autores (53% contra 42%). Lo anterior es confirmado por los resultados encontrados en otro de nuestros experimentos, en el cual el contenido de nitrógeno en las heces fue menor a medida que el contenido proteico de la dieta aumentó (ver tabla IV.VI).

Reforzando lo anterior, Jobling (1981b) encontró para el lenguado *Pleuronectes platessa*, que el contenido de nitrógeno en las heces dependió de la fuente de proteínas y carbohidratos,

presentando una menor cantidad de nitrógeno fecal los lenguados alimentados con dietas en las cuales las proteínas fueron de origen animal (preferentemente de peces frente a una fuente de plantas) y se utilizó almidón precocido como fuente de carbohidratos (Jobling, 1981b). Ambas características se deben a la adaptación del metabolismo de los peces carnívoros ante el alto contenido de proteínas y reducido contenido de carbohidratos que contienen sus dietas naturales. Debido a lo anterior, la actividad de las amilasas en el tracto digestivo de estos peces es limitada (Jobling, 1981b; Oliva-Teles, 2000). Aunado a lo anterior, la ingesta de carbohidratos no digeribles como el almidón crudo, reducen la digestión y la absorción de las proteínas, repercutiendo en el contenido de nitrógeno en las heces.

Está claro que el nitrógeno fecal está relacionado con el balance energético de las dietas y el tipo de nutrientes (fuente y tipo de proteínas y carbohidratos). Por ello, equipos de trabajo como el de Ng, Shiau y el nuestro llevan a cabo desde hace tiempo investigación sobre la utilización del alimento en el metabolismo de algunos peces como el bagre (Ng *et al.*, 1997), la tilapia (Shiau y Lin, 1993; Shiau y Liang, 1994, 1995; Shiau y Chuang, 1995; Shiau, 1997) y la dorada (Guinea, 1993; Metón, 1996; Guinea y Fernández, 1997; Fernández *et al.*, 1998, 1999; Metón *et al.*, 1999a,b, 2000). Estas investigaciones presentan un enfoque sobre el mejoramiento en la utilización del alimento y, de esta manera, evitar que una gran cantidad de heces alcancen el medio acuático, pues estas suelen asentarse en el fondo de los tanques de cultivo o, en el caso de una deficiente hidrodinámica costera, en el medio circundante a donde descargan los efluentes de las piscifactorías. Entre los efectos importantes sobre estos medios es el enriquecimiento excesivo de nutrientes como el N y el P (eutrofización) que respaldan los florecimientos algales, que pueden ser nocivos según la composición específica de estos (Ramseyer y Garling, 1998; Howarth *et al.*, 2000). Por otro lado, las heces sirven como sustrato para la proliferación de organismos patógenos que provocan enfermedades en el cultivo e incrementan la demanda de oxígeno, lo cual puede llevar a la creación de zonas anóxicas. Howarth y col. (2000) mencionan que en los Estados Unidos el nitrógeno contribuye a la degradación de ríos costeros, bahías y mares, siendo particularmente dañino en estos sistemas.

5.3. EFECTO DEL PESO DEL PEZ SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL NITRÓGENO.

En nuestro trabajo, para calcular la utilización del nitrógeno, hemos utilizado doradas que pueden dividirse en base a la talla en tres clases: peces menores que 15 grs, peces de 30 grs y peces entre 120-150 grs. Conocemos que la tasa metabólica (u otra variable biológica) está relacionada con el peso del pez, entre otros factores, y se reduce con el incremento de la talla y la edad, bajo un mantenimiento a temperaturas constantes (Porter *et al.*, 1987; Wilson, 1989; Jobling, 1994; Dosdat *et al.*, 1996; Lupatsch *et al.*, 1998).

En el presente estudio se realizó el balance de nitrógeno para doradas mantenidas a una temperatura entre 21-25°C (la temperatura de máximo crecimiento para esta especie es de 25-26°C, Calderer y Cardona, 1993; García-Alcázar *et al.*, 1994), las cuales fueron alimentadas con dietas de un contenido de carbohidratos entre 16-18% y un contenido proteico de 50-55%. Porter *et al.* (1987) determinan una proporción entre la excreción de amonio y el nitrógeno ingerido (AT_{exc}/N_{ing}) de alrededor del 30% en doradas de 3, 40 y 90 grs, destinando para el crecimiento aproximadamente un 30% del nitrógeno ingerido. En el trabajo de Dosdat y colaboradores (1996), el amonio excretado significó el 34.77 % del nitrógeno ingerido para los peces de 13 grs, y el 32.27% para los de 146 grs. A pesar de que las fracciones de amonio excretado variaron entre algunos de nuestros experimentos, esta fracción significó entre el 15% y 30% del nitrógeno ingerido para nuestro trabajo, valores en coincidencia de los reportados por los autores mencionados. Los niveles más bajos de amonio pueden deberse a la diferencia de temperaturas de mantenimiento utilizadas en cada experimento y los trabajos mencionados. El hecho de que se presente una menor excreción en forma de amonio para algunos experimentos, se tradujo en una mayor cantidad de proteínas disponibles para el crecimiento; estas diferencias pueden deberse a que nosotros trabajamos con temperaturas más cercanas a las reportadas como óptimas para el máximo crecimiento de la dorada.

Las tasas de excreción de amonio son consistentes con aquellas reportadas por otros autores para doradas de estas tallas (<30 grs y 120-150 grs; 400-450 mg N-NH₄⁺/kg pez.día y 116 mg N-NH₄⁺/kg pez.día, respectivamente). La excreción de amonio referida por unidad de biomasa en los trabajos mencionados (Echevarría *et al.*, 1993; Robaina *et al.*, 1995; Dosdat *et al.*, 1996), fue afectada por la talla de la dorada, reduciéndose con el incremento de la talla del pez. Echevarría y col. (1993) encontraron que las doradas de sus experimentos (280 grs) presentaron tasas de excreción de amonio menores a las que reportan Porter y colaboradores (1987) para juveniles de entre 3 y 45 grs de esta especie (en ambos casos mantenidos a 23°C).

Los niveles de nitrógeno fecal en el presente trabajo (8.2-14.5%) se encuentran en el rango reportado anteriormente para la dorada y otros peces, al igual que la retención de proteínas (25-37%) (Porter *et al.*, 1987; Dosdat *et al.*, 1996). Por otro lado, las doradas de mayor tamaño presentaron menores tasas de crecimiento que las doradas menores de 30 grs (Narbaiza, tesis doctoral en preparación).

En algunos trabajos con dorada se ha encontrado una relación entre el contenido de nitrógeno en las heces y la talla del pez (Dosdat *et al.*, 1996), pues juveniles de *Sparus aurata* con una talla de 146 grs, producen más nitrógeno fecal que juveniles de 13 grs. Por su parte Porter y col. (1987) encuentran un comportamiento similar para el nitrógeno fecal, aportando más nitrógeno por esta fuente los peces de 90 grs (5.7% del N ingerido) que los peces de 40 grs (4.7%), además que los peces de menor talla retienen más proteínas. En otro trabajo con la dorada mantenida a 23-24°C y alimentada a una ración del 2% y 3% del peso corporal, Lupatsch y colaboradores (1998) encontraron un mejor crecimiento en los peces de

90 grs (0.59-0.84 gramos/día) que en peces de 30 grs (0.73-1.05 gramos/día), pero no encontraron diferencias en cuanto a la retención proteica, a pesar de que estos últimos fueron alimentados con una dieta que contenía casi el doble de proteínas, por lo cual esta diferencia en el crecimiento se debe al metabolismo propio de la edad del pez, el cual se mantiene en una fase de mayor crecimiento. En nuestro trabajo, los peces de mayor talla (146 gramos) aportaron más nitrógeno a través de las heces y presentaron una mayor retención proteica y una reducción en la pérdida de nitrógeno por otras fuentes (urea + aminoácidos + $\text{NO}_2 + \text{NO}_3 = \text{N residual}$). Como se puede observar, los resultados sobre la utilización del nitrógeno en la dorada han sido muy variables en la literatura, dependiendo de las condiciones de cultivo y el manejo de la alimentación.

Lupatsch y Kissil (1998) aplicaron un modelo sencillo para evaluar una dieta comercial (46% proteínas/~30% carbohidratos/11.5% lípidos) para una temperatura de 23°C, y predecir la utilización del nitrógeno y el fósforo dietarios durante un ciclo de producción de dorada (peso inicial:1 gr; peso final:400 grs). En este caso, el modelo determinó que las tasas de crecimiento se incrementaron con el aumento de la talla de la dorada. De manera inversa, la eficiencia de utilización de los nutrientes se reduce con el incremento en la talla del pez.

Reforzando la diferencia encontrada entre el metabolismo y la talla del pez, Tátrai (1986) encontró en la brema *A. brama* una correlación positiva entre la retención proteica y la talla, este patrón coincide con los resultados de nuestro trabajo, encontrando una retención proteica del 36.6% para las doradas de 146 grs, mientras que los peces menores de 30 grs presentaron una retención proteica del 31-32%. Junto con nuestros resultados, lo anterior representa una capacidad de adaptación del metabolismo de algunos espáridos a lo largo de la etapa de crecimiento, como menciona Brafield (1985).

Existe un vacío en lo que respecta a trabajos que conjuguen un balance energético o de nitrógeno y la talla del pez (solo encontramos valores predictivos en el trabajo de Lupatsch y Kissil, 1998), por lo que solo podemos observar el efecto de la talla del pez sobre el balance de nitrógeno al comparar algunos elementos del mismo reportados en diferentes trabajos (ver tabla A-I del anexo). Por ejemplo, algunos autores describen la dependencia de la excreción nitrogenada (amonio y/o urea) debido a la talla del pez para las tilapias *Oreochromis niloticus* X *O. aureus* (Tung y Shiau, 1993; en Shiau, 1997), las truchas *O. mykiss* y *S. trutta* (Dosdat *et al.*, 1996), la lubina *D. labrax* (Dosdat *et al.*, 1996), los peces planos *S. maximus* (Dosdat *et al.*, 1996) y *P. platessa* (Jobling, 1981a), además de la carpa *Ctenopharyngodon idella* (Carter y Brafield, 1992). La excreción nitrogenada fue inversa al tamaño corporal en las mencionadas especies.

Así mismo, se ha visto que los peces planos de una talla menor que 60 grs (Carter *et al.*, 1998; Oliva-Teles *et al.*, 1999), presentan tasas de crecimiento mayores que los peces de 140 grs (Helland y Grisdale-Helland, 1998). Además, el rodaballo *S. maximus* y el lenguado *P. flesus*, retienen mayor proporción de proteínas que otro pez plano (*Hippoglossus hippoglossus*) de 140 grs.

En el caso de la lubina *D. labrax*, además que los peces de mayor talla excretan menor cantidad de nitrógeno por unidad de masa (Robaina *et al.*, 1999; Peres y Oliva-Teles, 2002), se ha encontrado que las lubinas de 75 grs (Ballestrazzi *et al.*, 1994) retienen mayor cantidad de proteínas que los peces de 6 grs (Peres y Oliva-Teles, 2002).

La tilapia híbrida *Oreochromis niloticus* X *O. aureus* (Shiau, 1997) presentó menores tasas de retención proteica y de crecimiento para los peces de mayor talla, aunque cuando la fuente de carbohidratos es la glucosa en vez del almidón, el comportamiento se invierte. Lo anterior demuestra dos cosas: que la calidad de los carbohidratos del alimento determina el

aprovechamiento de los mismos, lo cual puede presentar un efecto combinado con la talla del pez; y que la utilización de los carbohidratos es afectada por la talla del pez, siendo un tipo de carbohidratos mejor aprovechados por peces de determinada talla.

De acuerdo a los resultados encontrados en nuestro trabajo, las doradas con talla mayor a 130 gramos presentan menores tasas de crecimiento y pierden menos nitrógeno por las vías gluconeogénicas para proveer energía al pez (reflejado en la excreción de amonio). Además presentan una retención proteica mayor que los peces menores que 30 grs, indicando que los peces de mayor talla utilizan más eficientemente las proteínas que los peces pequeños, y los peces de menor talla presentan un gasto energético mucho mayor que los peces de mayor talla, lo cual es coherente, pues utilizan la energía para el crecimiento, como se ha comprobado también en otras especies de teleósteos.

5.4. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL ALIMENTO SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL NITRÓGENO.

Existe bastante información en los teleósteos que relaciona la calidad del alimento con parámetros que reflejan la eficiencia de utilización del mismo y sus componentes (retención de proteínas, crecimiento, actividad hepática de enzimas, excreción de amonio, niveles de amonio y glucosa en la sangre, tasas de respiración, etc) (Marais y Kissil, 1979; Porter *et al.*, 1987; Bonamusa, 1991; Vergara y Jauncey, 1991; Robaina *et al.*, 1995; Woo y Kelly, 1995; Dosdat *et al.*, 1996; Metón *et al.*, 1999b, 2000; Somanath *et al.*, 2000). Sin embargo, para los espáridos existen pocos trabajos en los que se relaciona la excreción nitrogenada y la utilización de las proteínas con el nivel de ingesta de las mismas, y los pocos que hay se realizan bajo una alta variabilidad de tallas, condiciones ambientales y de alimentación, aportando información limitada (ver tabla V-I en anexo), lo cual hace más difícil su comparación.

Se conoce que hay diferencias en los requerimientos proteicos de los diferentes grupos de peces, en relación a sus hábitos alimenticios (Oliva-Teles, 2000). Por ejemplo, para la dorada *Sparus aurata*, la lubina *Dicentrarchus labrax* y el rodaballo *Scophthalmus maximus*, peces carnívoros (Kaushik, 1997; Oliva-Teles, 2000); durante la etapa de engorde los requerimientos proteicos son de 45-48% de la dieta (mayores requerimientos para los alevines y hasta 50% para la lubina), mientras que para los ciprínidos, las tilapias y los ictalúridos, peces herbívoros y omnívoros, los requerimientos proteicos rondan el 30-40% de la dieta (Tacon y Cowey, 1985; Jobling, 1994). Por otro lado, los requerimientos proteicos en peces de agua dulce son menores que los de los peces marinos, de esta manera los salmónidos (peces carnívoros), presentan requerimientos proteicos que rondan entre el 38-42% de la dieta (Kaushik, 1997).

En nuestro caso utilizamos cuatro dietas con 4 niveles proteicos (46.6, 53.8, 57.0 y 60.0%) y cuatro niveles de carbohidratos (29.3, 20.2, 15.0 y 9.1%), significando estos últimos una sustitución aproximada del 5% para cada nivel de proteínas. La excreción de nitrógeno total y de amonio presentaron una correlación positiva con el nivel proteico de la dieta, aunque por otro lado, el nitrógeno fecal se comportó de manera inversa. No se encontraron diferencias significativas en la retención de las proteínas entre las doradas de los distintos tratamientos, excepto para la dieta con mayor contenido de proteínas (60%) y menor contenido de carbohidratos (9.1%), presentando los peces alimentados con esta dieta la retención proteica más pobre (27.5% del nitrógeno ingerido, contra 31.0-32.5% de los otros tratamientos). La mayor eficiencia de utilización del alimento y las proteínas fueron encontradas en las doradas alimentadas con las dietas intermedias.

Marais y Kissil (1979) encontraron que el nivel mínimo proteico necesario para asegurar el crecimiento en la dorada era del 40% de la dieta (tomando en cuenta que los niveles de carbohidratos que trabajó representaron también el 40% de la dieta), mientras que en otros trabajos se encontró un incremento de la utilización de las mismas con este nivel proteico (Woo y Kelly, 1995; Dosdat *et al.*, 1996). Un incremento del contenido proteico en el alimento provoca un aumento en la actividad de la tripsina en el intestino de la brema *Sparus sarba* (Woo y Kelly, 1995), lo cual provoca también un aumento de la excreción de amonio. En el presente trabajo la máxima retención proteica (NPU) se encontró para las doradas alimentadas con las dos dietas de un mayor contenido de carbohidratos (niveles de 46.56-53.8% de proteínas y 20.2-29.3% de carbohidratos), significando entre el 27-32.5% del nitrógeno ingerido. En otros trabajos se ha encontrado que una dieta con un valor 56% de proteínas y 6.0% de carbohidratos, aporta una retención proteica del 25% en doradas de 40 grs (Robaina *et al.*, 1995), lo cual coincide con la retención proteica encontrada para los peces de nuestro trabajo. Vergara y col. (1996a), por su parte, encuentran que un nivel proteico de 55% en el alimento asegura la máxima tasa de crecimiento en la misma especie, pero si el

nivel de lípidos se incrementa en el alimento, los requerimientos de proteínas para mantener el crecimiento se reducen a un 46% (Vergara *et al.*, 1996b).

Los peces planos presentan menores tasas de excreción que en el resto de los teleósteos (Jobling, 1981a; Dosdat *et al.*, 1996; en la tabla A-I del anexo), aunque el patrón también se cumple, las tasas de excreción de amonio se incrementan de acuerdo al aumento en la ingesta de proteínas, medido a través del tamaño de la ración (Carter *et al.*, 1998). Se ha reportado que el incremento del nivel proteico en la dieta tiene un efecto sobre la excreción de amonio pero no se incrementa la utilización de las proteínas. Cai y colaboradores (1996) observaron que al alimentar a la trucha arcoiris *O. mykiss* con un nivel excesivo de proteínas (45%) se produce un incremento en la excreción de amonio pero no altera las tasas de crecimiento; en cambio, cuando se le alimentó con un nivel proteico de 40%, las proteínas son aprovechadas por el pez para fines de crecimiento, reduciéndose la excreción de amonio.

Como se ha visto, los teleósteos tienen una alta habilidad para utilizar las proteínas; aunque presentan una pobre capacidad para metabolizar los carbohidratos (especialmente los peces carnívoros). Las proteínas son utilizadas por el metabolismo energético del pez solo cuando los carbohidratos son escasos en la dieta. La menor capacidad para digerir y metabolizar los carbohidratos que presentan los peces marinos y los carnívoros se debe a que la actividad de las amilasas (enzimas) en su tracto digestivo es más limitada que otros teleósteos (Oliva-Teles, 2000). Debido a lo anterior, los carbohidratos suelen ser escasos en las dietas de los carnívoros (entre el 10-20% de la dieta, Vergara y Jauncey, 1991; Wilson, 1994). Sin embargo, se ha demostrado que la dorada posee una mayor capacidad de tolerar altos niveles de carbohidratos en la dieta que otros peces carnívoros como la lubina y la trucha arcoiris, siendo utilizados con más eficiencia (Wilson, 1994; Peres *et al.*, 1999; Caseras, 2000; Metón *et al.*, 2000), pues para la dorada se presenta una mayor actividad de enzimas amilasas que en estas especies (Oliva-Teles, 2000), lo cual apunta a una mejor utilización de niveles altos de carbohidratos en la dieta con el objetivo de un ahorro proteico en la dorada. Hay que tomar en cuenta que la eficiencia de digestibilidad de los carbohidratos también depende del tipo de carbohidratos (complejidad de la molécula), tratamiento previo de los carbohidratos y la cantidad ingerida de estos (Oliva-Teles, 2000).

La reducción de los residuos nitrogenados como producto del metabolismo energético y el mejoramiento de la utilización proteica para la síntesis de tejidos del pez no se puede llevar a cabo solo con una reducción del nivel proteico en las dietas. Esto solo provoca una reducción de los niveles de excreción nitrogenada, como lo mencionan Jauncey (1982) y Cai y colaboradores (1996) para juveniles de tilapia y trucha arcoiris, respectivamente. Para otros teleósteos se ha demostrado que la eficiencia de utilización proteica ha mejorado cuando parte de la energía proteica proveniente de la dieta fue sustituida parcialmente por otra fuente como los carbohidratos (Austreng *et al.*, 1977; Rychly, 1980; Gallagher y Matthews, 1987; Woo y Kelly, 1995) o los lípidos (Brauge *et al.*, 1995; Vergara *et al.*, 1996b; Vergara y Jauncey, 1997).

Brauge y colaboradores (1995) no encontraron cambios en la excreción de amonio, el crecimiento y la retención proteica para la trucha con un peso de 70 grs, cuando fueron alimentada con un nivel proteico del 43% de la dieta y distintos niveles de carbohidratos (20%, 25% y 30%; ver tabla A-I en el anexo). En este caso, la sustitución parcial de las proteínas por carbohidratos en la dieta no mejoró el metabolismo de la trucha, aunque el nivel de retención proteica fue para este caso superior a la que se ha descrito en otros trabajos y la que se encontró para la dorada en el presente trabajo.

Shiau y Peng (1993; en Shiau, 1997), condujeron un estudio para evaluar el efecto de ahorro proteico por el incremento de los carbohidratos en la dieta de juveniles de la tilapia híbrida

Oreochromis niloticus X *O. aureus*. Demostraron que los peces retuvieron más proteínas cuando el nivel de estas fue menor (24-28%) y el contenido de carbohidratos fue alto (37-41%), aunque el crecimiento se vio reducido de forma notable.

Por otro lado, Ng y Wilson (1997) trabajaron con el bagre *Ictalurus punctatus*, alimentado con un nivel de 30% de proteínas en las dietas y en las que se utilizaron dos fuentes distintas de carbohidratos (glucosa y dextrina al 33%). La utilización de las dietas y nutrientes dependieron del tipo de carbohidratos en la dieta, encontrando una mayor ganancia de peso, eficiencia de utilización del alimento y de las proteínas para los peces alimentados con la dieta que contenía dextrina como fuente de carbohidratos, que en los peces alimentados con glucosa.

Como se ha visto, los requerimientos proteicos para la dorada son más altos que en los salmónidos y las tilapias. La dorada y estas especies presentan la capacidad de utilizar mejor las proteínas al utilizar altos niveles de carbohidratos en la dieta en sustitución parcial de proteínas, lo cual conduce a una reducción de la excreción de amonio y un efecto de ahorro proteico en las dietas.

Incluso en algunos trabajos realizados con la dorada y trucha, la sustitución de las proteínas por lípidos en las dietas lleva, de manera similar que los carbohidratos, a mejorar el metabolismo de los carbohidratos e incrementar el crecimiento, la utilización de las proteínas y la conversión del alimento (Vergara *et al.*, 1996b, Vergara y Jauncey, 1997; Santinha *et al.*, 1999; Caseras, 2000), aunque hay que tomar en cuenta que los lípidos, junto con las proteínas son los nutrientes más caros en las dietas (Brauge *et al.*, 1995), por lo cual los carbohidratos siguen representando una mejor opción para esta sustitución de fuente energética. Debido a que no es objetivo de este estudio evaluar a los lípidos como fuente alternativa de energía, este es un tema que no se discutirá, aunque si se propone como un objetivo para trabajos futuros.

En el presente trabajo observamos el efecto que presentó la sustitución parcial de la fuente de energía en la dieta sobre la reducción de la excreción de amonio, el mejoramiento de la utilización del alimento y la retención proteica. Los resultados fortalecen la idea de una mejor regulación metabólica en la dorada al utilizar una dieta con un contenido proteico de entre 46-54% y un 20-30% de carbohidratos; lo cual redundaría en un ahorro de proteínas, el ingrediente más costoso del alimento. Estos niveles de proteínas y carbohidratos, por otro lado, mantienen un incremento en la composición de proteínas corporales (Serra, 1999) y aseguran buenas tasas de crecimiento (Narbaiza, *op cit.*)

Además de las ventajas mencionadas, estos resultados apuntan a una reducción notable del aporte de residuos solubles nitrogenados dentro del cultivo y al medio natural, eliminando factores que afectan el buen desarrollo del cultivo y otras comunidades naturales de organismos (estrés fisiológico, entre otros); asegurando, por otro lado, que la proteína sea adecuadamente utilizada en la reparación y construcción de tejidos, mantenimiento de las funciones hormonales, producción de sangre y otras funciones, como conviene al piscicultor.

5.5. EFECTO DEL NIVEL DE ALIMENTACIÓN SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL NITRÓGENO.

Otro de los factores nutricionales que afectan sobre la excreción de nitrógeno es el tamaño de la ración alimenticia. Encontramos diferencias entre los niveles de excreción de amonio de los distintos niveles de ración probados para dos temperaturas distintas (15°C y 25°C, ver figura 4-8). Los estudios que incluyen el efecto del nivel de alimentación sobre la utilización de las proteínas son escasos en los teleósteos, y prácticamente nulos para los espáridos. Sin embargo, como los efectos debidos al tamaño de la ración sobre estos parámetros son los mismo que los provocados por el nivel proteico de las dietas (en ambos casos hablamos esencialmente de un nivel de ingesta proteica), podemos comparar trabajos en base al nivel de proteínas dietarias ingeridas. Un aspecto importante relacionado a la alimentación es el manejo de la ración de alimento durante el día, pues una distribución a lo largo del día resultar más beneficioso al mejorar la utilización del alimento y de las proteínas, alcanzando un mejor crecimiento y composición corporal en la dorada, como lo hemos mencionado en el apartado 5.1.2.

Las mayores tasas de excreción de amonio (por intervalos y por día) se presentaron en los peces alimentados a saciedad, comparada con la de los peces alimentados con una ración más baja, independientemente de la temperatura. La excreción diaria de amonio fue casi un 24% más alta para los peces alimentados a saciedad y mantenidos a 15°C, mientras que esta diferencia entre los peces mantenidos a 25°C fue mayor (un 46.4%, ver tabla IV.VIII).

Como hemos visto, las mayores tasas de excreción de amonio se encontraron en las doradas que fueron alimentadas *ad libitum*. De igual manera, [Jobling \(1981a\)](#) determinó para el lenguado *Pleuronectes platessa* alimentado con poliquetos y mejillones, que los niveles de excreción de amonio se elevaron cuando se hubo un incremento de la temperatura, la talla del pez y/o el nivel de alimentación. Por su parte, [Fernández y col. \(1999\)](#), encontraron para juveniles de dorada (10-25 grs) que el tamaño de la ración de dieta afectó negativamente la digestibilidad del nitrógeno y el carbón, reduciéndose conforme se incrementó el tamaño de la ración. Este efecto fue aún mayor cuando se utilizaron dietas de menor calidad (debido al tipo y proporción de los nutrientes).

En algunos trabajos se ha determinado que cuando la temperatura es menor a la óptima de crecimiento recomendada para cada especie, el efecto del nivel de alimentación sobre la excreción de amonio no se percibe ([Tátrai, 1986](#)), por el contrario, cuando la temperatura es superior a la óptima de crecimiento, este efecto es mayor, pues suele combinarse con el incremento de la excreción de amonio debido al incremento en el tamaño del pez.

Por otro lado, el impacto del nivel de alimentación sobre la utilización de las proteínas depende de que la dieta se encuentre balanceada energéticamente, de hecho, para el experimento en el que medimos el efecto del nivel de alimentación sobre algunos parámetros, trabajamos con la dieta que mejores resultados nos aportó durante los primeros experimentos (53.8% de proteínas y 20.2% de carbohidratos). Tanto el NPU como el PER, reflejaron una mayor eficiencia de utilización proteica para las doradas alimentadas con una ración menor a la de saciedad (deficiente); este efecto fue más significativo para las doradas mantenidas a 15°C (ver figuras 4-9 y 4-10) que para las doradas mantenidas a 25°C. El mismo comportamiento se presentó para la eficiencia de utilización del alimento (FER), siendo mejor utilizado el alimento por las doradas alimentadas por debajo del nivel de saciedad. [Narbaiza \(tesis doctoral en preparación\)](#) encontró también que la dorada presentó una mayor eficiencia en la utilización del alimento cuando fue alimentada con un nivel por debajo de la saciedad, sin embargo, el crecimiento fue mayor cuando fueron alimentadas a saciedad, sobre todo cuando fueron mantenidas a la temperatura de máximo crecimiento (25°C).

Sobre esto, la revisión realizada por [Wood \(2001\)](#) determinó que el incremento de la ración incrementa la excreción de amonio, lo cual es acompañado por una reducción en la absorción de nitrógeno y un mejor crecimiento. Como hemos visto anteriormente, esto se presenta en nuestro trabajo y se complementa con los datos de crecimiento de [Narbaiza \(op. cit.\)](#). Esto nos lleva a discutir que los costes de la producción del amonio se incrementan con el aumento de la alimentación, por lo que la energía se redistribuye en las tareas prioritarias del metabolismo, es decir, el crecimiento. Por otro lado, se reduce la energía destinada a la síntesis de proteínas corporales ([Jobling, 1981a; Wood, 2001](#)).

Es importante desde el punto de vista de salud del cultivo y para reducir el impacto sobre el medio por la calidad del agua residual, que ajustemos en lo posible el nivel de alimentación a los requerimientos del pez para crecimiento y retención proteica. Si bien un nivel de $\frac{1}{2}$ saciedad redujo notoriamente el crecimiento en la dorada, un nivel cercano a saciedad permitirá incrementar la retención corporal de proteínas y reducir los residuos nitrogenados que van al medio acuático circundante. Es importante encontrar un nivel en el que el crecimiento sea afectado lo menos posible, como conviene al productor.

El uso de una ración menor a la de saciedad llevará a una mejoría en la utilización de las proteínas en beneficio de la ganancia de proteínas corporales en lugar del gasto energético (como es deseado por los piscicultores) y la consecuente reducción en la generación de residuos nitrogenados disueltos (como es deseado por los ambientalistas).

El comportamiento de las tasas de excreción ya ha sido utilizado anteriormente como un índice de la utilización de las proteínas en los peces por [Lyytikäinen y Jobling \(1998\)](#). En nuestro trabajo, durante el día las tasas de excreción presentaron dos picos máximos A_{max} cuando los peces fueron alimentados con una ración deficiente (ver figura 4-8). Ambos picos de excreción están relacionados con el manejo de la alimentación, ya que cada pico se asoció a uno de los periodos de alimentación. Encontramos que la aparición del segundo máximo de excreción dependió del tamaño de la ración, presentándose con retraso para los peces alimentados con la ración más baja (4 horas después de la segunda alimentación). El incremento de las tasas de excreción y la repetición de los picos máximos de excreción durante el día han sido relacionados anteriormente a factores de alimentación y del fotoperiodo para la dorada y otros peces ([Brett y Zalá, 1975; Echevarría et al., 1993; Dosdat et al., 1996](#)). En la dorada se debe a un ritmo biológico que está sincronizado con el número de alimentaciones durante el día, además del fotoperiodo, tal y como lo mencionan [Echevarría y sus colaboradores \(1993\)](#). Estos autores encontraron para doradas sometidas a ayuno, que el comportamiento de las tasas de excreción fue igual que antes de que se iniciara el periodo de ayuno, mostrando un patrón controlado por la alimentación y el fotoperiodo (momento en el que la luz era apagada).

En conclusión, en la dorada el nivel de alimentación afectó de forma combinada con la temperatura a la utilización de las proteínas dietarias. Por ello, cuando las doradas fueron mantenidas a 25°C utilizaron las proteínas con mayor eficiencia cuando fueron alimentadas a saciedad con una alta retención proteica, similar al de las doradas alimentadas a $\frac{1}{2}$ saciedad; sin embargo, presentaron una reducción en las pérdidas de nitrógeno a través de la excreción y las heces e incrementaron el nivel de pérdidas de nitrógeno residual. Por el contrario, cuando fueron mantenidas a 15°C, las proteínas fueron mejor utilizadas con un nivel de alimentación deficiente ($\frac{1}{2}$ saciedad), con una mayor retención de proteínas y reducción de las pérdidas de nitrógeno a través de las heces y otras formas no determinadas (residual), aunque con una pérdida mayor de N a través de la excreción de amonio. Esto refleja una diferencia en los requerimientos energéticos para la dorada bajo distintas temperaturas, aprovechando mejor las proteínas para el crecimiento a 25°C que a 15°C.

5.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL NITRÓGENO.

La temperatura de cultivo es otro de los factores que afectan significativamente sobre la excreción de nitrógeno, el nitrógeno particulado y la utilización de las proteínas en los peces (Jobling, 1981a; Tátrai y Penczak, 1985; Azevedo *et al.*, 1998; Lyytikäinen y Jobling, 1998) y como hemos visto, también en combinación con el nivel de alimentación. Este factor también afecta el crecimiento y la composición corporal de los peces (Alliot *et al.*, 1983; Hidalgo y Alliot, 1988; Peres y Oliva-Teles, 1999; Wood, 2001).

Anteriormente se ha estudiado la relación que hay entre la temperatura y el metabolismo de la dorada *Sparus aurata*, encontrando un efecto positivo del incremento de la temperatura sobre el metabolismo de los juveniles. El aumento de la temperatura de 16°C a 21°C y de 16°C a 26°C provocó en las doradas un incremento en el consumo de oxígeno (Guinea y Fernández, 1997). Al aplicar un incremento gradual de la temperatura de 19°C a 24.5°C durante un cultivo larvario en la dorada, el crecimiento se aceleró y mejoró la supervivencia de las larvas (Tandler *et al.*, 1989). Por otro lado, es necesario un incremento en la temperatura para disparar la espermatogénesis en doradas sexualmente maduras (300 grs de peso, Vilia y Canario, 1997).

En nuestro trabajo la supervivencia no fue afectada por la temperatura de cultivo, sin embargo, la excreción de amonio para los peces mantenidos a 25°C fue hasta un 71% más alta que aquellos que fueron mantenidos a 15°C, siempre que fueron alimentados a saciedad. Bajo este nivel de alimentación, la retención proteica fue hasta 62% más alta también en los peces mantenidos a 25°C, sin embargo, la pérdida de nitrógeno por las heces, fue un 19% menor. Según los datos de crecimiento obtenidos para las doradas que utilizamos nosotros, [Narbaiza \(tesis doctoral en preparación\)](#) encontró que la temperatura del agua controló el crecimiento, alcanzando tasas de crecimiento y tallas finales mayores para las doradas mantenidas a 25°C. En la mayoría de los trabajos realizados para distintas especies de teleósteos, la digestibilidad del nitrógeno fue alterada positivamente por la temperatura (Hidalgo *et al.*, 1987; Hidalgo y Alliot, 1988; Azevedo *et al.*, 1998). Nosotros no encontramos diferencia entre los tratamientos para este parámetro, presentándose una digestibilidad de las proteínas muy alta (91.8-93.3%). Es importante resaltar la capacidad que presentó la dorada en el presente estudio para admitir mayores niveles de alimentación a 25°C, reflejándose en las menores diferencias encontradas entre los tratamientos para la excreción y retención de nitrógeno, de igual manera en que es mencionado para la trucha arcoiris por [Wood \(2001\)](#). Esto demuestra el efecto combinado de la alimentación y la temperatura sobre el metabolismo de la dorada, pues el estímulo sobre el metabolismo debido a la alimentación fue mayor a la temperatura por debajo de la óptima de crecimiento (15°C), existiendo un menor margen de estimulación del metabolismo por el nivel de alimentación cuando el pez es mantenido a una temperatura cercana a la óptima de crecimiento, provocando un desperdicio de energía cuando se alimenta por encima de los requerimientos de las doradas.

Por otro lado se encontró para la brema japonesa *Chrysophrys major* (100-150 grs) que, debido al incremento de la temperatura en el medio, los niveles de aminoácidos se elevaron en el plasma y los niveles de glucosa se redujeron como respuesta a un incremento del metabolismo y de la demanda energética para esta especie. Este efecto se reflejó también en el incremento del catabolismo proteico en el músculo y el hígado (Woo, 1990). El catabolismo de las proteínas y la movilización de la glucosa en el plasma son controlados por la actividad de las enzimas envueltas en el metabolismo de los carbohidratos (ver figuras 1-8 y 1-9), el cual fue afectado por la temperatura. [Woo \(1990\)](#) concluye que el metabolismo de la brema se reorganiza en respuesta al incremento de la temperatura; reflejándose en una mayor excreción de amonio y una reducción de la retención proteica. Además, la glucosa en

la sangre es consumida con mayor velocidad provocando que las enzimas que controlan el metabolismo de la glucosa presenten una preferencia por la vía gluconeogénica (mayor actividad de la *Glu-6P* y la *Fru-1,6P₂asa*) para satisfacer los requerimientos energéticos del pez. En nuestro caso, la retención proteica fue mayor y la excreción de amonio fue menor para los peces mantenidos a 25°C frente a aquellos mantenidos a 15°C, lo cual es inverso a los resultados encontrados por Woo (1990) para la brema japonesa. Estas diferencias se deben a que las temperaturas probadas por este autor y la utilizada en nuestro estudio son distintas, pues nosotros utilizamos una temperatura máxima de 25°C (óptima para el crecimiento de la dorada), mientras que Woo manejó temperaturas cercanas a la letal para la brema japonesa (~32°C). Esto explica los cambios negativos sufridos por la brema en el estudio de este autor (reducción de la glucosa en el plasma y de la retención proteica e incremento de la excreción de amonio).

Como el sustrato inmediato para la síntesis de glucosa en ausencia o deficiencia de carbohidratos son las proteínas, estas son sacrificadas para la generación de energía. Como una consecuencia de la reducción en las demandas energéticas (*i.e.* reducción del metabolismo en invierno) a una temperatura baja, la *Glu-6P DH* beneficia el desvío de la glucosa hacia la depositación de grasas en los tejidos del pez a través de la vía de las pentosas.

Por otra parte, Tátrai (1986) encontró una reducción en las tasas de excreción de nitrógeno total (NT) en la brema *Abramis brama* al disminuir la temperatura de cultivo, mientras que la fracción de amonio total se incrementó para los peces mantenidos a una temperatura más baja. En cuanto a la utilización de las proteínas, Tátrai y Penczak (1985) encontraron que la retención de proteínas mejoró con el incremento en la temperatura de cultivo para juveniles de esta especie de un peso entre 75-1400 mg al ser alimentadas a saciedad. La retención proteica fue el doble para los peces mantenidos a 15°C, comparado a aquellos mantenidos a 10°C, y aún dos veces mayor para los peces mantenidos a 20°C.

La utilización del alimento y el crecimiento en alevines de la lubina *Dicentrarchus labrax*, fueron factores influenciados más significativamente por la temperatura que por la salinidad (Alliot *et al.*, 1983, Hidalgo *et al.*, 1987), aprovechando mejor el alimento para crecimiento a 20°C y 22°C que a 15°C. En cuanto a la retención de proteínas la lubina no mostró cambios, lo cual sugiere que la síntesis proteica puede necesitar más energía a 15°C que a 20°C para llevarse a cabo, esto explica la pobre digestibilidad del alimento que se presentó para los peces mantenidos a la temperatura más baja (15°C). Por otra parte, Hidalgo y Alliot (1988) encontraron que la temperatura afectó sobre los requerimientos proteicos de los alevines de lubina, incrementándose con el aumento de la temperatura, aunque parece haber un acuerdo general de que la temperatura no afecta los requerimientos de alimento y proteínas dietarias en los salmónidos (Hidalgo y Alliot, 1988; Peres y Oliva-Teles, 1999). Algunos autores coinciden con la existencia de un efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la utilización del alimento por la lubina (Russell *et al.*, 1996; Peres y Oliva-Teles, 1999), presentando una reducción de estos parámetros de acuerdo al decremento de la temperatura. Sin embargo, estos factores fueron mas afectados cuando el alimento fue limitado (Russell *et al.*, 1996). Por ejemplo, en condiciones de abundancia de alimento, las lubinas pueden crecer bien en aguas frías. Un incremento de la temperatura por encima del nivel óptimo de crecimiento (21-22°C para la lubina), limita el crecimiento debido al desvío de las proteínas dietarias para la producción de energía, lo cual es un desperdicio de proteínas.

Se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre el metabolismo, la excreción de amonio y el crecimiento de peces planos (Jobling, 1981a; Burel *et al.*, 1996). Por ejemplo, se ha encontrado para el rodaballo *S. maximus*, mantenido a distintas temperaturas (8, 11, 14, 17 y 20°C), una relación lineal entre la temperatura y el crecimiento (Burel *et al.*, 1996). La

retención de grasa se redujo de acuerdo al incremento de la temperatura. Sin embargo, la retención proteica no fue afectada por este parámetro ambiental.

Azevedo y colaboradores (1998) mencionan que el incremento de la temperatura provoca una reorganización metabólica en la trucha arcoiris *O. mykiss* reflejada en el incremento de la actividad de las enzimas digestivas. Además observaron una reducción significativa de la ingesta de alimento como respuesta a la disminución de la temperatura. Sin embargo, cuando se elevó la temperatura de 6°C a 15°C, la retención de energía fue mayor (de 42% a 47%). Para el caso de la lubina *Morone chrysops* X *M. saxatilis* de 3-4 grs, Keembiyehetty y Wilson (1998) se encontró que el crecimiento y la utilización de los nutrientes fueron significativamente mayores en los peces mantenidos a 26.7°C en comparación de los peces mantenidos a 32.2°C. El mayor consumo de alimento encontrado para los peces mantenidos a la temperatura más alta, indica un incremento en los requerimientos energéticos para el mantenimiento y/o la actividad en estos peces.

En nuestro trabajo, la eficiencia de utilización del alimento del pez fue significativamente menor a 15°C que a 25°C, independientemente del nivel de alimentación. Según algunos trabajos mencionados, esto responde a una reducción en la demanda de alimento cuando la temperatura baja, tal como se ha encontrado para la trucha (Azevedo *et al.*, 1998) y la lubina (Hidalgo y Alliot, 1988; Peres y Oliva-Teles, 1999). Lo anterior explica que las pérdidas nitrogenadas por vías distintas al amonio sean mayores en las doradas mantenidas a 15°C y la retención proteica sea menor para estas.

La retención proteica y la eficiencia de utilización del alimento significaron casi el doble para las doradas mantenidas a 25°C que en los peces mantenidos a 15°C, cuando fueron alimentados a saciedad (ver tabla V.VII). Sin embargo, cuando fueron alimentadas a un nivel deficiente, esta diferencia se redujo para la utilización del alimento y la retención proteica. Es obvio que el aporte energético fue mayor que los requerimientos de las doradas mantenidas a 15°C, pues como hemos visto, los requerimientos de alimento se reducen a temperaturas menores a la óptima de crecimiento. Narbaiza (*op. cit.*) encontró para estas mismas doradas, que el peso final fue un 30% mayor a 25°C que a 15°C (peso final de 8.6 grs y 5.8 grs, respectivamente). Lo anterior representa una capacidad de adaptación del metabolismo de la dorada cuando son mantenidas a 25°C, lo cual es reflejado en una mejor retención y utilización de las proteínas (para el crecimiento), y mayor utilización del alimento (ver figuras 4-9 y 4-10).

De acuerdo a los resultados encontrados, la temperatura de cultivo afectó significativamente las tasas de excreción a lo largo del día (ver figura 4-8) y la excreción total por día (ver tabla IV.VIII), como se esperaba; además, de que este efecto se potenció cuando, de forma combinada, la ración de alimento fue mayor que los requerimientos dietarios del pez (por encima del nivel de saciedad).

En cuanto al balance de nitrógeno para doradas alimentadas a saciedad, la retención significó la mayor utilización del mismo (16.6 y 26.9% a 15°C y 25°C, respectivamente), seguido del N fecal (8.2 y 6.9%) y la excreción de amonio (15.8% y 13.4%).

Las máximas tasas de excreción de amonio presentaron un componente del bio-ritmo exógeno (relacionado con la temperatura y el fotoperiodo) y otro endógeno relacionado con la alimentación. El control de la temperatura y la luz sobre el metabolismo de la dorada ya ha sido reportado en base al incremento en el consumo de oxígeno (Guinea y Fernández, 1997). Cuando el periodo de luz comienza se incrementa la excreción de amonio, por lo que el requerimiento de energía también.

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

Algunos tejidos animales contienen trazas de algunos metales que tienen un papel dentro de algunas funciones metabólicas. Por ejemplo, el cobalto se concentra en forma de cloruro en el tejido pancreático de algunos peces ligado a la reducción de los niveles de insulina en el plasma; teniendo un efecto sobre el crecimiento (Hertz *et al.*, 1989). Hertz y col. (1989) encontraron que el cromo modula la acción de la insulina, mejorando la utilización de la glucosa y reduciendo las tasas de gluconeogénesis. De la misma forma incrementa la utilización de los aminoácidos a la síntesis de proteínas en el tejido de la carpa. Por lo anterior, estos autores mencionan que el uso de sales de cromo (y cobalto) en las dietas pueden ser una herramienta para mejorar la utilización de las proteínas con fines de crecimiento e incrementar la utilización de la glucosa con fines energéticos.

Debido a la anterior tesis, han surgido dudas sobre la utilización del óxido de cromo como marcador inerte en los estudios de digestibilidad de los nutrientes, pues el resultado de estas puede estar siendo afectado, mencionando que en la tilapia y la trucha arcoiris, las digestibilidades de los nutrientes se ven afectadas por la inclusión de Cr_2O_3 en la dieta, siendo mayores en las tilapias alimentadas con un nivel de 0.5% de Cr_2O_3 (Shiau y Liang, 1995), y en el caso de las truchas al ser alimentadas con un nivel del 2.0% de Cr_2O_3 (Tacon y Rodríguez, 1984).

En el presente trabajo no encontramos un efecto significativo debido a la inclusión de cromo en las dietas sobre las máximas tasas de excreción de amonio A_{max} durante el día para las doradas (32-38 mg N-NH_4^+ /kg pez.hora). Porter y colaboradores (1987) reportaron anteriormente valores para los máximos de excreción de 70.0, 36.4 y 25.2 mg N-NH_4^+ /kg pez.hora para juveniles de 3, 40 y 90 grs, respectivamente; por lo que estos resultados coinciden con los correspondientes a la talla de pez utilizada en nuestro trabajo (36.5-44.5 grs).

Sin embargo, la excreción diaria de amonio fue afectada por la inclusión de cromo en las dietas, siendo menor en las doradas alimentadas con las dietas con cromo, 384-417 mg N-NH_4^+ /kg pez.día contra 510 mg N-NH_4^+ /kg pez.día del tratamiento sin cromo. Estas tasas de excreción coincidieron también con los resultados de otros autores, por ejemplo para doradas de 10, 40 y 90 grs (412, 365 y 353 mg N-NH_4^+ /kg pez.día, respectivamente; Porter *et al.*, 1987)

La digestibilidad del nitrógeno tampoco fue alterada con la inclusión de Cr_2O_3 en el alimento, resultado que ya ha sido encontrado para la dorada en un trabajo realizado anteriormente en nuestro laboratorio (Fernández *et al.*, 1999). Por otro lado, encontramos que la retención de las proteínas y el N fecal producido, además de la utilización del alimento (FER) fueron afectados por la inclusión de Cr_2O_3 en la dieta. Por ejemplo, la retención de nitrógeno fue menor solo cuando la inclusión de Cr_2O_3 significó el 0.5% de la dieta; pero en el caso del nitrógeno fecal, se presentaron valores menores para niveles de Cr_2O_3 en la dieta de 0.5% y 1.0% de la dieta. El alimento fue mejor utilizado cuando las doradas fueron alimentadas con las dietas que contenían los mayores niveles de Cr_2O_3 (1.0% y 2.0%) y la dieta sin cromo (figura 4-14).

Por otra parte, DeSilva y Perera (1983) reportan cierto rechazo selectivo de la tilapia por el óxido cromo. Al respecto, Fernández y colaboradores (1999) trabajaron con dorada, alimentándolas con una dieta sin Cr_2O_3 (*blanco*) y otras con niveles de 5, 10 y 20 grs/kg de alimento; cuya fuente de carbohidratos en las dietas fue el almidón. Ellos no encontraron efecto de la adición del Cr_2O_3 sobre el metabolismo de los carbohidratos, no presentando

diferencias entre los tratamientos para la utilización de las proteínas, el crecimiento o la eficiencia de alimentación; aunque los peces alimentados con las dietas que contuvieron una menor inclusión de Cr₂O₃ (0.5% y 1.0%) retuvieron más cromo que los peces alimentados con la dieta control. En cuanto a la actividad de algunas enzimas envueltas en el metabolismo de los carbohidratos en la dorada, [Fernández y colaboradores \(1999\)](#) encontraron que la actividad de la Fosfofructoquinasa (PFK) y otras enzimas no fue afectada por la inclusión de Cr₂O₃ en el alimento. Hay otros estudios que ponen de manifiesto la importancia que tiene esta enzima en la regulación del metabolismo de los carbohidratos en la dorada ([Bonamusa, 1991](#); [Metón, 1996](#); [Metón et al., 1999b, 2000](#); [Caseras, 2000](#)).

Se ha encontrado que la adición de Cr₂O₃ en las dietas afecta el metabolismo de los carbohidratos en los peces, y que el efecto depende del nivel y tipo de los carbohidratos contenidos en la dieta ([Jobling, 1981b](#); [Shiau y Chen, 1993](#); [Shiau y Liang, 1995](#)). [Jobling \(1981b\)](#) encontró para el lenguado *P. platessa* alimentado con una dieta que contenía Cr₂O₃, la eficiencia de digestión y absorción de las proteínas disminuyeron cuando la fuente de carbohidratos fue una mezcla de almidón crudo (en vez almidón precocido). Sin embargo en otros trabajos con la tilapia híbrida *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*, la inclusión de Cr₂O₃ en las dietas provocó un incremento en la ganancia de peso y depositación de la energía, independientemente de la fuente de carbohidratos ([Shiau y Lin, 1993](#)). El incremento en los parámetros mencionados fue más pronunciado (aunque menores) en los tratamientos en los que se utilizó a la glucosa como fuente de carbohidratos contra la utilización del almidón para este fin. En la tilapia alimentada con una glucosa como fuente de carbohidratos, la ganancia de peso, eficiencia de alimentación y utilización proteica fueron mayores cuando se utilizaron dietas con un nivel de Cr₂O₃ del 0.5%, que cuando se utilizaron niveles del 2% ([Shiau y Liang, 1995](#)), además de alterar la digestibilidad de los nutrientes y promoviendo la actividad de las enzimas envueltas en la glucólisis (mayor actividad de la 6PFK) sobre las envueltas en la gluconeogénesis (menor actividad de la *Glu-6Pasa*). [Shiau y Shy \(1998\)](#), sin embargo, al probar dietas con diferentes niveles de inclusión de Cr₂O₃ (entre 0 y 5000 mg/kg) cuya fuente de carbohidratos fue la glucosa, determinaron que el nivel de Cr₂O₃ que no afectó la digestibilidad de los nutrientes y que además mejoró la utilización de la glucosa, fue del 0.5% de la dieta.

Los anteriores resultados reflejan un marcado efecto positivo en la utilización de la glucosa (potenciando la acción de la insulina) y el almidón precocido como fuente de carbohidratos en el alimento, lo cual mejora la utilización de los carbohidratos con fines energéticos, la utilización de las proteínas para el crecimiento e inhibiendo algún efecto debido a la inclusión de Cr₂O₃ en la dieta ([Shiau y Chen, 1993](#); [Shiau y Lin, 1993](#)).

Por otra parte, [Ng y Wilson \(1997\)](#) encontraron que el bagre *Ictalurus punctatus* al ser alimentado con glucosa como fuente de carbohidratos en la dieta (independientemente del nivel de Cr₂O₃ en la dieta), presentó una mayor ganancia de peso, eficiencia de utilización del alimento y las proteínas, además de que los niveles de glucosa en el plasma se redujeron. No se encontraron efectos sobre la composición de los peces por el tipo de carbohidratos ni por el nivel de inclusión de Cr₂O₃ en el alimento. Debido a los resultados anteriores, estos autores concluyeron que la inclusión de Cr₂O₃ en la dieta no tiene un efecto sobre el metabolismo del bagre, por lo que es un buen marcador inerte para los estudios de digestibilidad en esta especie.

En nuestro trabajo la utilización de las proteínas y la digestibilidad del nitrógeno no fueron claramente afectados por la inclusión de Cr₂O₃ en el alimento. Sin embargo se encontró que la excreción de amonio por día y la producción de N fecal se reduce con la inclusión de Cr₂O₃ en la dieta, mientras que la retención proteica y la eficiencia del alimento se reducen solo para un nivel de Cr₂O₃ de 0.5% de la dieta. La reducción hasta en un 33% de la excreción

diaria de amonio apunta a una alteración del metabolismo de los carbohidratos con la inclusión de Cr₂O₃, lo que indica que las proteínas son desviadas para el crecimiento, lo cual es respaldado por los resultados de [Narbaiza \(tesis doctoral en preparación\)](#), quien encontró un aumento en la ganancia de peso en las doradas alimentadas con las dietas que contenía Cr₂O₃.

En conclusión, la inclusión del Cr₂O₃ en la dieta no afectó la digestibilidad del nitrógeno, pero si se reduce el nitrógeno fecal con una inclusión de 0.5% y 2.0% de óxido crómico, además que con un nivel de Cr₂O₃ del 0.5% la retención proteica fue afectada negativamente. Por lo anterior un nivel del 2.0% de Cr₂O₃ es recomendado para los estudios de digestibilidad de nutrientes en la dorada.

A pesar de que la inclusión de Cr₂O₃ en la dieta mejoró sensiblemente la utilización de los carbohidratos como fuente de energía en el presente estudio, es necesario el desarrollo de nuevas investigaciones que puedan sostener con más fuerza esta conclusión, se recomienda que para estos estudios se incluya un análisis en la actividad de las enzimas envueltas en el metabolismo de los carbohidratos.

5.8. EFECTOS DEL NITRÓGENO RESIDUAL SOBRE LOS CULTIVOS DE DORADA *Sparus aurata*.

5.8.1. Toxicidad del amonio (amonio no ionizado, amoníaco, ANI).

La exposición de los peces al amonio ambiental repercute sobre los niveles de excreción de amonio de estos (Wajsbrodt *et al.*, 1991; Person-Le Ruyet *et al.*, 1995; Person-Le Ruyet *et al.*, 1997a,b). Como el amonio no ionizado (ANI o amoníaco) es solo una fracción del amonio total, a medida que el nivel de amoníaco se incrementa en el medio, tanto la excreción de nitrógeno total como la excreción de amonio en los peces se reducirán (Fromm y Gillette, 1968; en Person-Le Ruyet *et al.*, 1995). Entre las repercusiones de la exposición de los peces a concentraciones de amonio se encuentran la reducción del nivel de O₂ en el plasma, obligando a los peces a incrementar su tasa de respiración. La hiperventilación ya ha sido citada como otro de los principales síntomas en respuesta a la exposición prolongada a concentraciones de amonio en el ambiente. La exposición durante tres días a distintas concentraciones de amonio en el medio acuático (2 y 20 µg N-ANI/litro=66 y 660 µg N-NH₄⁺/litro, respectivamente) afectó el crecimiento en las larvas de dorada *S. aurata*. El aumento de la talla en esta especie incrementa la tolerancia a la exposición de amonio (Guillén *et al.*, 1993).

Knights (1985) mencionó que el crecimiento de los teleósteos es generalmente inhibido con niveles de 100 µg N-ANI/dm³ (litro) aunque no se relaciona necesariamente con la pérdida de apetito. Wajsbrodt y col. (1991) encontraron que las doradas presentan una sensibilidad al amonio similar al resto de los teleósteos, a excepción de los salmónidos, los cuales presentan una sensibilidad mayor que la dorada (Person-Le Ruyet *et al.*, 1995; Person-Le Ruyet *et al.*, 1997a,b). De igual manera determinaron que la sensibilidad de la dorada con un peso menor que 3 grs, para una exposición a niveles de amonio no-ionizado de 1.27 mg/litro por 96 horas, depende también del nivel de oxígeno disuelto, presentándose antes una alta mortalidad cuando la saturación de O₂ es menor al 40%. El nivel de oxígeno decrece cuando las poblaciones de microorganismos se incrementan en el medio y cuando aparecen florecimientos de algas, lo cual es común en los cultivos si no se mantienen buenos sistemas de intercambio de agua. En las larvas de la brema japonesa *P. major* (también conocida como brema del mar rojo), el crecimiento se detuvo cuando los niveles de amoníaco fueron de 2-20 µg N-ANI/litro, además que el desarrollo del esqueleto (cartilago) de las larvas fue alterado a concentraciones mayores a 50 µg N-ANI/litro (Guillén *et al.*, 1993).

Wajsbrodt y colaboradores (1991) recomiendan que para las granjas piscicultoras que los niveles de amoníaco se mantengan por debajo de 64 µg N-ANI/litro para evitar efectos sobre el crecimiento y la supervivencia de la dorada, cuidando que la saturación de oxígeno durante los cultivos se mantenga por encima del 85%. dependiendo este del aumento en el nivel proteico del alimento así como el tamaño de la ración y la temperatura. Una revisión posterior sobre el efecto del ANI en la dorada (26 grs), realizada por el mismo grupo de trabajo (Wajsbrodt *et al.*, 1993), determinó que un nivel de amoníaco de 500 µg N-ANI/litro, limitó el crecimiento y la supervivencia. Cuando los niveles del amoníaco superaron los 700 µg N-ANI/litro; el efecto sobre estos parámetros fue más crítico, presentando daños en el riñón de la dorada. Este último trabajo recomienda niveles de amoníaco menores a 300 µg N-ANI/litro para evitar efectos sobre el desarrollo de las doradas. Se ha reportado que la exposición de juveniles de dorada (*S. aurata*), lubina (*D. labrax*) y rodaballo (*S. maximus*) por 96 horas a niveles de ANI entre 1.7 mg N-ANI/litro (lubina) y 2.5-2.6 mg N-ANI/litro (rodaballo y dorada), provocó una mortalidad del 50%. Sin embargo, cuando el periodo de exposición a estas concentraciones de amoníaco fue de pocas horas (*i.e.* 12-24 horas), estos peces presentaron una alta capacidad de recuperación (Person-Le Ruyet *et al.*, 1995). Esta capacidad de recuperación se incrementó cuando los peces fueron de mayor tamaño. Los

resultados para la dorada son consistentes entre sí, pues Tomasso (1994; en Person-Le Ruyet *et al.*, 1997b) reporta una concentración letal (LC50) de 1.06-2.14 mg N-ANI/litro cuando los peces fueron expuestos por 96 horas a esta concentración de amoníaco. Sin embargo, cuando los peces son sometidos a una larga exposición a un nivel de amoníaco menor al que causa mortalidad, los peces presentan algunos efectos como son la falta de apetito y, por lo tanto, la reducción del crecimiento.

A este respecto, Person-Le Ruyet y col. (1997a,c) encontraron que el crecimiento en el rodaballo de 14, 23 y 104 grs fue afectado negativamente cuando fueron expuestos por 28 días a un nivel de 0.41, 0.21 y 0.10 mg N-ANI/litro, respectivamente. Lo anterior indica que los peces de mayor talla presentaron una sensibilidad mayor al amoníaco que los peces pequeños, en el caso del rodaballo. En algunos peces se presentan adaptaciones fisiológicas cuando son expuestos a altas concentraciones de amonio en el medio, igual que cuando los peces son sometidos a algún estrés fisiológico como una exposición al aire (como en el caso en que los peces son sometidos a periodos de desecación en la zona intermareal); estos peces direccionan (por vías aún no muy claras) su metabolismo para la síntesis de la urea a partir de precursores (Mommssen y Walsh, 1992; Walsh *et al.*, 1993, 1994). En el caso de la tilapia, el metabolismo incrementa la excreción de la urea como una manera de reducir el efecto tóxico del amonio.

De acuerdo al factor de seguridad de 0.1 que recomienda la Agencia de Protección Ambiental (EPA), respaldado por los estudios mencionados, el nivel de seguridad para evitar efectos negativos sobre el desarrollo de los peces por la toxicidad del amoníaco, es de 100 µg N-ANI/litro para los peces marinos, y de 20 µg N-ANI/litro para los salmónidos (Person-Le Ruyet *et al.*, 1995). En los experimentos realizados en nuestro estudio no se presentaron niveles de amoníaco suficientemente altos para amenazar siquiera el apetito o el crecimiento de las doradas (como primeros síntomas de toxicidad), lo cual refleja la buena calidad de las condiciones de cultivo en las que se trabajaron (ver tabla A-VII en el anexo). Sin embargo, la información generada evidencia la importancia que tienen las medidas de control del amonio en su forma no ionizada (NH₃-N ó N-ANI), por su efecto tóxico sobre el metabolismo de los peces. Estas medidas contemplan la continuidad del esfuerzo sobre el mejoramiento de las dietas utilizadas en la piscicultura comercial y el manejo de la alimentación para reducir las tasas de excreción de N, lo cual supone además de reducir el impacto sobre el sistema acuático (calidad del agua y salud de las comunidades), la prevención de efectos sobre los organismos dentro del cultivo. La vigilancia y remediación inmediata de los niveles de amonio, temperatura, pH, salinidad y O₂ disuelto en el medio de cultivo es una medida importante; pues estos son un indicador del grado de toxicidad del amoníaco y el nivel de este en el medio. Además de que bajos niveles de ANI en el medio por periodos de tiempo prolongados, presentan efectos sobre el comportamiento de los organismos (perdida del apetito y estrés). Un factor fundamentalmente importante es el aporte y la renovación del agua en los cultivos.

Como se ha encontrado en nuestro trabajo para la dorada, los niveles de excreción de amonio dependen de la talla del pez, la temperatura, la calidad del alimento (ingesta de proteínas) y de las condiciones de alimentación (tamaño de ración y número de raciones). La fracción de amoníaco con respecto al amonio total, depende de la salinidad, el pH (Bower y Bidwell, 1978; Kelly *et al.*, 1994) y los niveles de oxígeno disuelto (Person-Le Ruyet *et al.*, 1997a). Las variaciones del amoníaco en nuestros experimentos siguieron el mismo comportamiento que el amonio total.

Al final de los periodos de incubación para medir las tasas de excreción de amonio, encontramos que en algunos casos el amoníaco acumulado alcanzó niveles de hasta 2.46 µg N-ANI/litro (equivalente a 64 µg N-NH₄⁺/litro). Según los diversos resultados expuestos por otros trabajos mencionados para la dorada y otros espáridos y los niveles de seguridad de la

EPA, este nivel de amoníaco no representa peligro para el crecimiento, la supervivencia u otros parámetros del metabolismo de la dorada *Sparus aurata*. Sin embargo, en cultivos comerciales si no es vigilado el nivel de amoníaco, una exposición por más de 3 días a este nivel limita el crecimiento en larvas de dorada y otros espáridos como la brema japonesa.

La sensibilidad de los teleósteos al amonio depende tanto de la talla como de la especie. La dorada es una especie que presenta una mayor resistencia a altos niveles de amonio y cierta recuperación cuando el tiempo de exposición es corto. Además en la dorada, el rodaballo y la tilapia, los peces de menor talla toleran más niveles moderados de amoníaco. Sin embargo hacen falta más estudios que involucren las respuestas fisiológicas a los altos niveles de amonio en el medio, los cuales hasta ahora difieren tanto con la talla del pez como con la especie. Hay que tomar en cuenta la propiedad acumulativa que presenta el amonio en el medio acuoso, por lo que la circulación del agua en el medio de cultivo cobra mayor importancia.

5.8.2. Utilización del nitrógeno o balance de nitrógeno.

Tomando en cuenta los resultados derivados del presente trabajo para la dorada *Sparus aurata* (como se explicó en la sección 1.2), se puede realizar un balance de nitrógeno con las propiedades óptimas de utilización del mismo, asumiendo el mismo para un engorde desde los 15 grs hasta 150 grs, manteniendo a los peces bajo condiciones ambientales de 21-25°C (temperatura de máximo crecimiento, 25-26°C) de temperatura y una salinidad de 38 psu. El nivel de alimentación recomendado para este balance está determinado por la talla del pez, siendo de 3-4% de la biomasa viva para juveniles en fases de preengorde-engorde (<15 grs); del 2% para doradas de engorde entre las tallas de 15-50 grs; y para los juveniles entre 50-150 grs una ración del 1% del PT (ver figura 5-1). El balance se realizó tomando en cuenta la composición de la dieta que ha dado mejores resultados para el crecimiento y la utilización de sus componentes energéticos en el presente trabajo. Esta dieta puede tener una composición de 50% proteínas, 25% carbohidratos (almidón gelatinizado como fuente) y 15% lípidos). La utilización de una dieta con estas propiedades ha demostrado reducir los residuos nitrogenados a través de la excreción (amonio y urea) así como de nitrógeno fecal; además de aportar una mejor utilización de las proteínas para crecimiento, gracias a que el alto nivel de carbohidratos mejoró el metabolismo de los mismos. La adaptación de los procesos metabólicos que explican el ahorro proteico encontrado, se describen en el último apartado de este capítulo.

Este balance de nitrógeno se puede acoplar a casos particulares de producción de una granja piscícola o un modelo simple de producción y crecimiento como el utilizado por [Lupatsch y Kissil \(1998\)](#) y asignar datos sobre la cantidad de alimento utilizado (y por tanto, nitrógeno) a las fracciones de la figura 5-1. Con datos sobre la carga en biomasa de los tanques o jaulas y la producción esperada de peces, podemos conocer con precisión la descarga de nitrógeno (disuelto y particulado) y amonio no ionizado en el medio ambiente. El conocimiento de esto es de suma utilidad para predecir los residuos provenientes de esta actividad, siendo importante su conocimiento tanto para los piscicultores como para las instituciones de gobierno que gestionan este tipo de actividades económicas. En muchos países no existen suficientes datos sobre los impactos que los residuos generados por la acuicultura tienen sobre el medio ambiente, lo cual limita la acción predictiva y en muchos casos, correctiva de las instituciones involucradas en la gestión ambiental. Es de importante interés seguir el comportamiento de estos residuos de acuerdo a las condiciones dinámicas y bioquímicas de la zona, pues hay que estimar que porcentaje del nitrógeno particulado va a ser acumulada en el fondo marino y que fracción va a ser dispersada por las condiciones hidrodinámicas locales. De manera similar, la fracción soluble se va a dispersar de acuerdo a la dinámica local, pero también es importante conocer como van a ser utilizadas y

transformadas por la acción de las bacterias, el fitoplancton y las algas. Por otro lado, el conocimiento del balance de nitrógeno permite a los piscicultores evaluar y predecir los efectos que pueda presentar sobre los peces la acumulación de amonio y una exposición prolongada al amonio (en sus dos fracciones).

La solución para la dorada es, para el caso de los cultivos en estanques de tierra, un aporte suficiente de agua que lleve a prevenir que la calidad del agua se deteriore debido al exceso de nitrógeno presente en el medio en sus diferentes formas (además del P y partículas orgánicas). Para el caso de los cultivos en jaulas, la solución es la elección adecuada de la zona para el cultivo, teniendo que cumplir esta zona, además de estar protegida, tener una buena hidrodinámica. La protección de la infraestructura es con dos objetivos principales: evitar la pérdida de las instalaciones por eventos de tormenta y mantener un acceso permanente a las mismas para la alimentación de los peces y el mantenimiento de las estructuras. En cuanto a la hidrodinámica, esta debe ser suficiente para asegurar un tiempo de residencia corto del agua y de esta manera, evitar el estrés por la acumulación del nitrógeno excretado (amonio y urea) y la eutrofización (por nitrógeno y fósforo).

El nitrógeno restante que conforma el nitrógeno soluble de las heces es en forma de NO_3 y NO_2 , formas que ayudan a incrementar la productividad primaria en algunas zonas, y que incluso cubren las deficiencias en la zona costera, donde nitrógeno es el principal limitante para llevar a cabo la producción primaria (Parsons *et al.*, 1977).

Perdidas metabólicas de nitrógeno: amonio y urea.

A pesar de que la excreción de amonio y urea se comportaron de forma similar a lo largo del día (figura 4-16), no se presenta una dependencia entre ambas, es decir, que el comportamiento de las tasas de excreción de amonio no afecta el comportamiento de la excreción de urea. La magnitud de las tasas de excreción de amonio ha respondido de manera positiva a la ingesta de nitrógeno (mayor nivel de proteínas dietarias y mayor ración de alimento), de manera coincidente a otras especies de teleósteos (Porter *et al.*, 1987, Brauge *et al.*, 1995; Dosdat *et al.*, 1996). Los resultados coinciden con los mencionados trabajos, existiendo una relación entre los incrementos de las tasas de excreción y el número de ocasiones en que se aporta alimento durante el día a las doradas. Estos resultados se refuerzan con el trabajo realizado por Brauge y col. (1995) para la trucha arcoiris, en el cual la proporción de lípidos y carbohidratos en la dieta utilizada, no afecta las tasas de excreción de amonio o el nitrógeno total excretado en 24 horas, lo cual deja a la excreción de nitrógeno como dependiente solamente de la cantidad de proteínas ingeridas. También Boyce y col. (1999) han definido que la producción de urea y aminos primarias es independiente de la vía fisiológica de producción del amonio total.

Tomando en cuenta solamente al amonio y la urea, el amonio excretado cada día fue de 116.28 mg N-NH_4^+ /kg pez.día, significando el 87.41% del nitrógeno excretado, mientras que la urea significó solo el 12.59% del mismo (16.72 mg N-Urea/kg pez.día). La proporción del amonio excretado, en referencia al nitrógeno total excretado, se encuentra en el rango reportado para esta variable en otros trabajos para la dorada (Robaina *et al.*, 1995; Dosdat *et al.*, 1996). Por otro lado, la proporción de urea medida por vez primera en nuestro laboratorio presentó un valor que corresponde de manera precisa con el reportado por Dosdat y col. (1996; tabla V.VIII), para la dorada mantenida bajo condiciones similares a la de estos autores (15-16°C, salinidad entre 35-38 y ración del 0.45-0.5% del peso/día) y de tallas muy cercanas (130-135 grs), además de coincidir con el rango reportado para otros teleósteos amoniotélicos (entre 13% y 46%) (Bret y Zala, 1975; Tátrai y Penczak, 1985; Sayer y Davenport, 1987; Mommsen y Walsh, 1992; Boyce, 1999). Esta fracción de excreción de amonio fue superior que el encontrado para las especies de agua dulce (46-80%, Brett y Zala,

1975) y concuerda con el rango reportado para otras especies marinas (75-93%, Sayer y Davenport, 1987).

Retención de nitrógeno.

Se encontró para este estudio que las proteínas se retuvieron en el pez con una eficiencia entre el 25-30%. Esta eficiencia puede ser influida negativamente por una ingesta excesiva de proteínas a través de un incremento en el nivel proteico del alimento o una ración alta. Algunos autores han encontrado que la talla del pez afecta negativamente la utilización de las proteínas (Lupatsch y Kissil, 1998). Lo anterior se ha comprobado por los resultados obtenidos en nuestro laboratorio para el crecimiento de la dorada (Narbaiza, tesis doctoral en preparación) y la composición corporal (Serra, 1999).

Perdidas no-metabólicas de nitrógeno: heces y resto de alimento.

Otra de las vías por las que el nitrógeno de la dieta es eliminado al medio es a través del material no absorbido presente en las heces y el alimento no ingerido. Sin embargo, las pérdidas a través de las heces son minoritarias (5-15%), y la mayor parte del nitrógeno en peces carnívoros como la dorada, se pierde a través de las excretas solubles debidas al catabolismo proteico (Cho y Kaushik, 1985; Mommsen y Walsh, 1992), como ya hemos explicado anteriormente (ver tabla A-IX en el anexo). Debido a que las digestibilidades del nitrógeno encontradas en el presente trabajo fueron muy altas (90%), la fracción de nitrógeno fecal fue equivalente al reportado en otros trabajos (8-10% del nitrógeno ingerido).

Debido a que el amonio total y la urea son los principales compuestos nitrogenados excretados, en pocos estudios se miden otros compuestos residuales como son las aminos primarias. Sin embargo, para algunos peces marinos, estos productos finales pueden significar cantidades importantes de nitrógeno bajo circunstancias especiales como el exceso de proteínas en la dieta, tamaño de la ración y temperaturas altas (Boyce, 1999); tal como lo hemos encontrado en el presente trabajo. El 20.81% del nitrógeno ingerido fue desechado en forma de aminoácidos libres a través de las heces y el alimento no ingerido; este valor es significativamente mayor que los reportados anteriormente por otros autores (Prosser, 1971; Cockcroft y Du Preez, 1989, 1990; ambos citados por Boyce, 1999) para un par de espáridos del Atlántico y Mediterráneo (*Lithognathus lithognathus* y *L. mormyrus*, respectivamente), quienes estimaron valores entre el 2-11% para esta fracción. Esta diferencia puede deberse a que en nuestro trabajo estos aminoácidos provengan también de las comunidades bacterianas presentes en el acuario, pues los periodos de incubación utilizados son lo bastante largos para permitir una multiplicación rápida de la colonia. En cuanto a la fracción de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ correspondió al 8.97% del nitrógeno ingerido. La importancia de esta fracción radica en que tampoco es medida en los estudios realizados para completar los balances de nitrógeno.

Las formas de nitrógeno anteriormente tratadas (aminoácidos + $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ + nitrógeno residual = nitrógeno soluble) conforman la fracción de nitrógeno soluble. Esta fracción de nitrógeno medido dentro del acuario ha resultado provenir en parte de los restos de alimento y en parte de las heces, significando junto con el nitrógeno excretado (amonio+urea) y la retención proteica, la fracción mayoritaria en el balance de nitrógeno (30% del nitrógeno ingerido, ver figura 5-1).

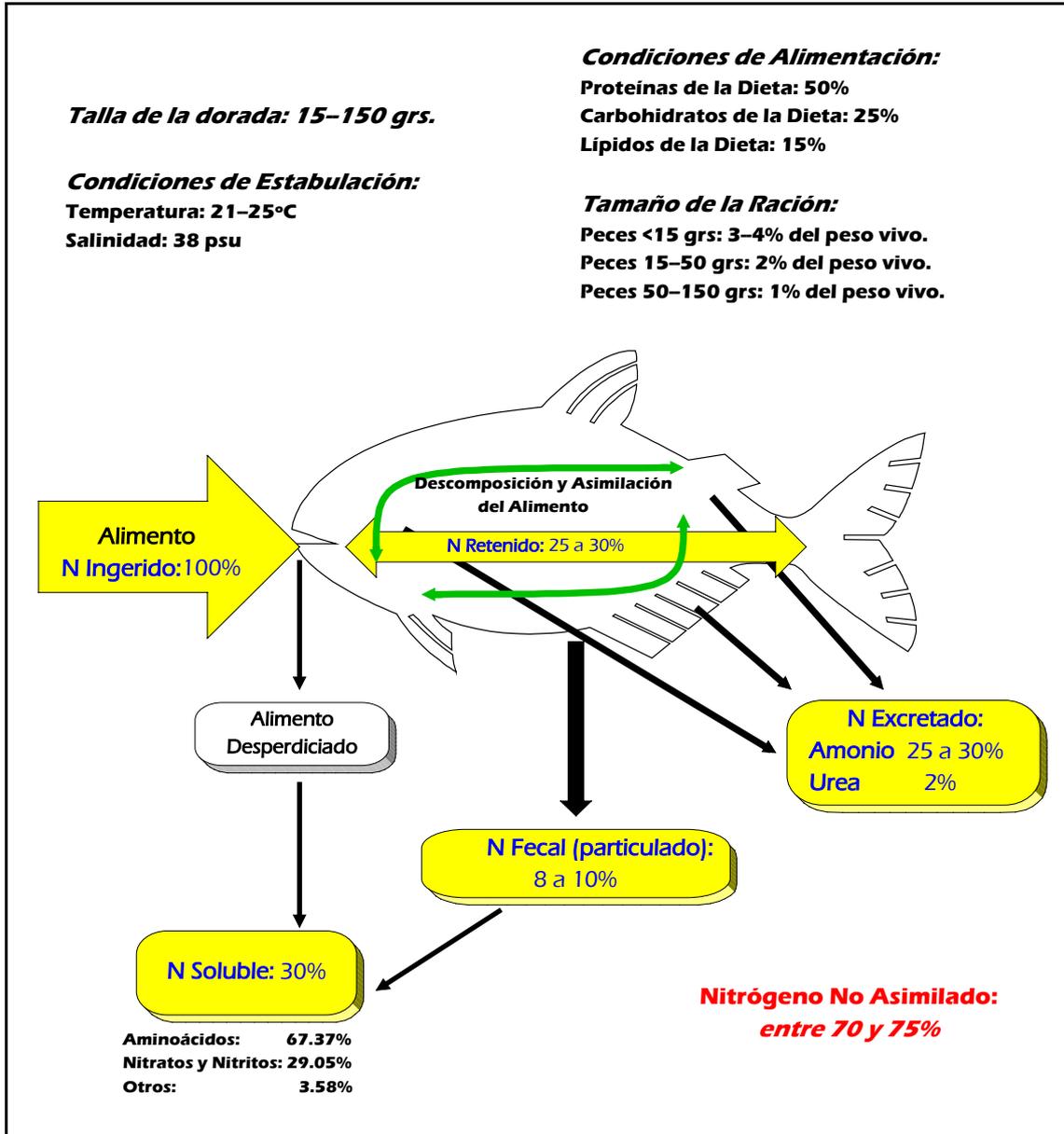


Figura 5-1. Balance de nitrógeno para la dorada *Sparus aurata*, utilizando las condiciones de estabulación y alimentación del presente estudio.

Regulación metabólica en la utilización del nitrógeno.

Como hemos visto, la dorada *Sparus aurata* presenta una buena capacidad de regulación metabólica frente a altos niveles de carbohidratos en las dietas, tal y como lo encontró Caseras (2000). Esto se reflejó en nuestro trabajo también en una reducción del nitrógeno excretado y mejoramiento de la retención proteica. La tolerancia que presenta la dorada a altos niveles de carbohidratos dietarios se refleja en la reducción de los residuos nitrogenados que llegan al medio y la reducción de los costos en las dietas como un efecto del ahorro de las proteínas dietarias (al ser las proteínas el nutriente más caro).

Lo anterior es posible gracias a la eficiente regulación nutricional del metabolismo de la dorada. Cuando se aportan dietas con alto contenido proteico, las cadenas de carbono de los aminoácidos (esqueletos carbonatados) son utilizadas para la síntesis hepática de glucosa (principal fuente de energía en las células) y los grupos amino de las proteínas son excretados. El hígado ejerce un control sobre el equilibrio entre la glucólisis (utilización de la glucosa como fuente de energía) y la gluconeogénesis (formación de glucosa), dependiendo de la disponibilidad de nutrientes en el medio, el estado energético y hormonal del pez (Bonamusa, 1991; Metón, 1996; Caseras, 2000).

La gluconeogénesis representa la síntesis de glucosa a partir de sustratos distintos a los carbohidratos; esta vía se ve beneficiada cuando las dietas son ricas en proteínas y deficientes en carbohidratos (ver figuras 1-7 y 1-8). La regulación nutricional en la dorada *Sparus aurata*, ejercida por la vía glucólisis/gluconeogénesis, se refleja en la actividad de las enzimas envueltas en el primer *ciclo de sustrato* (intervienen enzimas que catalizan reacciones opuestas), tales como la 6-Fosfofructo-1-quinasa (6PFK) para la vía glucolítica; por otro lado la Piruvato carboxilasa (PC) y Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) para la vía gluconeogénica (Bonamusa, 1991; Metón, 1996; Metón *et al.*, 1999a,b). A nivel hepático el punto de regulación para la formación del fosfoenolpiruvato o piruvato es en el que participan la enzima glucolítica Piruvatoquinasa (PK) y las enzimas gluconeogénicas Piruvato carboxilasa (PC) y Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK).

El segundo *ciclo de sustrato* se debe a la acción conjunta de la 6-Fosfofructo-1-quinasa (6PFK) por la vía glucolítica y la Fructosa 1,6 bifosfatasa (*Fru-1,6P₂asa* ó *FP₂asa*) por la vía gluconeogénica (Caseras, 2000). Hay que destacar el papel clave de la Fructosa 2,6 bifosfatasa (*Fru-2,6P₂asa*) como un potenciador alostérico de la 6PFK, a la vez que inhibe a la *Fru-1,6P₂asa*.

El último *ciclo de sustrato* que participa en la regulación metabólica de la glucólisis/gluconeogénesis es el que implica la interconversión entre la glucosa y la glucosa-6-fosfato (Glu-6P, ver figura 1-9); las enzimas que intervienen son la Glucoquinasa (GK) como la primera reacción de la glucólisis, y la Glucosa-6-fosfatasa (*Glu-6P*), la cual interviene en la etapa final de la gluconeogénesis y la glucogenólisis (degradación del glucógeno), promoviendo además la desfosforilación de la Glu-6P a glucosa.

En las tablas A-5 y A-6 (ver anexo) se muestran los resultados de algunos estudios realizados con la dorada para demostrar la regulación nutricional ejercida por las enzimas envueltas en el metabolismo de los carbohidratos bajo distintos parámetros de cultivo. De esta manera, Bonamusa (1991) encontró un incremento del flujo glucolítico en la dorada debido al incremento de los carbohidratos y la reducción del nivel de proteínas en la dieta (69% carbohidratos/17% proteínas), lo cual estimula la actividad hepática de las enzimas glucolíticas PFK y PK. Por el contrario, la actividad de las enzimas que llevan a la síntesis de glucosa en condiciones de abundancia de carbohidratos, se reduce, tal es el caso de la *Glu-6P DH*. Sin embargo la *Fru-1,6P₂asa*, no parece verse afectada por la reducción de carbohidratos

en la dieta. En otros trabajos que respaldan lo encontrado para la dorada (Metón, 1996; Metón *et al.*, 1999b, 2000; Caseras, 2000), se ha reportado el predominio de la vía glucolítica como una adaptación a una dieta con alto contenido en carbohidratos y deficientes en proteínas, lo cual explica la reducción en la excreción de amonio e incremento de la utilización y retención de las proteínas dietarias encontradas en nuestro trabajo. Al igual que en la dorada, el nivel de los carbohidratos en el alimento estimula la actividad de las enzimas que regulan los procesos glucólisis/gluconeogénesis, glucogenogénesis y *vía de las pentosas* (la *Glu-6P DH* y la *6-PG DH*) de otros peces como la trucha y la carpa (Panserat *et al.*, 2000).

Al estimular la vía de la glucólisis con altos niveles de carbohidratos y bajos niveles de proteínas, se incrementa la producción de piruvato y la producción de NADPH (a través de la *vía de las pentosas*), traducándose en la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis) y glucógeno (glucogenogénesis), la cual junto con la glucólisis llevan a la formación de grandes reservas energéticas, lo cual tiene un papel fundamental en procesos migratorios y de ayuno de algunos teleósteos. La importancia de estos procesos es que las proteínas provenientes de las dietas se utilizan o bien en el crecimiento y/o en la renovación celular (producción), en vez de la producción de energía por la vía gluconeogénica (con el amonio como producto residual) cuando en la dieta se utilizan niveles de carbohidratos por encima del 18.5% para el caso de la dorada.

En conclusión, se estima que la utilización de un nivel de proteínas entre 47-53% y un nivel de carbohidratos superior a 18% y menor a 30% en la dieta, mejora el metabolismo de los juveniles de dorada *Sparus aurata* de 15-150 grs, asegurando una máxima retención proteica, además de reducir notablemente la liberación de amonio, como se ha explicado en el apartado anterior. La dorada presenta una tolerancia importante para niveles altos de carbohidratos en la dieta, lo cual permite, a diferencia de otros teleósteos carnívoros, un ahorro proteico debido a la sustitución parcial de proteínas por carbohidratos en la dieta.