

# Capítulo 2:

# Objetivos



## 2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.

Los experimentos en el presente trabajo tienen la finalidad de cuantificar la excreción de compuestos nitrogenados en la dorada *Sparus aurata* en condiciones de laboratorio así como el efecto que tienen algunos factores nutricionales y ambientales sobre dicha excreción.

Un segundo objetivo consiste en establecer el balance de nitrógeno, para estimar el aprovechamiento del nitrógeno por los peces, y evaluar los efectos potenciales sobre la calidad del agua de cultivo.

Las metas particulares de este estudio son:

- ❖ Estudiar el efecto de la sustitución de proteínas por carbohidratos en el alimento sobre la tasa de excreción de amonio, el balance de nitrógeno y la utilización de las proteínas.
- ❖ Estudiar el efecto de la temperatura de cultivo y del tamaño de la ración sobre la excreción de nitrógeno en forma de amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ ), el balance de nitrógeno y la utilización de las proteínas por la dorada.
- ❖ Comprobar si la inclusión de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en la dieta presenta algún efecto sobre la excreción de amonio, el balance de nitrógeno y la utilización de las proteínas.
- ❖ Caracterizar las formas y proporciones de los metabolitos nitrogenados presentes en los residuos de excreción de la dorada *Sparus aurata*.



# Capítulo 3:

# Materiales y Métodos



### 3.1. DIETAS UTILIZADAS.

Para la alimentación de los peces de los primeros tres experimentos se utilizaron dietas comerciales fabricadas expresamente para nosotros por *NIDO Industrial*, los componentes de estas se presentan en la tabla III.I.

En todas estas dietas las proteínas procedían de harina de pescado blanco (*Norse LT-4*), aportado por *Sogem Ibérica* (Rubí; Barcelona, España); la fuente de los carbohidratos fue el almidón de maíz precocido (*Campo Ebro*, Zaragoza, España); y de los lípidos el aceite de pescado enriquecido con vitamina A (all-trans-retinol: 1 000 IU/gr) y vitamina D (colecalfiferol: 100 IU/gr), proveniente de *Bonafont Química* (Barcelona, España).

Los piensos de *NIDO Industrial* incluían además los complejos suplementarios de vitaminas y minerales esenciales para asegurar el desarrollo de los peces, los cuales se detallan a continuación.

*Mezcla de vitaminas (por kg de dieta):*

- ✿ Vitamina A o retinol (3 mg).
- ✿ Vitamina B<sub>1</sub> o tiamina.HCl (30 mg).
- ✿ Vitamina B<sub>2</sub> o riboflavina (24 mg).
- ✿ Vitamina B<sub>6</sub> o piridoxina.HCl (24 mg).
- ✿ Vitamina B<sub>12</sub> o cianocobalamina (0.12 mg).
- ✿ Vitamina C o ácido ascórbico (200 mg).
- ✿ Vitamina D<sub>3</sub> o colecalfiferol (25 mg).
- ✿ Vitamina E o acetato all-rac-tocoferol (60 mg).
- ✿ Ácido nicotínico (360 mg).
- ✿ Pantotenato cálcico (30 mg).
- ✿ Biotina (0.42 mg).
- ✿ Ácido fólico (4.8 mg).
- ✿ Menadiona • HNaSO<sub>3</sub> (10.6 mg).
- ✿ Cloruro de colina (3.2 mg).
- ✿ Mio-inositol (900 mg).

*Mezcla de minerales (por kg de dieta):*

- ✿ CaHPO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O (8.83 gr).
- ✿ CaCO<sub>3</sub> (2.56 gr).
- ✿ KCl (1.25 gr).
- ✿ MgO (1.0 gr).
- ✿ ZnO (90 mg).
- ✿ FeCO<sub>3</sub> (80 mg).
- ✿ MnO<sub>2</sub> (12.5 mg).
- ✿ CuSO<sub>4</sub> (7.5 mg).
- ✿ KI (1.5 mg).
- ✿ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0.28 mg).

La composición aproximada de las dietas se calculó de acuerdo a los siguientes análisis químicos estándar de la CEE: directivas 71/393 para humedad, 93/28 para proteína cruda por Kjeldahl, 71/393 para grasa cruda por extracción Soxhlet, y 71/250 para cenizas.

Los carbohidratos se calcularon por diferencia respecto al contenido en proteínas, lípidos y cenizas y el contenido de energía metabolizable se calculó a partir de los valores

recomendados por [Jobling \(1994\)](#) para los elementos calorigénicos que componen la dieta: proteínas: 5.76 kcal/gr; lípidos: 9.36 kcal/gr; carbohidratos: 4.08 kcal/gr.

Por otro lado, durante el último experimento (balance de nitrógeno), se utilizó la dieta comercial para la dorada de la casa DIBAO (*DIBAO Extruded*). La composición de esta dieta se presenta en la tabla I.II, la cual contiene un 47% de proteínas, 14.5% de carbohidratos y un 17% de grasa. La mezcla de vitaminas y minerales fue la siguiente:

*Mezcla de vitaminas (por kg de dieta):*

- ✿ Vitamina A (10 000 UI).
- ✿ Vitamina B<sub>1</sub> (25 mg).
- ✿ Vitamina B<sub>2</sub> (25 mg).
- ✿ Vitamina B<sub>6</sub> (16.5 mg).
- ✿ Vitamina B<sub>12</sub> (0.03 mg).
- ✿ Vitamina C (100 mg).
- ✿ Vitamina D<sub>3</sub> (3 000 UI).
- ✿ Vitamina E (120 mg).
- ✿ Vitamina H (0.76 mg).
- ✿ Vitamina K<sub>3</sub> (10 mg).
- ✿ Ácido Pantoténico (80 mg).
- ✿ Niacina (150 mg).
- ✿ Inositol (75 mg).

*Mezcla de minerales (por kg de dieta):*

- ✿ Mg (57.5 mg).
- ✿ Mn (15 mg).
- ✿ Colina (2 000 mg).
- ✿ Se (0.2 mg).
- ✿ Cu (1.5 mg).
- ✿ I (5 mg).
- ✿ Fe (2 mg).
- ✿ Zn (50 mg).
- ✿ Co (0.2 mg).



**Tabla III.I.** Composición de las dietas NOR de la casa NIDO Industrial, utilizadas en los experimentos con la dorada Sparus aurata.

DIETAS	NOR-1	NOR-3	NOR-4	NOR-6	D0	D5	D10	D20
<i>Formulación (% del peso fresco)</i>								
Harina de Pescado	81.95	75.20	68.40	60.00	68.16	68.16	68.16	68.16
Aceite de Pescado	7.95	8.12	8.73	9.00	4.98	4.98	4.98	4.98
Almidón de Maíz	5.10	11.68	17.87	26.00	21.86	21.36	20.86	19.85
Mezcla de Vitaminas	1.62	1.62	1.62	1.62	1.61	1.61	1.61	1.61
Mezcla de Minerales	1.38	1.38	1.38	1.38	1.39	1.39	1.39	1.39
Carragenina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
<i>Composición Proximal (% del peso seco)</i>								
Proteínas	60.06±2.6	57.0±0.72	53.81±1.1	46.56±0.9	50.62±2.4	51.87±0.7	51.25±3.5	50.0±0.2
Lípidos	15.4±0.5	15.8±0.5	14.3±0.5	13.6±1.0	9.7±0.3	9.4±0.3	9.9±0.4	9.5±0.2
Carbohidratos	9.1±0.7	15.0±0.8	20.2±0.7	29.3±0.5	26.0±0.3	25.1±0.6	24.5±0.6	25.7±0.2
Cenizas	13.4±0.4	12.2±0.1	11.9±0.03	10.8±0.05	13.8±0.1	13.9±0.1	14.2±0.1	14.7±0.1
<i>Composición Elemental</i>								
Humedad	2.30	2.10	2.60	1.63	4.5±0.6	4.4±0.6	4.5±0.5	4.6±0.5
Nitrógeno	9.61±0.59	9.12±0.11	8.61±0.17	7.45±0.14	8.1±0.4	8.3±0.1	8.2±0.6	8.0±0.03
Cromo (Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	-	-	-	-	.003±.002	0.31±0.02	0.66±0.07	1.35±0.06
<i>Energía Bruta (kcal/kg de peso seco)</i>	<i>5272</i>	<i>5374</i>	<i>5262</i>	<i>5150</i>	<i>4885</i>	<i>4892</i>	<i>4878</i>	<i>4818</i>

**Tabla III.II.** Composición del pienso para dorada de la casa comercial DIBAQ.

<b>DIETA DIBAQ</b>		
<b>Ingredientes:</b>		
Productos de Pescado		
Aceite de Pescado		
Productos y Subproductos de Semillas Oleaginosas		
Productos y Subproductos de Cereales		
Productos de Animales Terrestres		
Muestra Vitamínica Mineral		
<b>Composición</b>	<b>(gr/100gr dieta PF)</b>	<b>(gr/100gr dieta PS)</b>
Humedad	10.0	
Proteínas Bruta	47.0	52.22
Carbohidratos	14.5	16.13
Grasa Bruta	17.0	18.88
Fibra Cruda (celulosa)	2.5	2.77
Cenizas	9.0	10.00
<b>Composición Elemental (%)</b>		
Calcio	2.1	
Fósforo	1.3	
<b>Energía Bruta</b> <i>(kcal/kg de peso seco)</i>	4890	

### 3.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

#### 3.2.1. Aclimatación de los peces.

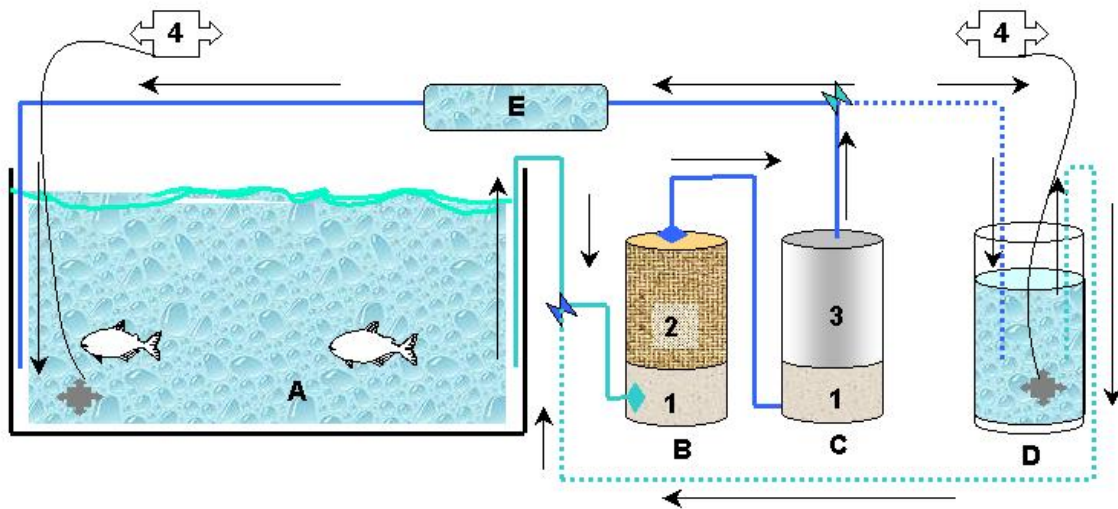
Los peces fueron trasladados a las instalaciones de cultivo en la Facultad de Biología (Departamento de Ecología) de la Universidad de Barcelona. Una vez en el laboratorio, los peces se distribuyeron en 12 acuarios (1.25 m de largo, 0.4 m de ancho y 0.5 m de alto, figura 4-1) de 260 l de capacidad con agua de mar natural a una salinidad de 38 ‰. Antes del comienzo de los experimentos, los peces fueron mantenidos por periodos de entre 15 y 21 días para que se aclimataran a las condiciones de cultivo. Los tanques se colocaron previamente dentro de cámaras isotérmicas generalmente a una temperatura de  $21 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , a excepción de los experimentos donde este parámetro cambie (se mencionará para cada caso).

El agua de mar utilizada se obtuvo del pozo propiedad del Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona (CSIC), y se transportó en bidones de 50-60 litros al laboratorio.

El número de peces por acuario dependió de la talla en cada experimento, lo cual se detalla más adelante para cada uno de ellos (capítulo 4). El ciclo de luz-oscuridad se programó para 12:12 horas.

### 3.2.2. Sistema de bombeo y filtración de agua.

Cada uno de los tanques fue conectado a un sistema cerrado de flujo de agua de mar, descrito en la figura 3-1. Los sistemas de flujo fueron individuales y nunca se mezclaron con el de otro acuario. El agua de cada uno de los acuarios fue bombeada a través de un sistema de filtración compuesto por un filtro mecánico mixto de cerámica y arena, y un filtro de carbón activado. El agua pasa posteriormente por una lámpara UV, y vuelve al acuario. En dichos acuarios se adicionó permanente oxigenación (a saturación) por medio de compresores de aire. El agua de los acuarios fue reemplazada parcialmente cuando fue necesario, manteniendo un estrecho monitoreo sobre los parámetros ambientales que condicionan la calidad del agua cada 10-12 días como el amonio (0.0-0.2 mg N/l) y el pH (7.0-8.0).



**Figura 3-1.** Sistema de flujo cerrado de agua utilizado (las líneas entrecortadas marcan el flujo externo): A) acuario, B) prefiltro, C) filtro y bomba, D) cilindro para flujo externo, E) filtro UV. Las flechas indican la dirección del flujo. 1. filtro grueso de cerámica, 2. filtro fino de arena, 3. filtro de carbón activado, 4. bombas de aire,  $\blacktriangledown$  válvulas de paso.

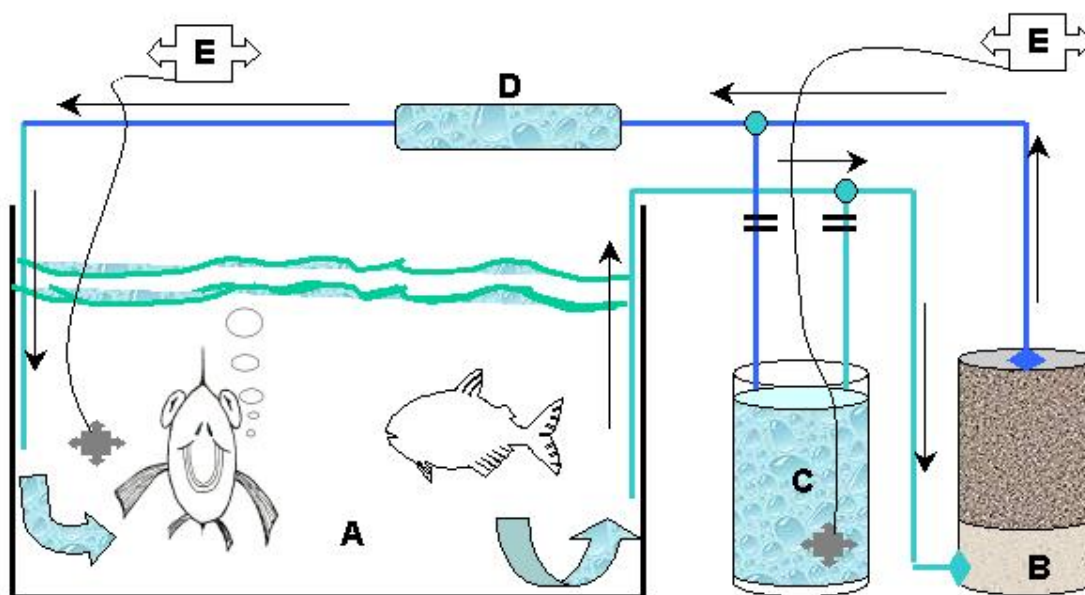
### 3.2.3. Incubaciones y toma de muestras.

En todos los experimentos, cuando se realizaron las incubaciones para la toma de muestras de amonio y otros residuos nitrogenados, se empleó un sistema de flujo externo (véase detalle en las figuras 3-2 y 3-3) que tiene dos objetivos principales: mantener sin recambio de agua el acuario (permitiendo la acumulación de las formas nitrogenadas) y que los filtros de arena no se queden sin flujo, manteniendo así las colonias de bacterias. Al término de los periodos de incubación, se restablece el flujo de agua al acuario, cerrando el flujo externo.

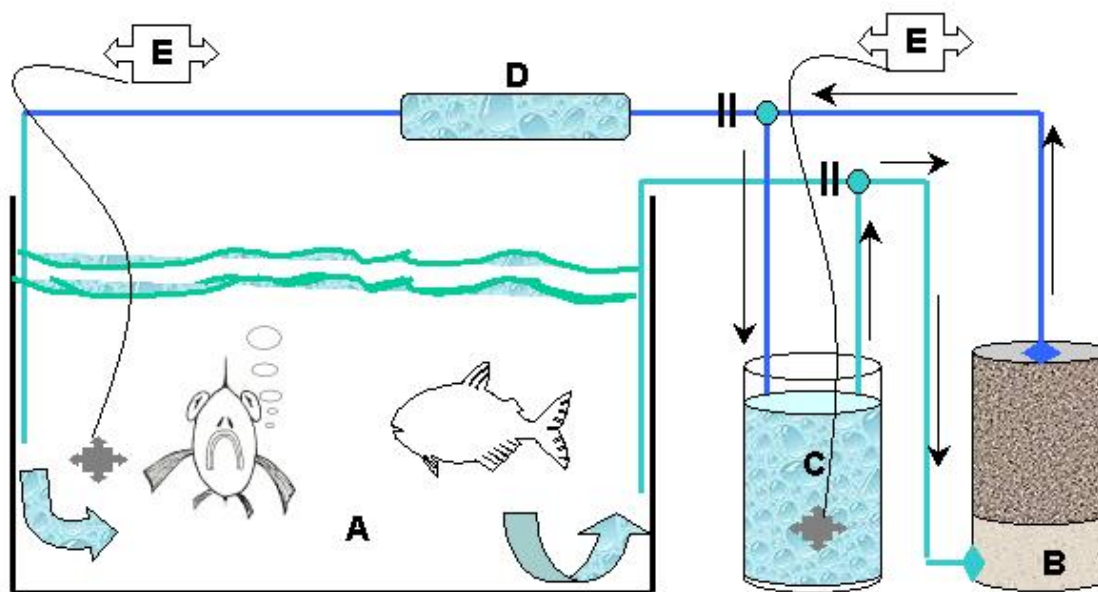
Previamente a los días de muestreo se pesaron los peces para adecuar la ración de alimento y un día antes del mismo se interrumpió la alimentación para pesar los peces en ayuno y que la ingesta de alimento no interfiera con el peso del pez. El día de muestreo se alimentó a las doradas con normalidad; además los acuarios fueron limpiados y nivelados a 200 litros. En todos los experimentos, cada fase de muestreo abarcó un total de 4 días durante tres semanas consecutivas. La duración de los periodos de incubación fue variable en cada experimento, por lo que se hablará en detalle para cada caso en el capítulo 4.

El procedimiento de muestreo para el análisis de amonio se describe a continuación: antes de tomar las muestras, se cerró el flujo de agua en los acuarios, desviándose al flujo externo (véase la figura 3-3). Se obtuvo una muestra de 50 ml de agua al inicio del periodo de incubación y otra al final del mismo, ambas por duplicado, colocándose en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad. La duración del periodo de incubación fue variable para cada experimento, la cual se especificará para cada caso más adelante. En los casos de los periodos en los que coincidió el tiempo de alimentación, primero se cerró el flujo de agua, enseguida se alimentó a los peces y finalmente se tomaron las muestras. Las muestras para análisis de amonio fueron fijadas con 2 ml de fenol (10 gr de fenol grado analítico/100 ml de alcohol etílico al 95%) hasta el análisis, el cual se realizó como máximo tres días después de tomarse las muestras. Según Degobbis (1973, en Parsons *et al.*, 1984), bajo estas condiciones las muestras pueden ser almacenadas sin congelar durante más de dos semanas antes de su análisis, el cual se describe más adelante (ver apartado 3.3).

Para el último experimento en que se tomaron muestras para análisis de urea, nitratos, nitritos, aminoácidos libres y nitrógeno particulado, además del amonio; el tamaño de la muestra de agua fue de 250 ml. Las muestras se filtraron y el filtro se destinó al análisis de nitrógeno particulado. El agua filtrada se dividió en cinco muestras (una por cada fracción de nitrógeno), de las cuales cuatro fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis de estas. La muestra para análisis de amonio se fija con fenol como se ha mencionado anteriormente. Todas las muestras fueron tomadas por duplicado.



**Figura 3-2.** Sistema simplificado de flujo de agua antes y después de las incubaciones: A) acuario, B) filtros mecánicos, C) cilindro externo y D) filtro UV, E) bombas de aire. Las barras paralelas indican el flujo cerrado, y las flechas la dirección del flujo.



**Figura 3-3.** Sistema simplificado de flujo de agua durante las incubaciones: A) acuario, B) filtros mecánicos, C) cilindro externo y D) filtro UV, E) bombas de aire. Las barras paralelas indican el flujo cerrado, y las flechas la dirección del flujo.

Por otra parte, los peces fueron pesados al inicio y a lo largo de los experimentos (por periodos entre 7 y 14 días). De esta manera, la alimentación se ajustó para el nuevo peso del pez. El peso de los peces se utilizó también para calcular las tasas de evacuación y excreción de nitrógeno de las formas que se han mencionado previamente, además de la eficiencia de utilización y retención proteica.

### 3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL NITRÓGENO EXCRETADO.

#### 3.3.1. Análisis de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).

El análisis del contenido de amonio en las muestras se realizó por el método alternativo de Solórzano (1969, descrito en Parsons *et. al.*, 1984), basado en la oxidación del amonio a nitrito por la adición de hipoclorito en medio alcalino. El nitrito contenido en la muestra se valora por el método de Bendschneider y Robinson (1952, descrito en Parsons *et. al.*, 1984). Este método es menos sensible que otros, aunque es fácil de realizar y su capacidad es buena (sensibilidad de  $1 \mu\text{g-at N/litro}$ ). Este análisis es descrito en el siguiente esquema (figura 3-4).

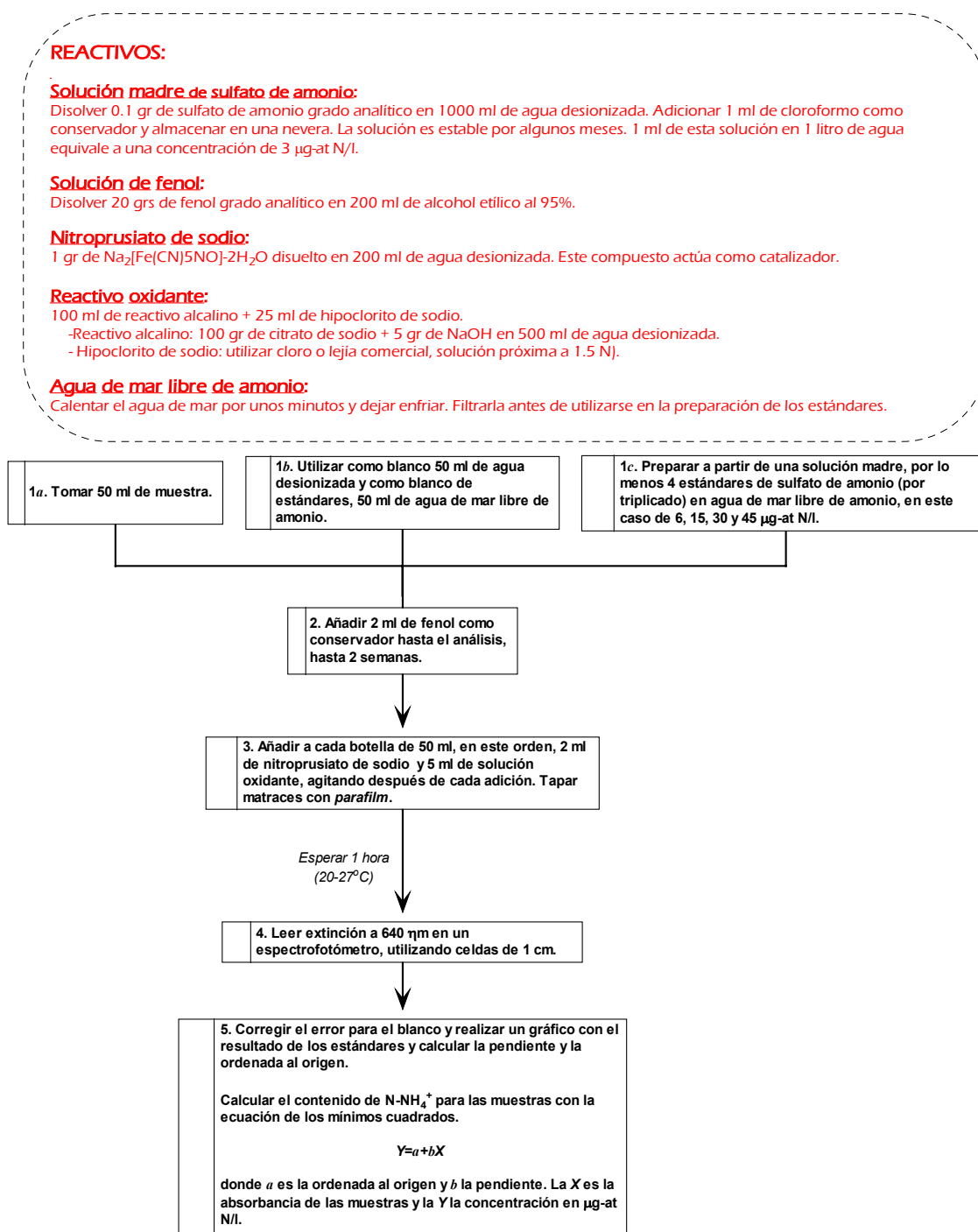


Figura 3-4. Protocolo utilizado para el análisis del nitrógeno en forma de amonio.

### 3.3.2. Cálculo del amonio no ionizado (amoníaco, NH<sub>3</sub> o ANI).

En el medio acuoso, el equilibrio del amonio entre la fracción de su forma ionizada (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y la no-ionizada (amoníaco, ANI o NH<sub>3</sub>), depende del pH, la temperatura y la salinidad. El porcentaje del amoníaco se calculó en base a las ecuaciones aportadas por Bower y Bidwell (1978), las cuales son derivadas de los cálculos de Whitfield (1974; en Bower y Bidwell, 1978), que son explicados a continuación.

$$\%ANI = \frac{100}{I + \text{anti log} [pK_a^s(T) - pH]} \quad (3.1)$$

en la cual,  $pK_a^s$  es el logaritmo negativo de la constante de ionización para una salinidad  $S_{psu}$  determinada. Como esta constante de ionización depende de la temperatura, se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$pK_a^s(T) = pK_a^s(T = 298^\circ C) + 0.0324(298 - T^\circ K) \quad (3.2)$$

La salinidad ( $S_{psu}$ ) corresponde a la fuerza molal iónica ( $FI$ ) del agua de mar, calculada a partir de la ecuación:

$$FI = \frac{19.9273 S_{psu}}{(100 - 1.005109 S_{psu})} \quad (3.3)$$

donde la  $FI$  calculada para una salinidad entre 37-40 psu por [Bower y Bidwell \(1978\)](#), fue de 0.8.

### 3.3.3. Análisis de urea.

La urea se determinó por la técnica de la *ureasa*, basada en la actividad de esta enzima, y fue desarrollada por McCarthy en 1970 (en [Parsons et. al., 1984](#)). Esta técnica se basa en la transformación de la urea a amonio, el cual es valorado por colorimetría con el método descrito por Solórzano en 1969 (en [Parsons et. al., 1984](#)). Esta técnica tiene una precisión de 3  $\mu\text{g-at N/litro}$ . Después de la toma de muestras, estas fueron almacenadas a una temperatura menor a  $-20^\circ\text{C}$ , hasta su análisis.

Se prepararon 4 estándares diferentes de urea a partir de una solución madre (0.09 gr de urea calidad grado reactivo en 1000 ml de agua destilada con 2 ml de cloroformo). Cada mililitro de solución madre en un litro de agua de mar (libre de amonio) equivale a 3  $\mu\text{g-at N-urea/litro}$ . Se deja un estándar más sin urea como blanco. Todos los estándares se hicieron por triplicado.

A partir de aquí, las botellas (50 ml) de los estándares y de las muestras fueron tratadas de la misma manera durante el análisis. A dos de los matraces de cada muestra se les añadieron 5 ml de una solución diluida de enzimas, mezclando el contenido y cerrando las bocas de los matraces con papel aluminio.

Los matraces que contuvieron la enzima se llevaron a un baño maría a  $50^\circ\text{C}$  por 10 minutos, y dejándolos enfriar posteriormente a temperatura ambiente. Al resto de las muestras que no se llevaron a baño de agua se les añadieron 5 ml de la solución de enzimas.

Se siguió en adelante el análisis para amonio, ya descrito en la sección 3.3.1. Se calculó la concentración de urea a partir de la expresión:

$$\mu\text{g-at N/litro} = Fx(E_s - E_B)$$



donde  $E_s$  es el promedio de la extinción en las muestras que fueron calentadas, y  $E_b$  es el promedio de la extinción en las muestras que no fueron calentadas.  $F$  es el factor determinado a partir de los estándares y de la ecuación siguiente:

$$F = \frac{(3.0)}{E_s - E_b}$$

dónde  $E_s$  y  $E_b$  son los promedios de extinciones de los estándares y los blancos.

Para evitar cualquier fuente de contaminación y con el objetivo de aislar la enzima, la *ureasa* (Casa Merck®, Código 14843) se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 0.25 gr de la enzima en un tubo de diálisis, el cual se colocó dentro de un vaso de precipitado conteniendo 800 ml de una solución de EDTA a una temperatura de 5°C. Esta solución se preparó disolviendo 10 gr de EDTA en 900 ml de agua destilada y, después de ajustar el pH de esta solución a 6.5, se enrasó a 1 litro).

Se colocó el vaso de precipitado en un refrigerador a 3-6°C agitando y cambiando el EDTA cada 12 horas durante 3 días.

Se pasó la solución de enzima a una botella de vidrio agregando 50 ml de glicerol reactivo y 5 ml del reactivo de Cleland (0.2 gr de ditiotreitól en 100 ml de agua destilada). La *ureasa* debe ser almacenada a 5°C, de esta forma la solución será estable por algunos meses.

El análisis de la urea fue realizado con la ayuda de personal cualificado del Servicio Científico Técnico de la Universidad de Barcelona (SCT-UB).

### 3.4. ANÁLISIS DE OTRAS FORMAS DE NITRÓGENO RELACIONADAS CON LA EXCRECIÓN.

En este apartado explicaremos los métodos utilizados en el análisis de otras formas nitrogenadas que están relacionadas con el amonio. Durante las incubaciones, el amonio es oxidado a nitratos en dos pasos, el primero es realizado por la actividad de bacterias llamadas *Nitrosomonas* spp, transformando el amonio en nitritos; en el segundo paso, las bacterias *Nitrobacter* spp transforman los nitritos a nitratos (Jobling, 1994). El porcentaje de cada uno de los compuestos y las tasas de transformación dependen, entre otros factores, por la duración de las incubaciones (intervalo entre la toma de muestras).

Tanto los nitratos como los nitritos pueden proceder, además de la transformación de residuos excretados como el amonio, de la fracción soluble del nitrógeno fecal. Más adelante se discutirá sobre este tema.

#### 3.4.1. Análisis de nitratos ( $\text{NO}_3^+$ ).

Parsons y colaboradores (1984) describen el método que utilizamos para el análisis de los nitratos desarrollado por Morris y Riley en 1963 y al que otros autores han adicionaron modificaciones (Grasshoff, 1964; Wood *et al.*, 1967) Las muestras de nitrato fueron reducidas casi en su totalidad a nitritos, cuando se pasaron a través de una columna activa con limadura de cadmio y cobre metálico, posteriormente, este nitrito producido es cuantificado por el método de Bendschneider y Robinson (1952, descrito en Parsons *et al.*, 1984), que describimos a continuación.



### 3.4.2. Análisis de nitritos (NO<sub>2</sub>).

Tanto los nitritos obtenidos directamente de las muestras como los nitritos provenientes de la reducción de los nitratos y la oxidación del amonio, fueron analizados por el método de Bendschneider y Robinson (1952, descrito en Parsons *et. al.*, 1984). En este método las muestras se mezclaron con una solución de sulfanilamida (en medio ácido), produciendo un compuesto que, al adicionarle N(-1-naftil)-etilenediamina, formó una solución altamente coloreada, la cual se midió con un espectrofotómetro a 543 nm y los nitritos se cuantificaron por el método de mínimos cuadrados a partir de la absorbancia de los estándares preparados a partir de una solución madre de nitrito de sodio (0.345 gr de NaNO<sub>2</sub> disueltos en 1 litro de agua destilada), Cada mililitro de la solución madre equivalió a 5 µg-at N-NO<sub>2</sub>/litro).

### 3.5. ANÁLISIS DE NITRÓGENO AJENO A LA EXCRECIÓN.

Otros compuestos nitrogenados que pueden estar presentes en el agua son los aminoácidos provenientes de los restos de alimento y de las heces. Ambas partes son restos de material particulado, de los que se pueden liberar compuestos al medio acuático susceptibles de ser medidos en forma disuelta. Tanto el nitrógeno particulado como los aminoácidos son fracciones no relacionadas con la excreción, sino con el alimento no ingerido y el alimento no absorbido por el tracto digestivo y liberado a través de las heces.

#### 3.5.1. Análisis de aminoácidos (AA).

El nitrógeno de los aminoácidos libres se obtuvo al hidrolizar estos y separarlos por cromatografía de intercambio iónico, según el método de Spackman y colaboradores (1958, en AOAC, 1996). Este método se basa en la diferencia del tiempo de retención de los aminoácidos libres, los cuales fueron comparados con una solución estándar de aminoácidos, la cual estuvo compuesta por los siguientes aminoácidos:

- Asparagina
- Treonina
- Serina
- Glutamina
- Prolina
- Glicina
- Alanina
- Valina
- Cisteina
- Metionina
- Isoleucina
- Leucina
- Tirosina
- Fenilalanina
- Lisina
- Arginina
- Histidina
- Triptófano
- Taurina

Los aminoácidos fueron leídos en un autoanalyzer Pharmacia LKB Biotechnology® (Alpha Plus Serie II), y su cuantificación se hizo mediante comparación de las áreas de cada pico con respecto a los mencionados estándares, de los cuales se conoce la

concentración. Este método presenta una precisión de hasta 1  $\eta$ mol. Los resultados son indicados como contenido de nitrógeno total en forma de aminoácidos libres por masa de pez y por tiempo (mg N-AA/kg pez.hora o mg N-AA/kg pez.día) El análisis de aminoácidos libres fue realizado con la ayuda de personal del SCT-UB y los aparatos citados también se encuentran en dichas instalaciones.

### 3.5.2. Análisis de nitrógeno particulado (NP).

Grasshoff (1983) dice que las fracciones disuelta y particulada de la materia en una muestra de agua de mar se pueden separar por filtración a través de filtros con un poro de 0.45  $\mu$ m. Según esta aseveración, el nitrógeno presente en el agua después de ser filtrada, es asumido como la fracción de nitrógeno disuelto, y el retenido por el filtro como la fracción de nitrógeno particulado. Por lo anterior y con el objetivo de obtener la fracción de nitrógeno particulado de nuestras muestras, se filtraron 250 ml de agua de la manera anteriormente explicada. Los filtros fueron llevados a sequedad en una estufa a 60°C.

En cada caso la muestra se colocó dentro de una cápsula de estaño con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (entre 1000-2000  $\mu$ g, según el tamaño de la muestra) y se valoró para carbono y nitrógeno con un analizador elemental CN (Carlo Erba NA 1500) propiedad de los SCT de la Universidad de Barcelona.

En este analizador, la muestra entra en una cámara de combustión con flujo continuo de helio (He), en la cual, al inyectar O<sub>2</sub> se produce una combustión total de la muestra. La combustión es beneficiada por el estaño de la cápsula y el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> añadido previamente a la muestra. Después de la cámara de combustión, la muestra ha sido convertida a distintas formas de nitrógeno, más CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, por lo cual pasa a través de un tubo de reducción para obtener todo el nitrógeno de la muestra como gas (N<sub>2</sub>). Entonces el agua es absorbida por un tubo de anhídrona y el N<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> pasan a través de una columna cromatográfica de gases para separarlos y que sean valorados por conductividad en base a unos patrones de <sup>13</sup>C (en forma de polietileno, grafito y sacarosa) y <sup>15</sup>N [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub> y N<sub>2</sub>]. El autoanalizador tiene una sensibilidad de 0.10-0.15 ppt (gr/kg).

### 3.6. BALANCE DE NITRÓGENO.

En el presente apartado se presentan algunos cálculos matemáticos utilizados para estimar el balance de nitrógeno y algunos índices para la eficiencia de utilización del alimento y las proteínas.

En todos los experimentos se realizó un balance de nitrógeno a partir de la ecuación siguiente, reportada por Jobling, (1994) y Verbeeten y colaboradores (1999):

$$N_{ing} = N_{abs} + N_{fec} \quad (3.4)$$

donde  $N_{ing}$  es el nitrógeno ingerido a través del alimento,  $N_{abs}$  es el nitrógeno absorbido por el tracto digestivo del pez, y  $N_{fec}$  es el nitrógeno contenido en las heces (fecal).

Una vez que el alimento es hidrolizado en el tracto digestivo, los nutrientes son absorbidos por la pared intestinal (ver apartado 1.2). El torrente sanguíneo transporta los nutrientes a las células donde son requeridos. Los diferentes destinos del nitrógeno en el balance son descritos por la siguiente ecuación:

$$N_{abs} = N_{ret} + NT_{exc} \quad (3.5)$$

donde  $N_{ret}$  es la fracción de nitrógeno que es absorbido y utilizado para crecimiento por el pez, y el  $NT_{exc}$  es la fracción de nitrógeno residual de las proteínas desviadas para la producción de energía. Esta última fracción está compuesta por el amonio y la urea, además de otros componentes denominados como  $N_{RES}$ , por lo que la ecuación 3.5 quedaría de la siguiente manera:

$$N_{ing} = N_{ret} + N_A + N_U + N_{fec} + N_{RES} \quad (3.6)$$

### 3.6.1. Nitrógeno asimilado ( $ADC_N$ ).

La absorción de un nutriente está dado por la eficiencia que tiene el tracto digestivo para degradar dicho nutriente (mediante enzimas, ácidos y otros compuestos), transportarlo al torrente sanguíneo y ponerlo disponible para ser utilizado por las células. En el caso del nitrógeno, la fracción absorbida es el porcentaje de nitrógeno contenido en el alimento que es digerido por el tracto digestivo y se evalúa a través del coeficiente de digestibilidad ( $ADC_N$ ), el cual se calculó de la siguiente manera:

En el caso de los experimentos (excepto el experimento *E3*), los últimos 15 días de tratamiento se aportaron dietas con igual composición que las dietas experimentales, aunque con la inclusión de 0.5% de  $Cr_2O_3$  (PS) que sustituyó a igual porcentaje de almidón. Se tomaron muestras de heces del intestino posterior para que el material no entrara en contacto con el agua y se perdiera parte del nitrógeno fecal soluble. También se tomaron muestras del alimento no ingerido por los peces y que se acumuló en el fondo de los acuarios. Las heces y muestras del alimento fueron secadas en una estufa a 60°C hasta obtener un peso seco constante y se analizaron para nitrógeno de la manera que se ha indicado anteriormente (ver apartado 3.5.2).

Otra parte de estas muestras se llevaron a una digestión ácida y la extracción obtenida fue analizada para cromo (Cr) en un espectroscopio atómico por inducción de plasma acoplado (ICP) tipo Jobin-Yvon JY38VHR (Verlinden, 1982). Ya con los datos de nitrógeno y cromo, el coeficiente de digestibilidad del nitrógeno fue calculado con la siguiente ecuación:

$$100 - ADC_N = 100 \cdot \left( \frac{\% Cr_{Alimento}}{\% Cr_{Heces}} \cdot \frac{\% N_{Heces}}{\% N_{Alimento}} \right) \quad (3.7)$$

Para el experimento *E3*, el coeficiente de digestibilidad del nitrógeno se calculó a partir de las dietas sometidas a tratamiento, las cuales presentaron distintos niveles de  $Cr_2O_3$  (ver apartado 4.3 para detalles).

### 3.6.2. Nitrógeno fecal ( $N_{fec}$ ).

El nitrógeno fecal se define como la parte del nitrógeno que es ingerido por el pez en el alimento y que pasa a través del tracto intestinal sin ser digerido o absorbido (Jobling, 1994). La proporción de nitrógeno asimilado respecto al nitrógeno ingerido viene dada por la digestibilidad del mismo ( $ADC_N$ ), de modo que:

$$N_{fec} = 100 - ADC_N \quad (3.8)$$

### 3.6.3. Nitrógeno total excretado ( $NT_{exc}$ ).

La fracción de nitrógeno total excretado ( $NT_{exc}$ ) respecto al ingerido se estima a partir de la diferencia entre el nitrógeno que es absorbido ( $ADC_N$ ) y el nitrógeno retenido (NPU):

$$NT_{exc} = ADC_N - NPU \quad (3.9)$$

Esta fracción puede ser calculada sumando las diferentes partes de nitrógeno excretado. Entre los componentes del  $NT_{exc}$  se encuentran mayoritariamente el amonio y la urea, los cuales fueron medidos directamente como se explicó anteriormente.

### 3.6.4. Retención de proteínas ( $N_{ret}$ ).

Uno de estos índices calculados en nuestro trabajo con el objetivo de valorar la utilización de las proteínas es la *Utilización Neta de las Proteínas* (NPU). La NPU está relacionada frecuentemente a la construcción y mantenimiento corporal (Knights, 1985; Wilson, 1989) y es definida como la diferencia entre el contenido de nitrógeno corporal al final de un periodo de tiempo determinado y al inicio de este, en relación al nitrógeno ingerido en el alimento. La ecuación que la define es la siguiente:

$$NPU = \frac{\text{Ganancia de Nitrogeno}}{N \text{ Ingerido Total}} * 100 \quad (3.10)$$

donde la *Ganancia de Nitrógeno* está dada por:

$$\text{Ganancia N} = P_{final} * \text{Contenido N}_{final} - P_{inicial} * \text{Contenido N}_{inicial} \quad (3.11)$$

Dónde el peso de los peces ( $P_{final}$  y  $P_{inicial}$ ) está dado como el peso total promedio por acuario, en cada uno de los tratamientos. El contenido de nitrógeno se refiere al cuerpo de los peces.

La NPU es utilizada en los estudios nutricionales de peces debido a que es un método poco laborioso, de gran utilidad en los estudios de balance del nitrógeno y que aporta información clara sobre la fracción de nitrógeno retenido por el organismo.

Para valorar el contenido corporal de nitrógeno, entre 10 y 20 peces fueron sacrificados antes de comenzar los experimentos y el resto al finalizar los experimentos. Los peces se secaron en una estufa a 60°C hasta obtener el peso seco de las muestras. Las muestras de pez se trituraron y posteriormente se analizaron para N por el método de relación isotópica descrito en el apartado 3.5.2. Para la evaluación de las proteínas se tomó en cuenta el factor:

$$\text{Proteínas} = N \times 6.25$$

## 3.7. OTROS ÍNDICES SOBRE LA UTILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y EL ALIMENTO.

Como una referencia de la utilización de las proteínas aportadas en el alimento, con fines de crecimiento, se calcula el Porcentaje de Retención de Nitrógeno o *Utilización Neta de las Proteínas* (*Net Protein Utilization, NPU*). Por otro lado, y con la finalidad de comparar la retención proteica con otros trabajos en los que no se reporta este índice, calculamos el

*Porcentaje de Eficiencia Proteica (Protein Efficiency Ratio, PER) y el Porcentaje de Eficiencia de Utilización del Alimento (Food Efficiency Ratio, FER).*

### 3.7.1. Porcentaje de Eficiencia Proteica (PER).

El *Porcentaje de Eficiencia Proteica (Protein Efficiency Ratio)*, fue definido por [Knights \(1985\)](#) y [Hardy \(1989\)](#) como la medida del peso ganado (en peso húmedo) por unidad de proteína ingerida, y es una manera de medir la retención de las proteínas provenientes del alimento. Este método es utilizado con regularidad para comparar la utilización de las proteínas para crecimiento del pez. Se calcula de la siguiente manera:

$$PER = \frac{\text{Incremento en Peso Húmedo (gr)}}{\text{Proteína Ingerida (gr)}} \quad (3.12)$$

### 3.7.2. Porcentaje de la Eficiencia de Utilización del Alimento (FER).

Hemos escogido un índice para medir la eficiencia de utilización del alimento que aportamos durante los experimentos. Los índices son de aplicación sencilla y se han utilizado en piscifactorías debido a la dificultad que implica recuperar el alimento no ingerido de los tanques y su separación de las heces. Algunos índices son reportados por [Knights \(1985\)](#), entre los que se encuentran el *Porcentaje de Eficiencia de Utilización del Alimento (FER, Food Efficiency Ratio)* y el *Índice de Conversión del Alimento (ICA)*. En nuestros experimentos utilizamos el *FER* para evaluar el aprovechamiento del alimento ingerido por las doradas, el cual es descrito como la cantidad de peso ganado (en peso húmedo) por el pez respecto al peso del alimento ingerido, como lo muestra la siguiente ecuación:

$$FER = \frac{\text{Incremento en Peso Húmedo (grs)}}{\text{Pienso Ingerido (grs)}} \quad (3.13)$$

## 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados en todos los experimentos se expresan como promedio de los datos y su respectivo error estándar de la media.

A partir de los datos de concentración de nitrógeno en los acuarios durante los periodos de incubación, se obtuvieron para todas las formas de nitrógeno medidas, las tasas de producción de nitrógeno en mg N/kg pez.hora, en el caso de los intervalos de muestreo, y mg N/kg pez.día.

Tanto los datos de las tasas de excreción de nitrógeno como los de eficiencia proteica fueron tratados de igual forma en los análisis estadísticos, excepto para el caso del experimento 2. Primero fueron analizados para normalidad de la varianza. Cuando los datos no tuvieron un comportamiento de una curva normal, fueron transformados por logaritmo y analizados para normalidad de la varianza nuevamente. Antes del *pool* de datos, las réplicas se expusieron a una prueba de *Análisis de Varianza* de un factor ( $P \leq 0.05$ ). Los efectos sobre las variables debidas a los tratamientos y al factor tiempo (entre los intervalos) para cada caso, se estimaron llevándolas a un ANOVA de una vía y prueba

de Levene (homogeneidad de varianza). Cuando se encontraron diferencias significativas entre las variables; se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan (de efecto *a posteriori*).

Para los casos donde intervinieron más de un factor en el experimento, aplicamos un ANOVA de dos factores para los datos de excreción diaria de amonio total. Los factores se explican para cada caso.

Las pruebas estadísticas y la parte descriptiva se realizaron con el programa SPSS® versión 10.0.1 (SPSS, Inc.®, USA; <http://www.spss.com/>).