

CAPÍTULO 2:

INFLUENCIA DE LA INCORPORACIÓN DE AROMA SOBRE EL COMPORTAMIENTO

2.1. Introducción.....	59
2.1.1. Métodos de estudio de la conducta alimentaria.....	59
2.1.2. Criterios generales a tener en cuenta en el diseño experimental de estudios de la conducta alimentaria.....	64
2.2. Objetivo del estudio.....	70
2.3. Material y métodos	71
2.3.1. Descripción de la metodología en estudio	71
2.3.2. Peces. Condiciones de estabulación.....	78
2.3.3. Aroma comercial. Desarrollo de la aplicación.....	79
2.3.4. Piensos utilizados	82
2.3.4.1. Piensos experimentales.....	82
2.3.4.2. Piensos control.....	83
2.3.5. Observadores.....	85
2.3.6. Metodología de observación.....	87
2.3.7. Métodos estadísticos.....	
2.3.7.1. Tratamiento de los resultados obtenidos.....	87
2.3.7.2. Definición de las variables <i>Índice de aceptación (I.a.) e Índice de aceptación global (I.a.g.)</i>	88
2.3.7.3. Análisis exploratorio de los datos...	89
2.3.7.4. Inferencia estadística.....	
2.4. Resultados y discusión	90
2.4.1. Influencia de los observadores.....	92
2.4.2. Influencia de las fases de la conducta	92

2.4.3. Influencia del horario de administración.	98
2.4.4. Influencia del tamaño de los peces.....	102
2.4.5. Influencia del tipo de pienso.....	105
2.4.6. Inferencia estadística.....	109
2.5. Conclusiones	115

2.1. Introducción

En el presente capítulo se plantea un desarrollo metodológico que tiene como objetivo evaluar el efecto sobre los peces de unos piensos experimentales organolépticamente modificados. Para ello se revisan en primer lugar los diversos métodos que recoge la bibliografía para estudiar el comportamiento de los peces frente al alimento. En segundo lugar, se establecerán los criterios a tener en cuenta en el diseño de un estudio de conducta de este tipo. Posteriormente, utilizando la metodología propuesta, se evaluarán y cuantificarán los cambios en la conducta alimentaria de los lenguados promovidos por piensos experimentales.

2.1.1. Métodos de estudio de la conducta alimentaria

La metodología para estudiar el comportamiento de los animales frente a un nuevo alimento ha sido descrita en detalle por SMITH & RASHOTTE (1978). De acuerdo con dichos autores, cuando el objetivo es evaluar la aceptabilidad de un alimento por una especie o una conducta alimentaria específica frente a un estímulo determinado, lo más obvio parece ser la utilización de *métodos ingestionales*. El fundamento de dichos métodos puede establecerse del siguiente modo: puesto que, obviamente, no existe interacción verbal con el animal, la mejor vía para inferir la detección, discriminación, aceptabilidad y preferencia por un alimento es a través de la ingesta. Este tipo de método puede definirse como aquel en el cual se presenta un alimento a un individuo, o grupo de individuos, permitiendo su consumo durante un período de tiempo determinado. Durante este período se registra la ingesta, de forma cualitativa o cuantitativa, dependiendo del objetivo del estudio.

El segundo gran grupo de métodos para el estudio de este tipo de conducta sería el de los *métodos instrumentales*, en los cuales el indicador de aceptabilidad es una respuesta motora que el animal debe realizar para tener acceso al alimento. Para ello se requiere el desarrollo de sofisticados aparatos que permitan registrar la conducta del animal. Existen equipos para llevar a cabo estas experiencias aplicables a cualquier especie, incluyendo los peces, pero suelen utilizarse más en otros grupos animales (ratas, perros, monos,...) en los cuales pueden establecerse secuencias

complejas de refuerzo o de castigo para estudiar o promover una conducta concreta.

Para registrar la ingesta en el laboratorio, existen diversos métodos ingestionales que conllevan diferentes grados de complejidad y resolución. Los métodos más empleados se pueden agrupar en tres (JOBILING *et al.* 1995):

1. *Determinación cuantitativa del contenido gastrointestinal mediante marcaje no invasivo:* en este tipo de método el marcaje puede realizarse mediante incorporación al alimento de colorantes (JONHSTON *et al.*, 1994), radioisótopos (STOREBAKKEN *et al.* 1981) o un determinado marcador que posteriormente pueda cuantificarse mediante rayos X (TALBOT & HIGGINS, 1983, KOSKELA *et al.* 1991). Aparte de los problemas inherentes a cada una de las técnicas, se detectan problemas comunes a todas ellas. El objetivo es siempre cuantificar la ingesta total, para lo cual en alguna ocasión es necesario proceder al sacrificio del animal o a la aplicación de lavados gástricos. En ambos casos, el registro de la ingesta puede ser erróneo por diversos motivos, entre otros, la tasa de evacuación gástrica o el grado de digestión y absorción que haya sufrido el alimento. Pero, en cualquier caso, la metodología sólo tiene como objetivo evaluar la cantidad total ingerida, sin que se puedan determinar otros aspectos de la actividad alimentaria que pueden ser interesantes. La metodología además es lenta e implica, cuando no el sacrificio, un elevado nivel de manejo de los animales, resultando por tanto, muy estresante.
2. *Registro de la actividad alimentaria mediante comederos autodemanda:* los primeros dispositivos autodemanda con fines de experimentación se encuentran descritos en ADRON (1972). Se utilizaron, entre otros, para determinar la capacidad de aprendizaje y elección de trucha arco iris (ADRON *et al.*, 1973, LANDLESS, 1976) y posteriormente para establecer la actividad estimulante de los L-aminoácidos, frente a los correspondientes D-aminoácidos en la misma especie

(ADRON & MACKIE, 1978). Dado este objetivo, se les podría clasificar en el grupo de los métodos instrumentales antes que en el de los ingestionales. Si en el presente apartado se les considera adecuados para medir la ingesta, es porque pueden emplearse con gran eficacia para este objetivo, a pesar de que con frecuencia los métodos instrumentales, aplicados a otros tipos de animales, suelen tener como objetivo la evaluación de variables psicobiológicas. En dichos casos se exige al animal que realice alguna actividad motora para conseguir el alimento, actividad que en muchas ocasiones no está en absoluto incluida en la pauta habitual de conducta alimentaria (por ej. presionar un botón, golpear discos de diferentes colores, recorrer un laberinto, etc.).

Con posterioridad, la informática se ha aplicado a este método para obtener una información más exhaustiva (BOUJARD, *et al.* 1992; CUENCA & DE LA HIGUERA, 1994). En estos dispositivos cada vez que un pez acciona el comedero, genera un pulso eléctrico que es detectado y registrado por un ordenador dando además la orden para liberar una cantidad de comida predeterminada (SÁNCHEZ-VAZQUEZ *et al.* 1994, 1997). De este modo, el dispositivo informa, no sólo sobre la cantidad total de pienso ingerido, sino sobre la dinámica de alimentación (frecuencia, horario, etc.). Muchas especies pueden ser entrenadas para accionar este tipo de dispensadores autodemanda, solamente a título de ejemplo se pueden citar los salmónidos (ADRON *et al.* 1973, ALANÄRÄ & BRÄNNÄS, 1993), la dorada (KENTOURI *et al.* 1994), la lubina (SANCHEZ-VAZQUEZ *et al.* 1994) y la carpa dorada (SANCHEZ-VAZQUEZ *et al.* 1997). Existe también un trabajo con *Limanda limanda* (GWYTHYER & GROVE, 1981) perteneciente a la familia Pleuronectidae aprovechando que utiliza una estrategia alimentaria visual (DE GROOT, 1969, 1971).

Aparte de la interesante y abundante información que ofrece este método (preferencias de dietas, frecuencia y duración de la actividad alimentaria, ritmos de alimentación, etc.), la principal ventaja que presenta es la posibilidad de realizar

estudios durante largos períodos de tiempo sin molestar a los peces.

Obviamente presentan *a priori* algunos problemas que se deben prever en el diseño experimental, siendo los más destacables los siguientes: (1) los datos que se obtienen no aportan una información individualizada, de tal modo que no se puede afirmar cuáles, o cuántos individuos dentro del grupo han accionado el dispositivo, y (2) tampoco permiten afirmar que todo el pienso suministrado ha sido realmente consumido. Existen soluciones técnicas para resolver dichos problemas. El primero de ellos, es decir la individualización de los datos, se puede resolver marcando a los peces con chips PIT (*Passive Integrated Transponder*) con códigos únicos, los cuales pueden ser identificados por el ordenador en el mismo momento en que el pez acciona el dispositivo de alimentación (BRÄNNÄS & ALANÄRÄ, 1993). El segundo problema puede resolverse mediante sofisticados mecanismos de recogida del alimento no ingerido que pueden a su vez accionar o detener el dispositivo de administración del alimento (MADRID *et al.*, 1997). Por otra parte, la principal desventaja de estas soluciones suele ser su coste.

3. *Observación directa*: las técnicas por observación directa son las más utilizadas en estudios de tipo etológico. Pueden aplicarse a un coste mínimo y en condiciones experimentales muy simples, incluso en trabajos de campo si es preciso.

De acuerdo con LEHNER (1979) la observación de los individuos permite obtener importante información cualitativa que no necesariamente se traduce en algo cuantificable, especialmente considerando que a menudo una conducta conduce a otra, generando una secuencia compleja de actitudes. Los cambios de una a otra conducta dentro de dicha secuencia se identifican mejor a través de la observación directa de los eventos.

Estas técnicas han sido utilizadas en diversos estudios de conducta alimentaria, tanto en peces (STRADMEYER 1989, BRÄNNÄS & ALANÄRÄ, 1992) como en crustáceos (PITTET *et al.* 1996) y moluscos (VIANA *et al.* 1994).

El principal problema de la observación directa es la subjetividad. Para evitarla al máximo y garantizar el éxito de este tipo de registros, es necesario identificar y definir el máximo número posible de variables presentes en el contexto de la observación y si es posible, adjudicarles unidades. A partir de esta descripción del marco de observación, es esencial detallar la secuencia de conducta que se va a observar e intentar estandarizar cada una de las fases que la componen. La información que se obtiene es un conjunto de datos de tipo descriptivo a partir de un procedimiento cuidadosamente pautado (LEHNER, 1979).

Otro posible problema ligado a la metodología de observación directa es el número de individuos y el nivel de análisis que se pretende aplicar. Si se pretende llevar a cabo un estudio al nivel de grupo o población, las posibilidades de éxito así como de aplicación de la metodología, dependerán en gran manera del tipo de organismo y del tipo de conducta a observar. Un clásico ejemplo de observación de grandes poblaciones, sin que existan prácticamente limitaciones en el tamaño de la población, podría ser un estudio de conducta social de insectos. En cambio, si el objetivo es estudiar conductas individuales (como sería la conducta frente al alimento) de animales de tamaño superior (por ejemplo peces), la observación directa sólo puede aplicarse con garantías en lotes reducidos de individuos. Una posibilidad que permite solventar este problema es la grabación en vídeo de la conducta en estudio, de este modo se puede visualizar posteriormente la grabación y recoger detalles difíciles de observar *in vivo*. A pesar de la complejidad técnica que las grabaciones en vídeo presentan en ciertas ocasiones, van apareciendo en la bibliografía trabajos realizados utilizando este método de observación directa (SKIFTESVIK, 1992; CLARK *et al.* 1995).

2.1.2. Criterios generales a tener en cuenta en el diseño experimental de estudios de conducta alimentaria

Sea cual sea el método propuesto, existen diversos conceptos que deben tenerse en cuenta en cualquier diseño experimental y que se relacionan a continuación:

- El tipo de conducta a estudiar debe conocerse y definirse cuidadosamente: la definición del tipo de conducta podría realizarse de muchos modos pero parece más correcto atenerse a una clasificación estandarizada existente, como podría ser la desarrollada por DELGADO & DELGADO (1963) y citada por LEHNER (1979), que se basa en los conceptos de *complejidad* e *interacción social* (Tabla II.1.).

Tabla II.1. *Clasificación de los tipos de conducta según su complejidad y su nivel de interacción social (a partir de DELGADO & DELGADO, 1963, citado en LEHNER 1979).*

A. Unidades de comportamiento simple:

1. Individual: el objetivo es la conducta de los individuos separadamente
 - (i) *unidades posturales o estáticas* que pueden definirse e identificarse mediante posiciones estáticas
 - (ii) *unidades gesturales o dinámicas* que pueden definirse e identificarse solamente mediante acciones
 - (a) *localizadas*: sólo una parte del cuerpo
 - (b) *generalizadas*: implican un cambio de posición de todo el cuerpo respecto al ambiente
2. Social: el objetivo es la relación de cada individuo con sus conespecíficos
 - (i) *unidades estáticas*
 - (ii) *unidades dinámicas*

B. Unidades de comportamiento complejo:

1. Conductas simultáneas
 2. Conductas secuenciales
 3. Conductas sintácticas (la misma conducta tiene un significado diferente dependiendo del contexto en que se desarrolla)
 4. Roles (papel que adopta cada individuo en el grupo)
-

- La pauta de conducta debe describirse exhaustivamente: las acciones que componen la pauta de conducta, bien en

conjunto bien separadamente, deben describirse de la forma más elaborada y precisa posible, así como los criterios utilizados para ello. La descripción debe ser lo suficientemente exhaustiva como para que cualquier otro investigador pueda afirmar por sí mismo que una conducta determinada se está produciendo en aquel momento y de qué manera se está produciendo. Si se establece una secuencia, lo mismo debe ser igualmente válido para cada una de las fases que componen la secuencia.

- La evaluación correcta del conjunto de la respuesta alimentaria, debe incluir el estudio de cada uno de los componentes comportamentales o fases dentro de la secuencia de dicha respuesta (STRADMEYER, 1989): de acuerdo con las teorías etológicas más clásicas, la puesta en marcha de una conducta concreta promueve (retroalimentación positiva) o bien inhibe (retroalimentación negativa) otros tipos de conducta lo cual puede llevar a resultados finales totalmente opuestos (LEHNER, 1979).

De este modo, parece obvio que la motivación desencadenada por un estímulo determinado en la fase inicial puede irse modificando a lo largo del proceso. El resultado en cada fase determinará, pues, lo que suceda en la siguiente. En la conducta frente al alimento en peces se ha demostrado (COLGAN, 1986), tal como ya se había hecho en tetrápodos, que cuando el pez encuentra un estímulo suficientemente incitante tiene tendencia a permanecer en la zona próxima a la fuente del estímulo, lo cual afectaría positivamente a la siguiente fase del proceso, es decir, la ingesta. Mientras que si el estímulo en la degustación ha resultado repelente, la tendencia sería a abandonar la zona inhibiendo la ingesta.

Aún en el caso de la conducta alimentaria y basándose en la secuencia definida por MACKIE & MITCHELL (1985) (Tabla I.2), si el objetivo es determinar la influencia de un estímulo determinado en una especie concreta, será imprescindible obtener un resultado para cada una de las cuatro fases de conducta descritas: orientación lejana,

orientación próxima, iniciación a la ingesta y continuación de la ingesta. Si el estímulo ofrecido debe modificarse, sólo puede hacerse a partir del conocimiento de sus efectos en cada una de las fases. Así pues, el método de estudio debe permitir la diferenciación de cada una de las fases para cuantificar el éxito en cada una de ellas.

- Es necesario establecer unidades de medida de la conducta que permitan comparar resultados y aplicar tratamientos estadísticos: en el estudio del comportamiento no siempre existen unidades de medida obvias que se puedan registrar. Si se está utilizando un método ingestivo cuantitativo, la unidad de medida podría ser la masa de alimento ingerido o el porcentaje que la ingesta representa sobre el alimento suministrado. Se pueden cuantificar también frecuencias por unidad de tiempo, por individuo, o por dispositivo autodemanda, para determinar ciclos diarios, jerarquías o preferencias por una u otra dieta respectivamente.

En la observación directa de los animales, por otra parte, la unidad de medida no es tan evidente y debe establecerse. En este tipo de aproximación al estudio de la conducta alimentaria, no siempre es fácil o factible determinar, por ejemplo, la duración de una secuencia de comportamiento, por muy bien descrita que esté.

Por este motivo, en etología, dentro de una secuencia se suele distinguir entre *estados* y *eventos*. Los primeros, los estados, se definen como aquellas conductas que se están produciendo y que pueden cuantificarse con un cronómetro (por ej. un pez que nada). Los segundos, los eventos, como aquellas conductas que constituyen un cambio de estado, es decir que se producen de forma instantánea y de las cuales sólo se puede registrar la ocurrencia (por ej. el pez que está nadando en un sentido, cambia bruscamente hacia otra dirección). En la Tabla II.2. se muestran las formas más frecuentes de medida de eventos y estados.

Es preciso definir en cada estudio la unidad que se va a utilizar partiendo de la descripción de los estados y eventos que componen la secuencia de conducta.

Tabla II.2. *Medidas más frecuentes de eventos y estados (LEHNER, 1979).*

Tipo de medida	Definición	Aplicación más habitual
Frecuencia total	Número de ocurrencias por unidad de muestra	Eventos, estados
Frecuencia parcial	Ocurrencias observadas por unidad de muestra sin que se conozca el total real	Eventos, estados
Tasa	Número de ocurrencias por unidad de tiempo	Eventos
Duración	Cantidad de tiempo por unidad de conducta	Estados

- El diseño de la experiencia debe controlar ciertos factores externos e internos que tienen una influencia determinante en la ingesta de los animales: existen muchas variables o factores que pueden afectar profundamente las reacciones del animal frente al alimento y deben definirse exhaustivamente para conformar el marco de realización de la experiencia. Estas variables pueden ser muy diversas dependiendo del tipo de estudio. Se presenta a continuación la clasificación de los factores más determinantes de la ingesta en experiencias orientadas al desarrollo de alimentos para animales, desarrollada por SMITH & RASHOTTE (1978), la cual se utilizará para el presente trabajo:
 - **Constitución corporal:** este concepto hace referencia a las diferencias inter e intraespecíficas en cuanto a la conducta, tasa de ingestión, equipamiento sensorial,...
 - **Condiciones orgánicas:** en cualquier diseño experimental deberían excluirse o tenerse en cuenta los *estados orgánicos especiales*, como la reproducción, la enfermedad, los estados inducidos por medicación, implantes, electrodos o el estrés, ya que pueden alterar sensiblemente su respuesta frente al alimento. Aparte de estos estados especiales, una

de las condiciones más decisivas en el resultado de una experiencia de alimentación es la privación. La conducta frente al alimento e incluso las preferencias por una u otra dieta, pueden variar radicalmente dependiendo del tiempo que un animal haya estado sin comer antes de iniciar la experiencia. Adicionalmente las propias consecuencias de la ingesta a corto y largo plazo deben considerarse en el diseño de la experiencia.

- ***Estimulación periférica:*** en la recepción de estímulos periféricos de la especie actúan, en mayor o menor grado, el gusto, el olfato, la visión y la mecanorrecepción. El diseño debe realizarse de manera que se pueda delimitar, dentro de lo posible, la actuación de cada uno de ellos. Si se pretende comparar, por ejemplo, el efecto de dos texturas, es importante que no existan posibles diferencias que el animal perciba a través de la quimiorrecepción o la visión. En este apartado también deberían tenerse muy en cuenta los ya citados *estados orgánicos especiales* que podrían alterar la sensibilidad de los receptores sensoriales, especialmente los gustativos.
- ***Experiencia previa:*** la falta de experiencia o, por el contrario, la experiencia previa puede afectar los resultados de un test de preferencias, en caso de que no se haya previsto. En este punto merece una especial atención el fenómeno conocido como *neofobia*, es decir aversión por todo aquello que no se reconoce y que es más pronunciada en animales salvajes que en domésticos. Asimismo las aversiones “aprendidas” suelen tener efectos muy marcados en la futura ingesta.
- ***Condiciones del test de aceptabilidad:*** siempre de acuerdo con los autores antes citados, la mayoría de procedimientos más comunes en los tests de aceptabilidad pueden clasificarse en una de las células de la siguiente matriz:

	un solo alimento	varios alimentos
Largo plazo (días, semanas)		
Corto plazo (minutos, segundos)		

Se ha demostrado que las conclusiones obtenidas sobre la aceptabilidad de un mismo alimento utilizando cada una de las 4 posibilidades de la matriz, no están siempre relacionadas.

Uno de los elementos que juega un papel más importante en el resultado obtenido dependiendo de la duración del ensayo, es el conjunto de consecuencias a largo plazo de la ingestión, ya que uno u otro tipo de dieta pueden afectar sensiblemente el balance energético y nutricional de un animal. Este desequilibrio no se haría patente en ensayos a corto plazo en los que intervienen más los aspectos organolépticos.

Se deberían añadir además dos grandes grupos de variables, no incluidos en la clasificación anterior:

- **Condiciones espaciales y temporales de realización de la experiencia:** dependiendo del tipo de conducta es importante detallar las diversas *condiciones espaciales*. Puede ser importante describir la localización de cada uno de los individuos en relación con el medio y con sus conespecíficos o bien el tipo de medio en el que se ha desarrollado la experiencia.

Asimismo, las *condiciones temporales* bajo las que se analiza una determinada especie, tienen una gran importancia debido a la interacción con los ritmos biológicos específicos de los animales. Dada la importancia del ritmo endógeno de cada especie, también en los trabajos que no tienen como objetivo directo la cronobiología, o estudio de dichos ritmos, es imprescindible considerar en el diseño experimental cuestiones como el ciclo diario de actividad de la especie, teniendo en cuenta también el ciclo anual y la ontogenia.

-
- **Variables “ruido”:** inevitablemente en cualquier experiencia concurren variables no deseadas que afectan negativamente el desarrollo de la misma provocando errores en los resultados obtenidos. Muchas de estas variables están ya incluidas en la clasificación de SMITH & RASHOTTE, cuando se habla de *estimulación periférica* y *experiencia previa*. Pero también se producen otras que a menudo el investigador es incapaz de detectar. Existen formas de minimizar los diferentes tipos de “ruido”. Cuando se trata de variables que se pueden detectar pero no evitar, es importante intentar mantener dichos factores constantes para todos los individuos de la experiencia y si es posible tenerlos en cuenta en el tratamiento estadístico de los resultados. Para prever el posible efecto negativo de variables que no se pueden detectar ni obviamente evitar, se deben asignar los sujetos al azar a las condiciones experimentales.

2.2. Objetivo del estudio

El presente ensayo se diseña para intentar determinar qué tipo de estímulo químico, de los que se presentan, desencadena una reacción más intensa en lenguados, y cuál es la presentación más adecuada en el pienso con el fin de mantener, y a ser posible potenciar, esta respuesta.

Para ello se define en primer lugar una metodología etológica que permitirá evaluar y cuantificar los posibles cambios en la conducta alimentaria del lenguado frente a un estímulo determinado. Entre los estímulos presentados se encuentran: (1) *aroma comercial* cuyo desarrollo se explica en el apartado 2.3.3. y que se ofrece en diferentes presentaciones con el fin de obtener una gama de piensos que permita comparar su eficacia y (2) *betaína* considerada atrayente universal para todas las especies de peces estudiadas pero en particular para el lenguado (MACKIE *et al.* 1980; CADENA ROA, 1983; METAILLER *et al.* 1983). Ambos tipos de estímulos se compararán con dos controles, uno de ellos en teoría no palatable y el otro un pienso comercial.

Este trabajo constituye pues un test de aceptación a corto plazo a partir del cual se formularán piensos experimentales para utilizar en experiencias a más largo plazo.

2.3. Material y métodos

2.3.1. Descripción de la metodología de estudio

La experiencia se diseña teniendo en cuenta las metodologías disponibles (2.1.1.) y los criterios generales de diseño experimental (2.1.2.) así como los requisitos concretos de la especie en estudio descritos en el Capítulo 1. De acuerdo con todo ello, el diseño experimental tiene las siguientes características:

I. Metodología a aplicar: observación directa

La elección de este método tiene como objeto poder definir adecuadamente la eficacia de un determinado estímulo (aroma comercial) en cada una de las fases de la conducta, o lo que es lo mismo, su eficacia como atrayente, frenador, incitante y estimulante según la clasificación de MACKIE & MITCHELL (1985). Para ello es preciso identificar de forma cualitativa (aunque luego se trate numéricamente para su cuantificación) la respuesta de los lenguados frente al estímulo presentado en cada una de las fases que componen dicha respuesta. El número de individuos que se observa, así como el espacio de observación, son lo suficientemente reducidos como para que se pueda aplicar esta técnica con garantías de éxito.

II. Definición del tipo de conducta a observar.

Siguiendo la clasificación expuesta en la Tabla II.1. se define la conducta sujeto del estudio como un **comportamiento simple** (conducta frente a un tipo determinado de alimento) que se analiza de forma **individual** (se tiene en cuenta el número de individuos de una población que despliega una conducta determinada, sin tener en cuenta las interacciones sociales). Se observan mayoritariamente **unidades de conducta gesturales o**

dinámicas (por ej. movimiento de los peces orientándose hacia o en sentido opuesto al estímulo) incluyéndose tanto las acciones **localizadas** (por ej. la degustación del alimento se detecta mediante determinados movimientos de cabeza) como las **generalizadas** (por ej. la natación hacia el estímulo).

III. Descripción de la secuencia de conducta y las fases que la componen:

La conducta frente al alimento del lenguado ha sido descrita por diversos autores, entre otros DE GROOT (1969), APPELBAUM *et al.* (1983) y BATTY & HOYT (1995) (ver apartado 1.3.3.). Asimismo MACKIE (1982) y MACKIE & MITCHELL (1985) realizan una descripción muy sistemática de la detección de estímulos químicos (Tabla I.2., apartado 1.4.2.).

Dicha información se ha utilizado como base del presente diseño experimental modificándola de acuerdo con las observaciones realizadas en las propias instalaciones durante el período de destete y mantenimiento previo a la experiencia. La secuencia de conducta que se desprende de todo ello y que se utilizará como base para el presente desarrollo metodológico, se compone de tres fases:

- (1) orientación lejana,**
- (2) orientación próxima e iniciación de la ingesta**
- (3) continuación de la ingesta**

Se describen de la siguiente manera:

Orientación lejana (atracción): cuando el estímulo resulta suficientemente atrayente a distancia, en el momento en que la partícula de pienso cae al agua, el lenguado reacciona inmediatamente o como máximo algunos segundos después, desplazándose hacia el lugar donde se encuentran las partículas de alimento. La reacción es relativamente rápida, siempre considerando que el lenguado es un nadador lento; es clara y decidida.

Orientación próxima e iniciación de la ingesta (atracción): cuando llega al origen del estímulo coloca la parte anterior de su cuerpo muy cerca o incluso encima de una partícula de alimento, para aproximar el orificio nasal de la cara nadiral o ciega al estímulo; a continuación mueve la cabeza de lado a lado para estudiarlo con los neuromastos de dicha cara y, o bien se mueve un poco hacia atrás para engullirla de una sola vez o bien ignora la partícula. Estas dos fases, que MACKIE presenta separadas se fusionan debido a que la aproximación al estímulo y la ingesta o rechazo de la partícula se realizan en un período de tiempo de pocos segundos y son difíciles de tratar separadamente.

Continuación de la ingesta (palatabilidad): si es de su agrado, el movimiento necesario para la ingesta es bastante rápido y el pez sigue ingiriendo otras partículas de pienso. Si no es de su agrado, los peces pueden expulsar las partículas ingeridas. Diversos autores consideran que el lenguado nunca escupe partículas de alimento ya que con la degustación previa a la ingesta le basta para decidir la aceptación o no del alimento (MACKIE, 1980; BATTY & HOYT, 1995). Contrariamente a esta opinión APPELBAUM *et al.* (1983) detectan rechazos de partículas que consideran lógicas debido a que el lenguado puede ingerir arena y detritus juntamente con el alimento y establecen que la degustación y discriminación se realizan en la boca. En nuestras experiencias se han detectado evidentes rechazos de partículas con expulsión de las mismas de acuerdo con la opinión expresada por APPELBAUM *et al.* (1983).

Decidida la aceptación, habitualmente el lenguado continúa comiendo durante un período aproximado de 10 minutos. A menudo, en este período de 10 minutos, se observa una parada general de la actividad ingestiva que puede durar desde unos segundos hasta casi un minuto, después de la cual se restablece de nuevo la actividad. No se ha encontrado una explicación plausible para este tipo de evento pero se cumple con suficiente regularidad como para considerarla en la pauta habitual de alimentación.

IV. Unidades de medida de la conducta:

La descripción de la pauta alimentaria realizada más arriba se considera la estándar para un individuo que encuentra un alimento suficientemente atrayente.

Tabla II.3. Descripción de la respuesta puntuable como positiva, intermedia o negativa para cada una de las fases de la secuencia.

Orientación lejana	<ul style="list-style-type: none"> + todos los peces o la mayoría de ellos reaccionan cuando el pienso cae dentro del agua. Reaccionan con cierta celeridad. o bastantes peces se mueven, mientras que el resto no muestra ninguna reacción hacia el alimento durante todo el período de observación - ningún pez reacciona o muy pocos de ellos lo hacen. Incluso se observa alguna reacción de miedo y huida
Orientación próxima e iniciación de la ingesta	<ul style="list-style-type: none"> + todos los peces o la mayoría de ellos prueban el pienso y lo ingieren. La reacción es bastante general en el conjunto de la población, llegando a ser del 100% de los individuos, y también bastante rápida. o la mayoría de los peces que reaccionan inicialmente prueban el pienso y lo ingieren, pero el comportamiento es más lento. Algunos de los peces, que han mostrado una atracción distante por el estímulo, ni siquiera prueban el alimento cuando se acercan lo suficiente a él, aún teniendo oportunidad de hacerlo. Habitualmente los peces que no reaccionan al principio nunca intentan comer. - ningún pez intenta comer. En algunos casos, se observa un movimiento de huida, mostrando un claro desagrado.
Continuación de la ingesta	<ul style="list-style-type: none"> + todos los peces o la mayoría de ellos comen de nuevo y continúan haciéndolo durante un período de 10 minutos. En algunos casos, se observan interrupciones generales como las descritas en la secuencia inicial, cuya duración es siempre inferior a un minuto. En estos casos la conducta no es continua pero es igualmente evidente y decidida. o algunos peces, -en ocasiones pocos -, siguen comiendo. Las paradas son más prolongadas y frecuentes. La actividad alimentaria puede considerarse lenta o muy lenta. - ningún pez come pienso y si lo comen se observan rechazos evidentes con expulsión de la partícula.

En la experiencia se observa una población de lenguados y se puntúa cualitativamente cómo reacciona el conjunto de la población al estímulo presentado, puntuando de forma positiva (+), negativa (-) o intermedia (o), de acuerdo con la descripción que se detalla en la Tabla II.3.

El objetivo de esta puntuación es ver si la mayoría de la población ejerce una acción determinada y el ritmo al que la realiza. Por ello, durante la observación se registra la ocurrencia de estados y eventos, pero no su duración.

Cada uno de los piensos se ofrece un determinado número de veces registrando las reacciones en cada repetición. Los resultados se registran en términos de frecuencia de cada tipo de respuesta específica (+, o, -), expresándose en porcentaje de respuestas positivas, intermedias y negativas respecto al total de respuestas en cada fase de la secuencia y para cada pienso. De este modo se obtiene un trío de valores por fase y un total de nueve valores por pienso.

V. Condiciones de realización de la experiencia:

Se parte de la clasificación descrita en 2.1.2.

- *Constitución corporal:* el perfil trófico de los Soleidos, descrito en el apartado 1.3.1., basado en crustáceos, poliquetos y moluscos en diferentes proporciones, constituye el criterio básico en la elección del aroma comercial que se utilizan en el presente trabajo.
- *Condiciones orgánicas:* tanto al inicio de la experiencia como durante el desarrollo de la misma el estado de los peces es satisfactorio. No existe deprivación, ni han sufrido ninguna patología.

Para compensar el posible efecto de un apetito excesivo (en la toma de la mañana) o de la saciedad (en la toma de la tarde) se van alternando los piensos experimentales en los dos horarios de administración (mañana y tarde,

respectivamente). Se elabora un calendario de distribución de los piensos experimentales que se respeta estrictamente durante toda la experiencia.

- *Estimulación periférica:* el aroma se aplica sobre pienso, trabajando pues con un estímulo completo que actúa sobre diferentes sentidos, a saber, gusto y olfato, vista y mecanorrecepción. De este modo, los resultados finales se aproximan más a los que se podrían obtener con un pienso convencional en condiciones de cultivo. Asimismo, para dar mayor fuerza a la comparación, se utilizan dos controles, uno de ellos denominado *interno*, constituido por la misma fórmula base pero sin modificación organoléptica alguna, y otro, denominado control *externo*, que es una presentación comercial.
- *Experiencia previa:* el denominado control *externo*, es el pienso con el cual los peces han realizado la transición de alimentación viva a inerte. Esto tiene como objetivo detectar posibles preferencias o aversiones hacia los “nuevos” piensos precisamente por el hecho de ser nuevos (*neofobia* o *neofilia*). Asimismo la rutina de alimentación se establece durante el período previo a la experiencia y se mantiene rigurosamente durante la misma, tanto en lo que respecta a horario como a las personas que la llevan a cabo, las cuales conocen bien las reacciones habituales de los peces.
- *Condiciones del test de aceptabilidad:* se aplica un test de un solo alimento a corto plazo, ya que estos tests son, según SMITH & RASHOTTE (1978) (apartado 2.1.2.), los que permiten evaluar mejor los factores implicados en el inicio de la ingesta.
- *Condiciones espaciales y temporales de realización de la experiencia:* en la experiencia no se tienen en cuenta la relación y/o posición de los individuos en el espacio ni entre ellos. Se valora la respuesta del grupo frente a cada pienso, ya que el

número de individuos (20 por tanque) no permite el estudio independiente de cada uno de ellos pero sí el del conjunto. Se debe considerar que en la especie en estudio, existen relativamente pocas interacciones entre conespecíficos ya que no es especialmente jerárquica ni agresiva. Solamente se valora la situación en el tanque del conjunto de los peces que componen la muestra al iniciar la observación para establecer la “normalidad”, tal como se explicará más adelante.

Respecto a las condiciones temporales cabe destacar que se establece un fotoperíodo de 12 h sincronizado con el ciclo día/noche natural. Como ya se ha comentado, la alimentación se realiza durante el día, que no corresponde precisamente al ciclo diario del lenguado, cuya máxima actividad se produce en ausencia de iluminación (KRUUK, 1963). FUCHS (1978), por otra parte, reporta una escasa influencia del fotoperíodo, tanto sobre el crecimiento como sobre la supervivencia, en juveniles de lenguado en condiciones de cautividad.

Considerando estos precedentes, los peces han sido habituados durante el período de adaptación a la alimentación diurna, habiendo respondido bien a este horario. Si los resultados fuesen negativos en general se podría considerar que los peces conservan de forma determinante su ritmo endógeno natural.

- *Variables “ruido”*: durante el desarrollo de la experiencia las condiciones externas se mantienen controladas de tal modo que no haya circulación de personas ajenas al experimento, ni ruidos innecesarios, etc.

Adicionalmente, antes de iniciar la metodología de observación diaria, los observadores deben certificar la “normalidad” de los peces para garantizar que no existe alguna fuente de estrés no identificada. Se considera que los peces están “normales” cuando, antes de iniciar la observación, están quietos en el fondo, preferiblemente

agrupados en algunas de las zonas más oscuras del tanque y realizando breves recorridos relativamente rápidos de vez en cuando. Esta conducta se corresponde con la descrita por MACQUART-MOULIN *et al.* (1991) y BATTY & HOYT (1995) para peces que están recibiendo una alimentación adecuada, detectándose una conducta más activa, especialmente en la columna de agua, cuando el alimento que están recibiendo es insuficiente o insatisfactorio en calidad y/o cantidad.

2.3.2. Peces. Condiciones de estabulación

Los lenguados (*Solea solea*) sujeto de la presente experiencia, procedentes de la *hatchery* del MAFF en Conwy (Gales), se trasladan a las instalaciones que la Escuela Superior de Agricultura de Barcelona tiene cedidas en el Acuarama del Zoológico de Barcelona. Una vez adaptados, se alimentan a base de nauplios de *Artemia*, continuando con la misma pauta de alimentación que recibían en la *hatchery*. El destete se realiza con pienso comercial para rodaballo proporcionado por la firma EWOS.

Justo antes de iniciar el período experimental, un lote de 120 peces de 220 días de edad, se anestesia (MS222, 100 ppm), se muestrea y se clasifica en dos grupos para reducir la dispersión de tallas.

De hecho, la dispersión de tamaños es un problema acusado en lenguados que ha sido objeto de diversos trabajos (RODRIGUEZ, 1984; BARAHONA-FERNANDES, 1990; PANAGIOTAKI *et al.* 1992; QUIROS & HOWELL 1993).

Por este motivo, aún cuando la diferencias de medias no es muy importante, se clasifica la población tomando como talla de corte el peso correspondiente a la mediana (8,4 g). Se obtienen dos grupos más homogéneos que se denominarán desde ahora, *peces grandes* (> 8,4 g en el momento de la clasificación) y *peces pequeños* (< 8,4 g en el momento de la clasificación). Los peces se distribuyen en 6 tanques. La distribución resultante de la clasificación se muestra en la Tabla II.4.

Tabla II.4. *Distribución de los peces en clases de peso. Se adjuntan las medias de peso así como el error estándar (M (ES)) y rango de pesos (Min-Max) para cada tanque, al inicio de la experiencia.*

	N. de tanque M (ES) Min-Max	N. de tanque M (ES) Min-Max	N. de tanque M (ES) Min-Max
	1	2	3
Peces pequeños	7,48 (0,12) 6,7-8,3	7,48 (0,13) 6,3-8,3	7,64 (0,15) 5,8-8,3
	4	5	6
Peces grandes	9,35 (0,18) 8,4-11,5	9,19 (0,17) 8,4-11,0	9,46 (0,22) 8,4-11,8

La experiencia se inicia 6 días más tarde para facilitar la recuperación del estrés ligado al muestreo y clasificación.

Algunas de las condiciones de estabulación que pueden tener interés se expresan a continuación:

T°C	La temperatura oscila alrededor de los 14°C durante toda la experiencia. Esta temperatura se encuentra en el rango de valores aportados por LIEWES (1984), según dicho trabajo la temperatura óptima para lenguado se halla entre 10 y 25°C para juveniles y entre 10 y 15°C para adultos.
Oxígeno	a saturación
Salinidad	36 ‰, de acuerdo con FONDS (1975) el rango de salinidad óptimo para crecimiento en <i>S.solea</i> es entre 10 y 40 ‰.
Iluminación	fotoperíodo de 12 h, iluminación artificial de 300-400 lux (los peces se cubren con una malla de transmitancia lumínica intrínseca del 64% fuera del período de observación).
Densidad	0,5-0,7 kg m ⁻³
Tasa de alimentación	3-3,5 % del peso vivo por día

2.3.3. Aroma comercial. Desarrollo de la aplicación.

Para la experiencia en curso la firma Givaudan-Roure aporta una serie de aromas escogidos utilizando como criterio el perfil trófico de la especie en estudio y que corresponden a aromas de crustáceos y moluscos. Es necesario, en una primera fase, elegir el aroma más adecuado para el

desarrollo de la aplicación sobre pienso que se utilizará en la presente experiencia. Para ello se desarrolla un dispositivo experimental cuyo objetivo es escoger aquel aroma que promueve un comportamiento más activo, aplicando un criterio cualitativo, después de registrar, mediante grabación en vídeo, la respuesta de una muestra de lenguados frente a cada uno de los aromas presentados (BALASCH, 1995).

La preparación finalmente escogida es un aroma de molusco bivalvo que, utilizando la definición descrita en la legislación vigente (apartado 1.5.4), se corresponde a una mezcla de sustancias aromáticas naturales idénticas cuya combinación define o recuerda un determinado producto, en este caso, un constituyente habitual de la dieta natural del lenguado.

Siguiendo la clasificación establecida por MACKIE (1982) y MACKIE & MITCHELL (1985) se requiere que la mezcla sea *atrayente, frenadora, incitante y estimulante*, para garantizar la atracción desde cierta distancia y la aproximación a la fuente del estímulo, el inicio de la ingesta y la continuación de la misma. Este criterio es el que se utiliza como base para desarrollar la aplicación sobre pienso.

Para satisfacer este objetivo es necesario conseguir dos presentaciones de aroma, una a incorporar exteriormente al gránulo de pienso, que deberá actuar como *atrayente y frenadora* y otra, incorporada en el interior del gránulo que debe actuar como *incitante y estimulante*. El desarrollo de las presentaciones corre a cargo del Departamento de I+D de la multinacional. Se realiza básicamente modificando el tipo de soporte y teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

Aroma en el exterior del gránulo: dos factores son los determinantes en la elección del soporte o *carrier* para esta presentación:

- (1) Para incorporar el aroma exteriormente al gránulo ya fabricado, se va a utilizar aceite como vehículo de incorporación que se aplicará como *coating*,

- (2) Es necesario que el aroma se disuelva suficientemente en el agua si se pretende que actúe como atrayente a cierta distancia.

Por tanto, será imprescindible crear un soporte para el aroma que proporcione una cierta retención en aceite (lipofilia débil) y una difusión suficientemente perceptible en el agua (hidrofilia), es decir un soporte que podríamos considerar anfifílico.

Como vehículo externo de la presentación se utiliza aceite de girasol. Este tipo de aceite, de características olfativas más discretas que el aceite de pescado, se emplea para evitar el posible efecto enmascarante del aroma que éste último podría tener. Se considera además que, dados los hábitos alimentarios del lenguado, el aceite de pescado podría resultar incluso repelente.

El *carrier* utilizado en este caso es una mezcla de disolventes autorizados en aromas alimentarios, en las proporciones consideradas adecuadas por los especialistas de Givaudan-Roure, para conseguir la anfifilia deseada en la presentación.

Aroma en el interior del gránulo: en este caso se requiere un soporte de las siguientes características:

- (1) que mezcle el aroma adecuadamente con el resto de ingredientes del pienso,
- (2) que le proteja de la oxidación y demás reacciones degradativas durante el proceso de fabricación y por la interacción con otros componentes del pienso y
- (3) que permita su liberación en el momento de la ingesta.

Para esta presentación se escoge un aroma tratado por *spray-drying* sobre soporte de *maltodextrinas* y *dextrinas* (almidones hidrolizados). Las maltodextrinas son polisacáridos nutritivos no dulces que se obtienen por hidrólisis parcial de almidón de maíz mediante enzimas y/o ácidos (KENYON & ANDERSON, 1988). Las maltodextrinas tienen la ventaja de ser prácticamente insípidas, se mezclan muy bien en la aplicación y tienen un coste relativamente bajo. Además tienen una buena

dispersabilidad en agua, aún a bajas temperaturas, lo cual aporta una excelente tasa de liberación de aroma.

2.3.4. Piensos utilizados

2.3.4.1. Piensos experimentales

En la Escuela Superior de Agricultura de Barcelona se formulan los piensos experimentales utilizando una hoja de cálculo informatizada diseñada para tal fin. La fórmula base se mezcla en los laboratorios de la misma Escuela e incluye harina de pescado, como ingrediente mayoritario, harina de soja, cuartas y salvado de trigo, levadura de destilería, harina de sangre, aceite de pescado y corrector vitamínico-mineral para rodaballo (Roche). Cuando se adiciona aroma o betaína en la mezcla, se incorpora en sustitución de levadura de destilería en la proporción correspondiente. Las fórmulas completas de estos piensos se encuentran detalladas en el Anexo.

Todas las dietas realizadas a partir de la fórmula base son extrusionadas en la planta piloto de fabricación de piensos de la Escuela de Ingenieros Agrónomos de la Universidad de Valencia¹. Además, antes de su utilización, todas las dietas fabricadas para el presente trabajo, incluso las que no incorporan aroma en el exterior, se tratan con el *coating* de aceite vegetal. La finalidad de la cubierta de aceite es, por una parte, eliminar las posibles diferencias que la presencia o ausencia de aceite podría introducir en el pienso (textura e incluso sabor u olor) y, por otra parte, mejorar la estabilidad en el agua de acuerdo con las pruebas físicas que se hallan descritas en el Anexo.

Fórmula base + aroma comercial:

Con estas dos formas de aplicación del aroma se preparan 3 tipos de pienso, de los cuales, uno incluye aroma en el interior y en el exterior, otro solamente aroma en el interior y otro sólo aroma en el exterior. El aroma interno se incorpora en el momento de la fabricación,

¹ Dr. Miguel Jover Cerda. Laboratorio de Acuicultura. Dep. de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia.

mientras que el externo se añade por *coating* cuando el pienso va a ser consumido. Las dosificaciones, recomendadas por Givaudan-Roure, son del 1,5% en el interior y del 0,5% en el exterior.

Fórmula base + betaína:

Se utiliza la misma fórmula base incorporando, durante el proceso de fabricación, betaína en un porcentaje del 3% de la fórmula. Este porcentaje se establece partiendo del trabajo de CADENA-ROA (1983) que establece en un 2,9% la dosis mínima de betaína para promover la conducta alimentaria de lenguados utilizando una dieta purificada. La fórmula del presente trabajo no es una dieta purificada pero se utilizará la misma proporción de betaína, lo cual se justifica adicionalmente por el interés en igualar, dentro de lo posible, el coste de adición de atrayentes con el pienso que incorpora la cantidad más elevada de aroma. También de acuerdo con CADENA-ROA (1983) se utiliza betaína base (Sigma) que en sus trabajos aporta mejores resultados que la betaína HCl utilizada por otros autores.

2.3.4.2. Piensos control

Se utilizan dos controles para comparar los piensos experimentales.

Control interno: Fórmula base

MACKIE (1982) considera que uno de los métodos ideales para experimentar con estimulantes de la conducta alimentaria consiste en incorporar dichas sustancias a una dieta en principio inaceptable o como mínimo no palatable, para el pez. Con este fin, MACKIE recomienda la utilización de piensos basados en caseína que no proporciona ningún sabor a la dieta. Otros autores (TOFTEN *et al.* 1995) consideran más adecuado el uso de piensos similares a los comerciales como base para la aplicación de estimulantes químicos. De este modo se garantiza la palatabilidad final del pienso, a pesar de las posibles interacciones del atrayente con los ingredientes habituales del mismo. Este es un planteamiento que acerca los resultados de la investigación a una posible transferencia al sector productivo ya que, en caso de obtener resultados positivos, la aplicación a un pienso convencional tiene mayores garantías de éxito.

En el presente trabajo, se opta por esta segunda opción, es decir, por la utilización de piensos base cuya formulación y composición sea similar a un posible pienso comercial para la especie. Como control se utiliza la misma fórmula que para los piensos experimentales pero sin ningún tipo de atrayente. Recordemos que esta fórmula base incluye como ingrediente mayoritario harina de pescado, además de harina de soja, cuartas y salvado de trigo, levadura de destilería, harina de sangre y aceite de pescado, alimentos, en principio, no palatables para el lenguado. El ingrediente más importante, la harina de pescado, producida básicamente a partir de peces teleósteos, contiene cantidades insignificantes de betaína según los trabajos de LOVE (1980). De acuerdo con ello, y en este caso también de acuerdo con MACKIE *et al.* (1980), existen bastantes probabilidades de que esta dieta experimental, ofertada sin ningún atrayente, fuese menos aceptada por los peces en estudio. Pero, por otra parte, la harina de pescado será el ingrediente más probable en caso de formular un pienso comercial e igualmente el resto de ingredientes utilizados tienen grandes posibilidades de terminar formando parte de un pienso comercial para la especie.

Este pienso se utiliza como control *interno*, ya que tanto los ingredientes (en composición y en calidad) como el proceso de fabricación son los mismos que en los piensos experimentales. Por este motivo si existiese algún problema debido a estos factores podría detectarse.

Control externo: pienso comercial

Esta fórmula está diseñada para rodaballo por EWOS (actualmente PROAQUA), y es el pienso con que los peces se han alimentado desde la transición de presa viva a alimento inerte hasta el inicio de la experiencia, siempre con un buen nivel de aceptación. Dicha fórmula incluye como atrayente betaína y una combinación de aminoácidos, en ambos casos en proporciones desconocidas. Además este pienso está fabricado a una escala diferente que los piensos experimentales, en una planta industrial de fabricación de piensos, y con diferentes ingredientes. Se considera pues un control *externo* por dos motivos: en primer lugar, por ser un pienso fabricado utilizando estándares industriales y en segundo lugar, por ser el pienso al cual los peces están más acostumbrados y que, por

tanto, permitirá detectar cambios comportamentales en el pez no necesariamente asociados al tipo de pienso.

Se consiguen, pues, 4 piensos experimentales, que varían en el tipo de atrayente (betaína o aroma) y la vía de incorporación en el caso del aroma comercial (interior o exterior), y dos piensos control, uno interno (igual fórmula base y proceso de fabricación) y otro externo (pienso comercial), tal como se describe en la Tabla II.5.

Tabla II.5. *Breve descripción de los 6 piensos utilizados en la experiencia. En el nombre del pienso las letras mayúsculas representan el tratamiento interno y las minúsculas el tratamiento externo aplicado, de tal manera que A/a significa aroma comercial, B betaína, C pienso comercial y O/o indica que no existe atrayente.*

Pienso	Tipo de pienso	Tipo de atrayente (interior)	Tipo de cubierta (exterior)
Aa	fórmula base	Aroma molusco	Aroma molusco
Ao	fórmula base	Aroma molusco	Ninguno
Oa	fórmula base	Ninguno	Aroma molusco
Bo	fórmula base	Betaína	Ninguno
Oo	fórmula base	Ninguno	Ninguno
C	fórmula comercial	Betaína + aminoácidos	

En todos los casos, el tamaño de las partículas de alimento es de 1-2 mm, de acuerdo con el tamaño de los peces al inicio de la experiencia.

2.3.5. Observadores

Los tests son llevados a cabo por dos observadores. Uno de ellos se considera “ciego”, es decir que desconoce el tipo de pienso problema que se está administrando. El otro prepara las raciones diarias a administrar de acuerdo con el calendario y las tasas de alimentación establecidas, pudiendo estar, por este hecho, sujeto a una mayor subjetividad. Cada uno de los observadores juega el mismo papel a lo largo de toda la experiencia.

2.3.6. Metodología de observación

Cada día se aportan dos piensos experimentales, uno por la mañana y otro por la tarde. El horario de la mañana está más próximo a su

ciclo diario natural, mientras que el de la tarde está totalmente fuera de su horario endógeno característico. A pesar de ello, durante el período previo a la experiencia ésta ha sido la pauta habitual de alimentación y parece existir una buena respuesta a dicho horario.

Asimismo, en cada una de las aportaciones de alimento puede intervenir de diferente manera bien el número de horas transcurridas desde la última aportación de alimento, bien el nivel de saciedad conseguido en la administración previa. Para evitar la posible influencia de dichos factores, las diferentes dietas se suministran de tal manera que, al final de la experiencia, todos los tanques reciben todos los piensos en todas las combinaciones posibles, tanto por la mañana como por la tarde.

El número final de repeticiones realizadas por pienso es el que se expresa en la Tabla II.6. Como se puede observar en dicha Tabla, el control externo se aporta un mayor número de veces en razón de una de las funciones que debe cumplir, concretamente la de avalar la “normalidad” de los peces.

Tabla II.6. *Número de repeticiones realizadas con cada pienso en el conjunto de los tanques experimentales*

Pienso	N. repeticiones	Pienso	N. repeticiones
Oo	54	Ao	54
Bo	52	Oa	52
C	96	Aa	52

La metodología de la observación se realiza según el siguiente protocolo:

- (1) **Administración 1** (8h30 min.): se distribuye el pienso y ambos observadores anotan independientemente sus consideraciones sobre la conducta de los peces, de acuerdo con la secuencia estándar descrita previamente, y adjudican, también de forma independiente, una puntuación para cada fase. No se permite ningún comentario, movimiento o ruido.

- (2) Transcurridos 15 minutos, repiten el mismo test en el tanque siguiente y así sucesivamente hasta completar los 6 tanques experimentales.
- (3) Antes de la segunda administración todos los tanques se limpian retirando, mediante sifonado, los restos de pienso no ingerido.
- (4) **Administración 2** (16 h) se repite la experiencia de la misma forma, lo cual constituye la segunda administración, procediendo de la misma manera con los 6 tanques.

2.3.7. Métodos estadísticos

El tratamiento estadístico se ha realizado con el programa SAS (Statistical System Software versión 6.12). El objetivo del tratamiento estadístico es conocer la reacción de los peces frente a cada tipo de pienso, teniendo en cuenta la influencia de factores definidos en el diseño, a saber, el horario de distribución del alimento y el tamaño medio de los animales. Se valorará la reacción registrada en cada una de las fases de la secuencia alimentaria, para conocer su nivel de eficiencia como *atrayente*, *frenador*, *incitante* y *estimulante*, así como la reacción global ante cada pienso.

2.3.7.1. Tratamiento de los resultados obtenidos

Una vez recogidas las puntuaciones obtenidas por cada pienso en las diversas observaciones, se puede calcular la frecuencia de cada tipo de respuesta en el conjunto de las repeticiones. A partir de dicha frecuencia, se calcula la distribución porcentual de respuestas positivas, intermedias y negativas, en cada fase de la conducta alimentaria y en el conjunto de la respuesta.

De este modo, y de acuerdo con el procedimiento de puntuación explicado en el párrafo anterior, cada pienso está representado por 9 valores, un trío por cada fase de la respuesta. Los resultados se clasifican en función del horario de administración de alimento, de la clase de peso de los peces y del tipo de pienso. Se dispone de un juego de resultados por observador.

2.3.7.2. Definición de las variables *Índice de aceptación (I.a.)* e *Índice de aceptación global (I.a.g.)*

Dada la complejidad de utilizar un conjunto de 9 valores para cada respuesta a un pienso, se define una variable cuantitativa, que se denominará *Índice de aceptación (I.a.)* y que permitirá resumir la información recogida por los observadores en relación al comportamiento de los peces.

Este índice se construye asignando unos coeficientes (1, 0,5 y 0) a los tres distintos tipos de respuestas definidas (positivas, intermedias y negativas, respectivamente). La aplicación de este índice, permite obtener 3 valores por pienso, uno por cada una de las fases consideradas..

La variable se define del siguiente modo:

$$I.a. = (a \times 1) + (b \times 0,5) + (c \times 0) / 100$$

donde *a* es el porcentaje de respuestas positivas,
b el de respuestas intermedias y
c el de respuestas negativas.

Este modo de presentar los comportamientos observados permite identificar de forma rápida y concisa las mejores respuestas, a la vez que facilita la evaluación conjunta de la información recogida. Utilizando este índice, un valor de *I.a.* cercano a 1 significará una muy buena respuesta del pez, mientras que índices muy próximos a cero indicarán una respuesta muy deficiente.

Asimismo, se utiliza un *Índice de aceptación global (I.a.g.)* para las tres fases, el cual se obtiene con la suma de los tres *I.a.* correspondientes a cada fase. Este índice global permite resumir aún más la puntuación total obtenida por un pienso en el conjunto de la respuesta, siendo en este caso las mejores puntuaciones aquellas que se aproximan a 3.

De este modo se puede establecer con mayor inmediatez tanto la comparación global de los piensos como su eficacia en cada una de las fases de la conducta.

2.3.7.3. Análisis exploratorio de los datos

Para el tratamiento estadístico se utilizan las respuestas transformadas a variable *Índice de aceptación (I.a.)*, para cada fase de la conducta alimentaria e *Índice de aceptación global (I.a.g.)* para el conjunto de la respuesta.

Se realizan representaciones gráficas de los datos (*stem-and-leaf plot* y *boxplot*). Para ratificar la normalidad de la distribución se aplican tests de normalidad (*normal probability plot*) para las variables *I.a.* e *I.a.g.*, agrupando los datos por administración, clase de peso y tipo de pienso. Se tabulan los valores de *I.a.* e *I.a.g.* calculados para las diferentes agrupaciones, así como resúmenes numéricos de tendencia central y dispersión.

2.3.7.4. Inferencia estadística

En todo el tratamiento estadístico el nivel de significación que se utiliza es $\alpha = 0,05$, aunque en algunos casos se indicarán específicamente niveles de significación distintos.

Influencia de los observadores:

Para evaluar, en primer lugar, la independencia de criterio entre los dos observadores, se aplica un test de homogeneidad (*Tabla de contingencia*) sobre el conjunto de las observaciones directas registradas por cada uno de ellos.

Influencia de las fases de la conducta:

En el diseño experimental, las fases se han definido formando parte de una misma secuencia, por tanto sería lógico que existiese interacción entre ellas. Sería de esperar que, tal como lo describe COLGAN (1986), el resultado de cada una de ellas influyese en la siguiente. Para valorar dicha interacción se representa un diagrama de dispersión en el cual se introducen los valores para la variable *I.a.* obtenidos en las tres fases. Puesto que en un diagrama de dispersión solamente se controlan dos variables (expresadas en los ejes *x* e *y* respectivamente), para poder incluir los valores de la tercera variable ésta se transforma a variable categórica. Así pues se representan los valores de *I.a.* obtenidos en la primera fase (orientación lejana) en el eje de abscisas, los de la segunda fase (orientación

próxima e iniciación a la ingesta) en el eje de ordenadas y los valores de *I.a.* obtenidos en la tercera fase (continuación de la ingesta) se transforman a variable categórica tal como se expresa más adelante. Esta expresión gráfica permite visualizar cada punto en relación con las tres fases en un solo diagrama. La transformación de los valores correspondientes a la tercera fase, a una variable categórica se hace del siguiente modo:

rango de valores de <i>I.a.</i>	variable categórica	rango de valores de <i>I.a.</i>	variable categórica
1 – 0,75	a	0,49 – 0,25	C
0,749 – 0,5	b	<0,25	D

Si se observa la interacción o dependencia esperada, se aplicará un *test de correlación de Pearson*, con el fin de conocer el grado de dicha interacción, y posteriormente, en todos los casos se aplicarán tests ANOVA independientes para cada fase de la secuencia alimentaria. Si no se observase la asociación entre fases, se podrían analizar todos los datos de forma conjunta en un solo test ANOVA.

Influencia del horario de administración, clase de peso y tipo de pienso:

Para poner de manifiesto la influencia de estos tres factores, se aplican análisis de la varianza (ANOVA) de 3 factores sin interacción. Los factores a analizar son tres: el horario de administración que tiene 2 niveles (1 y 2), la clase de peso individual también con 2 niveles (peces pequeños y peces grandes) y el tipo de pienso, con 6 niveles (Bo, Aa, Oo, Ao, Oa y C). Se consideran fijos, puesto que los diferentes niveles estudiados han sido escogidos por procedimientos no aleatorios. Este diseño factorial se aplica para las variables *I.a.* e índice de aceptación global *I.a.g.* Cuando el análisis evidencia la existencia de diferencias significativas, para alguno de los factores, se realiza un *Análisis de comparación múltiple de medias* mediante el *procedimiento de Tukey* (TUKEY, 1949), el cual se caracteriza por ser más conservador que otros tests.

2.4. Resultados y Discusión

En este apartado se revisarán y comentarán, en primer lugar, las tendencias más destacables que sugiere el análisis exploratorio de los

Influencia de la incorporación de aroma sobre el comportamiento

datos y su expresión gráfica. En segundo lugar, se analizarán los resultados obtenidos en la inferencia estadística.

Tabla II.7. Se expresa para cada tipo de pienso y en los peces pequeños, durante la primera y segunda administración: (1) porcentajes de frecuencia de cada tipo de respuesta respecto al total de respuestas en cada fase, (2) valores de I.a., (3) valores de I.a.g. para el conjunto de la secuencia alimentaria. Siendo O.l. orientación lejana, O.p.+i. orientación próxima e iniciación de la ingesta y C.i. continuación de la ingesta.

Administración 1													
Pienso	Frecuencia de cada tipo de respuesta (% sobre total de respuestas por fase y pienso)									I.a.			I.a.g.
	O.l.			O.p.+i.			C.i.			O.l.	O.p.	C.i.	
	-	O	+	-	o	+	-	o	+				
Aa	8	42	50	16	42	42	35	50	15	0,71	0,63	0,40	1,74
Ao	28	31	41	28	41	31	41	37	22	0,57	0,52	0,41	1,50
Oa	14	22	64	10	54	36	23	45	32	0,75	0,63	0,55	1,93
Oo	14	26	60	20	30	50	40	40	20	0,73	0,65	0,4	1,78
Bo	46	20	34	39	22	39	42	16	42	0,44	0,5	0,5	1,44
C	30	50	20	20	61	19	48	40	12	0,45	0,5	0,32	1,27
Administración 2													
Aa	29	40	31	25	46	29	32	64	4	0,51	0,52	0,36	1,39
Ao	20	35	45	28	42	30	50	45	5	0,63	0,51	0,28	1,42
Oa	33	37	30	59	38	3	50	45	5	0,49	0,22	0,28	0,99
Oo	41	28	31	29	56	15	44	50	6	0,45	0,43	0,31	1,19
Bo	50	41	9	59	38	3	50	20	30	0,30	0,22	0,40	0,92
C	50	30	20	51	40	9	56	37	7	0,35	0,29	0,26	0,90

Tabla II.8. Se expresan los mismos resultados que en la Tabla II.7. pero en los peces grandes.

Administración 1													
Pienso	Frecuencia de cada tipo de respuesta (% sobre total de respuestas por fase y pienso)									I.a.			I.a.g.
	O.l.			O.p.+i.			C.i.			O.l.	O.p.	C.i.	
	-	O	+	-	o	+	-	o	+				
Aa	0	8	92	0	22	78	15	50	35	0,96	0,89	0,6	2,45
Ao	7	14	79	4	32	64	0	43	57	0,86	0,8	0,79	2,45
Oa	0	8	92	4	11	85	0	62	38	0,96	0,91	0,69	2,56
Oo	15	35	50	5	45	50	0	50	50	0,68	0,73	0,75	2,16
Bo	11	31	58	8	46	46	32	34	34	0,74	0,69	0,51	1,94
C	10	51	39	16	54	30	31	41	28	0,65	0,57	0,49	1,71
Administración 2													
Aa	0	29	71	0	42	58	4	75	21	0,86	0,79	0,59	2,24
Ao	3	42	55	22	32	46	18	57	25	0,76	0,62	0,54	1,92
Oa	0	18	82	4	43	53	12	42	46	0,91	0,75	0,67	2,33
Oo	10	37	53	10	63	27	12	60	28	0,72	0,59	0,58	1,89
Bo	25	18	57	11	43	46	22	36	42	0,66	0,68	0,60	1,94
C	32	26	42	25	49	26	38	36	26	0,55	0,51	0,44	1,50

En las Tablas II.7. y II.8. se muestran los porcentajes de respuestas positivas, intermedias y negativas obtenidos para los diversos piensos experimentales en cada una de las fases de la secuencia alimentaria, así como los valores de *I.a.* y *I.a.g.*, correspondientes. A partir de este momento se utilizará la nomenclatura de los piensos descrita en el apartado 2.3.4., según la cual la primera letra, siempre expresada en mayúscula, representa el tratamiento aplicado en el interior, mientras que la segunda letra, en minúscula, indica el tratamiento exterior. Las letras utilizadas son A para indicar la presencia de aroma, B para Betaína y C para indicar el pienso comercial, mientras que la letra O indica que no existe ninguna sustancia organolépticamente activa añadida.

2.4.1. Influencia de los observadores

La aplicación del test de homogeneidad al conjunto de los resultados registrados por ambos observadores, no evidencia diferencias significativas, indicando, por tanto, que el factor observador no es significativo. A partir de este resultado todos los valores obtenidos por ambos observadores se analizarán de forma conjunta.

2.4.2. Influencia de las fases de la conducta alimentaria

El diagrama de dispersión de la Fig.2.1. permite representar la variable *I.a.* para las tres fases de la secuencia.

Al representar en un único diagrama de dispersión las tres fases se evidencia una cierta tendencia de tal modo que, mayoritariamente, valores elevados en la primera fase (orientación lejana), se corresponden con valores elevados en la segunda fase (orientación próxima e iniciación a la ingesta) y en la tercera (continuación de la ingesta).

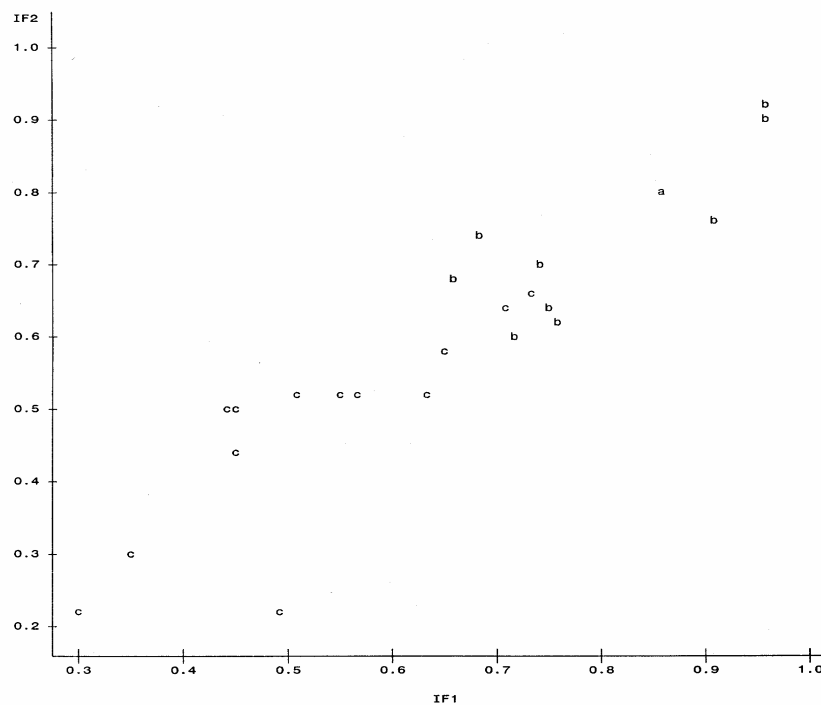


Fig. 2.1. Diagrama de dispersión de los valores de I.a. para las tres fases. La primera fase (IF1), observación lejana, se expresa en el eje de abscisas y la segunda, orientación próxima e iniciación de la ingesta (IF2), en el eje de ordenadas. La tercera (continuación de la ingesta) se expresa en el gráfico como variable categórica considerando que los valores de I.a. inferiores a 0,25 se nombran con la letra 'd', los valores entre 0,25 y 0,49 con la 'c', los valores entre 0,5 y 0,749 con la 'b' y los valores entre 0,7 y 1 con la 'a'.

Esta tendencia permite sospechar que existe una interacción entre las tres fases la cual, por otra parte, sería lógica, tal como se ha comentado en el apartado 2.3.7.4. Para ratificar dicha interacción se aplica el test de correlación de *Pearson*, en el cual se hace patente que las fases tienen un nivel muy elevado de correlación positiva (Tabla II.9.). Basándose en esta interacción, a partir de este momento se tratarán las fases de forma independiente (tests ANOVA para cada una de ellas) y no como niveles de un mismo factor.

A pesar de que la correlación entre fases es siempre alta, la tendencia del coeficiente es decreciente conforme se avanza en la secuencia alimentaria. Esta tendencia podría hacer pensar en una pérdida progresiva del efecto de atracción entre la primera y la segunda fase y aún una reducción mayor de la palatabilidad en la tercera.

Tabla II.9. Coeficientes de correlación de Pearson entre las tres fases que componen la secuencia alimentaria, siendo O.l. orientación lejana, O.p.+i. orientación próxima e iniciación a la ingesta y C.i. continuación de la ingesta.

	O.l.	O.p. + i.	C.i.
O.l.	1,000	0,919	0,738
O.p. + i.		1,000	0,795
C.i.			1,000

Respecto a dicha tendencia, en primer lugar, cabe destacar que la metodología propuesta se demuestra válida para estudiar de forma individualizada las diferentes etapas que componen la respuesta frente al alimento. Esta capacidad de individualización permite detectar cambios en la motivación de los peces conforme se desarrolla la secuencia comportamental.

En segundo lugar, es interesante discutir el porqué de los cambios motivacionales que se hacen evidentes en el estudio. Tal como se ha comentado anteriormente, se detecta una tendencia, generalizable a todos los casos que consiste en una reducción del porcentaje de respuestas positivas conforme avanza la secuencia, de tal modo que la *orientación lejana* registra siempre porcentajes de respuesta positiva superiores a la *orientación próxima y degustación*, y ésta a la *continuación de la ingesta*. La expresión gráfica de los *Índices de aceptación* (Fig. 2.2) que se obtienen para cada fase a partir del conjunto de observaciones disponibles, evidencia esta reducción progresiva.

Incluso en el análisis separado por piensos (Fig. 2.3.) y retomando la clasificación de MACKIE (1982) y MACKIE & MITCHELL (1985), se observa aproximadamente el mismo comportamiento. Todos ellos son, a cierta distancia, suficientemente *atrayentes* para los lenguados, ya que favorecen la aproximación del pez al estímulo. Asimismo los piensos resultan relativamente *frenadores* e *incitantes* puesto que consiguen que el pez se detenga en las proximidades del estímulo y lo pruebe. Pero en cambio resultan, menos *estimulantes* ya que promueven poco la continuación de la ingesta. El único pienso en el cual esta tendencia no parece tan evidente es el que incluye betaína (Bo) que registra una reducción muy pequeña de la respuesta a lo largo de las tres fases de la secuencia.

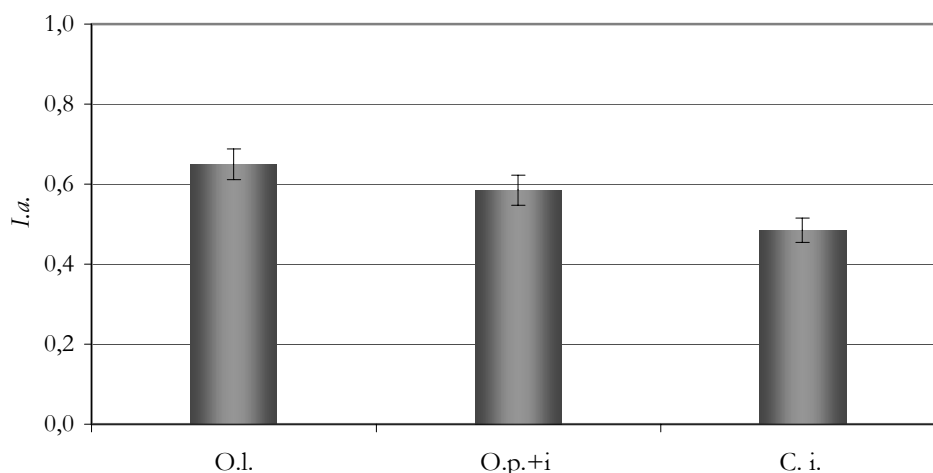


Fig. 2.2. Índice de aceptación (I.a.) medio obtenido en cada una de las fases de la secuencia alimentaria considerando todos los piensos. Siendo O.l. fase de orientación lejana, O.p. + i. fase de orientación próxima e iniciación de la ingesta i C.i. fase de continuación de la ingesta. En la barra de error se muestra el error standard de la media.

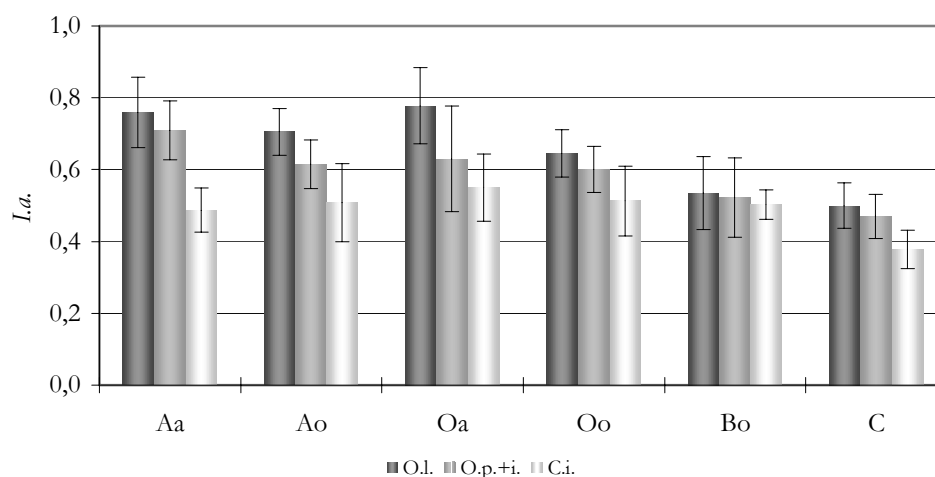


Fig. 2.3. Índice de aceptación (I.a.) medio y error standard, obtenido por cada uno de los piensos en cada una de las fases de la secuencia alimentaria. Siendo O.l. fase de orientación lejana, O.p. + i. fase de orientación próxima e iniciación de la ingesta i C.i. fase de continuación de la ingesta. La primera letra del pienso (en mayúsculas) indica el tratamiento interno, mientras que la segunda (en minúsculas) el externo, siendo A/a, aroma comercial, B betaina, O/o ninguno y C control externo.

Las posibles interpretaciones a esta tendencia deberían basarse seguramente en la percepción sensorial y no en cuestiones fisiológicas, ya que se observa, por alguna razón, un cambio motivacional en el desarrollo de la conducta frente al alimento, sin que haya tiempo para que se produzcan los cambios fisiológicos postprandiales característicos. El cambio se produce ya cuando el pez entra en contacto físico con la partícula

de pienso, en la fase de degustación, y la pérdida de motivación se hace más patente cuando el pez decide no aceptar un número superior de partículas de pienso.

Existen dos posibles interpretaciones: una de ellas que hace referencia a la recepción química de estímulos y la otra a la mecanorrecepción. En el primer caso es posible que el lenguado requiera bien otro tipo de sustancia que actúe con mayor eficacia como *estimulante* gustativo, bien una combinación de diversas sustancias, bien una dosis diferente de la utilizada aquí para cada una de los compuestos. La interpretación de los resultados bajo este punto de vista se realizará más adelante cuando se evalúen con mayor profundidad y de forma individual los piensos ofertados, puesto que existen diferencias de composición entre ellos.

La segunda interpretación, que sería común a casi todos los piensos, podría estar relacionada con la mecanorrecepción, ya que tanto en la fase de degustación o iniciación a la ingesta como en la continuación de la misma, actúa este sistema de recepción de estímulos, tal como han demostrado diversos autores (APPELBAUM & SCHEMMEL, 1983; BATTY & HOYT, 1995). Uno de los parámetros que el pez evalúa en la mecanorrecepción es la textura de las partículas. En este aspecto, como mínimo cinco de las seis presentaciones ofertadas se podrían considerar homogéneas, ya que se han fabricado expresamente para la experiencia y de la misma manera (el pienso C es el único fabricado de forma diferente). Es posible que la textura del pienso sea poco apetecible para el lenguado e influya de forma importante en la continuación de la ingesta, arrojando unos porcentajes de aceptación siempre inferiores a los registrados en las fases previas.

La importancia de la textura del pienso sobre la ingesta en peces, concretamente en salmón del Atlántico, ha sido demostrada por STRADMEYER *et al.* (1988). En dicho trabajo se ofrecen dos tipos de gránulo, uno duro y otro blando y también se distinguen claramente las diferentes fases comportamentales. Se detecta -igual que sucede en el presente trabajo- una tasa de captura satisfactoria para ambos tipos de partícula y en cambio un porcentaje de consumo de los gránulos duros muy inferior al de los gránulos blandos (32% frente a 63%). Es decir que, a pesar

de existir suficiente motivación como para acercarse al estímulo y probarlo, el resultado de la degustación es, con frecuencia, un rechazo por causa de la textura. Es interesante destacar que en el citado trabajo esta tendencia se hace más evidente conforme avanza la experiencia, es decir, que no parece existir una adaptación a la textura en principio menos agradable sino exactamente lo contrario.

BROMLEY (1974) en una experiencia con lenguados, detecta diferencias en el crecimiento de juveniles de *S.solea* (peso individual entre 20 y 30 g) que se alimentan con dietas conteniendo diferentes porcentajes de agua, es decir con diferencias importantes en la textura. El conjunto de resultados de dicho trabajo es difícil de utilizar como comparación con el tema que nos ocupa en este punto, ya que las dietas utilizadas por dicho autor incluyen ingredientes que pueden afectar su palatabilidad más allá de las diferencias debidas exclusivamente a la humedad (crustáceos -*Artemia*-, moluscos -*Crepidula*- y pescado -abadejo-) y adicionalmente pueden plantear también diferencias a nivel de aporte energético y nutricional. Pero en relación con la textura, se puede establecer la comparación entre tres de las dietas de la experiencia, las que incluyen *Artemia*, en forma fresca, congelada o desecada. El resultado de esta comparación es que el crecimiento se reduce de forma considerable en la dieta que incluye *Artemia* desecada respecto a las otras dos. A pesar de que el autor apunta diversas hipótesis en absoluto desdeñables (incapacidad para digerir dietas secas, desequilibrio en el aporte hídrico, lixiviación de nutrientes en el medio), justifica esta reducción en el crecimiento por una reducción de la ingesta, probablemente debida a factores organolépticos relacionados con la textura.

En la presente experiencia, quizás sería más plausible esta segunda hipótesis que relaciona la reducción de la motivación con un problema de la textura del pienso. Por dos motivos (1) el hecho de que piensos con componentes organolépticos tan diferentes coincidan en la tendencia en todos los casos y (2) la reducción del valor de *I.a.* entre la segunda y la tercera fase, justo cuando se realiza la degustación, es prácticamente el doble que la que se produce entre la primera y la segunda, cuando actúa más la atracción. A partir de la consideración conjunta de estos dos elementos se podría inferir una baja palatabilidad por parte del lenguado de las dietas evaluadas en el estudio, tanto en las dietas experimentales como en el control externo (dieta comercial).

De hecho, diversos trabajos en la bibliografía reportan resultados satisfactorios alimentando lenguado con piensos rehidratables que presentan una textura más blanda que los piensos secos (CADENAROA, *et al.* 1982; METAILLER, *et al.* 1983). Esta tendencia a utilizar alimentos húmedos también se produjo en los inicios del cultivo industrial del rodaballo que parecía aceptar únicamente este tipo de piensos. Puesto que otros aspectos de la formulación y fabricación de piensos para dicha especie han mejorado, a pesar de que todavía sigue empleándose una cierta proporción de piensos húmedos en las instalaciones comerciales, su uso es cada vez menor, dadas las evidentes ventajas de manejo que presenta el pienso seco. Podría ser que en el caso de lenguado suceda lo mismo y deban mejorarse otros aspectos de los piensos para garantizar suficientemente su consumo.

2.4.3. Influencia del horario de administración

En este apartado se evalúan todas las observaciones en función del horario de administración del alimento, que como se recordará consiste en una toma de alimento a las 8h30 de la mañana (administración 1) y otra a las 16h de la tarde (administración 2) (Fig. 2.4.).

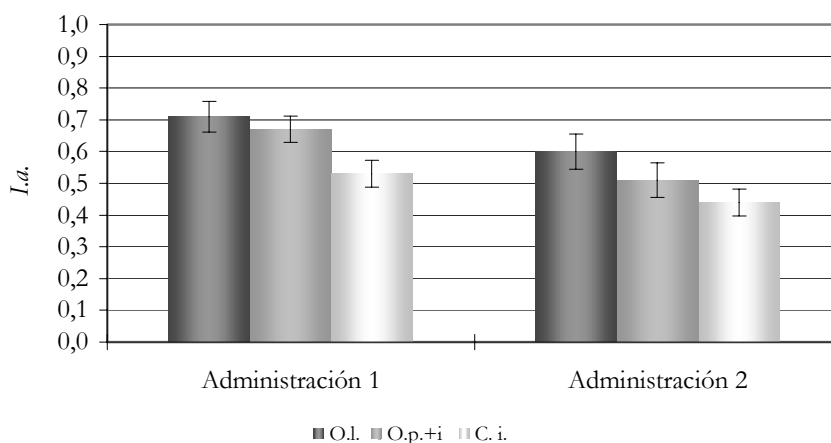


Fig. 2.4. Índice de aceptación (I.a.) medio y error standard obtenido en las dos administraciones y en cada una de las fases de la secuencia, considerando todos los piensos. Siendo O.l. fase de orientación lejana, O.p.+i. fase de orientación próxima e iniciación de la ingesta i C.i. fase de continuación de la ingesta.

Tanto la expresión gráfica de las observaciones como el análisis exploratorio de los datos, evidencian respuestas bien diferenciadas para ambos horarios, indicando que el factor horario de administración del alimento, en las condiciones de la presente experiencia, influye de forma muy importante en el comportamiento de los peces.

Dada la costumbre de alimentar a los peces siguiendo esta misma pauta horaria antes del inicio del ensayo, se podría suponer un cierto condicionamiento a dicho horario y por tanto no serían de esperar respuestas tan diferentes entre una y otra toma de alimento por este motivo. Esto debería ser especialmente cierto para el pienso C que se ha utilizado con estos peces durante el período previo a la experiencia. Pero los resultados parecen sugerir que dicho condicionamiento no existe de forma bien establecida ya que la población responde globalmente peor en la toma de la tarde.

Otra posibilidad sería atribuir la falta de apetencia por el pienso en la distribución de la tarde a la presencia de alimento en el tracto digestivo. Aunque existe poca información sobre la velocidad de tránsito gastrointestinal en lenguados, de forma preliminar KRUKK (1963) establece en 6 h el tiempo mínimo requerido por ejemplares de *S. solea* para vaciar el estómago, considerando que el alimento utilizado es *Arenicola marina*. Por otra parte, el tiempo necesario para vaciar completamente el tracto digestivo se situaría, según el mismo autor, en 18-24 h. De acuerdo con esta información la falta de apetencia no parecería atribuible a la presencia de alimento en el estómago de los peces, en especial considerando que posiblemente la velocidad de tránsito cuando el alimento es pienso sea superior a la que se registra con alimentación natural.

Si se observan los resultados en cada uno de los piensos, igualmente los porcentajes de respuesta positiva son más elevados en la primera administración que en la segunda (Fig.2.5.), lo cual se traduce en valores de *I.a.g.* superiores en la toma de la mañana. Es decir que la tendencia observada para el conjunto de los piensos (Fig. 2.4.) se repite en la observación individual de cada uno de ellos.

Dados los resultados y la magnitud de la diferencia entre ambas administraciones, se podría hipotetizar que, a pesar de estar reproduciendo el mismo horario de alimentación que se ha mantenido

desde el destete, la mayoría de los peces conservan en cierto modo su ritmo endógeno según el cual la máxima actividad se produciría entre la puesta y la salida del sol (KRUUK, 1963).

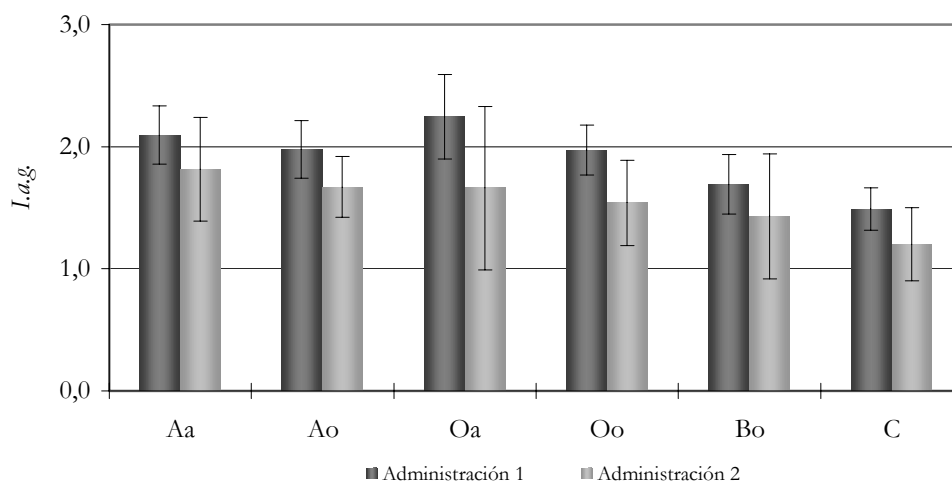


Fig. 2.5. Índice de aceptación global (I.a.g.) medio y error standard, obtenido en las dos administraciones por cada uno de los piensos. Siendo la primera letra, en mayúscula, el tratamiento interno (A aroma, B betaína, O, ninguno, C control comercial) y la segunda letra, en minúscula, el tratamiento externo (a aroma, o ninguno).

Es preciso recordar que la cuantificación del nivel de aceptación depende del número de individuos de la población que ejerce una acción determinada (Tabla II.3.), de acuerdo con ello, una puntuación negativa para el conjunto de la población de un tanque, implica un menor número de individuos reaccionando positivamente al alimento. Se podría pensar que existen individuos más voraces y/o con mayor capacidad de adaptación a un horario impuesto diferente del endógeno para la especie y otros individuos que no consiguen adaptarse a él. Los primeros serían mayoritariamente los responsables de la ingesta en el horario de la tarde.

En este sentido existen opiniones diversas entre autores. Tanto en juveniles (CHAMPALBERT & CASTELBON, 1989) como en adultos (KRUUK, 1963) ha quedado demostrada una escasa variabilidad en el ritmo endógeno en lenguados sometidos a fotoperíodos diferentes al natural. En ambos trabajos, peces sometidos a condiciones de oscuridad constantes, mantienen su ritmo de actividad durante las horas que corresponderían al período nocturno, con pequeñas variaciones en la hora

de inicio y final de la actividad. Esta invariabilidad del ritmo endógeno afectaría la conducta de los peces en relación con la alimentación y el manejo en condiciones de cautividad. Otros autores, como FUCHS (1978), reportan una escasa influencia del fotoperíodo existente sobre el crecimiento y la supervivencia en juveniles de lenguado en condiciones de cautividad.

Los resultados del presente trabajo parecen estar más acordes con los obtenidos por KRUUK (1963) y CHAMPALBERT & CASTELBON (1989). Según los resultados publicados por dichos autores, parece lógico que los peces respondan mejor a la administración de las 8h30, sólo unos minutos después de encender la luz y más próxima a su período normal de actividad, que a la administración de la 16h cuando ya llevan 8 horas sometidos a iluminación diurna y que correspondería plenamente a su período de inactividad.

Una vez asumida esta reducción de la ingesta entre una y otra toma probablemente debida al ritmo endógeno de la especie, resulta interesante el análisis de la Tabla II.10 en la que se muestran los porcentajes de reducción del *Índice de aceptación global* registrados entre la primera y la segunda toma de alimento en cada pienso.

Tabla II.10. *Porcentajes de reducción registrados en el valor de I.a.g. al pasar de la primera a la segunda administración.*

Aa	Ao	Oa	Oo	Bo	C
13,3%	15,4%	25,9%	21,8%	15,4%	19,5%

Se observa que los piensos Aa, Ao y Bo, seguidos por C, son los que registran un menor porcentaje de reducción en el nivel de respuesta entre una y otra toma. Parece que la presencia de algún compuesto organolépticamente activo en el interior del gránulo, sea aroma (Aa, Ao) sea betaína (Bo, C), tiende a mantener en cierto modo la apetencia en el horario de alimentación de la tarde.

A pesar de que los resultados registrados son globalmente peores en la segunda administración que en la primera, se debe destacar que en la administración de las 16 h, se registra un porcentaje aún interesante de respuestas positivas, a pesar de hallarse en un horario menos favorable. Ello podría indicar que, aunque menos adquirido de lo que se esperaba, existe

una cierta habituación al horario por parte de un determinado número de individuos y/o que los piensos resultan relativamente atrayentes. Ambos factores (individual o conjuntamente) resultan suficientes para promover una actividad alimentaria fuera del ritmo endógeno habitual de la especie.

Sin embargo, en caso de un potencial uso de la especie para cultivo industrial, podría conseguirse un mejor ajuste al ritmo endógeno de la especie mediante dispositivos automatizados de distribución del alimento que permitiesen su administración en horario nocturno. Además es probable que la palatabilidad de los piensos, aún en condiciones desfavorables, pudiese potenciarse respecto a la registrada en el presente ensayo, con la combinación adecuada de sustancias atrayentes.

2.4.4. Influencia del tamaño de los peces

Al comparar las observaciones registradas en ambas clases de peso, globalmente se observa una respuesta mejor en los peces grandes que en los pequeños.(Fig.2.6.).

Si se analiza el rango de valores de *I.a.* obtenidos en toda la experiencia y detallados en las Tablas II.7. y II.8., en peces grandes se sitúa entre 0,96 y 0,44, alcanzando en diversas ocasiones valores próximos al máximo posible (1), mientras que en peces pequeños el rango está entre 0,75 y 0,22, es decir, con un valor máximo también satisfactorio pero con un valor mínimo considerablemente bajo.

La misma tendencia se mantiene al analizar lo sucedido en cada una de las administraciones. Los *Índices de aceptación* son siempre globalmente superiores en la primera administración que en la segunda, tal como se ha comentado en el apartado anterior. Esta diferencia se mantiene para los dos grupos de peso, observándose además, que en la segunda administración las diferencias entre clases de peso son más importantes (Fig.2.7.).

En dicha figura (Fig. 2.7.) parece que las diferencias entre ambas administraciones podrían imputarse en gran medida a que los peces de la clase de peso inferior registran un descenso más importante del nivel

de respuesta al pasar de la primera a la segunda administración. Si se compara el *I.a.g.* que tendría cada clase de peso en cada administración, el valor medio de *I.a.g.* desciende en un 10,7% en los grandes (de 2,21 a 1,97), mientras que en los pequeños se reduce en un 29,2% (de 1,61 a 1,14).

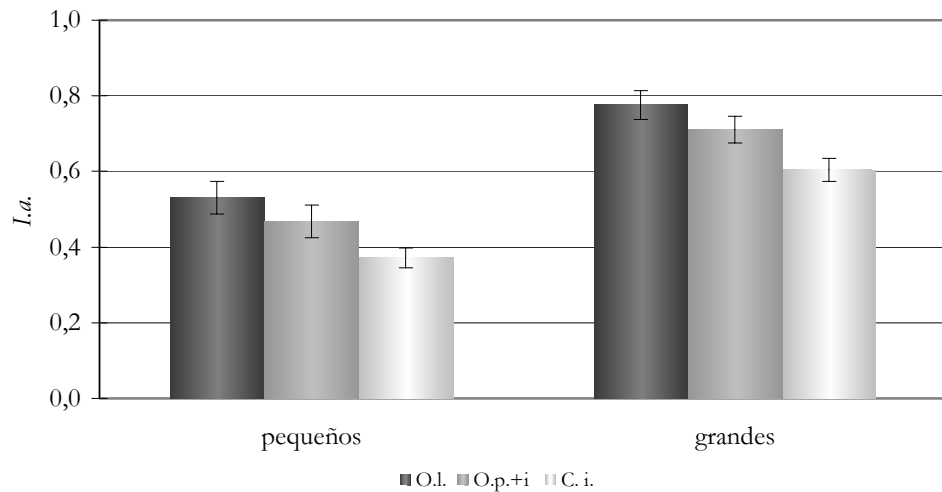


Fig. 2.6. Índice de aceptación (*I.a.*) medio y error standard obtenido por las dos clases de peso individual (peces grandes, peces pequeños) en cada una de las fases de la secuencia alimentaria (O.l., O.p.+i., C.i.), considerando todos los piensos.

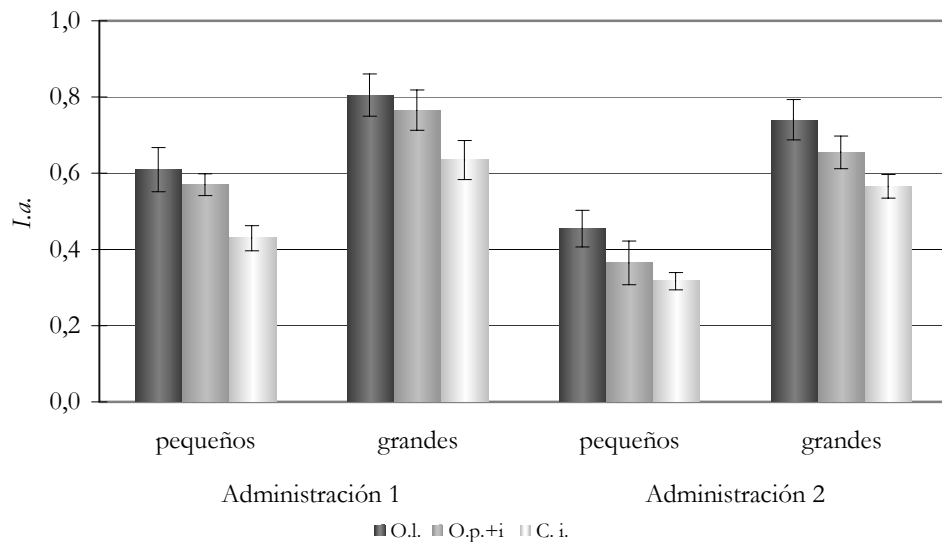


Fig. 2.7. Índice de aceptación (*I.a.*) medio y error standard obtenido por las dos clases de peso individual (peces grandes, peces pequeños), en cada una de las fases de la secuencia alimentaria (O.l., O.p.+i., C.i.) y en cada una de las administraciones de alimento (1 y 2), considerando todos los piensos.

Parece que los peces grandes presentan o un mejor acondicionamiento al horario artificial o simplemente una mayor apetencia por el pienso; en el caso de los peces pequeños se podría pensar que acusan más un horario que no se ajusta bien a su ritmo endógeno o no presentan una buena adaptación a la condiciones de cautividad.

Es sorprendente detectar diferencias tan remarcables entre dos grupos de peces que en realidad son coetáneos y de tamaño muy parecido. Recordemos que al inicio de la experiencia se separaba la muestra de peces por el peso correspondiente a la mediana para trabajar con poblaciones más homogéneas a partir de un único lote inicial (Tabla II.4.).

Una de las razones más inmediatas para justificar tal dispersión sería una elevada variabilidad genética en la población. Aunque todos los lenguados de la muestra proceden de la misma puesta, según información aportada por los proveedores, ésta se obtiene a partir de un *pool* de reproductores. En una experiencia diseñada para determinar la influencia parental en la dispersión de tamaños de larvas de lenguado, PANAGIOTAKI y coautores (1992) registraron un incremento más rápido y marcado de la dispersión de tamaños cuando se utilizaban, en una misma fecundación, huevos de varias hembras en lugar de huevos procedentes de una sola, lo cual parece lógico en razón de una mayor variabilidad genética.

Por otra parte, BARAHONA-FERNANDES (1990) considera que a pesar de la elevada tendencia a la dispersión en lenguados, ésta se puede mantener controlada homogeneizando los posibles factores que podrían introducir competencias entre los individuos, como la densidad o el acceso al alimento. En la presente experiencia ambas poblaciones se hallan en condiciones experimentales homogéneas, de tal modo que los factores ambientales más importantes que podrían favorecer la competencia, y que por tanto colaborarían a generar dispersión en la población, se mantienen bajo control.

De acuerdo con todo ello, y a pesar de que el origen (genético o ambiental) de la dispersión no se puede inferir a partir de la experiencia aquí descrita, la heterogeneidad de conducta registrada en peces de tamaño tan parecido (rango pequeños 5,8-8,3 g; rango grandes 8,4-11,8 g. en el momento de la clasificación) e igual edad, permitiría atribuir una

importancia remarcable a las diferencias individuales. En este mismo sentido, HUNTINGFORD (1986) destaca la importancia de la variabilidad genética en los cambios comportamentales observables entre peces conoespecíficos, aunque existen pocas evidencias experimentales sobre cómo se ejerce dicha influencia.

En las presentes condiciones, estas diferencias individuales contribuyen a una mejor aceptación del alimento aún en un horario desfavorable. Parece obvio que tenerlas en cuenta, aplicando una estricta rutina de clasificación, permitiría optimizar realmente la ingesta en condiciones de cultivo.

2.4.5. Influencia del tipo de pienso

En los apartados anteriores se han analizado factores que pueden tener una influencia en la aceptación del pienso por parte de los peces, como el horario de distribución del alimento y el tamaño de los peces que lo reciben. Finalmente en este apartado se pretende comparar la aceptación de los piensos experimentales por parte de los peces, que constituye el objetivo último de este capítulo.

Del análisis de la expresión gráfica de las observaciones registradas, antes de proceder a la inferencia estadística, surgen diversos comentarios. En la Fig. 2.8. se expresan los *Índices de aceptación globales (I.a.g.)* y en ella se observa de nuevo cómo casi todos los piensos, son mejor aceptados por los peces grandes que por los pequeños y, en cada clase de peso, reciben una mejor aceptación en la primera administración que en la segunda, indicando que tanto el factor clase de peso individual como el factor horario de alimentación probablemente juegan también un papel importante.

La excepción a la reducción registrada entre administraciones está constituida por el pienso con betaína (Bo) en los peces grandes. Este pienso consigue los mismos resultados de *I.a.g.* en la primera administración y en la segunda, mostrando una menor capacidad de atracción que el resto de piensos con la fórmula base incluso en un horario más favorable.

Al descomponer cada secuencia de alimentación en sus fases (Fig.2.9.) se observa, tal como se ha comentado en el apartado

correspondiente (apartado 2.4.2. y Fig. 2.3.), que en la mayoría de casos, se produce una respuesta decreciente al avanzar en la secuencia alimentaria, aunque de nuevo existen algunas excepciones.

En los peces grandes y en primera administración, la excepción a dicha tendencia se produce en el pienso Oo, denominado *control interno*, que no incorpora ningún tipo de sustancia atrayente. Esta fórmula, dada su composición mayoritaria en harina de pescado, debería ser en teoría menos palatable para el lenguado y sin embargo en la continuación de la ingesta registra mejores resultados que otros piensos portadores de aroma (Aa) o betaína (Bo y C). Muestra un mejor comportamiento como *estimulante* que como *atrayerente* (orientación próxima) o *frenador* (orientación próxima), demostrando que, para los peces grandes, tiene mejor palatabilidad que atracción. El pienso Ao, portador de aroma sólo en el interior, mantiene casi el mismo nivel de respuestas positivas en la segunda fase (orientación próxima e iniciación de la ingesta) que en la tercera (continuación de la ingesta) demostrando también una buena palatabilidad.

En los peces pequeños la excepción más destacable es el pienso con betaína, (Bo) que se muestra como un auténtico *estimulante* de la ingesta al promover más respuestas positivas en la continuación de la ingesta que en las dos fases anteriores, ratificando los resultados de MACKIE *et al.* (1980) que demostraban el poder estimulante de la betaína para el lenguado.

En el presente ensayo, en el cual se puede evaluar la conducta del estímulo en cada una de las fases de la secuencia, se puede decir que la betaína no parece especialmente capaz de atraer a los peces pero sí de conseguir que coman con una cierta continuidad. Esta reacción se produce de forma más intensa en los peces pequeños, aunque en los grandes los valores de *I.a.* obtenidos por el pienso Bo en la segunda administración, también demuestran un buen comportamiento como estimulante de la ingesta.

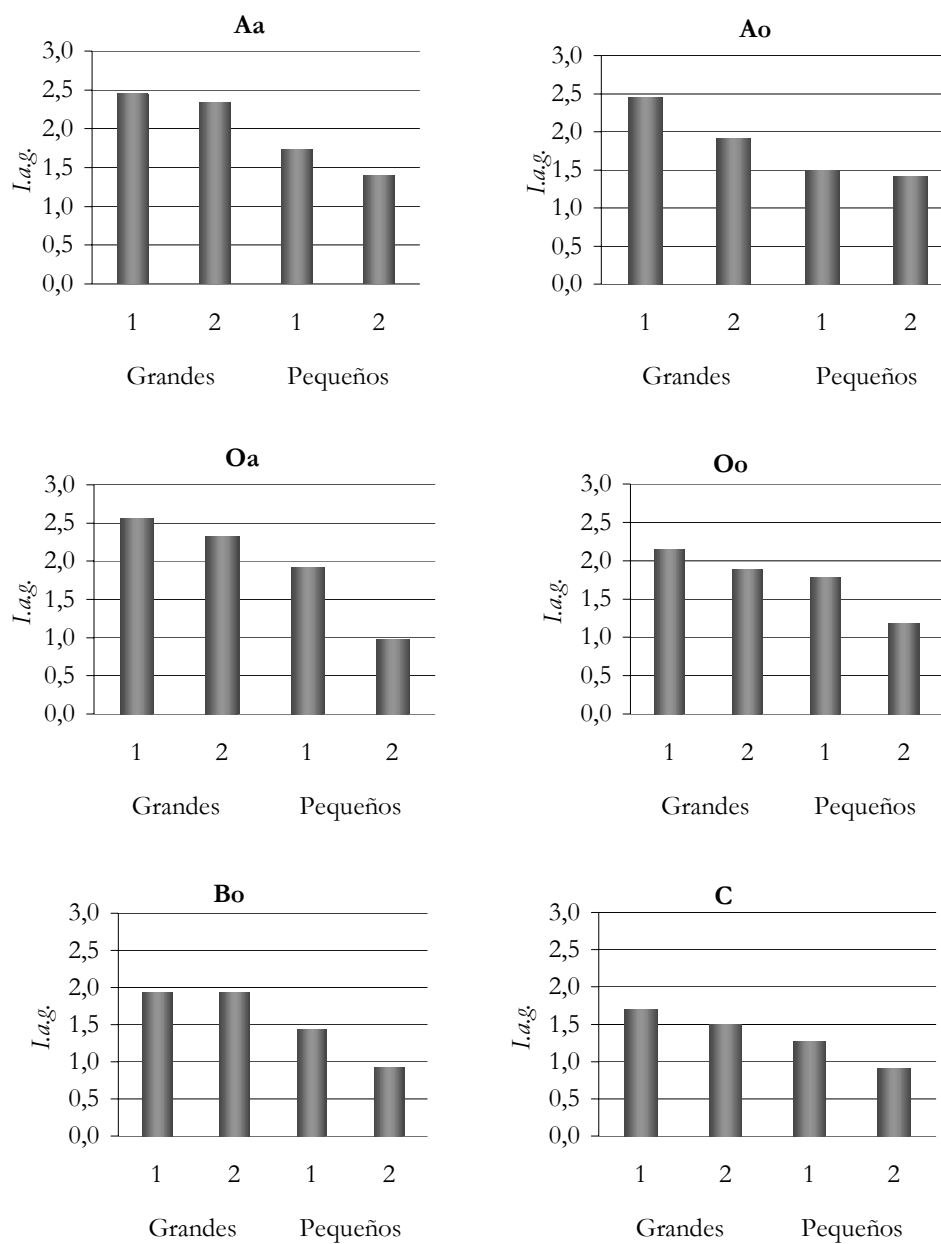


Fig. 2.8. Índice de aceptación global (I.a.g.) obtenido por cada pienso en las dos clases de peso individual (peces grandes, peces pequeños) y en cada una de las administraciones de alimento (1 y 2).

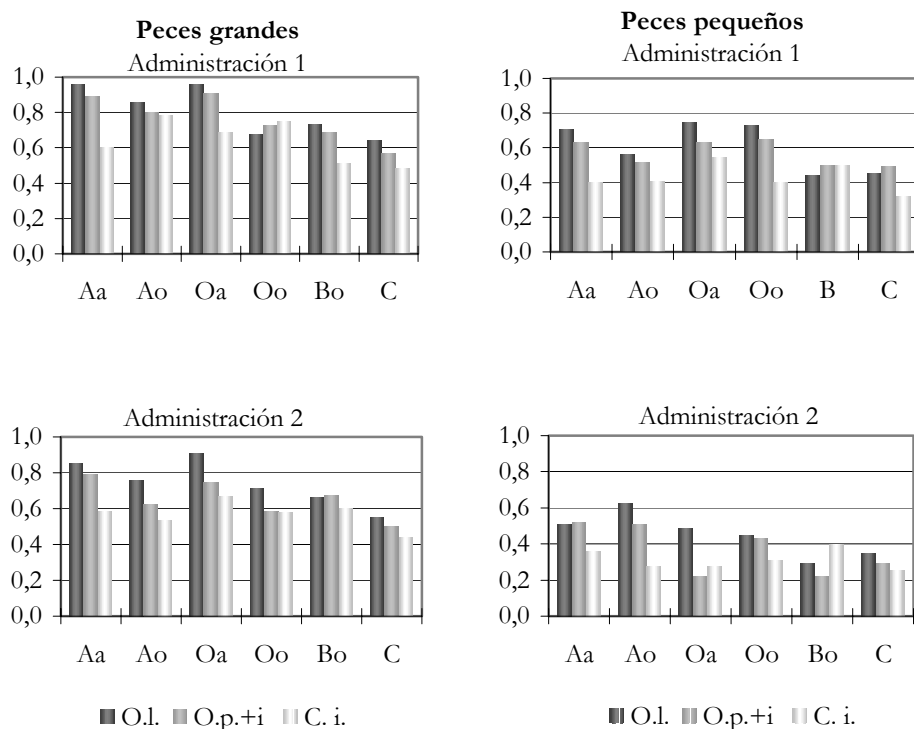


Fig. 2.9. Índice de aceptación (I.a.) obtenido por cada pienso en las dos clases de peso individual (grandes y pequeños), en cada fase de la secuencia alimentaria (O.l., O.p.+i., C.i.) y en cada una de las administraciones de alimento (1 y 2). La letra mayúscula indica el tratamiento aplicado en el interior, mientras que la letra minúscula indica el tratamiento exterior, siendo A aroma, B betaína, O nada y C pienso comercial que incluye betaína y aminoácidos en proporciones desconocidas.

En lo que respecta al resto de los piensos que se comportan según la tendencia mayoritaria (reducción progresiva de las respuestas positivas a lo largo de la secuencia), en los peces grandes, son las presentaciones que incluyen aroma las que producen mejores resultados. Estos piensos (Aa, Oa, Ao) destacan especialmente en las dos primeras fases en las que juega un papel importante la capacidad de atracción, comportándose eficientemente como *atrayentes* (orientación lejana) y algo menos como *frenadores* e *incitantes* (orientación próxima e iniciación a la ingesta). La máxima eficiencia como *estimulante* (continuación de la ingesta) en esta clase de peso y en la primera toma de alimento la consigue el pienso Ao que incluye aroma solamente en el interior.

Para los peces pequeños, sin que se pueda afirmar que la presencia de betaína sea determinante para la aceptación de un pienso, sí que parece aportar un cierto valor añadido puesto que mejora la

continuación de la ingesta, consiguiendo un nivel de aceptación más elevado que en las dos fases previas, tendencia contraria a la que generalmente se observa.

A la vista de los resultados que se muestran en la Fig. 2.9., considerando las pruebas de comportamiento realizadas hasta el momento, la mejor presentación para los peces grandes podría estar constituida por un pienso con aroma en el interior. Para los peces pequeños, tomando como base los resultados obtenidos en la primera administración, la combinación que podría ser válida sería betaína en el interior y aroma en el exterior, aunque en la segunda administración esta decisión no parecería tan clara.

2.4.6. Inferencia estadística

Los resultados analizados hasta ahora de forma descriptiva se estudian en este apartado después de realizar la inferencia estadística. Tal como se describe en el correspondiente apartado de Material y Métodos, se aplica un test ANOVA de tres factores sin interacción (horario de administración, clase de peso de los peces y tipo de pienso), para la variable *Índice de aceptación (I.a.)* en cada una de las fases y para el *Índice de aceptación global (I.a.g.)*.

El análisis de la Varianza (Tabla II.11.) ratifica estadísticamente que existen diferencias significativas entre ambos horarios de administración y entre ambas clases de peso de los peces, tanto para el *Índice de aceptación* de cada una de las fases como para el *Índice de aceptación global* para el conjunto de la secuencia. Efectivamente, el resultado del tratamiento estadístico sugiere que la influencia de estos dos factores es muy importante en el diseño experimental propuesto.

Tabla II.11. *Valor P en el test ANOVA para la variable I.a. en cada una de las fases (O.l., O.p.+i., C.i.) y para I.a.g., considerando los factores horario de administración (ADM), clase de peso de los peces (PES) y tipo de pienso (PIN). Se indican los distintos niveles de significación con diferentes símbolos, del siguiente modo: $\alpha \leq 0,05$, *; $\alpha \leq 0,01$, **; $\alpha \leq 0,001$, ***; n.s. = no significativo.*

	<i>Model</i>	ADM	PES	PIN
<i>I.a. O.l.</i>	0,001 ***	0,0032 **	0,0001 ***	0,0003 ***
<i>I.a. O.p. + i.</i>	0,001 ***	0,0006 ***	0,0001 ***	0,0276 *
<i>I.a. C.i.</i>	0,001 ***	0,0092 **	0,0001 ***	0,0905 n.s.
<i>I.a.g.</i>	0,001 ***	0,0002 ***	0,0001 ***	0,0010 ***

En lo que respecta a la influencia del tipo de pienso, el test detecta diferencias en dos de las tres fases de la secuencia (orientación lejana y orientación próxima e iniciación de la ingesta), así como en el Índice global (*I.a.g.*) que resume lo sucedido en el conjunto de la pauta de conducta descrita.

Sobre los resultados anteriores del test ANOVA para el factor pienso, se aplica el test de *Tukey-Kramer* que refleja la siguiente separación de medias. Ratificando los resultados obtenidos en el análisis de la varianza, el test de comparación de medias (Tabla II.12) señala diferencias significativas entre los *Índices de aceptación* registrados por los piensos en las dos primeras fases de la secuencia así como para el *Índice de aceptación global*, mientras que no es capaz de discriminar entre los piensos en la fase de continuación de la ingesta.

Tabla II.12. Resultados del test *Tukey* de comparación múltiple de medias de la variable *I.a.* para cada fase de la conducta e *I.a.g.* para el factor pienso. Para una misma fila, entre las medias con el mismo superíndice no existen diferencias significativas al nivel $\alpha = 0,05$. Valores expresados como media.

	Oa	Aa	Ao	Oo	Bo	C
<i>I.a.</i> O.l.	0,777 ^a	0,760 ^a	0,705 ^{ab}	0,645 ^{abc}	0,535 ^{bc}	0,500 ^c
<i>I.a.</i> O.p. + i.	0,627 ^{ab}	0,707 ^a	0,612 ^{ab}	0,600 ^{ab}	0,522 ^{ab}	0,467 ^b
<i>I.a.</i> C.i.	0,547 ^a	0,487 ^a	0,505 ^a	0,510 ^a	0,502 ^a	0,377 ^a
<i>I.a.g.</i>	1,952 ^a	1,955 ^a	1,822 ^a	1,755 ^a	1,560 ^{ab}	1,345 ^b

De acuerdo con los resultados del tratamiento estadístico pueden establecerse diferencias claras entre algunos piensos. En la primera fase o fase de orientación lejana (O.l.) se detectan diferencias estadísticamente significativas entre los piensos, de tal modo que las dos presentaciones que incorporan aroma como tratamiento externo (Oa y Aa) se diferencian significativamente del pienso con betaína (Bo) y el control comercial o *externo* (C). Tanto el pienso Ao, con aroma sólo en el interior, como el control interno (Oo) se sitúan en una posición intermedia. Aunque existen diversos niveles de aceptación, es interesante destacar que ninguno de los tres piensos con aroma se diferencia significativamente del control *interno* (Oo), en teoría no palatable en razón de su composición.

En la segunda fase o fase de orientación próxima e iniciación de la ingesta (O.p. + i.) se ponen en evidencia menos diferencias entre los piensos. Las dos únicas presentaciones entre las cuales existen claras diferencias estadísticas son Aa y el pienso comercial C, el resto de piensos ocupan una posición intermedia sin que puedan diferenciarse ni del uno ni del otro. En este caso los piensos Oa y Bo que en la fase anterior quedaban también situados en los extremos superior e inferior respectivamente, no pueden distinguirse del resto.

En la fase de continuación de la ingesta (C.i.) el análisis no logra establecer diferencias estadísticamente significativas entre los piensos ensayados. Considerando que en las dos primeras fases se evalúa la atracción y en la tercera la palatabilidad de la fórmula, se podría decir que los piensos son diferentes en cuanto a poder de atracción para los peces a cualquier distancia, pero no se pueden diferenciar en cuanto a palatabilidad.

Finalmente si se analizan los resultados obtenidos en el test *Tukey* aplicados sobre el *Índice de aceptación global (I.a.g.)* se observa que no se pueden establecer diferencias significativas entre ninguno de los 5 piensos experimentales formulados y fabricados especialmente para este ensayo (Aa, Ao, Oa, Oo y Bo). El pienso comercial (C), utilizado como control *externo*, se separa claramente de cuatro de los cinco piensos anteriores (Aa, Ao, Oa y Oo) no pudiéndose distinguir del pienso con betaína. El pienso con Betaína (Bo) se sitúa en una posición intermedia indistinguible estadísticamente de todos ellos. Por una parte parece lógica la proximidad entre Bo y C dado que ambos incluyen betaína en su composición, aunque en el caso del pienso comercial se desconoce la proporción así como la composición en aminoácidos libres que acompañan a este compuesto para mejorar la palatabilidad de la presentación. Por otra parte, es interesante destacar como cualquiera de los piensos experimentales es mejor aceptado por los peces que el pienso comercial lo cual podría sugerir algún problema de textura, dado que éste sería el elemento común a todas las presentaciones experimentales.

Resulta interesante intentar clasificar los piensos ensayados recuperando la clasificación de MACKIE *et al.* (1980) y MACKIE & MITCHELL (1985) (Tabla I.2.), es decir, según el papel que ejercen en cada una de las fases de la secuencia alimentaria. Considerando que un estímulo es *atrayente* cuando es capaz de conseguir que el pez se oriente hacia él desde

cierta distancia, se podría decir que los piensos que tienen una mayor eficacia como *atrayerentes* son Oa y Aa, ambos con aroma en el exterior, seguidos de cerca por Ao y Oo. En este caso parece ser que la cubierta externa de aroma cumple el cometido para el cual se ha diseñado la aplicación, es decir disolverse de forma perceptible en el medio para desencadenar el inicio de la conducta alimentaria en los individuos.

Cuando el objetivo es conseguir que el pienso sea *frenador e incitante*, es decir que el individuo se aproxime al estímulo, se detenga cerca de la partícula y se decida a probarla, el pienso que muestra una mayor eficacia es Aa con una ligera ventaja sobre Oa. Parece lógico pensar que la cubierta externa de aroma, común a ambas presentaciones, aporte una cualidad de *frenador e incitante* a la fórmula base experimental, y que las diferencias entre ambos piensos, a favor de Aa, se deban a la presencia de aroma en el interior en ésta última presentación.

Por último, la eficacia como *estimulante* es muy importante en los piensos ya que es la responsable de promover una ingesta continuada. En el presente trabajo esta característica no ha quedado bien definida por la inferencia estadística, pero se pueden utilizar para la discusión las orientaciones que aporta la expresión gráfica de los resultados. Ésta sugiere, como mínimo en los peces pequeños, que la betaína, especialmente en la fórmula experimental (Bo) es la que juega un papel más activo en esta fase si se consideran conjuntamente los dos horarios de administración. En los peces grandes, en cambio, el pienso Ao (con aroma solamente en el interior) demuestra también una elevada eficacia como *estimulante* de la ingesta.

Los resultados obtenidos hasta este punto pueden utilizarse como orientación para la mejora de la aplicación. La adición externa de aroma se revela como un instrumento interesante para mejorar la atracción de los piensos (orientación lejana y orientación próxima e iniciación de la ingesta). Si se considera además que su dosificación en las presentaciones utilizadas es muy baja (0,5%), se puede afirmar que el coste que representa queda compensado con creces por el rendimiento obtenido. Por otra parte, se podría pensar que un pienso que solamente sea buen *atrayerente y frenador*, no garantiza necesariamente la ingesta de forma tan clara como un pienso que además sea buen *estimulante*, ya que se pueden producir rechazos de las

partículas en el momento de la degustación, tal como demuestran diversos autores y como se ha comprobado en el presente dispositivo experimental. Para conseguir una buena palatabilidad (continuación de la ingesta) sería necesario incorporar en el interior de las partículas de pienso bien aroma bien betaína, dependiendo de si se toman los resultados para los peces grandes o pequeños respectivamente.

Obviamente los resultados obtenidos aquí se limitan a un tipo de aroma y a una dosis concreta, tanto para la cubierta externa como para el aroma incorporado en el interior de la mezcla. Dada la eficacia demostrada por dicha aplicación, podría ampliarse el abanico de posibilidades de cara a obtener un aroma aún más “personalizado” de acuerdo con los gustos concretos del lenguado y/o a definir otras dosis que pudiesen reducir los costes asociados a su uso.

Para finalizar la discusión de los resultados conseguidos con los diferentes piensos utilizados, se considera interesante destacar dos elementos, uno de ellos hace referencia a la betaína y otro a la fórmula base. En relación con la betaína, diversos autores (entre otros MACKIE *et al.* 1980, METAILLER *et al.* 1983) indican que dicho compuesto es un requisito imprescindible para garantizar la aceptación del pienso por los lenguados, lo cual representa una clara limitación económica. En dichos trabajos además las dosis de betaína utilizadas son más elevadas (entre 4 y 7%) que la utilizada en el pienso Bo (3%). Los resultados que aquí se discuten no sugieren de forma taxativa que dicho compuesto sea un requisito imprescindible para que el pienso sea aceptado por los lenguados. Quizás dosis mayores de betaína establecerían diferencias más claras entre los piensos pero en perjuicio del coste final de los mismos. De hecho, en la presente experiencia, los piensos con aroma o incluso la fórmula base que no incluye ningún atrayente, registran un nivel de aceptación interesante. De acuerdo con ello se podría descartar que la aceptación de piensos secos, constituidos mayoritariamente por harina de pescado, por parte de los lenguados vaya necesariamente ligada a la inclusión de betaína.

El segundo elemento a destacar hace referencia a los buenos resultados obtenidos por la fórmula base o control *interno* (Oo) a pesar de no incluir ningún atrayente y suponiendo que el sabor dominante será el de la harina de pescado. Según MACKIE *et al.* (1980) este ingrediente tiene una muy reducida palatabilidad para lenguados y sería responsable de la baja

aceptación de piensos secos por dicha especie. Asimismo, LOVE (1980) determina que la harina de pescado procedente de teleósteos tiene un contenido nulo de betaína, a pesar de ser esta sustancia un constituyente prácticamente universal en organismos acuáticos marinos, lo cual reduciría las posibilidades de que fuese bien aceptada por los lenguados.

Contrariamente a dichas opiniones, en la experiencia que aquí se discute, la fórmula base con un contenido mayoritario de harina de pescado presenta un nivel de aceptación similar al de otros piensos que contienen un elevado componente aromático. Especialmente cuando se valora la conducta en su conjunto (*I.a.g.*), no se consiguen establecer diferencias entre ella y el resto de las presentaciones organolépticamente modificadas por adición de aroma o betaína. CADENA-ROA (1983) reporta resultados similares al comparar dietas enriquecidas con mezclas de atrayentes y dietas base con lenguados de más de 4 g. Aunque los resultados que obtiene, especialmente en tasa de crecimiento, son más elevados con las dosis más altas de atrayentes, el autor destaca la aceptación y el crecimiento que registra con la dieta que no incluye ningún atrayente. Esto indicaría que la formulación de piensos para lenguado puede desarrollarse utilizando los ingredientes habituales para otras especies de peces, aunque ello no excluye la posibilidad de optimizar la ingesta incorporando a la dieta ciertos productos organolépticamente activos.

2.5. Conclusiones

Tal como se detallaba en los objetivos del presente Capítulo se ha puesto en práctica una metodología de observación de conducta destinada a conocer la respuesta de una población de lenguados frente a diversos piensos organolépticamente modificados. De los resultados obtenidos se extraen las siguientes conclusiones:

1. La metodología etológica propuesta se ha mostrado eficiente para evidenciar cambios en las diversas fases de la conducta alimentaria del lenguado en las condiciones experimentales disponibles. Asimismo, las variables previamente definidas para poder evaluar dichos cambios, a saber, *Índice de aceptación* en cada fase e *Índice de aceptación global (I.a.g.)* para el conjunto de la secuencia, se muestran como unidades de medida útiles para la cuantificación del nivel de respuesta y por tanto para una discusión en profundidad de los resultados.
2. Utilizando dicha metodología y las variables de cuantificación definidas se observa que el nivel de respuesta en cada una de las fases de la secuencia de conducta sigue siempre una misma tendencia: la fase de *orientación lejana* registra siempre porcentajes de respuesta positiva superiores a la *orientación próxima e iniciación de la ingesta* y ésta a la *continuación de la ingesta*. El hecho de que esta tendencia sea mayoritaria en los piensos evaluados y en todas las condiciones, sugiere que en general las presentaciones ofertadas tienen una mejor capacidad de atracción lejana que próxima y, posiblemente, algún problema de palatabilidad. Este problema de palatabilidad podría estar ligado a la textura de las presentaciones y a la aceptación de piensos secos por el lenguado.
3. En el diseño experimental propuesto, el factor horario de administración afecta significativamente los resultados revelándose como un elemento importante a considerar. Las diferencias horarias en la administración del pienso influyen sensiblemente en la aceptación de los piensos por los peces, no sólo de forma cuantitativa (cantidad de respuesta) sino también cualitativa, ya que incluso cambian las preferencias organolépticas. Es importante destacar que en el presente trabajo se consigue un cierto nivel de

ingesta fuera del horario preferido por la especie. A pesar de ello parece recomendable adaptar la alimentación al ritmo endógeno de los peces para optimizar la ingesta, ya que en un horario desfavorable el nivel de aceptación general es muy inferior y la ingesta escasamente discriminatoria.

4. El factor tamaño de los peces también influye significativamente en la respuesta a los diferentes piensos, a pesar de que la diferencia es muy reducida y de que los individuos son coetáneos y procedentes de la misma puesta. Los peces más pequeños, evidencian, en general, un nivel de aceptación muy inferior hacia todos los piensos y acusan más el efecto de un horario desfavorable, lo cual podría indicar un cierto grado de inmadurez o una peor adaptación a las presentes condiciones. En consecuencia la aplicación de una buena rutina de clasificación, permitiría optimizar realmente la ingesta en condiciones de cultivo
5. La presentación de aroma comercial desarrollada para su aplicación externa sobre las partículas de pienso cumple el propósito para el cual ha sido diseñada. A la vista de los resultados se concluye que se muestra eficaz como *atrayente* (orientación lejana) y *frenador e incitante* (orientación próxima e iniciación a la ingesta) consiguiendo que los peces se aproximen a la fuente del estímulo, se detengan en sus proximidades y lo prueben.
6. La capacidad *estimulante* o la palatabilidad de los diferentes piensos utilizados no queda ratificada por la inferencia estadística. En los peces más grandes, aunque los resultados no han quedado estadísticamente ratificados, es el pienso que incluye aroma en su interior (Ao) el que parece mostrar una mayor eficiencia como estimulante. En los peces más pequeños, el análisis exploratorio de los datos indica que la betaína en su presentación experimental (Bo) es mejor *estimulante* que el resto de los piensos favoreciendo la continuación de la ingesta. Este efecto se hace más patente en la segunda toma de alimento consiguiendo mantener e incluso mejorar el nivel de aceptación en el horario más desfavorable.

7. Más allá de las diferencias observadas entre las diferentes presentaciones, se considera importante destacar el nivel de aceptación conseguido por los piensos experimentales utilizados, los cuales incluyen como ingrediente mayoritario la harina de pescado. Incluso la fórmula base sin adición de compuestos organolépticamente activos, y por tanto teóricamente no palatable, y para la que se esperaba un rechazo, presenta cierta respuesta positiva. Desde el punto de vista organoléptico, la formulación de piensos para lenguados podría llevarse a cabo utilizando los ingredientes habituales para otras especies de peces, incluyendo la harina de pescado, si bien su optimización requeriría de la adición de otras sustancias que mejorasen su palatabilidad.

8. Evaluando la aceptación global de los piensos utilizados se podría recomendar para una próxima aplicación, una fórmula que incluya en el interior betaína para los peces más pequeños y aroma para peces un poco más grandes, así como una cubierta de aroma en el exterior en ambos casos. En el caso de la cubierta externa de aroma, dado que el porcentaje que se añade es muy reducido y por tanto su coste es bajo, su utilización parece interesante para garantizar la atracción de los peces por el pienso. En lo que respecta a la aplicación interna de las sustancias propuestas, podría optimizarse el coste suplementario que implican realizando experiencias específicas que permitiesen ajustar al máximo las dosis necesarias en cada caso.

