UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE POLI B-HIDROXIBUTIRATO (PHB) EN LA DIETA DE ESTURIÓN SIBERIANO (ACIPENSER BAERII)

por

BENTANCOR PEREZ, Diego

CUBAS SOSA, Rodrigo

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.
Orientación: Higiene, Inspección, Control y Tecnología de los alimentos de origen Animal.

MODALIDAD: Ensayo experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2014

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa: _____
Lic. Miguel Bellagamba

Segundo Miembro: _____
(Tutor) Dr. Daniel Carnevia

Tercer Miembro: _____
Dra. Maite Letamendía

Fecha: _____

Autores: _____
Diego Bentancor Pérez

_____
Rodrigo Cubas Sosa

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor el Dr. Daniel Carnevia por su paciencia, apoyo, y buena disposición en todo momento.

A todo el personal del área Acuicultura del Instituto de Investigaciones Pesqueras.

Al Dr. Alejandro Perreta, quién nos ayudó en la preparación y análisis de muestras hematológicas.

A la Dra. Daniela Carnales, quién nos ayudó en la interpretación de muestras en el microscopio, y nos orientó en la revisión bibliográfica.

A la Dra. Maite Letamendía, que siempre estuvo disponible para aclararnos dudas y consultas.

Al Dr. Álvaro Rosso, que nos acompañó a buscar los ejemplares hasta San Gregorio del Polanco.

A Mario Garabello por cuidarnos los peces.

A la empresa Esturiones del Plata por cedernos los ejemplares para el estudio y la ración. Al Dr. Andrés Ryncowsky por recibirnos en la empresa y por su ayuda.

Al área de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería por brindarnos el PHB, y las instalaciones para adicionarlo al alimento, en especial a las Ingenieras Químicas Verónica Saravia y Guadalupe Martinez.

A nuestra familia y amigos que nos acompañaron durante toda la carrera.

A la Facultad de Veterinaria.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN.....1

AGRADECIMIENTOS.....2

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS « « « 6

1- RESUMEN.....8

2- SUMMARY « « 9

3- INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....10

3.1- Acuicultura.....10

3.1.a- Motivos para realizar acuicultura.....10

3.1.b- $ V S H F W R V Q H J D W L Y R V G H O D D F X L F X O W X U D « «

3.1.c- 6 L W X D F L y Q G H O D D F X L F X O W X U D P X Q G L O O « « « « « «

3.1.d- Producció Q D F X t F R O D H Q W U H U H J L R Q H V « « « « «

3.1.e- Acuicu O W X U D H Q 8 U X J X D \ « « 14

3.2- (V W X U L y Q V L E H U L D Q R « « « « « « 19

3.2.a- Introducción e historia del cultivo de est X U L y Q H Q 8 U X J X D \ « «

3.2.b- Taxonom t D « « « « « «

4- + , 3 Ï 7 (6 , 6 31

5- 2 % - (7 , 9 2 6 32

6- 0 $ 7 (5 , $ / (6 < 0 e 7 2 ' 2 6 33

6.1- Diseño expe U L P H Q W D O 33

6.2- $ Q L P D O H V 33

6.3- $ O L P H Q W D F L y Q 33

6.4- (T X L S R V H L Q V W D O D F L R Q H V 34

7- 5 (6 8 / 7 $ ' 2 6 35

7.1- Índices productivos 35

7.1.a- 5 H V X O W D G R V J H Q H U D O H V 35

7.1.b- Análisis de los pesos fi Q D O H V G H O R V S H F H V 36

7.1.c- Análisis de los lar J R V I L Q D O H V G H O R V S H F H V 38

7.1.d- Análisis de l R V t Q G L F H V G H F R Q Y H U V L y Q 40

7.1.e- Aná O L V L V G H O D V R E U H Y L Y H Q F L D 40

7.2- Resul W D G R V K H P D W R O y J L F R V 41

7.2.a- 5 H V X O W D G R V J H Q H U D O H V 41

7.2.b- Análisis G H O F R Q W H R G H O L Q I R F L W R V 42

7.2.c- Análisis del conteo G H Q H X W U y I L O R V 43

7.2.d- Análisis del F R Q W H R G H H R V L Q y L O R V 44

7.2.e- Análisis del conteo de plaquetas F D G D O H X F R F L W R V 44

8- DISCUSIÓN 46

9- CONCLUSIÓN 49

10- BIBLIOGRAFÍA 50

11- $ 1 (; 2 6 54

11.1- ANEXO I: Registro diario 54

11.2- ANEXO II: Pesos y largos iniciales 55

11.3- ANEXO III: Pesos y largos finales 56

11.4- ANEXO IV: Resultados del conteo diferencial de la serie blanca « « 57

11.5- ANEXO V: Resultado del conteo de plaquetas cada 100 linfocitos « 58

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1- Especies ya utilizadas en Uruguay con fines de Acuicultura (Carnevia, 2013) « « «

Figura 8. Gráfica de cajas y bigotes del peso final de A. baerii alimentados con 0, 2, y 4 % de PHB en la ración « « «

1- RESUMEN

La acuicultura aparece como una forma alternativa de producir alimentos e insumos de origen acuático que permite aliviar los ecosistemas acuícolas sobreexplotados y alimentar a una población creciente. En nuestro país es una actividad en desarrollo, aunque se han realizado varias experiencias, como la del esturión siberiano, que además de adaptarse satisfactoriamente al ecosistema, presenta potencialmente una buena rentabilidad. Los costos de producción probablemente disminuyan si se mejora la resistencia a las enfermedades, el crecimiento, y la eficacia en la conversión de alimento, para lo que se han estudiado varias alternativas, como el uso de prebióticos, lo que también llevaría a una disminución en el uso de antibióticos. Remitiéndonos a nuestra investigación, evaluamos la sustitución parcial de la dieta de juveniles de esturión siberiano por poli- -hidroxibutirato, un polímero utilizado por ciertas cepas bacterianas como reserva de energía. Se supone que su acción benéfica se produce cuando es degradado a ácidos grasos de cadena corta en el tubo digestivo. La experiencia constó en la evaluación de los parámetros ganancia de peso, crecimiento en largo, índice de conversión, sobrevivencia, conteo diferencial de leucocitos y cantidad de plaquetas cada 100 leucocitos. Los peces se dividieron en tres grupos, uno con 2% de inclusión del prebiótico, otro con 4% de inclusión, y un grupo control. Los resultados mostraron que el grupo control presentó un crecimiento estadísticamente mayor en largo y peso, pero no se encontraron diferencias significativas en los parámetros restantes entre los grupos tratados y el control, aunque el conteo diferencial leucocitario mostró una diferencia estadística entre los grupos con 2 y 4% de inclusión. Tomando en cuenta los datos obtenidos, concluimos que aunque el PHB haya demostrado ser beneficioso en otros estudios, en el nuestro no lo fue para ninguno de los parámetros estudiados.

2- SUMMARY

Aquaculture appears as an alternative way to produce food and aquatic supplies, as a way to alleviate overexploited aquatic ecosystems while feeding an ever growing human population. In our country it is an activity still under development, although there have been several experiences such as the ones with Siberian sturgeon, a specie that in addition to successfully being able to adapt to the ecosystem, has potentially a good profit-earning capacity. Production costs are likely to decline if disease resistance, growth, and feed conversion efficiency are improved, for which several alternatives have been studied, such as the use of prebiotics, a practice that would also lead to a decrease in antibiotics usage. Referring to our research, we evaluated the partial replacement of the diet of Siberian sturgeon fingerlings with poly- -hydroxybutyrate, a polymer used by certain bacterial strains as an energy reserve. Presumably its beneficial action occurs when degraded to short chain fatty acids in the digestive tract. The experience consisted in the evaluation of some production parameters, including weight gain, growth in length, feed conversion rate, survival, differential leukocyte count and platelet count/ 100 leukocytes. Fish were divided into three groups, one with 2% prebiotic inclusion, another one with 4% inclusion, and a control group. The results showed that the control group had a statistically greater growth in length and weight, but no significant differences in other parameters between treated and control groups were found, although the differential leukocyte count showed a statistical difference between groups with an inclusion of 2 % and 4%. Taking into account the data obtained, we conclude that although the PHB has proven beneficial in other studies, in ours it was not for any of the studied parameters.

3- INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Acuicultura

/D DFXLFXOWXUD HV OD ³&UtD GH RUJDQLVPRV DFXiWLFR crustáceos y plantas. La cría supone la intervención humana para incrementar la producción; por ejemplo: concentrar poblaciones de peces, alimentarlos o protegerlos de los depredadores. La cría supone asimismo tener la propiedad de las SREODFLRQHV GH SHFHV TXH VH HVWpQ FXOWLYDQGR´)

(Q 8UXJXD\ OD OHJLVODFLyQ GHILQH D OD $FXLFXOWXUD cultivo o crianza de especies hidrobiológicas en medio controlado, abarcando ciclos biológicos completos o parciales, incluyendo las actividades realizadas en estructuras ubicadas en ambientes acuáticos marinos, continentales y en tierra. (Ley 19.175 de Pesca Responsable y Fomento de la Acuicultura, www.parlamento.gub.uy)

En el año 1996 la acuicultura fue declarada de interés nacional para nuestro país. (DINARA, 2013).

3.1.a- Motivos para realizar acuicultura:

Según FAO (2012) y DINARA (2013) los principales motivos para realizar acuicultura son:

Desarrollo sostenible, la explotación excesiva de los ecosistemas acuáticos por la pesca tradicional ha producido un daño a estos, ya sea afectando directamente a una especie, como el caso del atún rojo (Thunnus thynnus); o indirectamente alterando el equilibrio biológico de las redes tróficas acuáticas.

Contribución a la seguridad alimentaria, las estadísticas indican que en el período 1961-2009 el suministro mundial de alimentos pesqueros tuvo una tasa de crecimiento de 3,2% anual pasando de 9,9 a 18,4 kg/habitante/año. Al estar los recursos marítimos en su mayoría explotados plenamente o sobreexplotados, es imposible aumentar la extracción (que incluso ha disminuido), para cumplir la demanda de una población humana siempre creciente en número y avidez por el pescado. La acuicultura aparece como la única opción para incrementar la oferta de pescado como alimento para la humanidad.

Productos diferenciados, al ejercerse control sobre alimentación, ambiente, sanidad, condiciones de cosecha y procesamiento, el producto final de la acuicultura es de mejor calidad lo que conlleva a un precio más alto.

Buena rentabilidad, si bien los costos iniciales son altos, luego se observan buenos beneficios económicos, en parte por el alto índice de conversión de los organismos acuáticos comparados con otras especies.

Generación de fuentes de trabajo, la acuicultura puede generar directa e indirectamente fuentes de trabajo en el medio rural, como también la integración de sectores públicos y privados.

Permite mejorar suelos poco productivos, utilizando el agua de estanques acuícolas para riego y los lodos para abono de la tierra.

Posibilidad de complementar con otras actividades, un ejemplo de lo antes mencionado es la cría de carpas en arrozales, la agroacuicultura integrada o la acuicultura en tajamares usados para reserva de agua.

Desarrollo profesional y científico; crea oportunidades de experimentación, investigación e innovación.

Repoblación de embalses públicos; permite repoblar ambientes naturales que se encuentran mermados debido a la sobreexplotación por el hombre de algunas poblaciones de la fauna íctica.

Cultivo para pesca deportiva y peces ornamentales. Actividades de gran impacto económico y social.

3.1.b- Aspectos negativos de la acuicultura:

Aunque la acuicultura tiene un gran valor potencial, hay efectos negativos que deben ser tenidos en cuenta (WWF, 2013; Schryver, 2010), como por ejemplo:

Contaminación de los recursos hídricos por liberación de nutrientes, patógenos, químicos, y fármacos.

Incubación de enfermedades y parásitos, favorecido por el hacinamiento de los organismos acuáticos en instalaciones de cultivo.

Introducción de especies exóticas, que se escapan y compiten, infectan, o se alimentan de especies nativas.

Incremento en la presión sobre las poblaciones de especies pelágicas, para su uso como ingredientes de los piensos.

Desarrollo de resistencia bacteriana, por el uso masivo de antibióticos para prevención de infecciones.

3.1.c- Situación de la acuicultura mundial

Según datos tomados de la FAO (2014), en la actualidad se observa una clara tendencia al alza de la producción de pescado en el mundo, siendo su motor impulsor, la acuicultura, frente al estancamiento de la pesca de captura. La contribución de la cría de peces comestibles en cautividad a la producción pesquera mundial total pasó de 13,4% en 1990 a 25,7% en 2000, y a 42,2% en 2012.

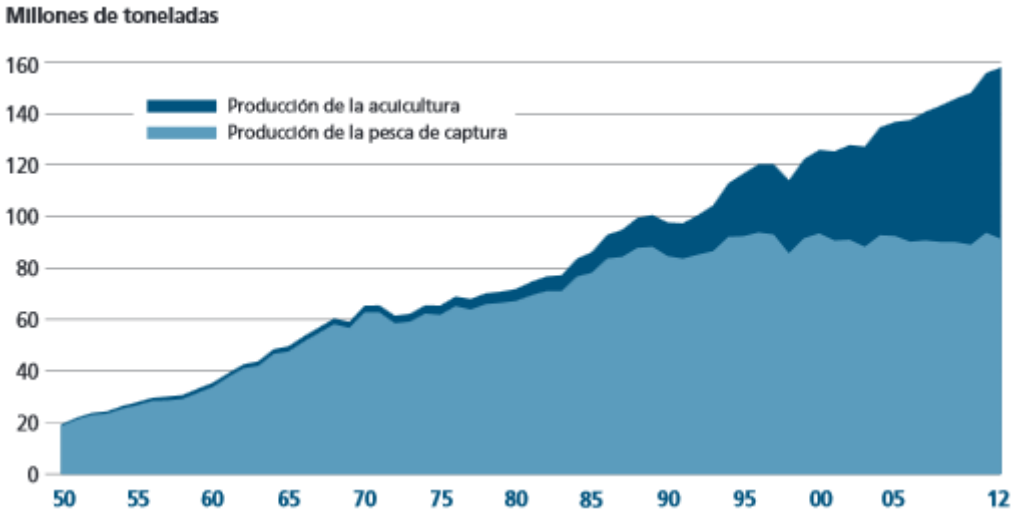


Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO, 2014).

Conforme a lo expresado en el informe de la FAO sobre el estado mundial de la pesca y acuicultura 2012, el peso relativo de la acuicultura en la producción mundial de especies comestibles pasó de 9% en 1980 a 47% en 2010.

En ese mismo año se produjeron 59,9 millones de toneladas de especies acuáticas comestibles provenientes del cultivo, 7,5% más que el año anterior. Se incluye dentro de especies comestibles a peces de escama, crustáceos, moluscos, anfibios (ranas), reptiles acuáticos (excepto cocodrilos), y otras especies como: erizos y pepinos de mar, ascidias, y medusas.

Hoy en día en el mundo se crían unas 600 especies acuáticas en cautiverio, en agua dulce, salobre, y salada, utilizando un grado variable de tecnología, instalaciones, y alimentación.

El predominio global de la producción con un 56,4% proviene de los peces de agua dulce, seguido con un 23,6% por moluscos, crustáceos (9,6%), peces diádromos (6,0%), peces marinos (3,1%) y otros animales (1,4%).

Una tercera parte de la producción se obtiene sin alimentación artificial, como las carpas y los bivalvos que se alimentan mediante filtración, y el resto recibe grados variables de alimentación (desde extensiva a superintensiva), o fertilización de las aguas.

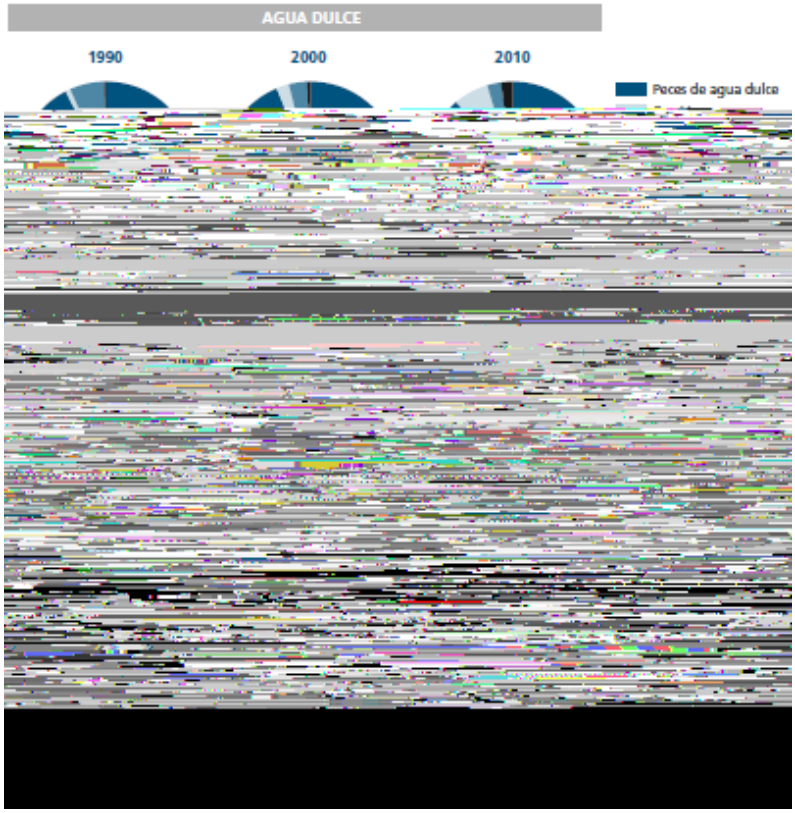


Figura 2. Composición de la producción acuícola mundial por ambiente de cultivo (FAO, 2012).

Las instalaciones varían según el caso, puede desarrollarse acuicultura en:

- Estanque: Es un contenedor de agua retenida por tierra, es el más común (99% de los casos), puede ser abierto o recubierto.
- Jaula: Barrera sólida de red o malla instalada en un ambiente natural o artificial.
- Cerco: Es Similar a una jaula, pero con piso de tierra.
- Raceway: Es un canal artificial de concreto, donde hay un permanente recambio de agua.
- Tanques
- Silos

Art 56- Las actividades de Acuicultura deben llevarse a cabo de modo que garanticen el desarrollo sustentable de la actividad, la protección del medio ambiente, la sanidad de los organismos acuáticos y la inocuidad alimentaria de los productos acuícolas.

Art 59- Condiciones sanitarias.

Todos los emprendimientos de Acuicultura deberán ejecutarse de manera que garanticen la sanidad de las especies en cultivo y la inocuidad alimentaria de los productos acuícolas.

Art 60- Efectos ambientales de la Acuicultura.

Para garantizar el desarrollo sustentable de la actividad, todo centro de cultivo deberá evitar dañar el ecosistema acuático en el que se lleva a cabo.

Art 64- La importación, exportación, y tenencia de especies destinadas a la Acuicultura está sujeta a la autorización previa de la DINARA.

Art 66- Crea el Consejo Consultivo de Acuicultura como órgano asesor del MGAP.

Capítulo X (Infracciones y sanciones)

Art 77- La ejecución de actividades de Acuicultura cuando ocasione daños graves sin contar con la autorización o concesión pertinente, la importación de especies exóticas sin contar con la aprobación necesaria, y el incumplimiento de las condiciones ambientales y sanitarias a las que se refiere la ley, serán consideradas infracciones muy graves.

También existen otras leyes que rigen la actividad, bajo la competencia de la DINARA:

Desarrollo y promoción de la Acuicultura

- Ley 14.484 del 18 de diciembre de 1975

Art. 3: G) refiere al estudio y la promoción de la acuicultura en todas sus formas.

J) Proyectar y hacer cumplir las reglamentaciones referentes a la sanidad y calidad de los productos de pesca y caza acuática y derivados y a los medios requeridos para su extracción, transporte, depósito, manipulación, industrialización y comercialización interna y externa (sin prejuicio de lo dispuesto en el literal C*).

/LWHUDO & GH OD /H\ [illegible] referentes al control de calidad del sector pesquero, asumiendo la total responsabilidad en todas sus etapas y llevar a cabo todas las investigaciones atinentes al mismo, que comprenderá entre otras disciplinas: la oceanología, biología, limnología y ecología.

- Decreto 259/996 de 26 de junio de 1996:

Art. 1: Declara de Interés Nacional la Acuicultura en todas sus etapas y especies.

Art. 2: El Poder Ejecutivo por resolución fundada y previo informe del Instituto Nacional de Pesca (hoy DINARA) y de la Unidad Asesora creada por el Decreto Ley14.178, de 28 de marzo de 1974, podrá incluir en los beneficios establecidos en el referido Decreto Ley 14.178, aquellos Proyectos de Inversión que presenten las empresas que desarrollan las actividades establecidas en el Artículo primero y cumplan con los objetivos establecidos en los planes de desarrollo económico y social.

Art. 3: La resolución de referencia indicará las medidas promocionales que beneficiarán las actividades de los sectores o actividades industriales, grupo de empresas o empresas que se incluyan.

Art. 4: Las empresas interesadas deberán presentar los proyectos de inversión correspondientes ante la Unidad Asesora de Promoción Industrial del Ministerio de Industria, Energía y Minería.

Importación de especies

- Decreto 149/997 de 7 de mayo de 1997:

Art. 3:ap) considera organismos acuáticos exóticos aquellos ingresados al país desde el exterior, así como los que se introducen en un ecosistema trayéndolos desde otro, aún dentro del propio país.

- Ley 13.833 del 23 de diciembre de 1969:

Art. 14: ³3URKtEDVH OD H[SeciesDivas yQ cualquierHVtado de su desarrollo, como asimismo la importación de especies exóticas, cualquiera fuese su estado de evolución, o su introducción en las aguas interiores, salvo DXWRUL]DFLyQ HVSHFLDO´

Aprobación de Proyectos de Acuicultura

- Decreto 149/997 de 7 de mayo de 1997:

Art. 3: aj) GHILQH ³3UR\HFWR´ DO FRQMXQWR GH HVSHFLILFDF con los requisitos que para cada caso indique DINARA, sea presentado ante el mismo para su aprobación sobre realizaciones de actividades de acuicultura así como actividades con mamíferos y aves acuáticos y actividades de pesca científica.

Control Sanitario

- Decreto 149/997

Art. 31: Establece que la DINARA es el organismo oficial competente en ejercer el control sanitario de especies acuáticas vivas, cualquiera sea su etapa de desarrollo, que ingresen o salgan del país y el único habilitado para expedir los certificados requeridos a nivel internacional.

Registro

- Decreto 149/997

Art. 34: h) la DINARA llevará el Registro General de Acuicultura.

(DINARA, 2013; www.parlamento.gub.uy)

3.2- Esturión

3.2.a- Introducción e historia del cultivo de esturión en Uruguay

Según los datos presentados por la empresa Esturiones del Rio Negro, estudios satelitales rusos indicaron que el Río Negro es uno de los dos lugares en el mundo con mejores condiciones naturales para la cría de esturiones productores de caviar. Teniendo en cuenta lo anterior, además del incremento en el consumo de caviar y la declinación en la producción mundial, una empresa de capitales uruguayos decide incursionar en el ramo, estableciéndose en las inmediaciones de la represa de Baygorria. En 1994 el gobierno uruguayo autoriza la importación de huevas fertilizadas de esturión siberiano y la tenencia de 7 hectáreas pertenecientes a UTE en modalidad de comodato. En 1996 llegan al país las primeras huevas fertilizadas directamente desde Rusia. En 1998 se realiza la primera exportación de carne de esturión a Brasil. En 1999 la explotación es declarada de interés nacional por el gobierno, y es también en este año que se logra la primera extracción de caviar de los esturiones Sterlet que llegan a la madurez un año antes que la variedad siberiana. Se extiende el comodato por 10 años más. En 2001 se logra la primera extracción y venta de caviar siberiano (200kg) en el mercado regional. En 2002 se produce la primera exportación de caviar uruguayo a Estados Unidos. El 2004 fue un año explosivo en cuanto a ventas y demanda, superando la capacidad productiva, se abre la exportación al mercado europeo. Inversiones extranjeras posibilitan una expansión en la infraestructura. La producción aumenta a unas 7 toneladas anuales en 2005 y se introduce el esturión ruso Acipenser gueldenstaedtti del que se obtiene la variedad oscietra. En 2007 y 2008 se realizan nuevas inversiones extranjeras para construir otra granja, y se obtienen las certificaciones ISO 9001:2000 e ISO 14000:2004. Durante el año 2010 se logra la primera reproducción de esturiones nacidos en Uruguay, y en 2011se extrae la primera producción de caviar Oscietra. En 2012 se importan huevas fertilizadas de la variedad Beluga del cual se obtiene el mejor caviar. (www.blackrivercaviar.com.uy)

3.2.b- Taxonomía:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Acipenseriformes

Familia: Acipenseridae

Género: Acipenser

Especie: A. baerii

Nombre común: Esturión siberiano

Figura 3. Acipenser baerii (FAO, 2013)

3.2.c- Anatomía y descripción:

Tienen las características de su orden: esqueleto cartilaginoso, cola heterocerca y mayor número de radios en sus aletas que en la base de ésta. Tienen 5 filas de escudos óseos sobre la piel a lo largo del cuerpo. Además, esta familia se caracteriza por tener cuatro largas barbas por delante de la boca, la cual no tiene dientes en los adultos, es protráctil y está situada en posición inferior del cuerpo. Tienen una vejiga natatoria muy grande, para mantener a flote en agua dulce su enorme peso con tamaños que pueden alcanzar más de cuatro metros de largo.

Espiráculo presente. Hocico y pedúnculo caudal subcónico. Membranas branquiales unidas al istmo. Boca transversal y labio inferior truncado en el centro. Las barbillas son suaves o ligeramente fibrosas. La longitud del hocico es sumamente variable (33.3 - 61 % de la longitud de la cabeza). 20 a 49 lamelas branquiales en forma de abanico, cada una con terminaciones en varios tubérculos. Radios en aletas: D:30-56 y A:17-33. 10-12 placas dorsales; 32-62 placas laterales; 7-16 (20) placas ventrales. Las placas de los especímenes jóvenes poseen terminaciones puntiaguadas, más no en los adultos. Numerosas placas óseas pequeñas se distribuyen entre las hileras continuas de placas. Existe una gran variabilidad en la coloración: desde gris claro hasta café oscuro sobre el dorso y los costados, y de blanco hasta amarillento en la parte ventral (FAO, 2013).

3.2.d- Biología:

Es una especie de agua dulce exclusiva del hemisferio norte en condiciones naturales, presente en los ríos de China, Kazajistán, y Rusia especialmente en la cuenca del río Ob, pero migra largas distancias para desovar; y a diferencia de otras

especies de esturiones continúa alimentándose en este período. Actualmente se encuentra en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza bajo la categoría amenazado. Son peces demersales, viven cerca del lecho del río, alimentándose principalmente de organismos que viven enterrados o en el fondo como el caso de crustáceos y moluscos (alimentación bentófaga). Se DGDSWDQ D XQ DPSOLR UDQJR GH- W&PS HWUDPEXLUDQ UGHV LM bajos niveles de oxígeno disuelto (pero en dichas condiciones no gana peso). La pubertad naturalmente ocurre tarde, sobre todo por las bajas temperaturas en las que se desarrollan: entre 10 y 17 años para los machos, y 12 a 20 años para las hembras, acortándose significativamente estos plazos en condiciones de cautiverio. (FAO, 2013; The IUCN Red List of Threatened Species, 2014).

3.2.e- Sistema de producción

El esturión siberiano es una especie gonocorista. Machos y hembras se mantienen separados debido a la diferencia en los productos que de ellos se obtienen, carne del macho y huevas de la hembra. Si bien presenta sexos separados, el dimorfismo sexual no es marcado, por lo que se utilizan técnicas de sexado: observación de gónadas por biopsia, dosificación de 11-ketotesterona plasmática, y exploración de gónadas con ultrasonido. Esto se realiza normalmente a los 3 años cuando las gónadas están desarrolladas, entonces los machos se venden, las hembras se conservan y se dejan crecer hasta que estén maduras para producir caviar. (FAO, 2013).

<u>Reproducción</u>

En aguas templadas, la madurez sexual se alcanza alrededor de los 6 años para los machos, y 7 para las hembras, bastante menos que en condiciones naturales (10 a 17 años para machos, y 12 a 20 para hembras). Luego de la pubertad se seleccionan las hembras reproductoras. La reproducción no es una tarea sencilla, ya que las hembras generalmente no ovulan todos los años, y además no son sincrónicas, por lo que en un año se obtiene entre un 35 a 63% de hembras maduras respecto al total. Con un control de la temperatura del agua, se puede recolectar huevas por un período extendido de 4 a 5 meses. Para la obtención de mejores productos, se puede además, realizar terapias hormonales con extracto de pituitaria de carpa o esturión, o análogos de GnRH. La cosecha de huevos se realiza por masaje abdominal cada 2 horas, o por laparotomía, constituyendo estos, un 8-14% del peso vivo de la hembra. El esperma de los machos se recolecta introduciendo un pequeño tubo flexible en el orificio genital, con lo que se fertilizan las huevas de las hembras. La incubación debe hacerse de modo de evitar la DGKHUHQFLD HQWUH ORV KXHYRV /XHJR GH GtDV D XQ embriones ya se encuentran desarrollados y se seleccionan por su fototropismo positivo. (FAO, 2013).

Cría

En todo el ciclo productivo es de capital importancia monitorear la calidad del agua. Se busca un alto tenor de oxígeno disuelto, cercano a la saturación, y un pH adecuado (entre 6,5 y 7,5). También es importante disponer de un volumen adecuado de agua y una buena tasa de recambio que permita mantener una concentración baja de productos de desecho (Chebanov y col, 2011). A una temperatura ideal de 17- r & H O S U L P H U D O L P H Q W R V H G H E H V X P L C 11 después de la eclosión, después que ha finalizado la alimentación endógena. En bateas de 15-20 cm de profundidad se obtienen buenos resultados en el crecimiento y sobrevivencia, pasándose posteriormente a tanques circulares de 2m de diámetro donde se crían los alevines. Es de capital importancia el manejo de la alimentación en esta etapa, ya que reduce la aparición de enfermedades y el canibalismo. (FAO, 2013).

Engorde

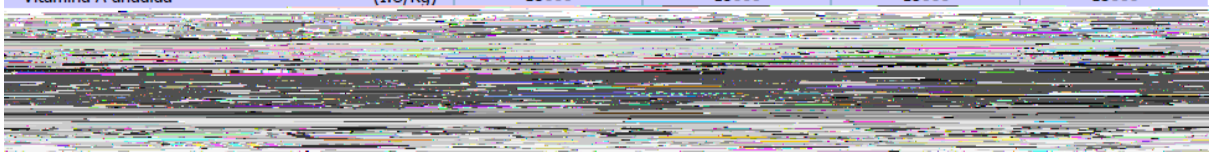
Se puede realizar en canales (raceways), jaulas, tanques circulares, y piscinas grandes de cultivo intensivo. Las carga máximas recomendadas en estanque aumentan si se proporciona oxigeno adicional. La alimentación consiste principalmente de pellets, recomendándose los extruidos que presentan mejor estabilidad hídrica (FAO, 2013). En algunos lugares la cría de esturiones e híbridos de esturiones se realiza en estanques de tierra, en monocultivo o policultivo con especies no predadoras (Pyka, 2003). La dieta debe satisfacer los requerimientos energéticos y nutricionales de cada etapa en el desarrollo suficientes para el metabolismo y el crecimiento, teniendo en cuenta la capacidad digestiva del pez y el tamaño de la boca del mismo. Las raciones formuladas para larvas tienen de 48 a 60% de proteínas y de 8 a 16% de lípidos, pero en peces de mayor tamaño la composición ideal presenta 42% de proteínas y menos de 15% de lípidos. En todas las etapas se busca mantener la cantidad de carbohidratos digestibles cerca de 0%, ya que llevan a un aumento de la deposición de grasas en el hígado. En etapas tempranas se considera efectivo la alimentación con un 6% del peso vivo, pero cuando se alcanzan un peso de 10 a 20 gramos, se reduce al 3% del peso. Pobres indice de conversión indican problemas fisiológicos o una calidad insuficiente del alimento, lo que además aumenta la carga de nutrientes en el agua y en los efluentes. Se debe prestar atención al almacenamiento de los alimentos, ya que si esto se hace en condiciones precarias, aparecen sustancias que pueden afectar negativamente al pez, como productos de la peroxidación lipídica y metabolitos de hongos y bacterias que se desarrollan en el alimento. Asimismo, la contaminación microbiana puede afectar adversamente la microflora del tubo digestivo llevando a inflamaciones o desarrollo de gas, que puede afectar al equilibrio y llevar a la muerte del pez (Chebanov y col, 2011).

Para dar un ejemplo de alimento balanceado para esturiones, tomamos como modelo la ración Efico Sigma de la empresa BioMar, que declara tener como

ingredientes: harina de pescado, torta de girasol, torta de soja, trigo, aceite de pescado, proteína de guar, aceite vegetal, vitaminas y minerales. A continuación en el siguiente cuadro se detalla la composición nutricional:

Cuadro 2. Composición nutricional de la ración para esturiones Efico Sigma 841.

DECLARACIÓN		3 mm	4.5 mm	6.5 mm	9 mm
Proteína bruta	(%)	47.0	44.0	43.0	43.0
Lípidos brutos	(%)	18.0	20.0	22.0	22.0
Carbohidratos	(%)	17.1	16.2	15.5	15.5
Celulosa bruta	(%)	3.5	4.0	3.8	3.8
Cenizas	(%)	9.5	10.8	10.8	10.8
Fósforo total	(%)	1.4	1.5	1.5	1.5
Energía bruta	(MJ/Kg)	21.5	21.6	22.0	22.0
Energía digestible	(MJ/Kg)	18.8	18.7	19.1	19.1
Proteína Digestible/Energía Digestible	(g/MJ)	23.6	22.0	20.9	20.9
Vitamina A añadida	(I.U/Kg)	15000	15000	15000	15000



(BioMar, 2014).

Cosecha y procesamiento

La captura se produce primero concentrándolos con malla y luego se capturan con redes manuales, o si son de mayor tamaño, de forma manual.

Primero se seleccionan las hembras, se mantienen en agua corriente por un tiempo, se atontan y se evisceran. La carcasa se procesa como cualquier pescado. Los ovarios se extraen enteros, son sometidos a enfriamiento, luego a revisión y finalmente se extraen los óvulos. Estos son sometidos a un enjuague, pesaje, salado, drenaje, enlatado, etiquetado, y preservado. (FAO, 2013).

3.2.f- Mercado internacional de los productos del esturión

Los esturiones son uno de los recursos silvestres más valiosos del planeta, las tendencias en la captura y el comercio ilegales constituyen un riesgo para todos esos beneficios, como en el caso del mar Caspio que fue tradicionalmente el mayor productor de caviar mundial y ahora sus poblaciones de esturión se encuentra bajo amenaza. La caída de la URSS a principios de los 90, hizo que se interrumpieran los planes de ordenamiento de las capturas de esturiones, el control de la producción y exportación de caviar, resultando en una multiplicación de la pesca ilegal y el

Cuadro 3. Sobrevivencia de nauplios de Artemia franciscana ante Vibrio campelli LMG 21363 con y sin agregado de -hidroxibutirato o butirato en el agua.

Los neutrófilos son los granulocitos más comunes en el frotis sanguíneo de pez, al ser las células más móviles de todos los leucocitos, son las primeras en responder a una invasión microbiana o lesión tisular y llegar a los tejidos inflamados, por este motivo son los primeros en aumentar en injurias agudas. Su función es capturar y destruir partículas extrañas como bacterias invasoras, a través de fagocitosis. Su forma es redonda a oval, su núcleo excéntrico, y puede ser redondo a oval, o lobulado. El citoplasma típicamente es gris claro, y con gránulos que se tiñen de forma diferente según la madurez de la célula. (Noga; 2000; Schalm, 2010; Tizard, 2000)

Los eosinófilos rara vez se observan, o se observan en poca cantidad (Schalm, 2010). Su función es la de fagocitosis y destrucción de parásitos (Noga, 2000). Se ha descrito que contribuyen en grado importante en reacciones de hipersensibilidad tipo I, liberando mediadores inflamatorios (Tizard, 2000). Su forma es ovoide o redonda con un núcleo típicamente excéntrico y lobulado. El citoplasma posee numerosos gránulos grandes y fuertemente acidófilos (Conroy, 2007).

Los basófilos son todavía más raros (Noga, 2000), se sabe poco de su función, pero se cree que es similar a la de los basófilos en mamíferos. (Schalm, 2010). Es una célula ovoide en la cual el núcleo es excéntrico en posición. El citoplasma se encuentra lleno de varios gránulos grandes y fuertemente basófilos. (Conroy, 2007).

Los monocitos usualmente están presentes en el pez, son fagocitos y están influenciados por las citoquinas. Es común encontrar fagocitos mononucleares en la inflamación crónica. (Noga, 2000). Son células grandes, redondeadas, con un núcleo también redondeado o en forma de herradura de posición generalmente excéntrica. Su citoplasma ocupa al menos la mitad de la célula y frecuentemente presenta vacuolas (Conroy, 2007; Noga, 2000; Schalm 2010).

Los trombocitos o plaquetas no forman parte de la serie blanca, pero deben diferenciarse de los leucocitos para obtener un conteo fiable del leucograma, y su número varía en ciertas enfermedades (Noga, 2000). Participan de la coagulación, y son activados por los mismos mecanismos que las plaquetas de mamíferos (Schalm, 2010). Presentan un núcleo condensado y un citoplasma claro y escaso. La forma celular varía según el grado de activación, pudiendo ser de forma de huso, ovalada, o redonda (Conroy, 2007; Schalm, 2010).

En cuanto al conteo diferencial, Palíková y colaboradores (1999) estudiando Acipenser baerii, Acipenser stellatus, y Huso huso obtuvieron los siguientes resultados, el conteo en las tres especies fue similar, 68,0 a 73,5% para linfocitos, 21,8 a 25,1% para neutrófilos, y 3,0 a 4,6% para eosinófilos. Otros tipos celulares como monocitos, y etapas inmaduras de granulocitos y linfocitos fueron escasos (0,7 a 2,0%).

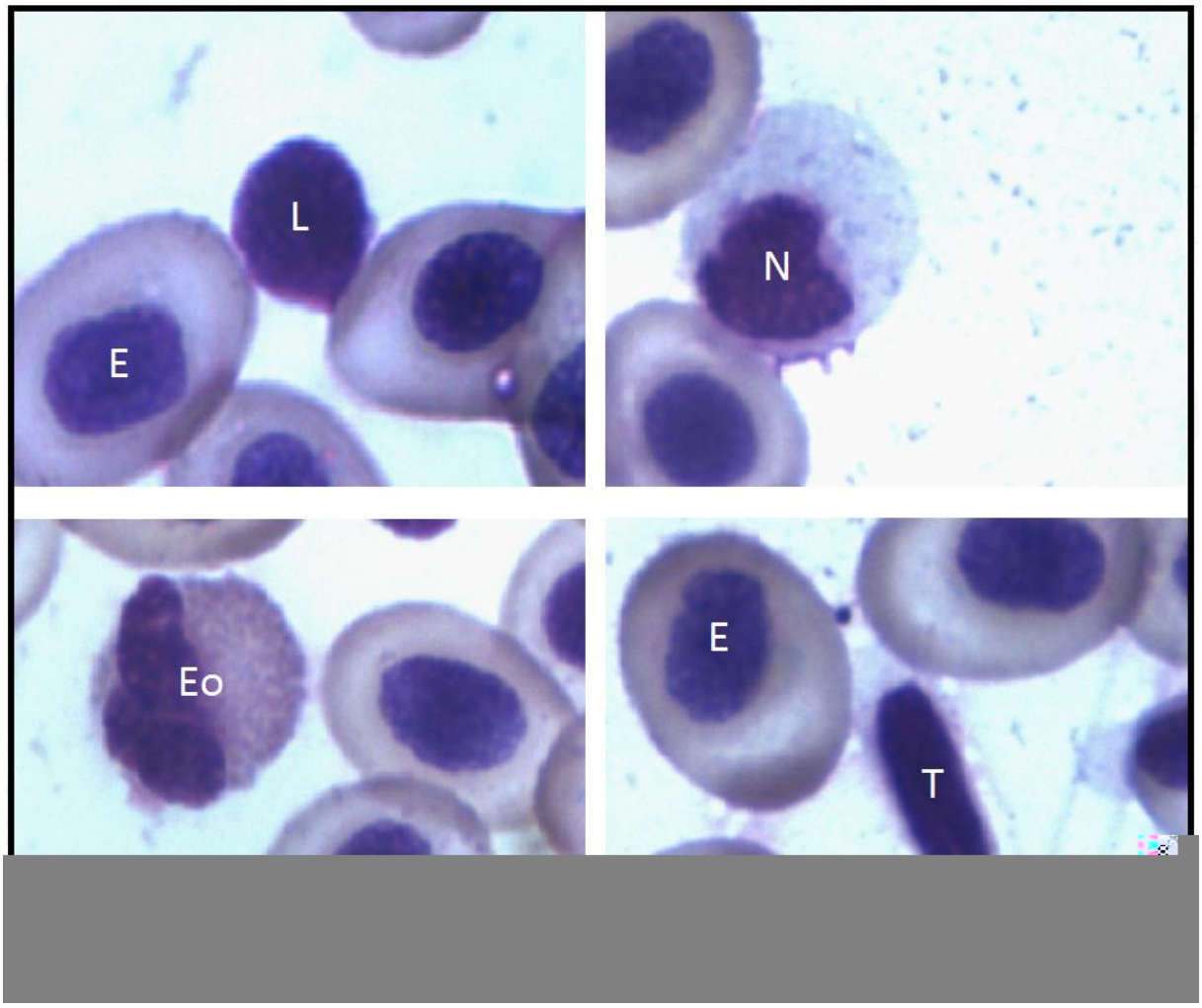


Figura 5. Frotis de sangre periférica de A. baerii donde se observa un linfocito (L), un neutrófilo (N), un eosinófilo (Eo), un trombocito (T), y varios eritrocitos (E). Tinción de May Grünwald-Giemsa.

4- HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis de trabajo fue que la inclusión de PHB como prebiótico en la ración balanceada de esturión siberiano, tendrá un efecto benéfico sobre varios parámetros productivos, como el crecimiento, la sobrevivencia y el índice de conversión, y no alterará los porcentajes de leucocitos sanguíneos.

Hipótesis operacionales

Los lotes alimentados con PHB en la ración tendrán un mayor crecimiento que los lotes control.

Los lotes alimentados con PHB en la ración tendrán una mayor sobrevivencia que los lotes control.

Los lotes alimentados con PHB en la ración tendrán un índice de conversión menor que los lotes control.

Los lotes alimentados con PHB en la ración no tendrán diferencias significativas en los porcentajes de leucocitos sanguíneos con los lotes control.

5- OBJETIVOS

Objetivo generales

Determinar la eficacia del uso de PHB como prebiótico en el engorde de esturión siberiano (A. baerii), tomando como referencia el crecimiento, la sobrevivencia y el índice de conversión.

Objetivos específicos

Comparar el crecimiento en largo y peso, la sobrevivencia en porcentaje, el índice de conversión, conteo diferencial leucocitario y conteo de plaquetas cada 100 leucocitos, de ejemplares juveniles de Acipenser baerii distribuidos en tres grupos diferentes, dos grupos tratados, con 2% y 4% de poli-hidroxibutirato respectivamente, y un grupo control, durante un lapso de tiempo de 3 meses.

6- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1- Diseño experimental:

El estudio del presente trabajo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Pesqueras de la Facultad de Veterinaria. El mismo consistió de tres tratamientos, un control, uno con 2% de inclusión y uno con 4% de inclusión de PHB.

6.2- Animales

El trabajo se realizó durante el período comprendido entre el 28 de agosto hasta el 19 de noviembre, utilizando 120 ejemplares de esturión siberiano (Acipenser baerii) cedidos por la empresa Esturiones del Plata, una granja fluvial ubicada en el embalse de Rincón del Bonete sobre el Río Negro, San Gregorio de Polanco. Los mismos fueron transportados hasta el Instituto de Investigaciones Pesqueras en camioneta acondicionada con un tanque de 450 litros para transporte de organismos acuáticos.

6.3- Alimentación

La ración con la que se alimentó, fue donada por la empresa Esturiones del Plata, y adicionada con distintos porcentajes de PHB cedido por la Facultad de Ingeniería. Se confeccionó un plan de alimentación que consistió en formar tres grupos: un grupo control (0% agregado de PHB) de dos repeticiones con 15 peces cada una; otro grupo con 2% adicionado de PHB, y un último grupo con 4% de PHB; estos últimos dos constan de tres repeticiones, con 15 peces cada una.

La cantidad de ración suministrada varió en función de la biomasa por tanque y de la temperatura ambiental. La biomasa fue determinada por peso cada 15 días. La proporción de ración dada aumentó con la temperatura, teniendo en cuenta que los peces son poiquilotermos y su metabolismo aumenta a mayor temperatura, el esquema utilizado es el siguiente:

- desde 28/ 8 al 14/10, 3% de la biomasa
- desde 15/10 al 8/11, 4% de la biomasa
- desde 9/11 al 19/11, 5% de la biomasa.

<u>Agregado de PHB</u>

La adición se realizó en el laboratorio de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería y la técnica se describe a continuación:

Primero el polímero obtenido por fermentación microbiana de Ralstonia eutropha DSM 545, es disuelto en un solvente orgánico, en este caso cloroformo y sometido a FDORU KDVWD TXH VH IRUPD OD VROXFLyQ /XHJR VH DJU tres partes de cloroformo y se homogeniza con la ración con espátula. El secado es por evaporación.

Elaboración de los frotis

Se extrajo sangre de los ejemplares con jeringa previamente heparinizada, una gota de dicha sangre se depositó sobre el porta objetos y se realizó el extendido del frotis. Luego de esto se tiñeron las muestras mediante la técnica de May Grünwald-Giemsa y se fijaron con metanol.

6.4- Equipos e instalaciones

- 8 tanques de fibrocemento de 450L, con entrada y salida de agua, aireadores; con un grupo de 15 peces cada uno.
- Balanza digital
- Ictiómetro
- Termómetro
- Bandejas plásticas
- Baldes y calderines
- Microscopio óptico con objetivo de inmersión
- Aceite de inmersión
- Jeringas
- Portaobjetos
- Metanol
- Heparina
- Solución de May Grünwald
- Solución de Giemsa.

7- RESULTADOS

7.1- Índices productivos

7.1.a- Resultados generales

Los resultados de las medidas iniciales, finales y durante los muestreos realizados se muestran en el cuadro 4, y en las figuras 6 y 9.

Cuadro 4. Resultados del peso y largo inicial, del peso y largo en los muestreos y del peso y largo final de A. baerii alimentados con ración balanceada conteniendo 0%, 2% y 4 % de PHB.

	Control		2%		4%	
Fecha	Peso promedio (gr.)	Largo promedio (cm.)	Peso promedio (gr.)	Largo promedio (cm.)	Peso promedio (gr.)	Largo promedio (cm.)
28/08/2013	11,40	15,15	10,80	14,80	10,80	14,40
12/09/2013	14,85	16,90	14,20	16,50	13,80	16,20
18/09/2013	16,00		16,93		16,90	
01/10/2013	19,03		18,45		17,95	
25/10/2013	26,03		23,21		22,97	
11/11/2013	34,82		28,92		26,42	
18/11/2013	38,59	23,60	31,32	21,70	31,37	21,80

Cuadro 5. Medidas del desempeño (medido como peso final, largo final, sobrevivencia e índice de conversión) de A. baerii alimentados con ración balanceada conteniendo 0, 2 y 4 % de PHB.

Contenido de PHB en ración	Peso final promedio (gr)	Largo final promedio (cm)	Sobrevivencia (%)	Índice de conversión
0 %	38,59 (±13,86) [a]	23,60 (±3,27) [a]	93,33	1,35
2%	31,32 (± 13,97) [b]	21,70 (± 3,49) [b]	95,55	1,88
4%	31,37 (± 12,74) [b]	21,80 (±3,17) [b]	91,11	1,69

En cada columna letras distintas designan grupos significativamente diferentes.

7.1.b- Análisis de los pesos finales de los peces

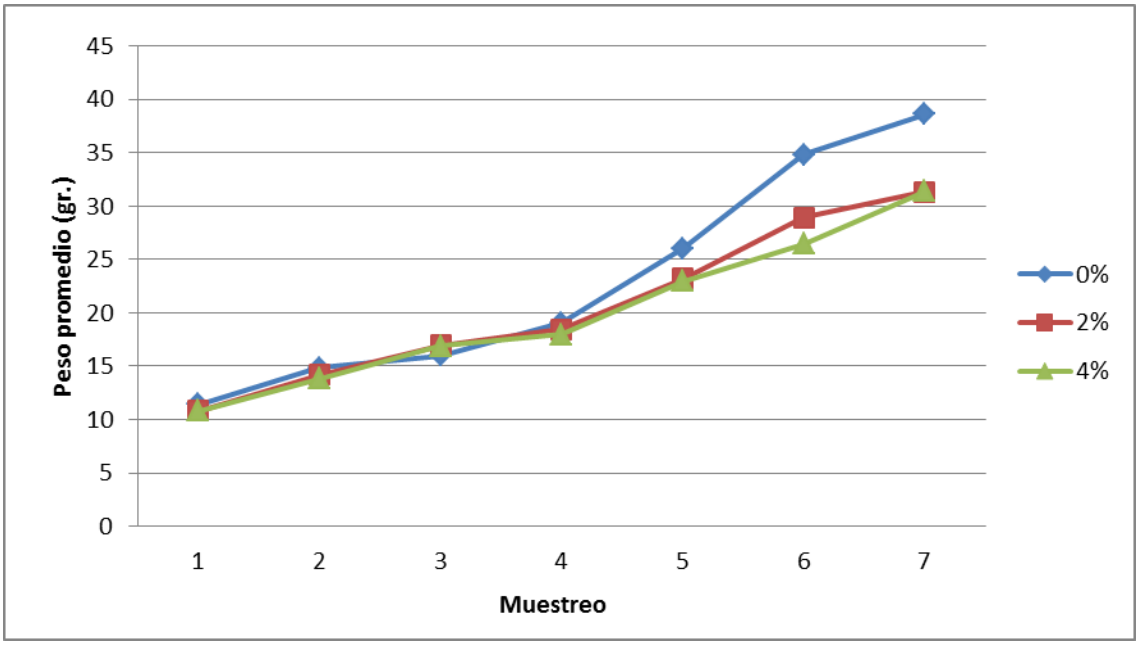


Figura 6. Crecimiento en peso de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

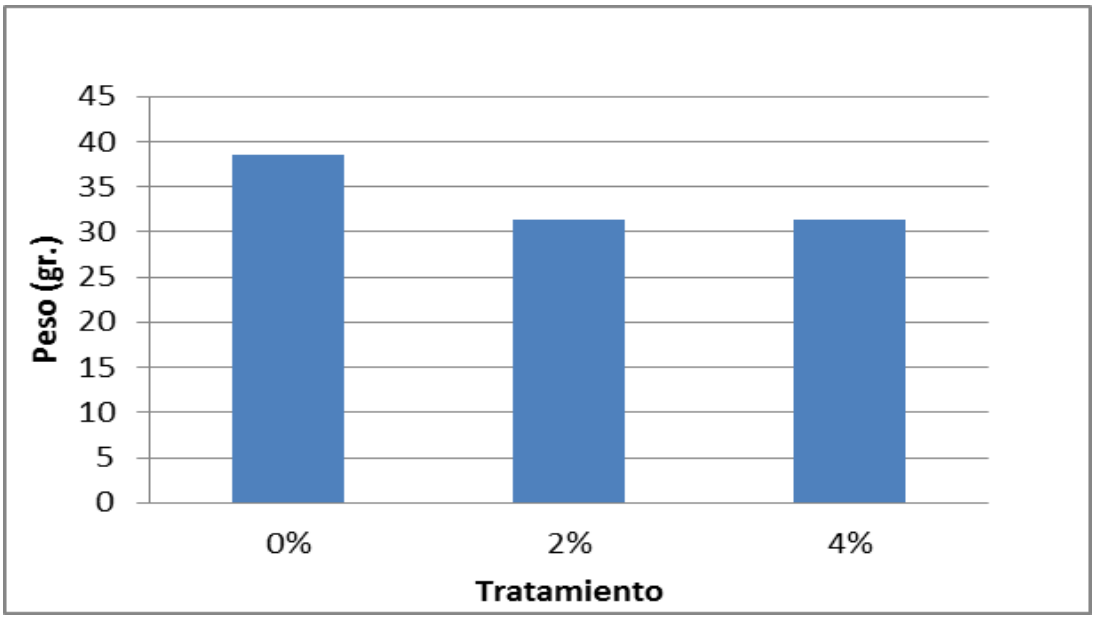


Figura 7. Peso promedio final de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

Luego de establecer que los pesos de los peces en los diferentes tratamientos tenían una distribución normal y cumplían con los requisitos de homogeneidad de la varianza, se realizó un análisis de varianza entre los datos de peso final de los diferentes tratamientos (0, 2 y 4 % de inclusión de PHB en la ración).

Al análisis de varianza de los pesos, se demuestra una diferencia significativa entre los grupos ($F= 3,87_{2,94}$ con p = 0,024). Realizado el test de rangos múltiples el grupo diferente fue el control (0 % de PHB) con un 95% de nivel de confianza, lo que se expresa en el siguiente gráfico.

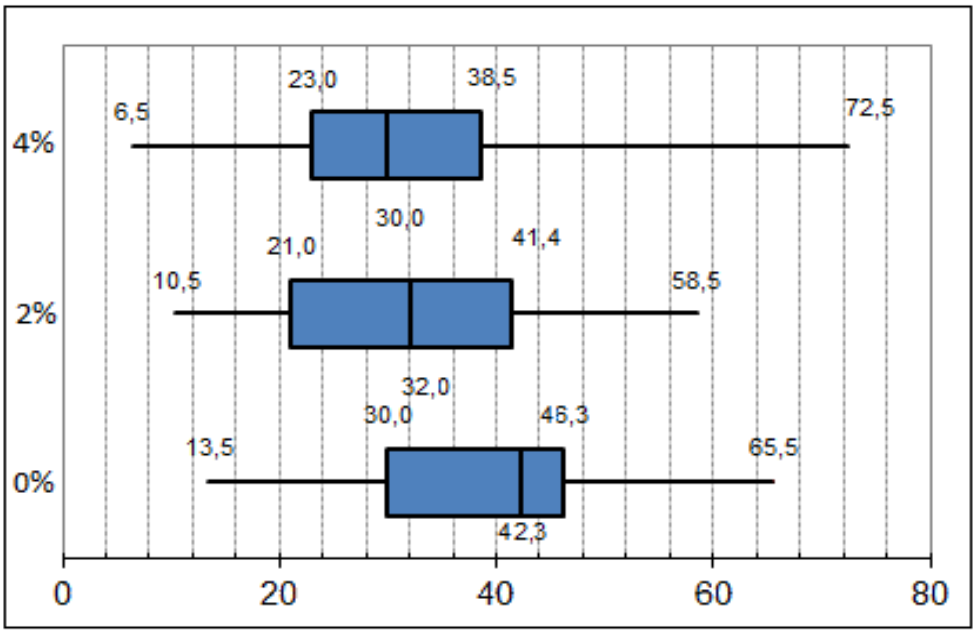


Figura 8. Gráfica de cajas y bigotes del peso final de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

7.1.c- Análisis de los largos finales de los peces

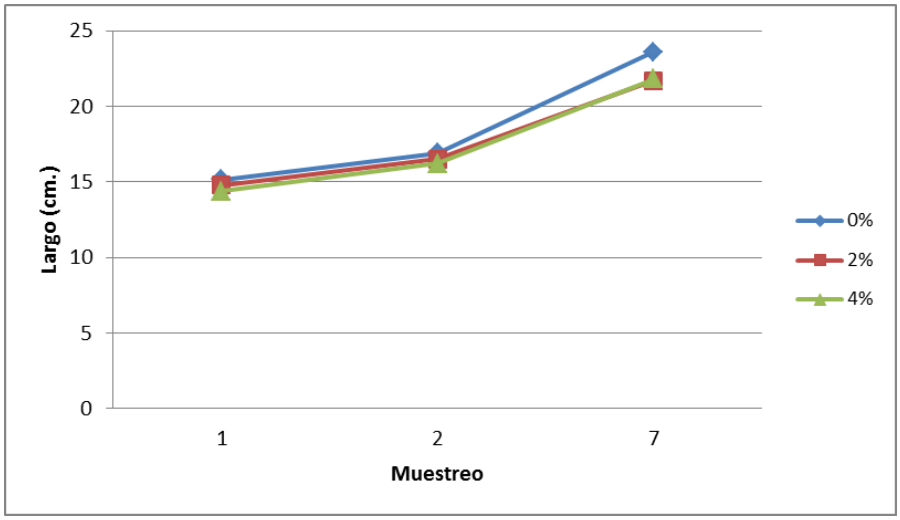


Figura 9. Crecimiento en largo de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

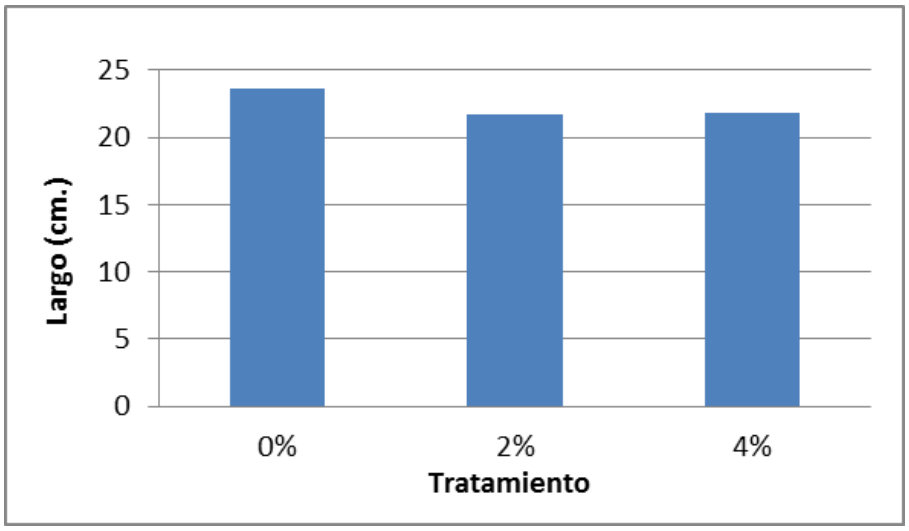


Figura 10. Largo promedio final de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

Al establecer que los largos de los peces en los diferentes tratamientos tenían una distribución normal y cumplían con los requisitos de homogeneidad de la varianza,

se realizó un análisis de varianza para los largos finales de los diferentes tratamientos (0, 2 y 4 % de inclusión de PHB en la ración).

Al análisis de varianza de los largos, se demuestra una diferencia significativa entre los grupos ($F= 4,07_{2,94}$ con $p = 0,020$). Realizado el test de rangos múltiples el grupo diferente fue el control (0 % de PHB) con un 95% de nivel de confianza, lo que se expresa en el siguiente gráfico.

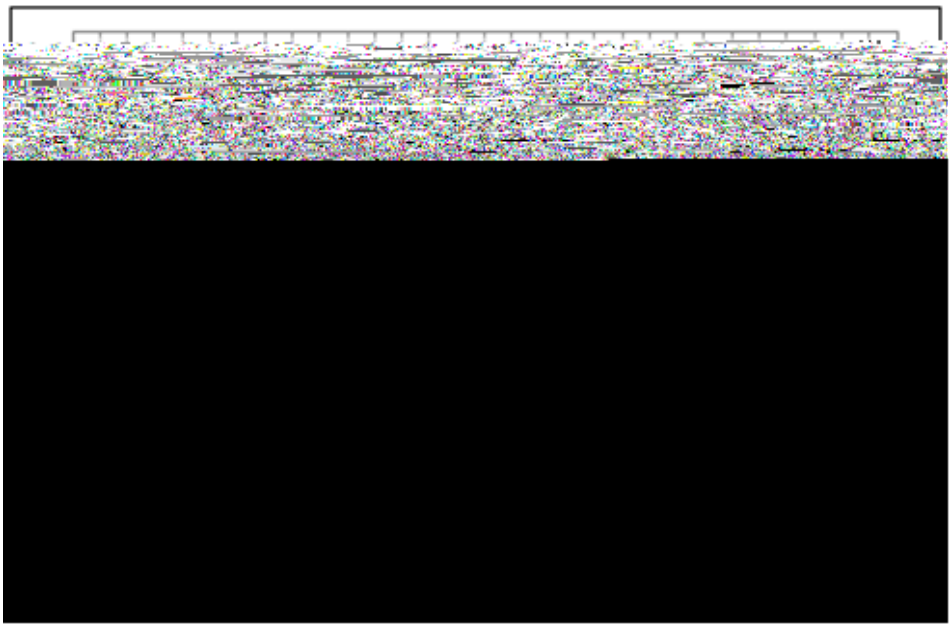


Figura 11. Gráfica de cajas y bigotes del largo final de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

Para más información, los datos completos de pesos y largos iniciales se pueden consultar en el anexo II, y los datos finales en el anexo III.

7.1.d- Análisis de los índices de conversión

La eficiencia con que los diferentes grupos de peces convirtieron el alimento en peso animal se evaluó mediante el índice de conversión que se muestra en la siguiente gráfica. Al análisis de Chi^2 para testar la hipótesis de tasas iguales, se encontró que no hay diferencias significativas entre los tres índices de conversión (Chi^2 = 3,02 con p = 0,2204), con un 95 % de confianza. Igualmente el grupo que presentó mejor índice de conversión fue el control.

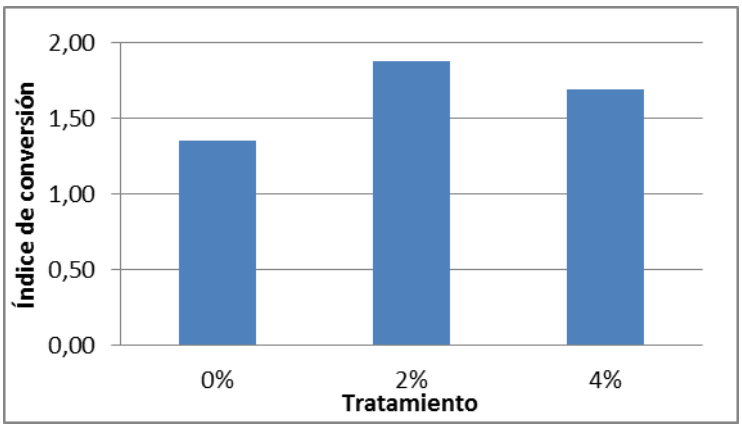


Figura 12. Índice de conversión de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

7.1.e- Análisis de la sobrevivencia

Al análisis de Chi^2 para proporciones, los grupos no son diferentes entre sí (Chi^2 =0,71 con p=0,7003), con un 95 % de confianza.

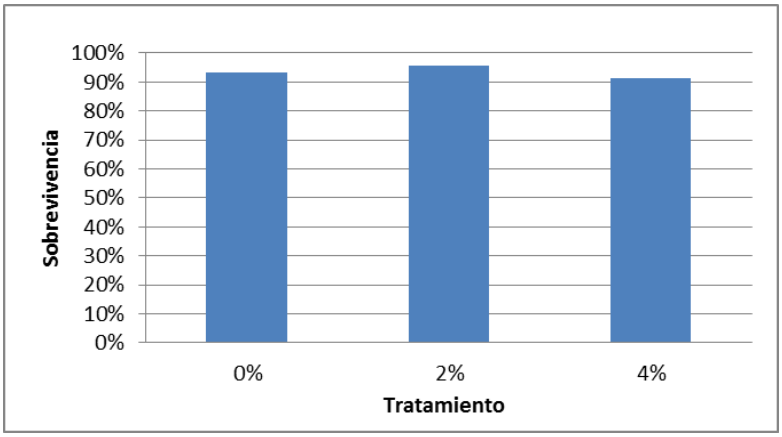


Figura13. Sobrevivencia de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

Cabe notar que aunque en los grupos 5 y 6 se produjeron muertes importantes o totales, estas no se tomaron en consideración para el cálculo de la sobrevivencia por tratarse de un error de manejo, en este caso una intoxicación por cloro. En el grupo 6 como las muertes fueron cercanas al inicio de la experiencia, se mantuvieron los ejemplares sobrevivientes y los muertos se reemplazaron por otros peces de la misma generación que se habían dejado como reserva, para mantener la biomasa por tanque y no inducir errores. En cuanto al grupo 5 dichas muertes no afectaron el cálculo de la sobrevivencia por ocurrir el día previo a finalizar la experiencia.

7.2- Hematología

7.2.a- Resultados generales

Se realizaron frotis de sangre de una muestra de 10 peces de cada tratamiento con PHB y de 5 peces del grupo control. Se realizó el conteo diferencial de leucocitos y plaquetas para cada pez. Los valores de porcentajes de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos se muestra en el cuadro 6 y en la figura 14, la distribución de los valores se expresa en las figuras 15,16, y 17.

Cuadro 6. Porcentaje de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en sangre de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

	Linfocitos	Neutrófilos	Eosinófilos
0%	59,49 (±11,60)^{ab}	37,98 (±10,67)^{ab}	2,54 (±2,52)
2%	67,66 (±7,68)^{a}	29,76 (±7,19)^{a}	2,26 (±2,36)
4%	49,41 (±10,01)^{b}	45,26 (±10,71)^{b}	4,66 (±3,61)

*En cada columna letras distintas designan grupos significativamente diferentes.

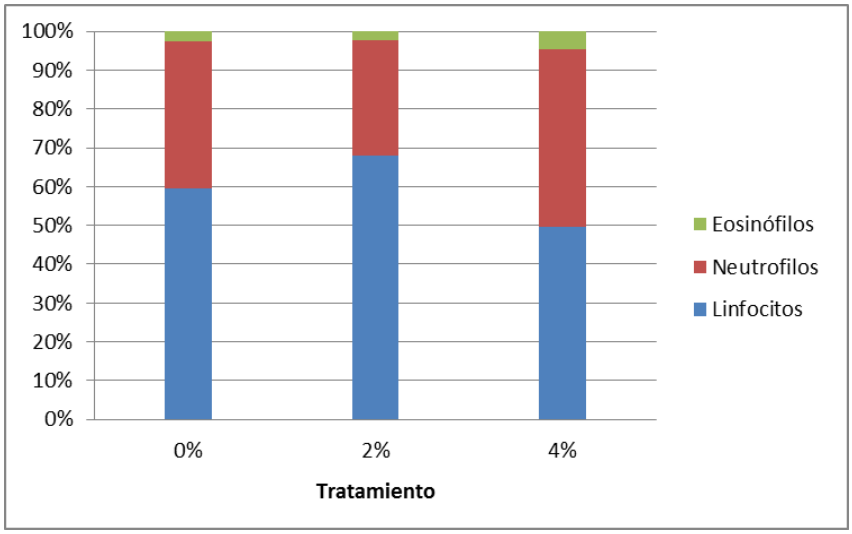


Figura 14. Porcentaje de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en sangre de A. baerii alimentados con 0, 2 y 4 % de PHB en la ración.

Luego de comprobar que los datos del conteo diferencial de células de la serie blanca de los peces en los diferentes tratamientos se ajustaban a una distribución normal y cumplían con los requisitos de homogeneidad de la varianza, se realizó un análisis de la misma para el conteo de linfocitos, neutrófilos, y eosinófilos cada 100 leucocitos, de los diferentes grupos tratados (0, 2 y 4 % de PHB en la ración).

7.2.b- Análisis del conteo de linfocitos

Al análisis de varianza del conteo linfocitario, se demuestra una diferencia significativa entre los grupos ($F= 8,86_{2,21}$ con $p = 0,016$). Realizado el test de rangos múltiples se observó una diferencia entre los grupos con 2 y 4% de inclusión de PHB, no así entre estos y el grupo control (0 % de PHB) con un 95% de nivel de confianza, lo que se expresa en el siguiente gráfico.

Figura 15. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la distribución en el conteo de linfocitos de sangre de A. baerii alimentados con 0, 2, y 4% de inclusión de PHB en la dieta.

7.2.c- Análisis del conteo de neutrófilos

Al análisis de varianza del conteo de neutrófilos, se comprueba una diferencia significativa entre los grupos ($F= 6,51_{2,21}$ con p = 0,0063). Realizado el test de rangos múltiples se observó una diferencia entre los grupos con 2 y 4% de inclusión de PHB, no así entre estos y el grupo control (0 % de PHB) con un 95% de nivel de confianza, lo que se muestra en el gráfico siguiente:

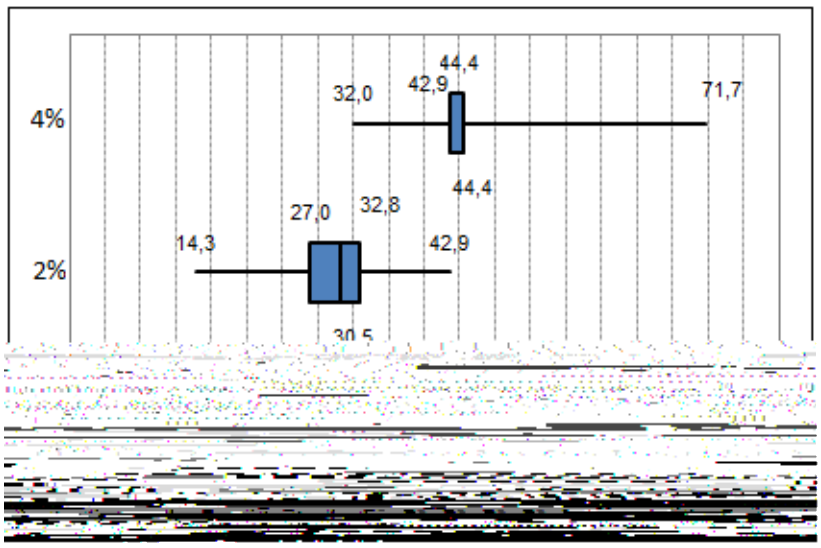


Figura 16. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la distribución en el conteo de neutrófilos de sangre de A. baerii alimentados con 0, 2, y 4% de inclusión de PHB en la dieta.

8- DISCUSIÓN:

El polihidroxi-butirato, aislado por primera vez en 1925 por Lemoigne en el instituto Pasteur de París, es un polímero usado por ciertas bacterias como reserva de carbono y energía. Permaneció sin utilidad aparente hasta que despertó interés empresarial por tener propiedades similares a las de los plásticos, pero presentar la ventaja de ser biodegradable, por lo que se pensó que podría remplazar a los polímeros derivados del petróleo. Esto no fue viable debido al costoso proceso de obtención y la poca cantidad obtenida, por lo que su uso como reemplazo total del polipropileno, polietileno, y otros plásticos no es económicamente rentable hasta que se mejore el proceso de obtención. En los últimos años se sugirió su uso como agente de control microbiano lo que despertó interés en la comunidad científica. Su mecanismo de acción sospechado se da mediante el aporte de ácido butírico que penetra a la célula bacteriana y acidifica el citoplasma lo que interfiere con el metabolismo microbiano.

En la acuicultura se ha estudiado el uso de PHB como prebiótico, ya sea en adicionado en el agua o en la ración.

En nuestro estudio evaluamos el efecto de la inclusión de poli- -hidroxibutirato sobre los varios parámetros productivos en el esturión: crecimiento en largo, ganancia de peso, índice de conversión, sobrevivencia, conteo diferencial de leucocitos, y cantidad de plaquetas cada 100 leucocitos. Partiendo de pesos y largos iniciales similares el grupo control presentó mayores pesos y largos finales con una diferencia estadísticamente significativa, en contradicción con el estudio en esturiones siberianos de Najdegerami y col. (2012) que no encontró diferencias estadísticas en el desempeño entre los grupos, aunque en el grupo con 2% de inclusión la respuesta fue mayor en ganancia de peso y crecimiento en largo. En lo estudiado por De Schryver (2010) en róbalos en lo que respecta a la ganancia de peso, los grupos tratados con 2 y 5% de inclusión presentaron una mayor ganancia de peso demostrada estadísticamente.

En cuanto al índice de conversión no se observó una diferencia significativa a nivel estadístico entre los grupos tratados y el control, al igual que lo observado por Najdegerami y colaboradores (2012), aunque en nuestro estudio el control presentó una mejor eficiencia en la conversión. Sin embargo De Schryver y colaboradores (2010) encontraron un mejor índice de conversión en los grupos tratados 2% y 5%, estadísticamente demostrable.

En el parámetro sobrevivencia nuestro estudio no obtuvo diferencias significativas, al igual que lo estudiado De Schryver y col. (2010), pero el grupo 2% presentó un mejor desempeño. En discrepancia con esto, en el estudio realizado por Najdegerami y col (2012) en esturiones, que obtuvo una sobrevivencia mayor en los tratamientos con 2 y 5% de inclusión, al igual que lo observado por Defoirdt y col. (2007) en el agua de cultivo de nauplios de Artemia franciscana infectados con

Vibrio campbelli, y The Nhan y col. (2010) en larvas de langostinos de rio alimentados con artemia cultivada con PHB en el medio, que presentaron una sobrevivencia significativamente mayor en los grupos tratados.

Algunas de las posibles explicaciones para el pobre desempeño de los lotes con PHB en la ración son:

Alteración del alimento al agregar el PHB

Si bien se siguió el protocolo descrito por Najdegerami y col. (2012), durante el desarrollo de la experiencia se observaron varias cosas que podrían indicar problemas técnicos en la forma de adicionar el PHB.

Las propiedades físicas del alimento se ven modificadas por la adición de PHB, ya que al comportarse como un plástico, el polímero flota, lo que ocasiona que la ración se mantenga en la superficie y esto puede interferir con los hábitos alimenticios del esturión, un pez de alimentación bentófaga.

La palatabilidad así como otras propiedades organolépticas pudieron verse modificadas por el solvente orgánico usado en la dilución y adición del polímero

Pudo ocurrir una alteración de la composición nutricional del alimento. Se observó en el proceso de adición del polímero que el fondo del recipiente donde se hizo la mezcla quedaba un sedimento de consistencia oleosa, arrastrado del alimento, que se podría deber a que el solvente arrastró parte del contenido en lípidos de la ración, quedando esta con una composición diferente a la ración control.

También es importante notar el efecto de sustitución, al tener un cierto porcentaje de PHB, el alimento de los grupos tratados tiene una menor cantidad de la ración original.

Podría suceder que el solvente al ser de naturaleza orgánica causara alguna modificación en el valor nutricional, por una alteración de proteínas, vitaminas, lípidos, u algún otro componente. Es sabido que los disolventes orgánicos tienden a desnaturalizar las proteínas (Voet y col., 2006)

Es posible también que el agregado de la solución de PHB y cloroformo a una temperatura elevada a la ración, cause algún daño sobre componentes termolábiles del alimento, como vitaminas y proteínas.

El efecto tanque también debe ser tenido en cuenta. Aunque cada contenedor presenta condiciones similares, en cuanto a volumen de agua, carga animal, y alimentación, cada uno es un ecosistema diferente con variantes en los parámetros fisicoquímicos y biológicos. Cada grupo genera un ambiente propio con distinta microbiota (plancton), y temperatura. Para eliminar en parte este efecto es que se diseñó la experiencia con tres repeticiones por tratamiento. Un hecho que podría haber alterado los ecosistemas con ración con PHB, es la acción del producto en la

flora microbiana del tanque, ya que parte del producto se separó del pellet y quedó en el ecosistema. Puede haber un efecto de inhibición bacteriana así como también que algunos microorganismos lo puedan usar como sustrato energético.

En la parte hematológica de nuestro estudio como se mencionó en los resultados, no hubo diferencias significativas observables en la formula leucocitaria entre los grupos tratados y el control, aunque los tratados fueron estadísticamente diferentes entre sí, en cuanto a linfocitos y neutrófilos. Esta diferencia se pudo haber dado por un aumento de linfocitos y/o una disminución de neutrófilos en el grupo tratado con un porcentaje de inclusión del 2%, o una disminución de linfocitos y/o un aumento de neutrófilos en el tratado con 4% de inclusión. No se puede conocer cuál de estas situaciones se presentó, debido a que el conteo se realizó de forma diferencial, o sea que no se conoce el número de células por unidad de volumen. Esta diferencia puede deberse a cuatro situaciones posibles, linfocitosis, linfopenia, neutrofilia, y neutropenia.

Según lo mencionado anteriormente en la sección de hematología, una linfopenia presente en los peces puede deberse a un factor de estrés asociado a la presencia de PHB en el alimento, como por ejemplo un cambio en el hábito alimenticio, o dicho PHB influir negativamente en la formación de linfocitos.

La linfocitosis se asocia a infecciones bacterianas o víricas, esto relacionado con la adición de PHB podría explicarse como infecciones debido a la modificación de la flora bacteriana intestinal, o como un efecto favorable del PHB en la producción linfocitaria por el organismo.

La neutrofilia se presenta en infecciones agudas, esto en relación al agregado de PHB podría asemejarse a lo ocurrido en la linfocitosis, modificación de la flora bacteriana intestinal o efecto favorable del PHB en la formación de neutrófilos. También podría deberse a lesiones tisulares mecánicas producidas por el PHB a nivel intestinal.

La neutropenia puede ser causada por infecciones bacterianas y víricas, esto puede ser debido al cambio de la flora intestinal. También debe tenerse en cuenta que el PHB podría influir de manera negativa en la formación de neutrófilos por parte del organismo.

9- CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que el uso de PHB como prebiótico en la ración de esturión siberiano no acarrea resultados positivos, por lo menos en lo que respecta a los parámetros peso, largo, sobrevivencia, e índice de conversión, en las condiciones en que se realizó nuestro estudio. Se podría incluso decir que la influencia es detrimental, como se ve en el mayor largo y peso promedio del grupo control respecto a los tratados.

En lo relativo al estudio hematológico no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados y el control.

10-BIBLIOGRAFÍA

1. Acuicultura Punta Negra. Historia. Disponible en: http://www.acuiculturauruguay.com/ . Fecha de consulta: 12 de setiembre de 2013.

2. ANII. Producción de alevines de tilapia en Uruguay. Disponible en: http://www.anii.org.uy/web/proyectos_beneficiarios/producci-n-de-alevines-de-tilapia-en-uruguay . Fecha de consulta: 4 de agosto de 2013.

3. Bio Mar. Composición ración Efico Sigma 841 para esturiones. Disponible en: http://www.biomar.com/Countries/common%20ceu/Datasheets/Datasheets%20West%20Med/Sturgeon/Spanish/SP%20EFICO%20Sigma%20841%20Sturgeon.pdf?epslanguage=es . Fecha de consulta: 29 de agosto de 2014.

4. Black River Caviar. Historia. Disponible en: www.blackrivercaviar.com.uy Fecha de consulta: 4 de agosto de 2013.

5. Bourdeaux, M. (2010) Platelet Structure. En: Weiss, D; Wardrop, J. Schalm´s Veterinary Hematology. 6a. ed. Ames, Ed. Blackwell Publishing Lta. pp. 561 ± 568.

6. Carnevia D (2007). Análisis de las oportunidades de cultivo de especies acuáticas en Uruguay, Montevideo. DINARA ±FAO, 40 p.

7. Chebanov, M; Rosenthal, H; Gessner, J; van Anrooy, R; Doukakis, P; Pourkazemi, M; Williot, P. (2011) Sturgeon hatchery practices and management for release. Guidelines. Roma, Ed. FAO, 110 p.

8. Conroy, D; Conroy, G. (2007) Atlas Básico de las Células Sanguíneas normales y anormales en Tilapias cultivadas, Reino Unido, Ed. Patterson Peddie. 32p.

9. Day, M. (2010) Biology of Lymphocytes and Plasma Cells. En: Weiss, D; Wardrop, J. Schalm´s Veterinary Hematology. 6a. ed. Ames, Ed. Blackwell Publishing. pp. 358 ±366.

10. Defoirdt T, Halet D, Vervaeren H, Boon N, Van de Wiele T, Sorgeloos P, Bossier P, Verstraete W. (2007) The bacterial storagecompound poly- -hydroxibutyrate protects Artemia franciscana from pathogenic Vibrio campbellii. Enviromental Microbiology, 9 (2): 445-452.

11. Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P. (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Current Opinion in Microbiology, 14: 251-258.

12. De Schryver P, Kumar A Singh P, Baruah K, Verstraete W, Boon N, De Boeck G, Bossier P. (2010) Poli- -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass (Dicentrarchus labrax). Applied Microbiology and Biotechnology, 86: 1535-1541.

13. DINARA, Acuicultura. Disponible en: http://www.dinara.gub.uy/web_dinara/index.php?option=com_content&view=category&id=39&Itemid=58 . Fecha de consulta: 6 agosto de 2013.

14. FAO (2012) El estado mundial de la pesca y acuicultura 2012. Roma. Ed. FAO, 235 p.

15. FAO (2014) El estado mundial de la pesca y acuicultura 2014. Roma. Ed. FAO, 253 p.

16. FAO. Programa de información de especies acuáticas, Acipenser baerii. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Acipenser_baerii/es Fecha de consulta: 6 de agosto de 2013.

17. Ganguly S, Chandra Dora K, Sarkar S, Chowdhury S. (2012) Suplementation of prebiotics in fish feed: a review. Fish Biology and Fisheries, 23: 195-199.

18. Hrubec, T; Smith, S. (2010) Hematology Fishes. En: Weiss, D; Wardrop, J. Schalm´s Veterinary Hematology. 6a. ed. Ames, Ed. Blackwell Publishing. pp. 994 ±1003.

19. Koning G, Lemstra P. (1992) Crystalization phenomena in bacterial poly[(r)-3-hydroxybutyrate]:2 Embrittlement and rejuvenation. Polymer, 34: 4089-4094.

20. Ley 19.175 de Pesca Responsable y Fomento de la Acuicultura (2013). Disponible en: http://archivo.presidencia.gub.uy/sci/leyes/2013/12/cons_min_806.pdf Fecha de consulta: 20 de agosto de 2014.

21. Manning T, Gibson G. (2004) Prebiotics. Best Practices & Research Clinical Gastroenterology, 18: 287-298.

22. Nabity, M; Ramaiah, S. (2010) Neutrophil Structure and Biochemistry. En: Weiss, D; Wardrop, J. Schalm´s Veterinary Hematology. 6a. ed. Ames, Ed. Blackwell Publishing, pp. 263 ±267.

23. Najdegerami, E; Tran, T; Defoirdt, T; Marzorati, M; Sorgeloos, P; Boon, N; Bossier, P. (2012) Effects of poly- -hydroxybutyrate (PHB) on Siberian Sturgeon (Acipenser Baerii) fingerlings performance and its gastrointestinal tract microbial community. FEMS Microbial Ecol, 79: 25 ±33.

24. Noga, E. (2000) Fish Leukocyte responses. En: Feldman, B; Zinkl, J; Jain, N. Schalm´s Veterinary Hematology. 5a. ed. Oxford, Ed. Blackwell Publishing, pp. 433 ±439.

25. Nuñez, L; Bouda, J. (2007) Patología Clínica Veterinaria, 2a. ed. México D.F. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, 335p.

26. Palíková, M; Mares, J; Jirásek, J. (1999) Characteristics of Leukocytes and Thrombocytes of selected Sturgeon species from intensive breeding. Acta Vet. Brno, 68: 259 ±264.

27. Pohlman, L. (2010) Basophils, Mast Cells, and Their Disorders. En: Weiss, D; Wardrop, J. Schalm´s Veterinary Hematology. 6a. ed. Ames, Ed. Blackwell Publishing, pp. 290 ±297.

28. Ruiz, G. (2009) Fundamentos de Hematología, 4a. ed. México D.F. Médico Panamericana, 345p.

29. Pyka, J; Kolman, R. (2003) Feeding Intensity and Growth of Siberian Sturgeon Acipenser Baeri Brandt in Pond Cultivation. Archives of Polish Fisheries, 11: 287- 294.

30. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponible en: www.iucnredlist.org Fecha de consulta: 13 de agosto de 2014.

31. The Nhan, D; Wille, M; De Schryver, P; Defoirdt, T; Bossier, P; Sorgeloos, P. (2010) The effect of poly- -hydroxibutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii. Aquaculture, 302: 76-81.

32. Tizard, I. (2002) Inmunología Veterinaria, 6a. ed. México D.F. Mc Graw-Hill Interamericana, 517p.

33. Varela Z (1984) Desarrollo de la acuicultura en Uruguay. En: Informes nacionales sobre el desarrollo de la acuicultura en América Latina FAO Infopesca. Roma, Pedini Fernando Criado. Disponible en: www.fao.org/docrep/005/ad0205/AD020516.htm

34. Voet, D; Voet, J. (2006) Voet-Voet Bioquímica, 3a. ed. México D.F. Editorial Médica Panamericana. 1776 p.

35. Weiss, D; Souza, C. (2010) Monocytes and Macrophages, and Their Disorders. 6a. ed. En: Weiss, D; Wardrop, J. Schalm´s Veterinary Hematology. Ames, Blackwell Publishing. pp. 298 ±306.

36. WWF. Marine problems: Aquaculture. Disponible en: http://wwf.panda.org/about_our_earth/blue_planet/problems/aquaculture/ Fecha de consulta: 27 de agosto de 2014.

37. Young, K; Meadows, R. (2010) Eosinophils and Their Disorders. En: Weiss, D; Wardrop, J. Schalm´s Veterinary Hematology. 6a. ed. Ames, Blackwell Publishing. pp. 281 ±289.

38. Zhou Q, Buentello A, Gatlin III D. (2010) Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (Sciaenops ocellatus). Aquaculture, 309: 253-257.

11-ANEXOS

ANEXO I: Registro diario

Día	Alimentación	Observaciones
28-ago	Sí	Inicio de la administración de prebiótico
29-ago	Sí	
30-ago	Sí	
31-ago	Sí	
01-set	No	
02-set	Sí	
03-set	Sí	
04-set	Sí	
05-set	Sí	
06-set	Sí	
07-set	No	
08-set	No	
09-set	Sí	
10-set	Sí	
11-set	Sí	12 días de alimentación (60 gr. Por grupo)
12-set	Sí	Censo. MUERTE G3
13-set	Sí	
14-set	No	
15-set	No	
16-set	Sí	
17-set	No	
18-set	Sí	Reajuste de la alimentación según biomasa (3%)
19-set	Sí	
20-set	Sí	
21-set	No	
22-set	No	
23-set	Sí	
24-set	No	
25-set	Sí	
26-set	Sí	
27-set	Sí	
28-set	Sí	MUERTE G5 Y 8
29-set	No	
30-set	Sí	
01-oct	No	Ajuste de ración según biomasa, rotación de tanques
02-oct	Sí	
03-oct	Sí	
04-oct	Sí	12 muertes en G6, reemplazo para mantener biomasa*
05-oct	Sí	
06-oct	No	
07-oct	Sí	Muerte en grupo 1 Y G3
08-oct	Sí	
09-oct	Sí	
10-oct	Sí	
11-oct	Sí	
12-oct	No	
13-oct	No	
14-oct	Sí	
15-oct	Sí	Aumento de la alimentación (4% de la biomasa de 1/8)
16-oct	Sí	
17-oct	Sí	
18-oct	Sí	
19-oct	No	
20-oct	No	
21-oct	Sí	
22-oct	No	
23-oct	Sí	
24-oct	No	
25-oct	Sí	Reajuste de la alimentación según biomasa (4%)
26-oct	No	
27-oct	No	
28-oct	Sí	
29-oct	Sí	
30-oct	Sí	
31-oct	Sí	
01-nov	Sí	
02-nov	No	
03-nov	No	
04-nov	Sí	
05-nov	No	Cambio parcial de agua. Muerte en G 8 y 3 Pesada
06-nov	Sí	
07-nov	no	
08-nov	Sí	
09-nov	No	
10-nov	No	
11-nov	Sí	Ajuste de ración según biomasa (5% del peso de 5/11)
12-nov	Sí	Muerte en G 4
13-nov	Sí	
14-nov	Sí	
15-nov	Sí	
16-nov	No	
17-nov	No	
18-nov	Sí	Muerte total en G5**
19-nov	No	Pesaje final

*Debido a tratarse de una intoxicación por cloro, dichas muertes no se tomaron en cuenta para el cálculo de la sobrevivencia por ser factores externos.

ANEXO II: Pesos y largos iniciales

GRUPO 1		4%
Nº	Longitud (cm)	Peso (gr)
1	15,0	11,1
2	14,1	11,1
3	12,7	7,4
4	15,2	14,1

GRUPO 2		4%
Nº	Longitud (cm)	Peso (gr)
1	15,0	10,6
2	14,5	10,4
3	12,5	9,6
4	14,5	10,0

GRUPO 3		4%
Nº	Longitud (cm)	Peso (gr)
1	15,3	11,0
2	14,0	9,5
3	12,0	7,0
4	14,0	11,5

ANEXO III: Pesos y largos finales

GRUPO 1		4%
Nº	Longitud (cm)	Peso (gr)
[redacted]		

GRUPO 2		4%
Nº	Longitud (cm)	Peso (gr)
[redacted]		

GRUPO 3		4%
Nº	Longitud (cm)	Peso (gr)
[redacted]		

[redacted]		

[redacted]		

[redacted]		

[redacted]		

* Para largo y peso solo se tomaron en cuenta estos individuos, el resto son ejemplares agregados para mantener la biomasa, alterada debido a un accidente.

ANEXO IV: Resultados del conteo diferencial de la serie blanca

	Control		
	linfocitos	neutrófilos	eosinófilos
	65,82	34,19	0
	76,15	22,94	0,92
	49,55	46,85	3,6
	48,65	49,55	1,8
	57,27	36,36	6,36
promedio	59,486	37,977	2,536

	PHB 2%		
	linfocitos	neutrófilos	eosinófilos
	66,21	28,38	5,4
	60	33,33	6,67
	66,08	33,04	0,87
	66,4	32	1,6
	72,03	26,27	1,69
	60,02	26,55	4,42
	69	30	1
	57,14	42,86	0
	85,71	14,28	0
	65,04	30,97	0,97
promedio	67,66	29,76	2,26

	PHB 4%		
	linfocitos	neutrófilos	eosinófilos
	47,58	44,35	8,06
	53,51	44,74	1,75
	42,24	44,4	10,34
	59,48	39,65	0,86
	49,17	43,33	7,5
	52,24	42,86	1,9
	52,17	44,35	3,48
	60,8	32	7,2
	27,43	71,68	0,88
promedio	49,4	45,26	4,66