

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN ACUICULTURA**



**“INFLUENCIA DEL SISTEMA BIOFLOC SOBRE LA  
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y LOS PARÁMETROS  
PRODUCTIVOS DE JUVENILES DE PAICHE (*Arapaima gigas*)”**

**Presentada por:**

**ROCIO MILAGROS MARAVI AGUILAR**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN ACUICULTURA**

**Lima - Perú**

**2017**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de investigación a mi familia por brindarme su apoyo y motivación desmedida, en especial a mi abuelita Julia quien fue y será siempre un ejemplo a seguir.

Asimismo, a mi persona favorita César A. quien fue mi principal soporte durante este arduo pero muy gratificante trabajo de investigación.

Y como olvidarme de mis dos queridos gatos Kakashy y Niko por darme su compañía nocturna y siempre estar vigilantes a mis movimientos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un sincero agradecimiento a todos mis profesores de la maestría en acuicultura, por los conocimientos impartidos y por siempre estar dispuestos a absolver mis interrogantes, sobre todo agradecer a mi patrocinadora Jessie Vargas que por su guía y conocimientos se hizo posible desarrollar el presente trabajo.

También un agradecimiento muy especial a la profesora Giovanna Sotil por brindarme apoyo y acceso a las instalaciones del laboratorio de Genética del IMARPE (Instituto del Mar del Perú), lo cual fue clave para poder realizar la presente investigación.

Y como olvidar agradecer a mis colegas y compañeros del laboratorio de Acuicultura: César A., José Á., Leonel A., Andrea M., Jairo Z. y Raquel B., por su interés y dedicación.

Finalmente un profundo agradecimiento a CONCYTEC (Consejo nacional de Ciencia y tecnología) por el apoyo económico recibido como participante del Proyecto de la Maestría de Acuicultura (Convenio de Gestión N°017-2013-FONDECYT)

# ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1	Descripción de la especie.....	3
2.1.1	Ubicación taxonómica.....	3
2.1.2	Características biológicas de la especie.....	4
2.1.3	Requerimientos nutricionales y desempeño productivo de <i>A. gigas</i> .....	5
2.2	Cultivo en sistemas de biofloc (SBF).....	6
2.2.1	Generalidades de la tecnología biofloc.....	6
2.2.2	Manejo del cultivo biofloc.....	7
2.2.3	Compuestos bioactivos en el sistema biofloc (SBF).....	9
2.3	Actividad enzimática digestiva en peces.....	11
2.3.1	Definición general de la actividad enzimática digestiva .....	11
2.3.2	Acción de los diferentes tipos de enzimas digestivas.....	12
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1	Lugar y periodo de ejecución de la investigación.....	15
3.2	Etapa pre –experimental.....	15
3.2.1	Material Biológico.....	15
3.2.2	Formulación y elaboración del alimento.....	15
3.2.3	Acondicionamiento del sistema Biofloc.....	16
3.3	Hipótesis planteadas.....	17
3.4	Etapa experimental.....	17
3.4.1	Diseño experimental.....	17

3.4.2	Manejo experimental .....	19
3.5	Procedimientos y técnicas de recolección de datos. ....	20
3.5.1	Calidad de agua. ....	20
3.5.2	Colecta de muestras para los ensayos enzimáticos.....	22
3.5.3	Métodos de análisis de las actividades enzimáticas .....	23
3.5.4	Cálculo de las actividades enzimáticas.....	26
3.6	Parámetros productivos:.....	28
a .	Ganancia de peso (GP) .....	28
b.	Tasa de crecimiento específico (TCE) .....	28
c.	Factor de conversión alimentaria (FCA) .....	28
d.	Sobrevivencia (S) .....	29
3.7	Colección del biofloc y carcasa de los paiches para el análisis proximal.....	29
3.8	Procedimiento de análisis de datos. ....	29
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
4.1	Calidad de agua.....	31
4.2	Composición químico proximal del biofloc y carcasa de <i>Arapaima gigas</i> .....	39
4.3	Parámetros enzimáticos .....	42
4.3.1	Proteína soluble del tracto digestivo de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> .....	42
4.3.2	Actividad enzimática digestiva de los juveniles de <i>Arapaima gigas</i> . ....	45
4.3.3	Actividad enzimática extracelular o exógena del agua de cultivo.....	53
4.4	Parámetros de producción.....	56
4.4.1	Ganancia de peso .....	57
4.4.2	Factor de conversión alimenticia (FCA) .....	59

4.4.3	Tasa de crecimiento específico (TCE).....	61
4.4.4	Supervivencia (S) y densidad (Kg/m <sup>3</sup> ) .....	62
V.	CONCLUSIONES .....	64
VI.	RECOMENDACIONES .....	65
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
VIII.	ANEXOS .....	77

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Requerimientos nutricionales para juveniles de <i>Arapaima gigas</i> . ....	6
Tabla 2: Parámetros de calidad de agua a considerar en el sistema biofloc (SBF). ....	8
Tabla 3: Formulación y análisis químico proximal del alimento empleado durante el periodo experimental. ....	16
Tabla 4: Esquema del diseño experimental. ....	18
Tabla 5: Valores promedio de los parámetros de calidad de agua en el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). ....	31
Tabla 6: Composición químico proximal (%) del biofloc y de la carcasa de los juveniles de <i>Arapaima gigas</i> . ....	40
Tabla 7: Valores de la proteína soluble (mg/ml) de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> al inicio, mitad y final del experimento. ....	42
Tabla 8: Valores de la actividad enzimática digestiva de los juveniles de <i>Arapaima gigas</i> al inicio, mitad y final del experimento. ....	45
Tabla 9: Actividad enzimática extracelular del agua de cultivo en el SBF y CRA luego de 45 días experimentales. ....	53
Tabla 10: Valores de los parámetros productivos en juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , en el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA), por un período de 45 días. ....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de las unidades experimentales .....	18
Figura 2: Concentraciones de nitrógeno inorgánico en el periodo experimental. (A) nitrógeno amoniacal total (NAT); (B) nitrógeno en nitritos (N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ); (C) nitrógeno en nitratos (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). Media ± desviación estándar. ....	34
Figura 3: Cambios de las concentraciones de alcalinidad (mgCaCO <sub>3</sub> /L) a lo largo del periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).36	
Figura 4: Variación del pH durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). ....	37
Figura 5: Variación de la temperatura durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). ....	38
Figura 6: Variación de las concentraciones de oxígeno disuelto (mg/L) a lo largo del periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).38	
Figura 7: Proteína soluble (mg/ml) en el extracto enzimático del tracto digestivo de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). ....	43
Figura 8: Relación entre la proteína soluble y peso de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> al inicio, mitad y final del experimento: (A) sistema con biofloc SBF y (B) sistema con recambio de agua CRA. ....	44
Figura 9: Actividad específica de proteasas totales (U/mg de proteína) en el tracto digestivo de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).....	46
Figura 10: Actividad específica de Tripsina en el tracto digestivo de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). ....	48
Figura 11: Actividad específica de Quimiotripsina (mU/mg proteína soluble) en el tracto digestivo de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA) .....	49

Figura 12: Actividad específica de Lipasas en el tracto digestivo de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). .....	50
Figura 13: Actividad específica de Amilasas en el tracto digestivo de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). .....	51
Figura 14: Crecimiento en peso (g) de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).58	
Figura 15: Factor de conversión alimenticia (FCA) en juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA) .....	60
Figura 16: Tasa de crecimiento específica (TCE %/día) en juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , durante el periodo experimental. En el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).....	61

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Cálculo de la cantidad de Carbono necesario para la inmovilización del Nitrógeno. Tomado de Crab <i>et al.</i> (2012).....	77
Anexo 2: Cultivo en sistema de tecnología biofloc, que se empleó de inóculo para la etapa experimental en sistema SBF. ....	78
Anexo 3: Unidades experimentales que se emplearon para el desarrollo del experimento. ....	78
Anexo 4: Instrumentos para la medición de parámetros y colecta de datos.....	79
Anexo 5: Medición de los parámetros de calidad de agua. ....	80
Anexo 6: Biometría de un alevín de <i>Arapaima gigas</i> . ....	83
Anexo 7: Obtención del tracto digestivo de los juveniles de <i>Arapaima gigas</i> .....	84
Anexo 8: Contenido del tracto digestivo de juveniles de <i>Arapaima gigas</i> , en SBF.....	85
Anexo 9: Determinación de la proteína soluble, método Bradford. ....	85
Anexo 10: Manual del kit comercial de la marca SIGMA-ALDRICH para ensayos de actividad enzimática de amilasas.....	86
Anexo 11: Datos de calidad de agua para los tratamientos CRA y SBF.....	87
Anexo 12: Datos de los parámetros productivos para los tratamientos CRA y SBF ....	98
Anexo 13: Datos de la actividad enzimática digestiva de <i>Arapaima gigas</i> para los tratamientos CRA y SBF.....	102
Anexo 14: Análisis estadístico de los datos de calidad de agua.....	122
Anexo 15: Análisis estadístico de los parámetros productivos de SBF y CRA. ....	125
Anexo 16: Análisis estadístico de la actividad enzimática digestiva de SBF y CRA. .	127

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto del biofloc sobre la actividad enzimática digestiva y los parámetros productivos de juveniles de *Arapaima gigas*, se realizó un experimento con un diseño de bloques completos al azar durante 45 días. Se aplicó dos tratamientos: sistema con biofloc (SBF) con relación C: N de 15:1, utilizándose azúcar rubia como fuente de carbono (53,36 % C) y un sistema control sin biofloc con recambio diario de agua (CRA). Un total de 54 juveniles de *A. gigas* fueron distribuidos en 6 tanques de 300L cada uno (biomasa inicial de 6kg/m<sup>3</sup>) correspondientes a tres bloques BI (161,99±14,62 g), BII (121,09±6,90 g) y BIII (99,43±10,81 g). Los peces recibieron un alimento (46,35% de proteína) a una tasa de alimentación del 3% distribuida seis veces al día. Los valores de nitrógeno amoniacal total (NAT) fueron de 2,019 y 1,371 mg/L para SBF y CRA respectivamente, y los valores de nitrógeno en nitritos (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nunca excedieron 1,82 mg/L para SBF y 0,87 mg/L para CRA. Los parámetros productivos no presentaron diferencias entre tratamientos (p>0,05). Sin embargo los días 15 y 45 del experimento, los valores de tasa de crecimiento específico (TCE) presentaron diferencias significativas (p<0,05) a favor del SBF con valores de 3,3 y 1,2 %/día respecto al CRA con 3,1 y 1,0 %/día respectivamente. Mientras que los valores de factor de conversión alimenticia (FCA) para el día 45 fueron de 2,6 para SBF y 3 para CRA. En cuanto a los parámetros enzimáticos digestivos, los juveniles de *A. gigas* del tratamiento, SBF presentaron valores significativamente mayores (<0,05) de actividad de amilasas y lipasas. Los resultados sugieren un aporte enzimático del biofloc y que es posible el cultivo de juveniles de *A. gigas* en SBF ya que no hubo alteraciones en cuanto al desempeño productivo.

Palabras Clave: *Arapaima gigas*, tecnología de biofloc (SBF), Crecimiento, Actividad enzimática digestiva.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of biofloc over digestive enzyme activity and growth parameters of *Arapaima gigas* juveniles. Randomized complete block design was performed in a period of 45 days with two treatments: a zero water exchange system or biofloc technology (BFT) with a C: N ratio of 15:1, brown sugar was used as a carbon source (53.36% C). The second was the control treatment with water exchange system (WES). A total of 54 *A. gigas* juveniles were distributed into 6 tanks of 300 L each (Initial biomass of 6 kg / m<sup>3</sup>) in three blocks: BI (161.99 ± 14.62 g), BII (121.09 ± 6.90 g) and BIII (99.43 ± 10.81 g). Fish were fed six times daily at 3% of their body weight with a 46.35% protein diet. Total ammonia nitrogen (TAN) values were 2.019 and 1.371 mg/L for BFT and WES, respectively, and the nitrite nitrogen (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) values never exceeded 1.82 for BFT and 0.87 mg/L for WES. Growth parameters did not differ among treatments (p > 0.05), However, on the experiment days 15 and 45 specific growth rate (SGR) on BFT treatment showed better performance (p < 0.05) with values of 3.3 and 1.2%/day compared to 3.1 and 1.0%/day in WES treatment. At the end of the experiment feed conversion ratio (FCR) was 2.6 for BFT and 3 for WES. Respect digestive enzyme parameters, *A. gigas* juveniles from BFT treatment showed significant (p < 0.05) increment of amilases and lipases activity in the gut. The results suggest an enzymatic contribution of biofloc on *A. gigas* juveniles and is possible to rear them in BFT since there were no differences in terms of growth performance.

Keywords: *Arapaima gigas*, biofloc technology (BFT), growth, digestive enzyme activity.

## I. INTRODUCCIÓN

El paiche, *Arapaima gigas*, goza de renombre internacional y tiene gran potencial para conquistar los mercados del mundo. Las principales dificultades que se presenta en el cultivo de esta especie son: la reproducción, mortalidad inicial, nutrición y diferenciación sexual. Las fases iniciales, constituyen etapas críticas en la producción del paiche. Se ha observado que la elevada mortalidad se debe primordialmente a deficiencias en la disponibilidad y/o calidad de alimento (Franco y Peláez, 2007; Alcántara *et al.* 2006). También se presenta una gran mortalidad debido a las infecciones parasitarias en los criaderos debido al difícil manejo de estanques de gran tamaño (Delgado *et al.*, 2013). Otro problema en esta etapa son las bajas densidades por unidad de volumen lo cual resulta adverso económicamente.

El traslado hacia ambientes cerrados constituye una forma de manejo, donde las condiciones de cultivo pueden ser mejor controladas, por tanto, con mayores posibilidades para disminuir la mortalidad (Guerra, 2002). En esta fase de cultivo, las dietas suministradas a los peces carnívoros contienen alta concentración de proteínas de origen animal, de alto costo y origina que los peces excreten altos niveles de fósforo y nitrógeno, lo que contribuye a la eutrofización de las aguas minimizando la calidad del agua (Read y Fernandes, 2003). La eutrofización por descargas de nutrientes, componentes orgánicos e inorgánicos (amonio, fósforo, materia orgánica, carbono orgánico disuelto y sólidos suspendidos), son los responsables de la polución, (Martínez *et al.*, 2011).

Durante los últimos años un tipo de sistema de cultivo con cero recambios de agua, ha sido ampliamente estudiado y aplicado en la acuicultura. Se trata del sistema biofloc (SBF), cuyo principio se basa en dar las condiciones de dominancia a una comunidad bacteriana heterótrofa, manejando una relación C/N en el agua, para que así estos microorganismos puedan reciclar los residuos de los alimentos, materia orgánica y compuestos nitrogenados tóxicos como el amonio y nitritos para transformarlos en biomasa bacteriana, anulando así los recambios de agua, asimismo se tendría un mejor control del ingreso de patógenos a los

cultivos, garantizando así la sostenibilidad ambiental y económica de la actividad acuícola (Avnimelech, 2009). Se han cultivado varias especies bajo el sistema biofloc encontrándose un mejor crecimiento lo que podría deberse a la mayor retención de la proteína debido a su mejor aprovechamiento. Cabe señalar que los bioflóculos o los microorganismos adheridos podrían ejercer un efecto positivo en la actividad de las enzimas digestivas de todas estas especies cultivadas, lo que conllevaría a una mejor digestión del alimento ingerido (Moss *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009 mencionados por Xu *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2012a).

En un análisis enzimático de los bioflóculos Xu *et al.* (2012a) encontraron que éstos exhibieron acción de proteasas y amilasas, lo cual indicaría que los microorganismos residentes en los bioflóculos producirían estas enzimas, las que podrían ser liberadas en el tracto digestivo del organismo en cultivo. A medida que estas enzimas ayudasen en la hidrólisis de proteínas, hidratos de carbono y otros ingredientes nutricionales en unidades más pequeñas, los biofloc presumiblemente estarían facilitando la digestibilidad y la absorción del alimento. Si se demuestra que la presencia de bioflóculos puede estimular la producción de enzimas digestivas o aumentar la actividad enzimática, se podría optimizar la asimilación de nutrientes, en especial el de la proteína que es el componente más caro dentro de la ración.

Por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo fue determinar el efecto del sistema biofloc (SBF) sobre la actividad enzimática digestiva y el comportamiento productivo de juveniles de *Arapaima gigas*. Siendo los objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad enzimática digestiva de proteasas (tripsina y quimiotripsina), lipasas y amilasas en los juveniles de *A. gigas*.
2. Evaluar la actividad enzimática extracelular de proteasas (tripsina y quimiotripsina), lipasas y amilasas en el sistema biofloc (SBF).
3. Evaluar los parámetros productivos y sobrevivencia en juveniles de *A. gigas* cultivados bajo el sistema biofloc (SBF).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Descripción de la especie.

#### 2.1.1 Ubicación taxonómica.

El paiche (*Arapaima gigas*, Cuvier, 1829), conocido en Brasil como “pirarucú”, en Colombia como “warapaima”, y en las Guyanas como “de-chi”, es una especie nativa de la cuenca amazónica. Es considerado el pez de escamas más grande de agua dulce, existiendo ejemplares que sobrepasan los 200 kg de peso y alcanzan hasta 3 m de longitud. Es un recurso pesquero tradicional y de gran importancia económica debido a la calidad y cantidad de su carne, científicamente es de gran interés por ser una especie primitiva única en su género (Rebaza *et al.*, 1999).

Es un pez perteneciente al superorden Osteoglossomorpha que comprende seis familias y 206 especies, las cuales han existido desde el periodo cretáceo, hace 65 a 136 millones de años, y se cree que descendieron de los peces óseos primitivos. Siguiendo el sistema taxonómico adoptado por Berger (1972) se ubica en la siguiente forma:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Osteoglossiformes

Familia: Osteoglossidae

Género: *Arapaima*

Especie: *Arapaima gigas*

Nombre común: Paiche

### 2.1.2 Características biológicas de la especie

El *Arapaima gigas* habita en ríos de poca corriente, particularmente de aguas negras. Los lugares preferidos por esta especie son las aguas de tipo eutrófico conocidos como cochas. Tolerancia alta concentración de sedimentos y bajas concentraciones de oxígeno disuelto. La temperatura en los ambientes naturales en donde se encuentra varía entre 25°C y 32°C, mientras que los alevines al ser más susceptibles al estrés térmico deben mantenerse en un rango de 26°C a 29°C. El pH recomendado para el manejo del paiche debe estar entre 6,5 y 8 unidades y el oxígeno disuelto recomendable para los primeros estadios debe ser superior a 4mg/L. Para estadios sucesivos este rango puede mantenerse entre 3 y 5 mg/L (Rebaza *et al.*, 1999).

La tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno se debe a su anatomía del aparato respiratorio el que presenta un sistema branquial con un grado relativo de atrofia el cual es insuficiente a la hora de abastecer de oxígeno a la gran masa corporal. Esta deficiencia es compensada por la presencia de una vejiga natatoria con numerosas trabéculas, que asemeja a un pulmón y funciona como órgano respiratorio principal. Debido a esto necesitan salir a tomar aire atmosférico.

La frecuencia con la que salen a captar el aire atmosférico va disminuyendo según la edad del individuo, teniéndose que un adulto sale a tomar aire cada 15 minutos y los alevines entre ocho a diez centímetros de longitud cada minuto aproximadamente (Guerra, 2002). Presentan una boca de posición superior, grande y oblicua, provista de varios dientes pequeños e iguales entre sí, una lengua bien desarrollada con un hueso interno achatado y ligeramente arqueado llamado hioides recubierto por pequeños conos esmaltados muy resistentes. La boca presenta lateralmente placas óseas las cuales funcionan como verdaderos dientes, con los que detiene y mata a la presa antes de la deglución. El tubo digestivo que presentan es corto como la mayoría de peces carnívoros, presentado ciegos pilóricos en pequeño número (Rebaza *et al.*, 1999).

Debido a las características que presenta el paiche de resistir altas concentraciones de amonio y la tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno (Cavero *et al.*, 2004), el cultivo del paiche, es capaz de albergar elevadas densidades del cultivo, en comparación a otros organismos acuáticos (Oliveira *et al.*, 2012). Incluso se ha llegado a obtener un consumo más eficiente

de la ración y disminuir la conversión alimenticia aparente, a medida que se va incrementando la densidad (Cavero *et al.*, 2003). Esto hace del paiche una especie potencial para intensificar su cultivo en sistema biofloc.

Según Chacón (2007) se considera la fase de alevinos desde los quince días (4-5 cm) hasta los tres meses de edad (20 cm) y a partir de los tres meses de edad hasta que alcance la edad reproductiva se les considera juveniles. Es así que Ituassú *et al.* (2005), Akifumi *et al.* (2008) y Del Risco *et al.* (2008) consideran juveniles de paiche a partir de 120,6; 96,8 y 86,8 gramos respectivamente.

### **2.1.3 Requerimientos nutricionales y desempeño productivo de *A. gigas*.**

El gran potencial de la especie para la piscicultura ha atraído el interés de los productores y empresarios. Pero para que el paiche pueda establecerse en el cultivo de peces de forma sostenible es necesario que se produzcan dietas nutricionalmente completas y equilibradas (Cavero *et al.*, 2003). Los requerimientos nutricionales dependen de la edad, la fuente proteica y las condiciones ambientales. Generalmente los requerimientos proteicos en peces piscívoros varían entre 30 a 55% (NRC, 1993). La alta concentración de proteínas hacen que los peces excreten altos niveles de fósforo y nitrógeno, lo que contribuye a la eutrofización de las aguas (Read y Fernandes, 2003).

Las dietas balanceadas para paiche están formuladas en base a insumos tradicionales tales como la harina de pescado, torta de soya, maíz, polvillo de arroz y afrecho de trigo. Estas dietas deben ser suplementadas con pre mezclas de vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para garantizar un crecimiento óptimo (Sandobal, 2007). Chu-Koo *et al.* (2007) reportaron excelentes niveles de crecimiento en juveniles de 500 g, cultivados en jaulas flotantes utilizando dietas extruidas con 40% de proteína, alcanzando pesos finales entre 8 a 12 kg en un año.

Resultados de investigaciones conducidas tanto en Brasil como en Perú indican que raciones balanceadas con 40 a 45 porciento de proteína propician el crecimiento óptimo de juveniles de paiche para la producción de carne (Sandobal *et al.*, 2007). En la Tabla 1 se resumen los valores nutricionales propuestos por diferentes autores para la etapa de alevinos y juveniles.

**Tabla 1: Requerimientos nutricionales para juveniles de *Arapaima gigas*.**

COMPOSICIÓN PROXIMAL		PARÁMETROS PRODUCTIVOS	AUTOR
Proteína bruta (%)	48,6	Peso (g): $120,6 \pm 3,5$	Ituassú <i>et al.</i> (2005)
Fibra bruta (%)	1,2	GP(g): $233,5 \pm 17,7$	
Carbohidratos (%)	29,5	FCA: $2,3 \pm 0,8$	
EB (kcal/100g)	564,5	TCE: $2,4 \pm 0,5$	
Energía: proteína	11,6		
Proteína bruta (%)	43,9	Peso (g): $96,8 \pm 2,3$	Akifumi <i>et al.</i> (2008)
ED (kcal/Kg)	3965		
Energía: proteína	9,0		
Proteína bruta (%)	40	Peso (g): $86,8 \pm 15,73$	Del Risco <i>et al.</i> (2008)
Grasa (%)	7,79	GP(g): 382,1	
Fibra bruta (%)	1,31	FCA: 1,27	
Carbohidratos (%)	31,42	TCE: 0,86	
ED (Mcal/100g)	3,20		
Proteína bruta (%)	50	Peso (g): 25,70	Padilla <i>et al.</i> (2003)
Extruido comercial		GP(g): 382,1	
		FCA: 3,0	
		TCE: 0,90	
Proteína bruta (%)	40	Peso (g): $1550 \pm 85$	Queiroz (2013)
Extruido comercial		GP(g): $5250 \pm 155$	
		FCA: $2,82 \pm 0,09$	
		TCE: 0,90	
Proteína bruta (%)	40	Peso inicial (g): 133	Pereira-Filho <i>et al.</i>
Extruido comercial		Peso final (Kg): 7	
		FCA: 1,5	

GP, ganancia de peso; TCE, tasa de crecimiento específico; FCA, factor de conversión alimentaria; ED, energía digestible; EB, energía bruta.

## 2.2 Cultivo en sistemas de biofloc (SBF).

### 2.2.1 Generalidades de la tecnología biofloc.

En todo sistema de producción acuícola se producen grandes desperdicios constituidos por productos de excreción, alimento no consumido, heces, material sólido y material soluble como fósforo y nitrógeno, lo cual se acrecienta con el aumento de la biomasa que demanda más alimento. El nitrógeno puede estar presente en los ambientes acuáticos en diferentes formas, siendo el amonio no ionizado (NH<sub>3</sub>) y el nitrito (NO<sub>2</sub>) los más tóxicos para las especies cultivadas y se convierten en un factor limitante para el crecimiento y sobrevivencia, por lo que su transformación a nitrógeno no tóxico es primordial para disminuir los riesgos (Avnimelech, 2009; Ebeling *et al.*, 2006).

Según Ray *et al.* (2010), el sistema biofloc (SBF) o sistema de cero recambio de agua, consiste en el co-cultivo de microorganismos favorables que cumplen una función de reciclaje del carbono y nitrógeno para mantener niveles de concentraciones de amonio a niveles no tóxicos. En la columna de agua se produce una compleja interacción entre la materia orgánica, el sustrato físico y gran variedad de microorganismos como el fitoplancton, las bacterias libres y unidas, agregados de la materia orgánica particulada y diversos microorganismos heterotróficos, tales como rotíferos, ciliados, protozoos flagelados y copépodos. Estos se encuentran unidos por una matriz de mucosidad que es secretada por las mismas bacterias y los microorganismos filamentosos y por atracción electrostática. Esta productividad natural juega un papel importante en el reciclaje de nutrientes, produciendo una fuente de alimento, a la vez manteniendo la calidad del agua. Funcionalmente se define como un complejo en el que ocurren a la vez actividades autotróficas y heterotróficas que requieren aportes exógenos (Ebeling *et al.*, 2006).

El SBF es una forma de producción super-intensiva que pretende un aumento de la biomasa por volumen de agua utilizando cada vez menos agua, siendo el desafío concreto tener un menor costo ambiental. A las cualidades que presenta el SBF se le puede sumar que los bioflóculos incrementan la actividad de varias enzimas implicadas en el crecimiento y que también contienen agentes probióticos (Avnimelech, 2009).

La bioseguridad es una prioridad en la industria acuícola, la tecnología biofloc trae una ventaja adicional al reducir al mínimo el consumo y la emisión de agua, la reducción en la introducción de patógenos y por ende mejora la bioseguridad del cultivo acuícola. La tecnología biofloc permitirá entonces que la acuicultura crezca hacia un enfoque respetuoso con el medio ambiente (Emerenciano *et al.*, 2013).

### **2.2.2 Manejo del cultivo biofloc**

La tecnología SBF se basa en que el microcosmos acuático que se forma en el sistema de cultivo aprovecha el carbono disuelto en el agua en condiciones ricas de nitrógeno, ya que las bacterias fijan carbono como fuente de energía y aprovechan el nitrógeno para la síntesis de proteínas, logrando reciclar los nutrientes. De esta manera se puede contrarrestar la acumulación de compuestos nitrogenados, especialmente amonio y nitritos, en los sistemas de producción (Collazos-lasso y Arias-castellanos, 2015).

El manejo del cultivo biofloc se da a partir de una relación C: N, siendo el N proveniente de la excreción propia de la especie y del alimento no consumido, mientras que el carbono se obtiene por adición externa de carbohidratos (Emerenciano *et al.*, 2013). Esta adición de carbono se calcula tomando en cuenta el contenido proteico de las dietas, las excretas, el alimento consumido, y conociendo el porcentaje de C de la fuente de carbohidratos (Avnimelech, 2009), tal como se muestra en el Anexo 1.

La elección de la fuente de carbono dependerá de su disponibilidad, costo, biodegradabilidad y la eficiencia de asimilación por parte de la bacteria, siendo entre las más utilizadas el acetato, celulosa, dextrosa, glicerol, glucosa, tapioca, sorgo, harina de trigo, melaza y almidón (Emerenciano *et al.*, 2012). Hargreaves (2013) sugiere que el azúcar y la melaza son asimilados más rápidamente por las bacterias, aumentando la producción de biofloc en menos tiempo. También menciona que el azúcar es la mejor fuente de carbono para agregar durante la puesta en marcha del sistema.

En la Tabla 2 se resumen los parámetros de calidad de agua y los rangos que se deben considerar dentro de este sistema.

**Tabla 2: Parámetros de calidad de agua a considerar en el sistema biofloc (SBF).**

Parámetros	Unidades	Rango de Valores	Autor
Temperatura	(°C)	18 -35	Wilen <i>et al.</i> (1999) Krishna y Van Loosdrecht (1999)
Oxígeno disuelto	(mg/L)	> 4 – 5	Avnimelech (1999) Timmons <i>et al.</i> (2002)
pH	-	7 – 9	Avnimelech (2009)
Alcalinidad	(mgCaCO <sub>3</sub> /L)	40- 100	Avnimelech (2009)
Sólidos totales sedimentables	(mg/L)	400 -100	Schveitzer <i>et al.</i> (2013)

En el SBF los microorganismos pueden actuar en diferente grado para remover los compuestos nitrogenados del agua. Por ejemplo: asimilación por algas, oxidación por bacterias quimioautótrofas y asimilación por bacterias heterotróficas (Ray y Lotz, 2014) a las cuales si se les suma otros organismos tales como zooplancton, hongos y nemátodos que presentan gran capacidad reproductiva, se consigue un control casi absoluto de los desechos nitrogenados (Monroy *et al.*, 2013).

El SBF en la práctica consiste en el manejo de las comunidades microbianas para transformar los compuestos nitrogenados lo que se logra según Ebeling *et al.* (2006) de diferentes formas, tales como: (a) la descomposición del amonio para convertirlo en biomasa bacteriana por parte de las bacterias heterotróficas; (b) por las bacterias quimioautótrofas que incluyen la descomposición del amonio ( $\text{NH}_3$ ) en nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3$ ) y (e) por un proceso de desnitrificación en nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ).

### **2.2.3 Compuestos bioactivos en el sistema biofloc (SBF).**

El sistema biofloc ha demostrado que no solo es útil para mantener los niveles de amoníaco por debajo de los niveles tóxicos y mejorar la eficiencia de la utilización de nutrientes de los animales cultivados, sino que también es útil para proporcionar nutrientes adicionales y enzimas digestivas exógenas (Xu *et al.*, 2012 a), el biofloc también puede conducir a un aumento del crecimiento, la supervivencia y el rendimiento reproductivo de los animales cultivados.

Numerosos estudios han indicado que los flóculos microbianos contienen numerosas enzimas extracelulares, tales como proteasas y amilasas, las que pueden actuar como suplemento de enzimas para descomponer las proteínas y los carbohidratos en el intestino de los animales y mejorar el rendimiento del crecimiento (Yu *et al.*, 2007, 2009).

En un estudio en carpa común (*Cyprinus carpio* L.) cultivada en sistema biofloc, Najdegerami *et al.* (2016) encontraron que los flóculos microbianos estimularon la producción y la actividad de las enzimas digestivas, resultando en una mejor digestión de los nutrientes en el intestino, obteniéndose un mejor crecimiento y una mejor utilización del alimento.

Por otro lado, Long *et al.* (2015) encontraron valores significativamente mayores de actividad de amilasas en el intestino de la tilapia *Oreochromis niloticus* cultivada en SBF, que lo atribuye a una actividad relativamente alta de amilasas extracelulares encontradas en los bioflóculos. Así también reportaron un aumento en la actividad de lipasas, que facilitó la digestión y la utilización de los lípidos. Esto fue reflejado en un aumento del contenido de lípidos en la carcasa de las tilapias cultivadas en SBF.

Debido a que las enzimas extracelulares microbianas pueden ayudar a descomponer las proteínas, hidratos de carbono y otros ingredientes nutricionales presentes en las dietas, los bioflóculos presumiblemente podrían facilitar la digestibilidad y absorción del alimento. Por tanto el biofloc puede complementar la nutrición microbiana y contribuir a la mejora de la digestión y al uso del alimento (Luo *et al.*, 2014).

El consumo de los microorganismos asociados a los bioflóculos reduce el factor de conversión alimentaria (FCA). Es así que Azim y Little (2008) en un estudio en tilapia del nilo encontraron un crecimiento 45 por ciento mayor para el grupo de peces cultivados en SBF en comparación al grupo control, que fueron cultivadas en sistema de recirculación de agua, concluyendo que los peces cultivados en SBF utilizaron los bioflóculos como alimento.

Según Xu *et al.* (2012 b) una mejor asimilación de las proteínas por los animales criados en sistema de biofloc SBF está relacionada con el aumento de la actividad de la proteasa digestiva en el tracto intestinal, como resultado de la contribución de enzimas digestivas exógenas por los microorganismos del biofloc y la mayor producción de enzimas digestivas endógenas debido a la estimulación de zimógenos por parte de los bioflóculos.

En un análisis enzimático de los bioflóculos realizado por Xu *et al.* (2012b), estos exhibieron acción de proteasa y amilasas, lo cual indicaría que los microorganismos residentes en los bioflóculos producirían estas enzimas que ayudarían a mejorar la digestibilidad y absorción del alimento.

## **2.3 Actividad enzimática digestiva en peces.**

### **2.3.1 Definición general de la actividad enzimática digestiva**

La acuicultura presenta como objetivo técnico principal maximizar el rendimiento biológico de los organismos producidos, y es la digestión probablemente el proceso fisiológico fundamental que determina el aporte de los principales nutrientes, los que son necesarios para las funciones biológicas vitales. De ello dependen los rendimientos finales a obtener y es por ello que se debe tener en cuenta este proceso biológico siempre que se quiera utilizar una tecnología nueva en una especie.

Una vez que el alimento es ingerido por la especie en cultivo se inicia el proceso de digestión, aquí el aparato digestivo juega un papel importante puesto que sirve de interfase entre el alimento y el organismo animal. En el aparato digestivo se realiza la manipulación inicial, hidrólisis y absorción de los nutrientes, y es con estas funciones en donde las diferentes enzimas cumplen un papel sumamente importante. Las enzimas digestivas se encargan de la degradación de macromoléculas en los primeros compartimientos del tracto digestivo, así como también terminan dicha transformación y colaboran en la absorción de los principales nutrientes de la dieta (Javier y López, 2006). El rompimiento químico del alimento es lo que determina los tipos y la cantidad de nutrientes que estarán disponibles para la asimilación (Le Moullac *et al.*, 1994).

De manera general las enzimas digestivas presentes en los procesos digestivos pueden ser clasificadas de acuerdo a su papel catalítico, en enzimas responsables de la digestión de proteínas, carbohidratos y lípidos. Las enzimas digestivas también pueden ser divididas en enzimas endógenas y exógenas. Las enzimas endógenas son sintetizadas por los propios animales y las enzimas exógenas son sintetizadas por la flora intestinal residente en el tracto digestivo, las cuales se pueden obtener por liberación de microorganismos lisados u obtenidos por los alimentos ingeridos. Como se sabe las enzimas más estables y efectivas son aquellas de origen microbiano y vegetal, ya que éstas no son degradadas y conservan su función durante el paso por el estómago y son activas a un margen amplio de pH (2-8) (Ehren *et al.*, 2009).

### **2.3.2 Acción de los diferentes tipos de enzimas digestivas.**

#### **a) Proteasas**

Dentro de las enzimas que juegan un papel importante en la digestión se tiene a las proteasas, las que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas, por tanto la presencia de proteasas en el tracto digestivo es clave para la digestibilidad y para la eficiente asimilación de las proteínas ingeridas (Picos-García *et al.*, 2000). Las proteasas se clasifican en dos subgrupos: Las exopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína) y las endopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos internos. La digestión de las proteínas comienza usualmente por la segregación de pepsina (en el estómago), siendo completada por la segregación de proteasas alcalinas (en el intestino), tales como la tripsina y la quimiotripsina (Sabapathy y Teo, 1993).

Como endopeptidasas podemos mencionar a las serino proteasas como la tripsina y la quimiotripsina. La tripsina participa en la hidrólisis de enlaces peptídicos cuando la función carbamil es suscrita por la arginina o lisina y la quimiotripsina hidroliza enlaces peptídicos cuando la función carbamil es suscrita por aminoácidos aromáticos como tirosina, fenilalanina o triptófano. La tripsina y la quimiotripsina son las principales enzimas digestivas secretadas en la porción anterior del intestino y son las más estudiadas porque participan en la digestión de las proteínas en todos los animales tanto terrestres como acuáticos (Mathews y Van Holde., 1998).

Al comparar estas dos enzimas se nota que la quimiotripsina presenta un espectro para la actividad proteolítica mucho mayor que la tripsina (Lundstedt, 2003). Debido a la importancia de la proteína en la nutrición de peces, una serie de estudios se han enfocado en el papel de la tripsina como indicador nutricional, ya que se le considera una enzima clave en el proceso de la digestión, activando su propia forma precursora (tripsinógeno), aunque la tripsina también es activada por una enteroquinasa. La quimiotripsina es activada cuando el quimiotripsinógeno es secretado al lumen y entra en contacto con la tripsina.

## **b) Amilasas**

Las amilasas catalizan la hidrólisis del enlace  $\alpha$ 1-4 del almidón y del glucógeno y se dividen en alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) amilasas, o endo y exo amilasas. Las primeras están presentes en el jugo pancreático e hidrolizan indistintamente enlaces a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de glucosa y maltosa, y las ( $\beta$ ) amilasas hidrolizan a los carbohidratos por el extremo no reductor y se restringen exclusivamente al reino vegetal (Hirikado *et al.*, 1994).

La  $\alpha$ -amilasa digestiva ha sido localizada en todo el tracto digestivo de muchas especies de peces, pero poco se sabe sobre la regulación de la actividad de amilasa, su secreción o biosíntesis en peces. Se conoce que la actividad amilásica de tejidos y de contenido intestinal varía entre las especies siendo mayor en peces herbívoros y omnívoros que en carnívoros (Chakrabarti *et al.*, 1995). Así por ejemplo, la trucha al ser un pez carnívoro presenta niveles bajos de  $\alpha$ -amilasa (Hidalgo *et al.*, 1999). Un aumento de la producción de amilasas puede ocurrir en respuesta a la presencia de carbohidratos o de sus productos de hidrólisis en el tracto gastrointestinal. La glucosa puede influenciar directamente la producción de amilasas por el tejido pancreático, o indirectamente estimulando la liberación de insulina por el páncreas (Jobling, 1994). Según algunos autores la segregación es independiente de la dieta, pero otros estudios muestran un aumento de su actividad al aumentar almidón en la dieta, además existen inhibidores de la actividad amilohidrolítica que son endógenas y están presentes en trigo y otros granos (Krogdahl *et al.*, 2005).

La digestibilidad de los polisacáridos está directamente relacionada con su naturaleza química y la capacidad digestiva de cada especie. Peces tropicales de agua dulce pueden aprovechar mejor los carbohidratos de las dietas que las especies marinas y los salmónidos (Lundstedt, 2003).

## **c) Lipasas**

La digestión de lípidos ocurre en los ciegos pilóricos y en el intestino por una variedad de lipasas y colipasas. Los lípidos de las dietas, principalmente en forma de triglicéridos, son hidrolizados por lipasas inespecíficas en ácidos grasos libres y glicerol (De silva e Anderson, 1995), que al ser absorbidos son usados para procesos biosintéticos de varios componentes celulares o para la obtención de energía.

Las lipasas están presentes en el estómago de algunas especies de peces, pero el sitio primario de hidrólisis lipídica para la mayoría de especies parece estar en la porción anterior del intestino y en los ciegos pilóricos (cuando éstos están presentes). Sin embargo existe una digestión continúa de lípidos en las demás zonas del intestino, principalmente en las especies estrictamente carnívoras y que presenten un tracto digestivo extremadamente corto (Ferraris y Ahearn, 1984).

Las lipasas se clasifican en esterases y lipasas verdaderas, la primera actúa sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular con una cierta capacidad de solubilizarse y las segundas hidrolizan sustratos poco solubles. Esta enzima se ha descrito en páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático (Álvarez, 2003).

Existen pocos estudios sobre otras enzimas lipolíticas en peces, sin embargo han sido encontradas actividades de esterases y fosfolipasas (Guillaume y Choubert, 2001). Las lipasas de peces difieren de los vertebrados superiores por mostrar afinidad similar para triglicéridos de diferentes ácidos grasos y son especialmente activas para aquellas en posición  $\alpha$ . Por último, es difícil afirmar que estas enzimas en los peces son secretadas por el estómago o por el páncreas ya que las lipasas, en general tienden a no ser específicas.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar y periodo de ejecución de la investigación**

La parte experimental de la investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Pesquería perteneciente a la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, por un periodo de 45 días, comprendidos entre el 12 de mayo y el 26 de junio del 2015.

#### **3.2 Etapa pre –experimental.**

##### **3.2.1 Material Biológico.**

Los juveniles de *Arapaima gigas* se obtuvieron del centro de cultivo en Yurimaguas (Empresa Privada, AMAZONE) con un peso promedio de  $4,2 \pm 1,5$  g. Y fueron aclimatados durante una semana a las condiciones de la calidad de agua de la Universidad Nacional Agraria la Molina, obteniéndose un peso promedio final de  $4,9 \pm 1,3$  g. Posteriormente fueron trasladados al laboratorio de Acuicultura donde fueron mantenidos por cuatro meses hasta alcanzar un peso promedio de  $127,5 \pm 28,41$ . Con el fin de poseer una población experimental en óptimas condiciones, la aclimatación de los juveniles se centró en las condiciones de calidad de agua que presenta la Universidad Nacional Agraria la Molina, cuya dureza del agua puede llegar hasta los 3,5 mS. En este periodo se evaluó sobrevivencia, crecimiento y consumo de alimento. La dieta que se manejó en este periodo fue un alimento comercial para peces carnívoros con 45 por ciento de proteína. La alimentación fue *ad libitum* cada hora, 10 veces al día, empezando a las 8h y finalizando a las 17h.

##### **3.2.2 Formulación y elaboración del alimento.**

La formulación, elaboración y análisis proximal del alimento se llevó a cabo en la Universidad Nacional Agraria la Molina. En la formulación se utilizó el método de tanteo y se formuló una dieta experimental con 46,35 % de proteína y 5126,72 k cal/Kg de energía

bruta. La dieta se elaboró según los requerimientos nutricionales para paiches (Akifumi *et al.*, 2008). La elaboración del alimento se realizó en la planta de alimentos y el análisis químico proximal de las dietas se realizó en el laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) de la Facultad de Zootecnia. En la Tabla 3 se muestra la fórmula y el análisis químico proximal de la misma.

**Tabla 3: Formulación y análisis químico proximal del alimento empleado durante el periodo experimental.**

INSUMOS %		ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL	
Harina de pescado	58,5	Humedad,%	6,43
Harina de soya	16	Proteína total (Nx6,25),%	46,35
Aceite de pescado	15		
Harina de maíz	9	Grasa,%	19,36
Premix Aqua*	0,3	Fibra cruda,%	1,73
Antioxidante	0,02	Ceniza,%	10,69
Inhibidor de hongos	0,2	Extracto libre de nitrógeno, ELN,%	15,44
Cloruro de colina	0,2	Energía bruta, Kcal/Kg	5126,72
Aglutinante	1		

\*Premix- Vitamina A 14'000,000 U.I. Vitamina D3 2'800,000 U.I. Vitamina E 140,000 U.I. Vitamina K3 8.000 g Tiamina (B1) 18.000 g Riboflavina (B2) 20.000 g Niacina 150.000 g Ácido Pantoténico 50.000 g Piridoxina (B6) 15.000 g Biotina 0.800 g Ácido Fólico 4.000 g Ácido Ascórbico 600.000 g Vitamina B12 0.030 g Manganeseo 40.000 g Hierro 20.000 g Zinc 20.000 g Cobre 1.500 g Iodo 1.500 g Selenio 0.300 g Cobalto 0.150 g Antioxidante 120.000 g Carbonato de Calcio (Excipiente) c.s.p. 3,000.000 g. En base a un total de 20Kg. Cloruro de Colina- 600.000 g. En base a un total de 10Kg. Se agregará 200 gramos del Premix más 100 gramos de Cloruro de Colina.

### 3.2.3 Acondicionamiento del sistema Biofloc

El volumen necesario de biofloc (1180 L) se obtuvo a partir de un inóculo de 100L procedente de un biorreactor. Este se estabilizó del 1abril al 8 de mayo en el laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria la Molina. Para esto en un tanque de 0,5 m<sup>3</sup> se colocó los 100 L del inóculo, 200 L de agua clara y se utilizó como material biológico a juveniles de tilapia que aportaron una carga de 2,5 Kg/m<sup>3</sup>. Estas fueron alimentadas 3 veces al día con una dieta comercial (40 por ciento de proteína) a una

taza de alimentación del 3,5 por ciento. Para madurar y estabilizar el biofloc en una relación (C:N) de 15:1 se agregó diariamente azúcar rubia (53.36 % C) como fuente de carbono y las concentraciones de sólidos sedimentables se mantuvieron menores a 20ml/L. (Anexo 2).

### 3.3 Hipótesis planteadas

- **H<sub>p</sub> 1:** Existe un aporte enzimático exógeno por parte de los microorganismos presentes en el sistema con biofloc (SBF) que mejoran el comportamiento productivo de los juveniles de *Arapaima gigas*.
- **H<sub>p</sub> 2:** Existe un aporte enzimático exógeno por parte de los microorganismos presentes en el sistema con biofloc (SBF) que mejoran la capacidad enzimática digestiva de los juveniles de *Arapaima gigas*.
- **H<sub>o</sub> 1:** No existe un aporte enzimático exógeno por parte de los microorganismos presentes en el sistema con biofloc (SBF) que mejoren el comportamiento productivo de los juveniles de *Arapaima gigas*.
- **H<sub>o</sub> 2:** No existe un aporte enzimático exógeno por parte de los microorganismos presentes en el sistema con biofloc (SBF) que mejoren la capacidad enzimática digestiva de los juveniles de *Arapaima gigas*.

### 3.4 Etapa experimental

#### 3.4.1 Diseño experimental

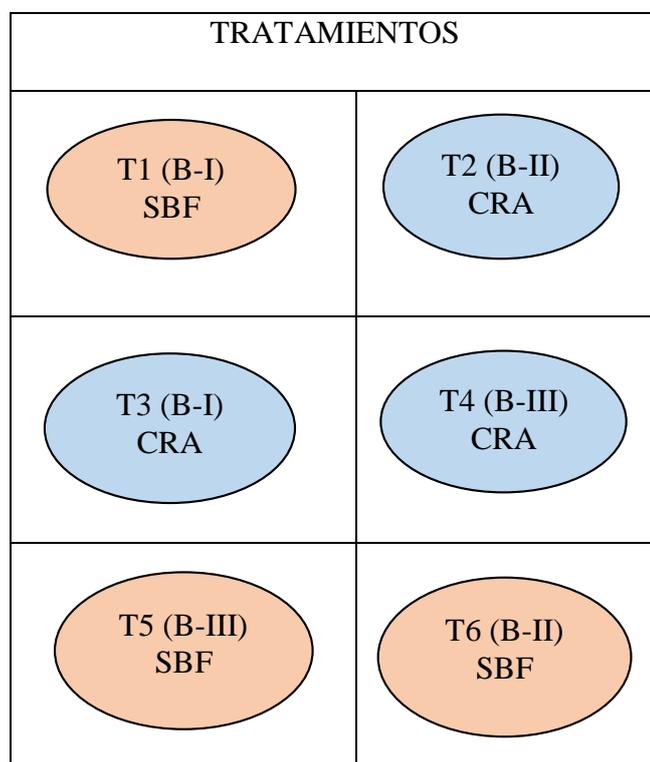
Debido a la dispersión de tallas y pesos en los juveniles se aplicó un diseño en bloques completos al azar y se trabajó con dos tratamientos: un tratamiento con el sistema biofloc (SBF) y el otro tratamiento sin biofloc con recambio de agua (CRA) del 50%. Cada tratamiento contó con 3 réplicas (Tabla 4). Los juveniles de paiche fueron agrupados en tres bloques con pesos diferentes: Bloque I (161,99+14,62 g), Bloque II (121,09+6,90 g), Bloque III (99,43+10,81 g).

Un total de 54 juveniles de paiche, fueron distribuidos aleatoriamente en seis tanques circulares de fibra de vidrio de 500 litros de capacidad. El volumen útil fue de 300 litros (Anexo 3) hasta alcanzar una densidad de cultivo de 9 juveniles/ tanque o extrapolando

6kg/m<sup>3</sup>, carga que fue regulada a través del volumen del agua teniéndose: Bloque I (250 L), Bloque II (190 L) y Bloque III (150 L).

**Tabla 4: Esquema del diseño experimental.**

	SISTEMA DE CULTIVO	REPETICIONES		
TRATAMIENTOS	SISTEMA CON BIOFLOC (SBF)	R1	R2	R3
	SISTEMA SIN BIOFLOC CON RECAMBIO DE AGUA (CRA)	R1	R2	R3



**Figura 1: Distribución de las unidades experimentales**

### 3.4.2 Manejo experimental

La fase experimental tuvo una duración de 45 días, durante los cuales los juveniles de paiche fueron alimentados cada dos horas, seis veces al día (8h, 10h, 12h, 14h, 16h y 18h), los siete días de la semana con una tasa de alimentación del 3 por ciento de la biomasa. Quincenalmente se realizó las biometrías en cada unidad experimental para determinar el incremento en biomasa y reajustar la tasa de alimentación, así como también evaluar la sobrevivencia.

Durante todo el periodo experimental se trató de mantener los siguientes parámetros fisicoquímicos: Oxígeno disuelto mayor a 3 mg/L, pH entre 6,5 y 7,5, temperatura entre 27-30°C y nitrógeno amoniacal total (NAT) menor a 3 mg/L. Los instrumentos, días y hora de colecta de datos se muestran en Anexo 3.

En el sistema con recambio de agua (CRA) fue necesario realizar un recambio diario del 50 por ciento del volumen de agua y sifonear diariamente el fondo de los tanques de cultivo para poder mantener los niveles adecuados de calidad de agua.

En el sistema con biofloc (SBF), para controlar el nitrógeno amoniacal (N- NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) se adicionó diariamente azúcar rubia (%C=54,36) a una proporción C/N= 15/1 la cual se añadió dos horas después de la primera alimentación. La cantidad de azúcar rubia que se debió añadir fue calculada utilizando la siguiente formula adaptada de Avnimelech (1999).

$$\text{Azúcar} = \frac{(TA * B) * (\%P) * (\%N) * (\%Ex)}{(0.066)}$$

Donde:

TA=Tasa de alimentación = 3%

B= Biomasa

%P= Porcentaje de proteína en el alimento

%N= Porcentaje de Nitrógeno en la proteína =16 %

% Ex= Porcentaje de excreción de Nitrógeno por el pez más la amonificación del alimento no consumido = 75 %, según Piedrahita (2003).

%CF= Porcentaje de Carbono en la Fuente (azúcar rubia) = 54,36%

Aplicando esta fórmula se obtuvo que la cantidad de azúcar rubia a agregarse a los sistemas SBF resultó ser el 84% del alimento suministrado (TA\*B), porcentaje relativamente cercano al empleado por Luo *et al.* (2014) de 75%. Según Abu Bakar *et al.* (2015) y Long *et al.* (2015) una proporción de C: N = 15:1, es adecuada para mantener el sistema SBF.

### **3.5 Procedimientos y técnicas de recolección de datos.**

#### **3.5.1 Calidad de agua.**

Los parámetros de calidad de agua en el SBF y el CRA; tales como la concentración de oxígeno disuelto (mg/L) y temperatura (°C) fueron registrados mediante un oxímetro de marca YSI. Y el potencial de hidrogeno (pH) fue registrado con un potenciómetro de marca SCHOTT. Los tres parámetros de calidad de agua fueron registrados 3 veces al día (8h, 13h y 18h) (Anexo 5).

La concentración de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrógeno amoniacal total (NAT) fueron evaluados dos veces a la semana a las 14h. Para su determinación se tomaron muestras de 100ml del agua de cultivo en cada unidad experimental, las cuales se filtraban a través de un papel filtro pre-secado (1,2  $\mu\text{m}$ ). Luego se procedía a la medición de los compuestos nitrogenados acorde a los métodos correspondientes del APHA (1998). El NAT se midió según el método Nessler. Los nitritos por el método de diazotización y los nitratos por el método de reducción de Cadmio. Al ser reacciones colorimétricas se requirió del uso de un espectrofotómetro (HACH) (Anexo 5).

En el SBF además de los parámetros anteriormente mencionados se tomaron los siguientes parámetros:

#### a) Sólidos sedimentables (SS)

Calculado por el volumen de los bioflóculos. Fue evaluado diariamente (8h) según el protocolo de APHA (1998). Consistió en tomar 1000ml del agua de cultivo en cada unidad experimental del sistema SBF, dentro de un cono de IMHOF y dejar sedimentar durante 20 minutos (Anexo 5), Cabe mencionar que el valor de SS es relativo según la composición de

organismos presentes en los flóculos por lo que es mejor usar el valor del peso seco de los flóculos (sólidos suspendidos totales SST).

b) Los sólidos suspendidos totales (SST)

Estos fueron medidos dos veces a la semana (8h). Los SST son los materiales retenidos por un filtro estándar de fibra de vidrio (1,2 µm) y secado en una estufa marca Memmert a 103–105 °C durante una hora según el protocolo de APHA (1998). Se aplicó la siguiente fórmula:

$$SST (mg/L) = \frac{(P2 - P1) * 1000}{V}$$

Donde:

P1= Peso del filtro preparado (mg/L)

P2= Peso del filtro más el residuo seco a 103-105°C (mg/L)

V= Volumen de la muestra (L)

c) Alcalinidad (CaCo3 mg/l)

Este fue medido diariamente (15h). Para su determinación se utilizó ácido sulfúrico a 0,02059N e Indicador mixto compuesto por cada 100mL por 0,02g de Rojo de Metilo, 0,1 g de verde de Bromocresol enrasado con etanol al 95% (Anexo 5).

$$Alcalinidad \text{ como } mg \text{ CaCo}_3/L = \frac{A * 50 * 1000 * N}{V}$$

Donde:

A= Gasto del ácido sulfúrico en la titulación (mL)

N= Normalidad del ácido sulfúrico

V= Volumen de la muestra (mL)

La alcalinidad fue mantenida cercana a 100 mg/L. Para ello la cantidad de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) requerido para aumentar la alcalinidad se determinó según el método de Loyless y Malone (1997).

### **3.5.2 Colecta de muestras para los ensayos enzimáticos**

#### **a. Obtención de muestras de agua de cultivo y del tracto digestivo de los peces**

Para poder analizar la presencia de enzimas exógenas (proteasas, lipasas y amilasas) se tomaron muestras de 100 ml al inicio (día 0), mitad (día 25) y final (día 45) del experimento del agua de cultivo de cada una de las unidades experimentales. Para el caso de las muestras del tracto digestivo de los juveniles se eligieron al azar tres juveniles por tratamiento en el muestreo inicial, nueve juveniles a mitad del experimento y doce en el muestreo final, a los cuales se les separó en tinas y se les mantuvo en ayunas durante 24 horas previos a su muestreo. Durante este periodo en las tinas se mantuvieron los parámetros de calidad de agua iguales al de la unidad de cultivo de donde procedían los paiches capturados. Pasadas las 24 horas de ayuno se procedió al sacrificio de los peces mediante el método de schock por hipotermia para luego aplicarles una punción retrocraneal (Luo *et al.*, 2014). Posteriormente se procedió a la extracción del tracto digestivo que fue colocado sobre una cama de hielo (Anexo 7). Luego se diseccionó las zonas anterior y media del tracto digestivo, las cuales fueron enjuagadas en frío con agua destilada y puestas en tubos eppendorf de 1,5 mL previamente rotulados e inmediatamente colocadas dentro de un conservador con hielo seco (T= - 4°C). Al término de todo el muestreo, las muestras rotuladas fueron transportadas el mismo día al laboratorio de Genética del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) para ser almacenadas en una ultracongeladora (NUAIRE) (T= - 80°C) hasta su posterior análisis.

#### **b. Extracción de enzimas del agua de cultivo**

Fue utilizado el método modificado de Yu *et al.* (2009). Las muestras del agua de cultivo colectadas de las unidades experimentales, se transfirieron a tubos falcón de 15 mL y se llevaron a centrifugación a 2000×g por 15 minutos a 4°C (centrífuga LCM – 4200R). Se decantaron las muestras y el sedimento del fondo se resuspendió a un quinto de su volumen original utilizando buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7. Seguidamente los tubos fueron agitados en un vortex (0-3000RPM MIXER) por 30 segundos e inmediatamente llevados a un baño con hielo para ser tratados en un procesador de ultrasonido (QSonica Sonicators) a una frecuencia de 20 kHz durante 1 minuto. El contenido obtenido fue transferido a tubos eppendorf de 1,5 mL y centrifugados a 16900×g durante 20 minutos a 4°C (centrífuga 5418

R). Finalmente el sobrenadante (extracto de enzimas) fue almacenado en alícuotas de 300  $\mu$ L en la ultracongeladora (NUAIRE) (T=- 80°C) hasta su determinación enzimática.

### **c. Extracción de las enzimas del tracto digestivo de los juveniles de paiche**

Se realizó de la parte anterior y media del intestino. Previamente las muestras fueron descongeladas y pesadas en una balanza analítica de cuatro decimales (Cis- Lab), para obtener porciones de 0,2 gr del intestino que se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL. Se realizó un homogenizado en frío de estas porciones del tracto digestivo con buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 (200mg de tejido/ ml buffer) y con la ayuda de unos bastoncillos de plástico especiales para homogenizar tejido. Posteriormente, se tomaron muestras de 100  $\mu$ l del homogenizado las que fueron transferidas a tubos eppendorf de 0,5 mL y almacenadas en la ultracongeladora (T= - 80°C) hasta su posterior determinación de lipasas. El resto del homogenizado se centrifugó a 10000 $\times$ g durante 20 minutos a 4 °C (centrífuga 5418 R), con el objetivo de eliminar restos de tejido y lípidos. Finalmente el sobrenadante obtenido, que contiene el extracto enzimático, se dispuso en alícuotas de 500  $\mu$ l en tubos eppendorf y mantenidos en la ultracongeladora (T= - 80°C) hasta la posterior determinación enzimática de proteasas, tripsinas, quimiotripsinas y amilasas.

## **3.5.3 Métodos de análisis de las actividades enzimáticas**

### **a. Determinación de la proteína soluble**

La lectura para la determinación de la concentración de la proteína de las muestras se realizó en microplacas de 96 pocillos mediante la técnica de análisis Bradford (Bradford, 1976) (Anexo 9). Para esto, a 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford se le añadió 0,5  $\mu$ l de extracto enzimático del tracto digestivo, o en el caso del agua de cultivo, 15  $\mu$ l del extracto. Luego se añadió buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 hasta obtener una mezcla de reacción de 220  $\mu$ l que fue agitada en un vortex. Posteriormente la densidad óptica (DO) se midió a 595 nm en un espectrofotómetro uv/visible (VARIAN 50 MPR) entre los 15 y 60 minutos del inicio de la reacción colorimétrica. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. La recta patrón o de calibración se elaboró agregando cantidades de 0, 2, 4, 6, 10, 15 y 20  $\mu$ l de una solución estándar de albúmina bovina (BSA) a una concentración de 100 $\mu$ g/ml. Estas fueron llevadas a 20  $\mu$ l con agua destilada y sobre ellas se agregó 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford y se les midió la DO. La preparación de la solución estándar se realizó usando el stock BSA de

1mg/ml, del cual se tomó 100 µl y se diluyó con 900 µl de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8. La sensibilidad de este método está comprendido entre 0 y 25 µg/ml. Aquellos extractos que dieran una absorbancia a 595 nm mayor a lo obtenido en la recta patrón se diluyeron para ajustar su valor de absorbancia a dicha recta.

### **b. Proteasas totales**

El análisis de la actividad enzimática de proteasas se realizó en tubos eppendorf de 1,5 mL mediante el método modificado por Toro *et al.* (2011). El análisis enzimático se logró midiendo la actividad de hidrólisis del sustrato 0,5 % W/V de azocaseína en el buffer Tris-HCl y 10 mM CaCl<sub>2</sub> a pH 9,5 a 37 °C durante un tiempo de incubación de 30 minutos. Para esto se agregó 100 µl del sustrato, 100 µl del buffer y 2 µl del extracto enzimático del tracto digestivo o en el caso del agua de cultivo, el de ambos sistemas, 30 µl del extracto. Pasado el tiempo de incubación la reacción se detuvo mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración de 20 %.

El precipitado no hidrolizado se separó por centrifugación a 10000×g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se traspasó a microplacas de 96 pocillos para realizar la lectura de la DO en un espectrofotómetro uv/visible (VARIAN 50 MPR) a 280nm, comparado con el agua destilada como control. La lectura de la actividad enzimática se expresa como el cambio de absorbancia por minuto por mg de proteína mediante la cantidad de tirosina liberada.

### **c. Tripsina**

Para su evaluación se empleó el método modificado de Erlanger *et al.* (1961). Este consistió en preparar una solución de 100 mM de BAPNA (N $\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina-P-NitroAnilida) en 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO) que se enrazó a 100 ml usando el buffer 50 mM de Tris-HCl y 10 mM CaCl<sub>2</sub> a pH 9. Para iniciar la reacción se mezcló 250 µl de sustrato (a 37°C) con 4 µl del extracto enzimático del tracto digestivo o en el caso del agua de cultivo del SBF y CRA 30 µl de extracto del agua. La reacción se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos para facilitar la lectura de la absorbancia a 410 nm durante 10 minutos en intervalos de 1 minuto, utilizando un blanco como control. Una unidad de actividad es expresada como 1

$\mu\text{mol}$  de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar  $8800\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

#### **d. Quimiotripsina**

Fue determinada según la metodología descrita por Asgeirsson y Bjarnason (1991): Se evaluó a  $256\text{ nm}$  durante  $10$  minutos en intervalos de  $1$  minuto por hidrólisis de BTEE (N-Benzoil-LTirosina Etil Ester) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para ello a  $20\text{ }\mu\text{l}$  BTEE ( $5\text{ mM}$  en DMSO) se le añadió  $178\text{ }\mu\text{l}$  del tampón  $44.4\text{ mM}$  Tris,  $55.5\text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  a  $\text{pH}$   $8$ . La reacción se inició con la adición de  $2\text{ }\mu\text{l}$  de extracto enzimático del tracto digestivo o  $90\text{ }\mu\text{l}$  del extracto del agua de cultivo de ambos sistemas. Una unidad de actividad enzimática se define como  $1\text{ }\mu\text{mol}$  de BTEE hidrolizado por minuto usando como coeficiente de extinción molar  $964\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

#### **e. Lipasas**

Se determinaron por el método de Versaw *et al.* (1989) el cual consiste en agregar a  $10\text{ }\mu\text{l}$  de taurocolato de sodio ( $100\text{ mM}$ ),  $190\text{ }\mu\text{l}$  de Tris HCl  $50\text{ mM}$  ( $\text{pH}=7.2$ ) y  $4\text{ }\mu\text{l}$  de extracto enzimático digestivo o  $30\text{ }\mu\text{l}$  del extracto del agua de cultivo para el caso de ambos sistemas. Luego fueron incubados a temperatura ambiente durante  $5$  minutos y se inició la reacción con  $4\text{ }\mu\text{l}$  de  $\beta$ -naftil caprilato ( $200\text{ Mm}$ ) por  $30$  minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después se les agregó  $4\text{ }\mu\text{l}$  de *fast blue* ( $100\text{ mM}$ ) y se incubaron por  $5$  minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando  $40\text{ }\mu\text{l}$  de TCA ( $0.72\text{ N}$ ). Fue agitada en el vortex y la absorbancia leída a  $540\text{ nm}$ . La unidad de lipasa se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar  $0,01$  unidades de absorbancia a  $540\text{ nm}$  por minuto, como un miligramo de naftol liberado por minuto con un coeficiente de extinción molar de  $0,02\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

La actividad específica se representó como las unidades de enzima por miligramo de proteína.

#### **f. Amilasas**

La determinación de amilasas se realizó mediante el uso del Kit (Amylase Activity Assay Kit de SIGMA – ALDRICH), donde se siguió el protocolo descrito por el fabricante Anexo 4. La cantidad de extracto enzimático del tracto digestivo que se uso fue de  $3\text{ }\mu\text{l}$ , y la cantidad del extracto del agua de cultivo para ambos sistemas fue de  $23\text{ }\mu\text{l}$ . La actividad de la amilasa se registró como  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$  (miliunidades), una unidad de amilasa es la cantidad de

amilasa que hidroliza al etilideno-pNP-G7 para generar 1,0  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto a 25°C.

$$\text{Actividad amilasa} = \frac{B * \text{FDM}}{t * V}$$

Donde:

B: cantidad de bitrofenol generado entre T inicial y Tfinal

FDM: Factor de dilución de la muestra

T: tiempo de reacción Tfinal – T inicial (minutos).

V: Volumen de la muestra (ml)

### 3.5.4 Cálculo de las actividades enzimáticas

La actividad de amilasas, lipasas y proteasas totales fueron determinadas mediante la técnica de punto final, mientras que la actividad de tripsina y quimiotripsina fueron evaluadas cinéticamente.

#### a. Actividad en unidades por mililitro (ml).

La Comisión de enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica es la que estandariza los valores de actividad enzimática, los cuales se expresan en unidades internacionales (UI), Estas representan la cantidad de enzima que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en condiciones estándar previamente establecidas. Para su determinación se utilizó la siguiente formula.

$$\text{Unidad/ml} = \frac{\Delta\text{abs} * V_f}{\text{CEM} * t * V_e}$$

Donde:

$\Delta\text{abs}$ : variación de la absorbancia a una determinada longitud de onda

$V_f$ : Volumen al final de la reacción (ml)

CEM: Coeficiente de extinción molar ( $\text{ml} * \text{mg}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ )

T: Tiempo de la reacción (minutos)

Ve: Volumen del extracto (ml)

### **b. Actividad específica de las enzimas**

La actividad enzimática específica para los homogenizados del tracto digestivo de los juveniles de *Arapaima gigas* se expresa como unidades por miligramo de proteína soluble (U/mg proteína soluble), mientras que la actividad enzimática específica presente en el agua de cultivo se expresa como unidades por miligramo de sólidos suspendidos totales (U/mg SST).

- **Unidades por mg de sólidos suspendidos totales**

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg SST}} = \frac{\text{U/ml}}{\text{mg SST/ml}}$$

En donde:

U/ml: Actividad en unidades por mililitro

mg SST: miligramos de sólidos suspendidos totales por mililitro

- **Unidades por mg de proteína soluble en el extracto**

La actividad específica se da en unidades por miligramo de proteína, gramo de tejido fresco, o por mililitro de preparado enzimático, que constituye una medida de la pureza de la preparación enzimática (Álvarez, 2003), a través de la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg proteína soluble}} = \frac{\text{U/ml}}{\text{mg Ps/ml}}$$

En donde:

U/ml: Actividad en unidades por mililitro

mg Ps/ml: miligramos de proteína soluble por mililitro

### **c. Actividades específicas de tripsina y quimiotripsina:**

Se calcularon con el algoritmo unidades de actividad por  $\text{mg}^{-1}$  proteína por variación de la absorbancia (Abs) por  $\text{min}^{-1}$ .

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg proteína soluble}} = \frac{(\Delta\text{Abs min} - 1) * 1000 * V}{8800 * \text{mg Ps/ml}}$$

En donde:

$\Delta\text{Abs min-1}$ : variación de absorbancia por minuto

V: Volumen de mezcla de reacción

mg Ps/ml: miligramos de proteína soluble por mililitro

### 3.6 Parámetros productivos:

Se calcularon en base a las biometrías quincenales realizadas en las primeras horas del día (8h). Se registraron valores de longitud total (cm) y peso húmedo (g) de toda la población experimental. Se utilizó un ictiómetro y una balanza electrónica (OHAUS) con aproximación de un decimal (Anexo 6). El análisis de los parámetros productivos, se realizó con fórmulas tomadas de Luo *et al.* (2014):

#### a. Ganancia de peso (GP)

$$GP (\%) = \frac{Pf - Pi}{Pi}$$

Donde:

Pf: Peso del pez al final de un periodo de tiempo

Pi: Peso del pez al inicio de un periodo de tiempo

#### b. Tasa de crecimiento específico (TCE)

$$TCE \left( \frac{\%}{\text{día}} \right) = 100 * \frac{\text{Ln}(Pf) - \text{Ln}(Pi)}{D}$$

Donde:

D: Número de días del periodo de tiempo

#### c. Factor de conversión alimentaria (FCA)

$$FCA (\%) = \frac{C}{Bf - Bi}$$

Donde:

C: Consumo de alimento en un periodo de tiempo

BF: Biomasa final después de un periodo de tiempo

Bi: Biomasa inicial antes de un periodo de tiempo

#### **d. Supervivencia (S)**

La supervivencia en ambos sistemas fue evaluada al final del experimento.

$$S (\%) = \frac{N_f}{N_i} * 100$$

Donde:

Nf: Número de peces al final de un periodo de tiempo

Ni: Número de peces al inicio de un periodo de tiempo

### **3.7 Colección del biofloc y carcasa de los paiches para el análisis proximal.**

Al final del experimento, el agua de los tanques del SBF se filtró en una malla de 10  $\mu$  (Xu *et al.*, 2012a), luego las muestras se secaron a 60°C hasta obtener un peso constante y posteriormente se almacenaron a -20°C en una congeladora marca Bosch, hasta su posterior análisis proximal.

La carcasa de los juveniles de paiche *Arapaima gigas* se obtuvo de los animales sacrificados para la extracción del tracto digestivo en la etapa final del experimento. Para esto 5 juveniles de cada tratamiento fueron congelados a -20° y posteriormente se procedió a secarlas en un secador-deshidratador marca Klimatechnik a 60°C hasta obtener un peso constante. A continuación las muestras fueron rotuladas y almacenadas en una congeladora a -20°C hasta su posterior análisis proximal. El análisis químico proximal de los bioflóculos y de la carcasa se realizó en el laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) de la Facultad de Zootecnia, bajo la metodología de AOAC (1995).

### **3.8 Procedimiento de análisis de datos.**

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico Minitab ® 16.2.3, versión 16.0; se usó un diseño experimental en bloques completamente al azar. Para el análisis de datos

primero se realizó una prueba de significación de datos y de normalidad (Anderson – Darling). Se aplicó un análisis de varianza (ANVA) para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Se utilizó un modelo lineal en los parámetros de crecimiento, composición proximal y actividad enzimática. El nivel de significancia fue del 5%. Los resultados fueron representados como el valor de la media  $\pm$  la desviación estándar de la media.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Calidad de agua

Los resultados en calidad de agua para los tratamientos: sistema con biofloc (SBF) y sistema sin biofloc con recambio de agua (CRA) se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5: Valores promedio de los parámetros de calidad de agua en el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).**

Parámetros	SBF	CRA
Temperatura (°C)	28,07 ± 0,47 <sup>a</sup> (26,60 – 29,60)	28,28 ± 0,48 <sup>a</sup> (26,6 – 30,0)
Oxígeno disuelto (mg/L)	6,08 ± 0,67 <sup>a</sup> (3,90 – 7,30)	5,73 ± 0,76 <sup>b</sup> (3,81 – 7,18)
pH	7,75 ± 0,17 <sup>a</sup> (7,20 – 8,10)	7,35 ± 0,22 <sup>b</sup> (6,80 – 7,90)
Alcalinidad (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	90,31 ± 13,04 <sup>a</sup> (61,77 – 113,30)	55,99 ± 17,37 <sup>b</sup> (25,70 – 87,50)
SS (mL/L)	52,02 ± 30,57 (5 – 150)	ND
SST (mg/L)	408,70 ± 33,90 <sup>a</sup> (160 – 576)	8,25 ± 2,78 <sup>b</sup> (2 – 15)
NAT (mg/L)	2,02 ± 1,23 <sup>a</sup> (0,3 – 5,7)	1,37 ± 0,57 <sup>b</sup> (0,7 – 2,8)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0,79 ± 0,52 <sup>a</sup> (0,16 – 1,71)	0,28 ± 0,20 <sup>b</sup> (0,11 – 0,87)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	16,29 ± 3,293 <sup>a</sup> (10,79 – 22,4)	9,12 ± 4,54 <sup>b</sup> (3,18 – 16,21)

La data esta presentada en Media ± desviación estándar (Mínimo - Máximo). CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc; SS, sólidos sedimentables; SST, sólidos suspendidos totales; NAT, nitrógeno amoniacal total; N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitrógeno en nitritos; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrógeno en nitratos. ND, no detectable

Los parámetros de calidad de agua mostraron diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) para la concentración del oxígeno disuelto (OD), pH, concentración de nitrógeno

amoniacal total (NAT), nitritos (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitratos (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), alcalinidad (mgCaCO<sub>3</sub>/L), sólidos sedimentables (SS) y sólidos suspendidos totales (SST), (Tabla 5). Cabe mencionar que durante todo el experimento los valores de calidad de agua se encontraron dentro de los rangos óptimos para juveniles de paiche, tal como lo definió Rebaza *et al.* (1999).

Durante el desarrollo del experimento las condiciones físicas y químicas fueron cambiando a lo largo del tiempo. En el tratamiento CRA los niveles de sólidos sedimentables (SS) y sólidos suspendidos totales (SST) siempre se mantuvieron en niveles muy bajos, y estos últimos nunca excedieron de 15 mg/L. En el tratamiento SBF los niveles de SS y SST fueron incrementando gradualmente. Es así que inicialmente se registraron valores de 5 mL/L (SS) y 160 mg/L (SST), alcanzando valores más altos de 150 mL/L y 576 mg/L respectivamente (Tabla 5). Como ha sido demostrado por Ray *et al.* (2010), la concentración de SST en los cultivos con biofloc está estrechamente relacionados con la calidad de agua, pudiendo llegar a obstruir las branquias de los peces, por lo tanto deben de ser bien controlados. El valor de SST que se maneje en el sistema biofloc dependerá de la especie en cultivo. Es así que en *Rhamdia quelen* se consiguió un mejor crecimiento y sobrevivencia con una concentración de 200 mg/L de SST (Poli *et al.*, 2015), mientras que para *Ictalurus punctatus* el mejor desempeño productivo se dio con 790 mg/L de SST (Green, 2015).

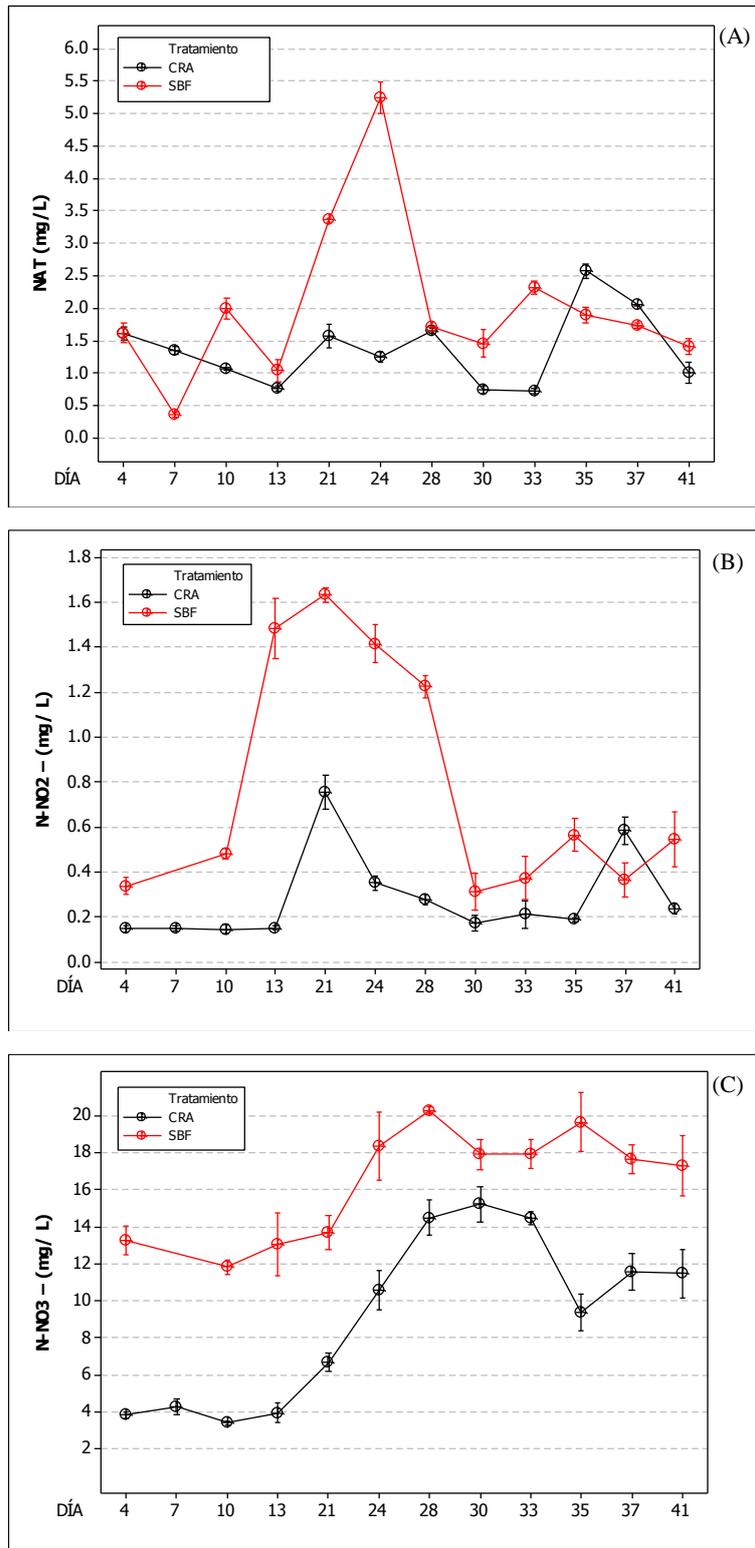
En el presente experimento en el tratamiento SBF se trató de mantener niveles de SST alrededor de 400mg/L (Tabla 5) por lo que cada vez que excedía este valor se procedía a la remoción de sólidos. Según Avnimelech (2012) las concentraciones de SST pueden alcanzar valores hasta de 1000 mg/L pero que deben limitarse a 400 mg/L. Por otro lado, en un cultivo de tilapia Avnimelech (2007) reportó valores de SST que variaron de 460 a 643 mg/L mientras que Azim y Little (2008) presentaron niveles medios de 597 y 560 mg/L. En el presente experimento no se observó aparente influencia negativa de los niveles de SST sobre la supervivencia o crecimiento de los juveniles de *Arapaima gigas* criados bajo el sistema con biofloc (SBF).

Los valores de SS inicialmente fueron mantenidos por debajo de 20ml/L, pero en la segunda semana del experimento este valor se elevó hasta registrar valores de 150ml/L en algunas unidades experimentales. Esta situación también fue reportada por Azim y Little, (2008) quienes indicaron que los valores de SS no eran muy confiables durante el desarrollo del

experimento debido a que el valor dependía de las comunidades de organismos que coexistían en dicho momento. Schweitzer *et al.* (2013) encontraron una baja correlación entre SS y SST en el cultivo en sistema con biofloc de *Litopenaeus vannamei* debido al cambio de patrón de sedimentación de los sólidos durante el cultivo y mencionaron que la turbidez tuvo una asociación más estrecha con los SST. Por lo anteriormente mencionado se consideró más importante tener en cuenta los niveles de SST por su mayor confiabilidad.

En la tabla 5 y en las figuras 2(A y B) se muestran las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT) y nitrógeno en nitritos ( $\text{N-NO}_2^-$ ) para ambos sistemas de cultivo. Se observa que presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos. Los valores para CRA siempre estuvieron por debajo de 2,77 y 0,87 mg/L para el NAT y  $\text{N-NO}_2^-$  respectivamente, mientras que en el SBF los valores de NAT fueron fluctuando a lo largo del periodo experimental, incrementándose hasta llegar al pico más alto registrado el día 24 con un valor de 5,67 mg/L para luego bajar y estabilizarse a partir del día 28, luego del cual ya no presentan diferencias significativas entre los tratamientos SBF y CRA. Cavero *et al.* (2004) obtuvo que tras exponer a juveniles de *Arapaima gigas* durante 33 días aproximadamente a  $2,0 \text{ mg}^{-1}$  de amonio no ionizado (25 mg/L de amonio total) en condiciones de temperatura y pH constantes los peces continuaron alimentándose normalmente con un 100% de sobrevivencia. En el presente experimento en términos de amonio no ionizado se obtuvo un valor máximo de 0,37 mg/L lo que sugiere no ser tóxico para los juveniles de paiche.

Por otro lado, los valores de  $\text{N-NO}_2^-$  en SBF (0,79 mg/L) fueron significativamente más altos que los valores que se presentaron en CRA (0,28 mg/L). En SBF se observa una acumulación a partir del día 10, alcanzando el mayor valor promedio el día 21 con 1,63 mg/L. Estos altos niveles perduraron hasta el día 28, luego del cual los niveles de  $\text{N-NO}_2^-$  se estabilizaron y disminuyeron manteniéndose con una media de 0,43 mg/L hasta el final del experimento.



**Figura 2: Concentraciones de nitrógeno inorgánico en el periodo experimental. (A) nitrógeno amoniacal total (NAT); (B) nitrógeno en nitritos (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>); (C) nitrógeno en nitratos (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Media ± desviación estándar.**

En un reporte del Instituto de investigación de la Amazonía Peruana (IIAP, 2010) se mencionó para alevines de *Arapaima gigas* un valor de concentración letal media a 96h ( $CL_{50-96h}$ ) para nitritos ( $NO_2$ ) de 70,31 mg/L, equivalente en  $N-NO_2^-$  a 21,39 mg/L. Si a este valor se le calcula el nivel de seguridad o de no efecto (NOEL, por sus siglas en inglés, (*NO Effect Level*), que corresponde al 9% de la  $CL_{50}$  (Ashe *et al.*, 1996), se obtendría un valor de 1,93 mg/L. En la presente investigación para el tratamiento SBF se obtuvo un valor máximo registrado de 1,71 mg/L el cual estuvo 0,22 unidades por debajo del nivel máximo de seguridad. Cabe mencionar que durante los días en el que se presentó los niveles elevados de  $N-NO_2^-$  y NAT (5,70 y 1,71 mg/L) se presentó una mortalidad en la unidad T5 en el SBF del 22,22 %.

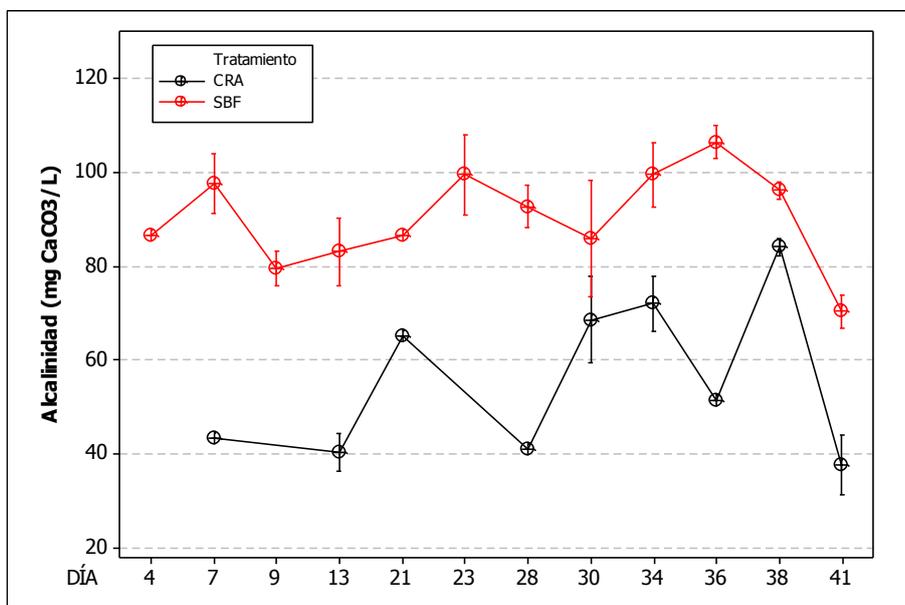
Los nitritos tienen un efecto tóxico, ya que cuando se presentan en niveles altos en el sistema de cultivo, inducen una variedad de alteraciones fisiológicas como la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina. Esta reacción produce anoxia en los peces debido a que la metahemoglobina es incapaz de transportar el oxígeno, causando así la mortalidad de los organismos en cultivo (Jensen, 2003).

En el SBF las concentraciones de NAT y  $NO_2-N$  pueden ser controladas de manera efectiva por la asimilación heterotrófica (mediante la asimilación por la biomasa microbiana) o por la nitrificación autótrofa (asimilación de NAT para convertirlo a nitrito y luego a nitrato) una vez que se establezca y se presente una comunidad madura en el biofloc (Xu *et al.*, 2015). Estos dos tipos de bacterias son diferentes en términos de la utilización del sustrato, la biomasa bacteriana que generan, los subproductos que producen y también por su velocidad de reproducción. Debido a que las bacterias nitrificantes presentan menor velocidad de reproducción necesitan alrededor de 30 días para su establecimiento en un sistema de cultivo, por lo que antes de ello existe una dominancia de parte de las bacterias heterotróficas (Timmons y Ebeling, 2010). En la Figura 2B se puede observar un cúmulo de nitritos del día 10 al día 28, que indicaría probablemente el establecimiento de bacterias nitrificantes.

En la Figura 2C también se observa que se presentó una leve acumulación de  $N-NO_3^-$  para los sistemas SBF y CRA durante los 28 primeros días de experimento. Esta baja acumulación de  $N-NO_3^-$ , posiblemente se debió a que el  $N-NO_3^-$  fue inmovilizado por la acción de las bacterias heterotróficas en el SBF (Luo *et al.*, 2014). Los valores más altos registrados para

SBF fueron de 22,40 mg/L y para CRA 16,21 mg/L, los cuales se registraron los días 28 y 30 respectivamente.

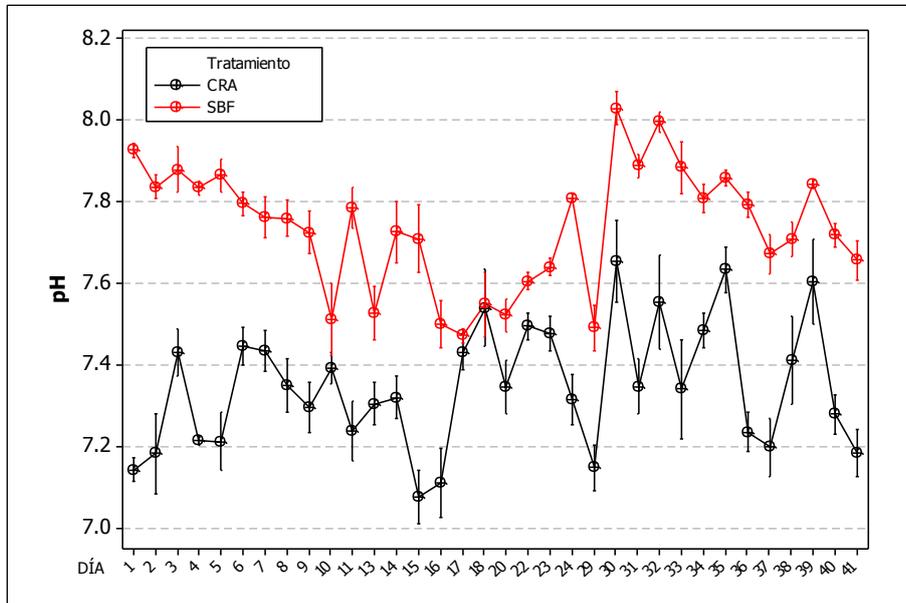
En la Tabla 5 se observa los valores para la alcalinidad (mgCaCO<sub>3</sub>/L). Presentándose diferencias significativas (p<0,05) entre ambos tratamientos. En la Figura 3 se observa que este parámetro fluctuó durante el experimento en los tanques de SBF y CRA por la tendencia de los sistemas a perder su capacidad buffer, por lo que hubo necesidad de adicionar frecuentemente bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) en ambos sistemas. La alcalinidad para SBF presentó una variación de 61,77 a 113,25 mgCaCO<sub>3</sub> /L, mientras que para CRA varió de 25,74 a 87,51 mgCaCO<sub>3</sub> /L (Figura 3). Debido al mayor suplemento de CaCO<sub>3</sub> en el sistema SBF para la corrección de la alcalinidad se produjo la diferencia significativa de alcalinidad respecto al tratamiento CRA, ocasionando a su vez las fluctuaciones en los valores de pH (Figura 4).



**Figura 3: Cambios de las concentraciones de alcalinidad (mgCaCO<sub>3</sub>/L) a lo largo del periodo experimental.** Media ± desviación estándar. Sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).

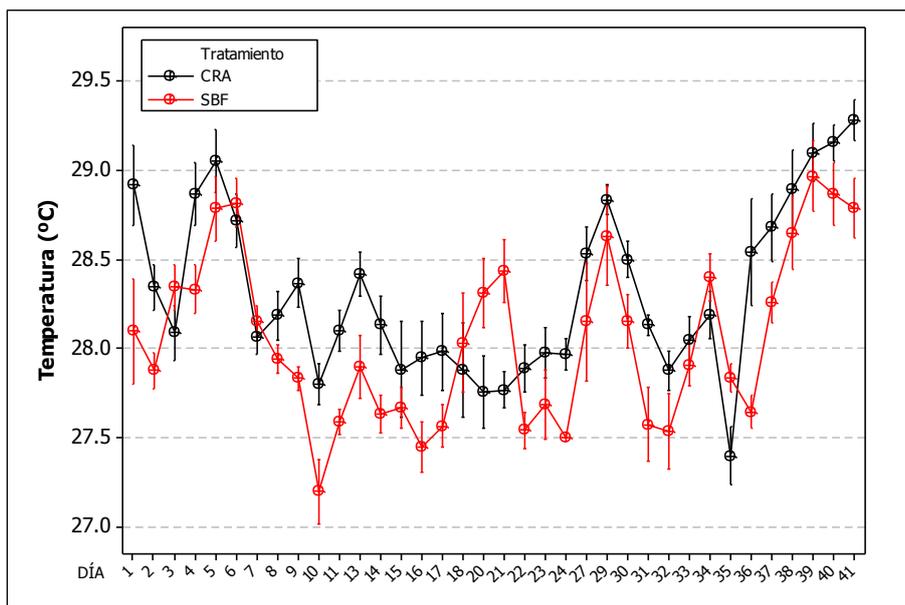
Los valores de pH observan en la Tabla 5 y Figura 4. Presentando diferencias significativas (p<0,05) entre los tratamientos SBF y CRA. El SBF presentó valores de pH cercanos a 7,75 mientras que en el CRA se mantuvieron alrededor de 7,35. Como se observa en la figura 4, durante las dos primeras semanas de cultivo existe una diferencia más marcada del pH entre

los tratamientos. Esto debido a que durante este periodo no se realizó una corrección de la alcalinidad en el CRA, pero debido a su gradual disminución se decidió agregarle bicarbonato de sodio a partir del día 15. Esta necesidad de agregar frecuentemente bicarbonato de sodio para mantener el pH aunada a la leve acumulación de nitratos nos evidencia que en ambos sistemas ocurre el proceso de nitrificación (Azim *et al.*, 2008).



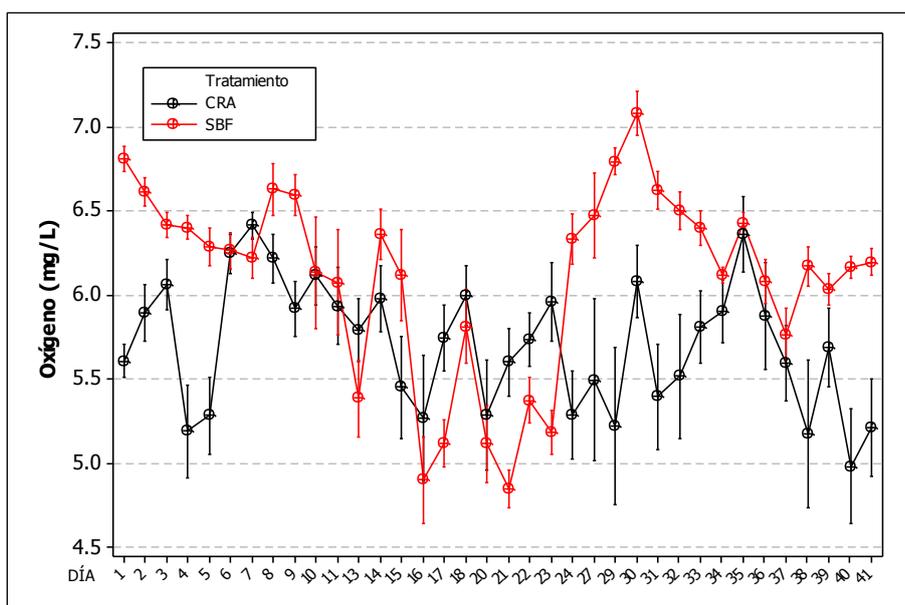
**Figura 4: Variación del pH durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).

En lo que respecta a la temperatura (Tabla 5) no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos. Con valores dentro del rango recomendable para el cultivo de *Arapaima gigas* durante el periodo experimental (Rebaza *et al.*, 1999). Las variaciones de temperatura se observan en la Figura 5, donde se tiene que para el SBF se registró un valor medio de 28,07 °C con un rango de variación de 26,60 a 29,60 °C y para el caso de CRA se registró una temperatura media de 28,280 °C con un rango que varió de 26,6 a 30,0 °C (Figura 5).



**Figura 5: Variación de la temperatura durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).

Los valores promedio de oxígeno disuelto (OD) se presentan en la Tabla 5 encontrándose que hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos SBF y CRA. La variación de OD registrados durante el periodo experimental se observan en la figura 6.



**Figura 6: Variación de las concentraciones de oxígeno disuelto (mg/L) a lo largo del periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA).

Se muestran valores promedio en el SBF de 6,08 y en el CRA de 5,73 mg/L. El OD presentó valores mínimos de 3,89 y 3,81 mg/L y valores máximos de 7,30 y 7,18 mg/L para SBF y RCA respectivamente. Esta variabilidad de datos del OD posiblemente se debió a que las piedras difusoras se obstruían con facilidad por lo que fue necesaria hacer la limpieza de éstas con una frecuencia de 2 veces al día. Sin embargo, *Arapaima gigas* es una especie de respiración aérea obligada por lo que posee una ventaja de no depender completamente del oxígeno disuelto, por tanto las concentraciones de OD no afectan el metabolismo de esta especie (Cavero *et al.*, 2003).

Así también se observa que entre los días 16 y 24 del experimento, se tuvieron las concentraciones más bajas de oxígeno disuelto (Figura 6). Esta caída de oxígeno disuelto concuerda por un lado con el aumento del nitrógeno amoniacal total (NAT) entre los días 13 y 24 del experimento (Figura 2A), y por otro lado con el pico máximo de la concentración de nitrógeno en nitritos (N- NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) entre los días 13 y 28 del experimento (Figura 2B). El proceso de estabilización del sistema con biofloc (SBF), implica una proliferación y dominio por una comunidad de bacterias heterotróficas las cuales requieren de oxígeno para realizar un funcionamiento normal de su metabolismo, Avnimelech (1999) recomienda que los SBF mantengan una concentración de OD por encima de 4-5 mg/L, ya que éste es necesario para el metabolismo de las bacterias y otros organismos. Por lo tanto, la estabilización jerárquica de las bacterias heterotróficas y la mayor concentración de sólidos pudieron también estar relacionados con la caída del oxígeno. Los SBF presentan picos de NAT y N- NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el periodo de estabilización del sistema, el cual dura aproximadamente 20 días (Azim y Little, 2008; Luo *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2015), evidenciando que el comportamiento de la concentración de NAT y N- NO<sub>2</sub><sup>-</sup> estuvieron acorde con el proceso de inmovilización del nitrógeno en el SBF asociados a los bioflóculos.

#### **4.2 Composición química proximal del biofloc y la carcasa de juveniles de *A. gigas***

En la Tabla 6 se muestran los resultados del análisis químico proximal de la carcasa de los juveniles de paiche *Arapaima gigas*. Se observa que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). Aun así cabe mencionar que los juveniles procedentes del SBF presentaron niveles numéricamente mayores de proteína total (62,94 %) y grasa con (14,35 %), comparado a los

valores encontrados en CRA en donde se presentaron valores de 62,02 y 13,35 para proteína total y grasa respectivamente. Así también Luo *et al.* (2014) encontraron valores relativamente más altos de proteína (80,25 %) y lípidos (4,2 %) en tilapias *Oreochromis niloticus* cultivadas en sistema biofloc comparadas con el grupo control cultivados en sistema de recirculación (RAS) con 79,72 por ciento de proteína y 4,69 por ciento de lípidos. Mientras que Xu *et al.* (2012) también encontraron mayor porcentaje de proteína (18,78 %) y lípidos (1,96 %) en *L. vannamei* cultivados en SBF respecto al control.

**Tabla 6: Composición químico proximal (%) del biofloc y de la carcasa de los juveniles de *Arapaima gigas*.**

Nutriente	Biofloc	Carcasa de los juveniles de paiche	
		SBF	CRA
Humedad, %	6,96	7,31 + 0,68 <sup>a</sup>	7,08 + 0,13 <sup>a</sup>
Proteína total (Nx6.25), %	37,83	62,94 + 0,58 <sup>a</sup>	62,02 + 1,65 <sup>a</sup>
Grasa, %	0,58	14,35 + 1,09 <sup>a</sup>	13,35 + 0,99 <sup>a</sup>
Ceniza, %	18,16	13,54 + 0,42 <sup>a</sup>	13,70 + 2,15 <sup>a</sup>
Extracto libre de nitrógeno, (ELN), %	36,47	2,93 + 0,61 <sup>a</sup>	2,78 + 0,27 <sup>a</sup>

Media ± desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

Así también en la Tabla 6 se presenta la composición proximal del biofloc procedente del tratamiento SBF donde se tiene que el porcentaje de proteína cruda que presentaron los bioflóculos al final del experimento fue de 37,83 por ciento. Valores similares fueron reportados por varios autores (Long *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2014 y Xu *et al.*, 2012) quienes reportaron valores de 41,13; 30,90 y 31,6 % de proteína. Generalmente los requerimientos

proteicos en peces piscívoros como el caso del paiche, varían entre 30 a 55% (NRC, 1993), aunque los mejores resultados para el cultivo de estadios tempranos de *Arapaima gigas* han sido obtenidos con un contenido de proteína de 40-45 por ciento (Chu-Koo *et al.*, 2007, NRC, 1993, Ituassú *et al.*, 2005). En cuanto al contenido de lípidos, el biofloc presentó un valor muy bajo de 0,58 por ciento. Este bajo porcentaje de lípidos en biofloc también fue reportado por otros autores en el cultivo de *Oreochromis niloticus*, así tenemos a Long *et al.* (2015) quien reportó valores de 1,03 por ciento y Luo *et al.* (2014) 1,27 por ciento, aunque otros trabajos reportaron niveles de 2 a 5 por ciento de lípidos (Azim y Little, 2008; Azim *et al.*, 2008 y Crab *et al.*, 2010).

En cuanto a la ceniza, ésta presentó un valor de 18,16 por ciento, el cual es mucho mayor a lo reportado por Long *et al.* (2015) en el cultivo de *Oreochromis niloticus* quienes obtuvieron un valor de 6,07 por ciento y mucho menor a lo reportado por Xu *et al.* (2012), en el cultivo de *Litopenaeus vannamei* quienes reportaron un valor de 49,4 por ciento. El porcentaje de cenizas presentes en los bioflóculos se relaciona al contenido inorgánico o mineral de la muestra. Azim *et al.* (2008) reportaron un aumento en el contenido de cenizas con el aumento de la proteína en la dieta, y mencionaron que la presencia de bioflóculos estimula la acumulación de grasa y cenizas en la carcasa de las tilapias.

Como se observa, los valores reportados en la composición químico proximal del biofloc muestran un valor muy bajo de lípidos respecto a lo requerido por peces carnívoros, y en cuanto al extracto libre de nitrógeno presenta un valor muy alto respecto a lo requerido por peces carnívoros. Bajo estas premisas se podría asumir que los bioflóculos podrían no ser nutricionalmente adecuados para los juveniles de paiche. Desde ese punto de vista, Avnimelech (2009) encontró que la composición bromatológica de los bioflóculos no es constante o única sino que varía y que el uso del biofloc como fuente alimenticia dependerá principalmente de los hábitos alimenticios de la especie, así como del tamaño y densidad de la partícula del biofloc.

Sin embargo, Xu *et al.* (2013) señalaron que un menor factor de conversión alimenticia (FCA) de los organismos cultivados en sistema biofloc no se asocia únicamente a la obtención de nutrientes por parte del uso de los bioflóculos como fuente de alimento. Varias investigaciones informaron que el biofloc contiene compuestos bioactivos como enzimas

exógenas, las cuales pueden tener un efecto positivo sobre la capacidad enzimática digestiva del animal cultivado. Este hecho puede ser beneficioso para el crecimiento de los organismos cultivados en este sistema (Ju *et al.*, 2008).

### 4.3 Parámetros enzimáticos

#### 4.3.1 Proteína soluble del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

En la Tabla 7 y Figura 7 se muestran los valores de la proteína soluble presente en el homogenizado del tracto intestinal de los juveniles de *Arapaima gigas*. Los valores de proteína soluble no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), durante el periodo experimental entre los tratamientos: sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). Sin embargo cabe mencionar que al final del experimento el valor de la proteína soluble fue numéricamente mayor en SBF (48,66 mg/ml) en comparación con el 46,57 mg/ml encontrado en paiches del CRA.

**Tabla 7: Valores de la proteína soluble (mg/ml) de juveniles de *Arapaima gigas* al inicio, mitad y final del experimento.**

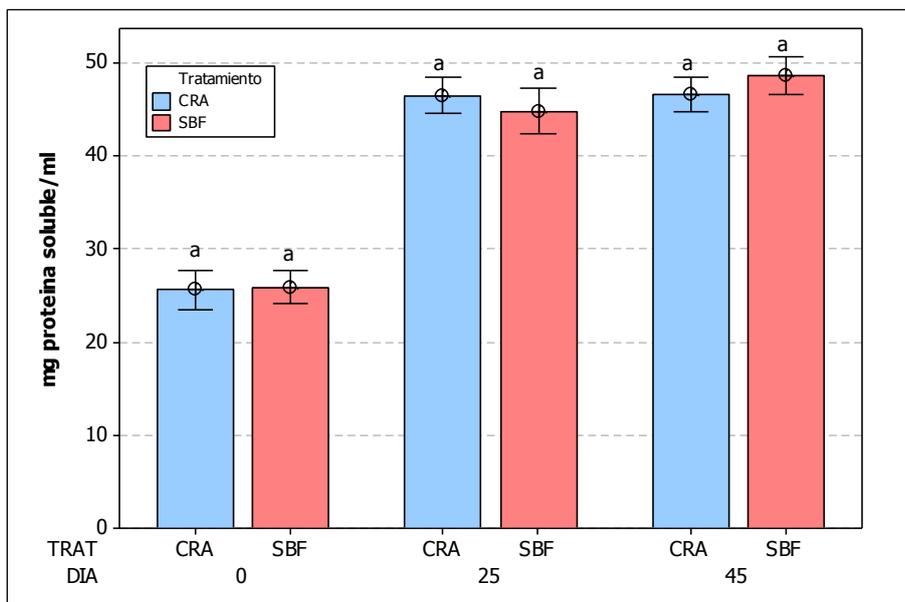
	INICIO	MITAD (25 días)		FINAL (45 días)	
	(0 días)	SBF	CRA	SBF	CRA
Proteína soluble (mg/ml)	25,61 ± 4,69	44,77 ± 14,51 <sup>a</sup>	46,45 ± 11,30 <sup>a</sup>	48,66 ± 13,68 <sup>a</sup>	46,57 ± 12,59 <sup>a</sup>

Media ± desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

Así también en la Figura 7 se puede observar un aumento significativo de la proteína soluble del día 0 al día 25, presentándose un incremento del valor inicial de 25,61 a 44,77 mg/ml para el SBF y 46,45 mg/ml para CRA. Sin embargo, del día 25 al día 45 se presentó un incremento numérico aunque no significativo para el SBF con valores finales de 48,66; mientras que para CRA fue de 46,57 mg/ml.

Como se sabe la medición de la actividad enzimática específica esta expresada en base a la proteína soluble; por lo tanto es importante conocer la relación que sigue este parámetro con

respecto al crecimiento de los peces ya que de esto dependerá el patrón que seguirá la actividad específica de las enzimas digestivas (Le Moullac *et al.*, 1994).

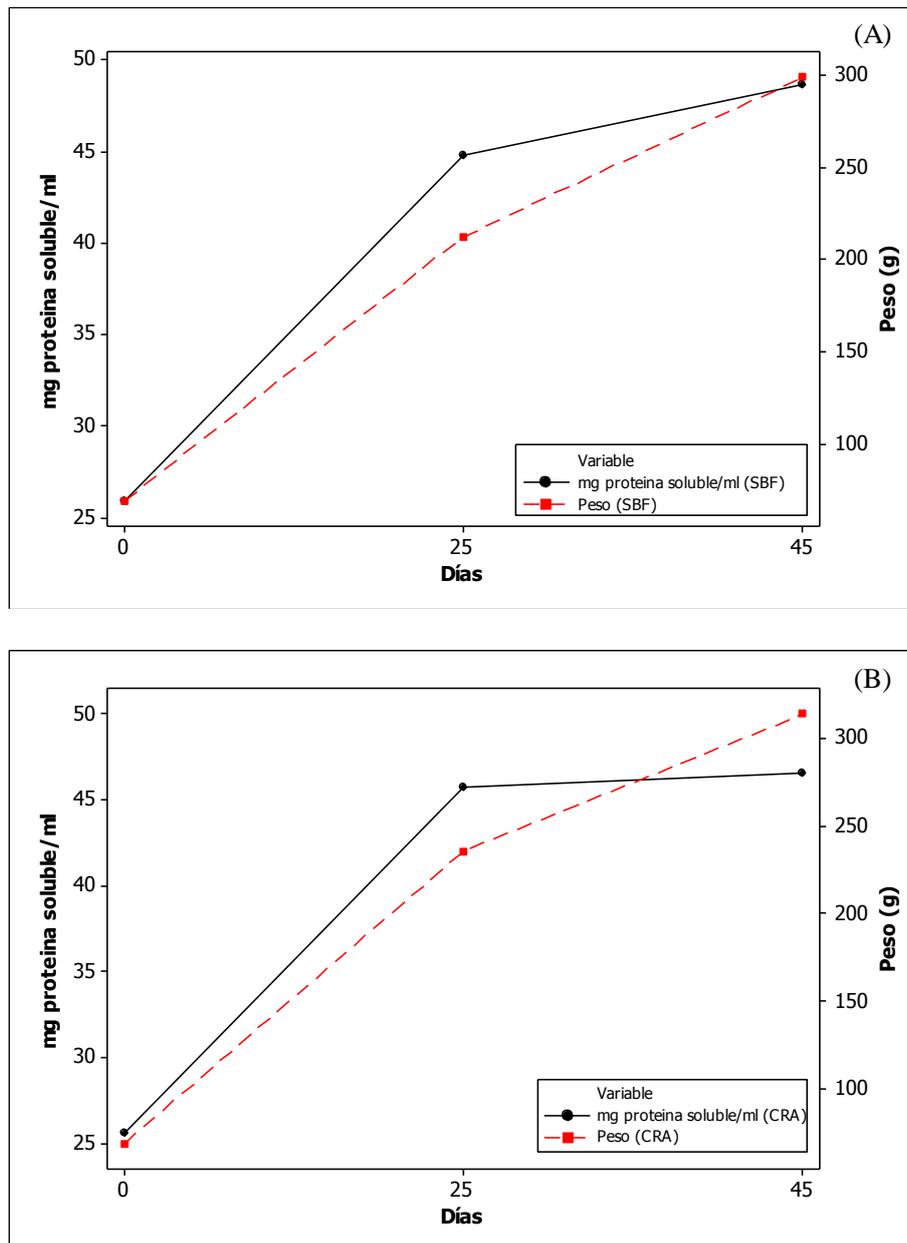


**Figura 7: Proteína soluble (mg/ml) en el extracto enzimático del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media ± desviación estándar.

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

En la Figura 8 (A y B) se muestra la relación entre los valores de la proteína soluble (mg/ml), con la ganancia de peso corporal para el tratamiento SBF y para el tratamiento CRA. En el presente experimento se determinó un aumento significativo de la proteína soluble relacionada a la ganancia de peso corporal de los juveniles de *Arapaima gigas*. Se puede observar que conforme aumenta el peso (g) de los juveniles, aumentan los valores de la proteína soluble, sin embargo este incremento se hizo menos evidente del día 25 al 45, lo que está relacionado a la menor tasa de crecimiento mostrado por los juveniles. El incremento de la concentración de proteína soluble con respecto al peso se puede explicar que es debido a que cuando un organismo va creciendo, también incrementan su masa y volumen tisular lo que se expresaría en un incremento del contenido corporal en proteína soluble (Cara *et al.*, 2002). En el presente experimento no se presentaron diferencias significativas en el crecimiento de los juveniles de *Arapaima gigas* entre los tratamientos

SBF y CRA por lo que no se evidenció una diferencia significativa en cuanto a proteína soluble entre estos.



**Figura 8: Relación entre la proteína soluble y peso de juveniles de *Arapaima gigas* al inicio, mitad y final del experimento: (A) sistema con biofloc SBF y (B) sistema con recambio de agua CRA.**

### 4.3.2 Actividad enzimática digestiva de los juveniles de *Arapaima gigas*.

En la Tabla 8 se muestran los valores que corresponden al inicio (0 días), mitad (25 días) y final del experimento (45 días) de la actividad enzimática específica de las proteasas totales, tripsina, quimiotripsina, amilasas y lipasas, expresadas en unidades por miligramo de proteína soluble del tracto intestinal de juveniles de *Arapaima gigas* para los tratamientos: sistema con biofloc (SBF) y sistema sin biofloc con recambio de agua (CRA).

**Tabla 8: Valores de la actividad enzimática digestiva de los juveniles de *Arapaima gigas* al inicio, mitad y final del experimento.**

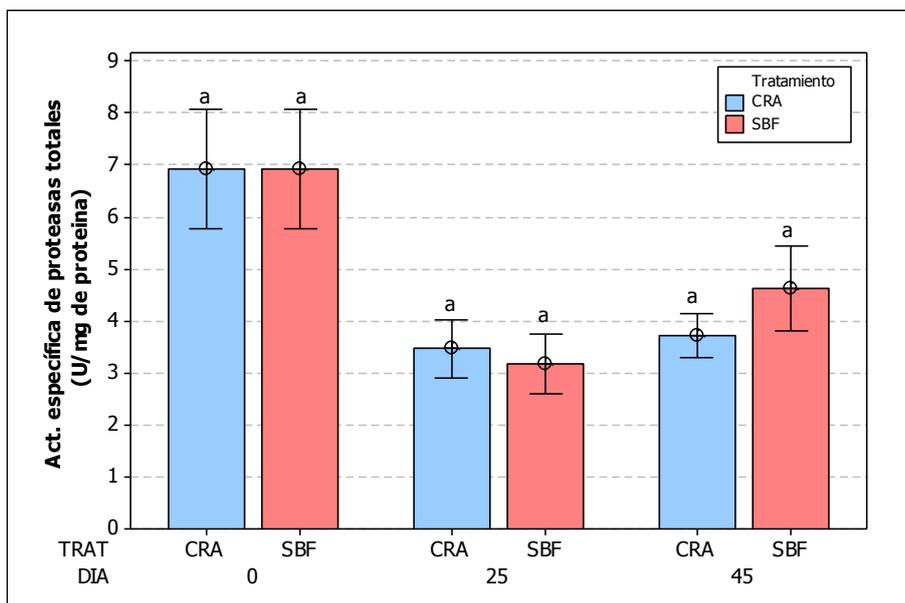
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA	INICIO (0 días)	MITAD (25 días)		FINAL (45 días)	
		SBF	CRA	SBF	CRA
Proteasas (U/mg proteína)	6,92 ± 2,32	3,19 ± 3,26 <sup>a</sup>	3,47 ± 3,20 <sup>a</sup>	4,62 ± 5,49 <sup>a</sup>	3,72 ± 2,83 <sup>a</sup>
Tripsina (mU/mg proteína)	0,70 ± 0,03	0,73 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,29 <sup>a</sup>
Quimiotripsina (mU/mg proteína)	0,20 ± 0,10	0,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,37 <sup>a</sup>
Lipasas (U/mg proteína)	2,24 ± 1,08	1,44 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,67 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,55 <sup>b</sup>
Amilasas (U/mg proteína)	0,07 ± 0,05	0,04 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>b</sup>

Media ± desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

#### a) Actividad específica de las proteasas totales (U/mg proteína soluble)

Los valores de proteasas totales del tracto intestinal de los juveniles de *Arapaima gigas* se muestran en la Tabla 8 y Figura 9. No se observó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) a lo largo del periodo experimental entre los tratamientos SBF y CRA; sin embargo al final del experimento (día 45) se observa una actividad numéricamente mayor de proteasas en el

tratamiento SBF con respecto al tratamiento CRA. Observando el comportamiento de los valores de la actividad específica de las proteasas a lo largo del periodo experimental se ve que ambos tratamientos presentaron una disminución significativa del día 0 al día 25 de 6,92 (U/mg de proteína) a 3,19 (U/mg de proteína) en el SBF y 3,47 (U/mg de proteína) para el CRA. Sin embargo del día 25 al día 45 se presentó un incremento numérico aunque no significativo presentándose valores finales de 4,62 y 3,72 (U/mg de proteína) para SBF y CRA respectivamente.



**Figura 9: Actividad específica de proteasas totales (U/mg de proteína) en el tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

La eficiencia en la utilización de la proteína depende en parte del proceso digestivo en sí. Las proteasas juegan el papel central en la digestión de proteínas al hidrolizarla en sus aminoácidos constituyentes dentro del tracto digestivo. La digestión de las proteínas comienza usualmente por la segregación de pepsina (en el estómago), siendo completada por la segregación de proteasas alcalinas (en el intestino), tales como tripsina y quimiotripsina (Sabapathy y Teo, 1993).

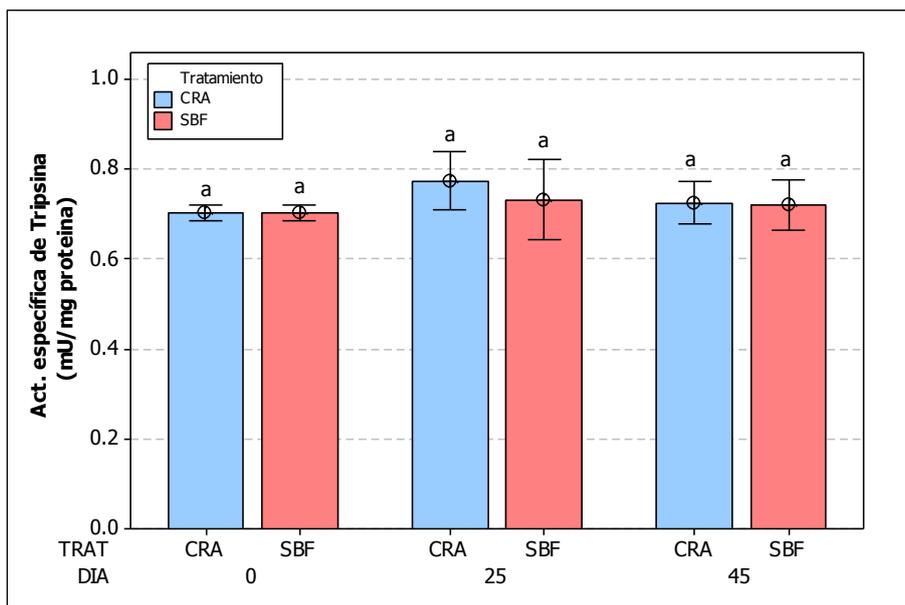
Por lo general, la actividad de las proteasas depende de la composición de la dieta y tiende a ser más altas en peces carnívoros mientras que las amilasas son más activas en los peces

herbívoros y omnívoros (Lazzari *et al.*, 2010). Los valores obtenidos de la actividad específica de las proteasas fueron mayores a los valores reportados por otros autores para peces carnívoros como para el besugo (*Sparus aurata* L.), trucha (*Oncorhynchus mykiss* W.), anguila (*Anguilla anguilla* L.) que presentaron valores de proteasas 0,81; 3,44 y 0,46 (U/mg de proteína) respectivamente (Hidalgo *et al.*, 1999). También se obtuvo mayores valores a los obtenidos por Xiong *et al.* (2011) en el pez carnívoro *Glyptosternum maculatum* en el que en el intestino anterior, posterior y medio obtuvieron valores de 3,18; 1,76 y 1,52 (U/mg de proteína) respectivamente.

En general la elevada actividad enzimática mostrada al inicio del experimento puede deberse a tres factores principales: primero a la respuesta de la ingesta (comportamiento alimenticio), debido a que antes de colectar a los juveniles pertenecientes al primer muestreo, estos estaban siendo alimentados a saciedad con una tasa de alimentación que variaba del 2,5 al 5%; también pudo deberse a que existe una mejor utilización de la proteína en los individuos de menor tamaño tal como lo menciona Cara *et al.* (2002).

#### **b) Actividad específica de Tripsina (mU/mg proteína soluble)**

Los valores de tripsina del tracto intestinal de los juveniles de *Arapaima gigas* se muestran en la Tabla 8 y Figura 10. No se observó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) a lo largo del periodo experimental entre los tratamientos: sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). Por otro lado en cuanto al comportamiento de la actividad enzimática específica de la tripsina esta se mantuvo estable en ambos tratamientos a lo largo del periodo experimental, presentando valores iniciales (día 0) de 0,76 (mU/mg proteína soluble); el día 25 presentó valores de 0,70 (mU/mg proteína soluble) para SBF y 0,77 (mU/mg proteína soluble) para CRA. Estos valores se mantuvieron sin cambio significativo hasta el final del experimento con valores de 0,72 y 0,73 (mU/mg proteína soluble) para SBF y CRA respectivamente.



**Figura 10: Actividad específica de Tripsina en el tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

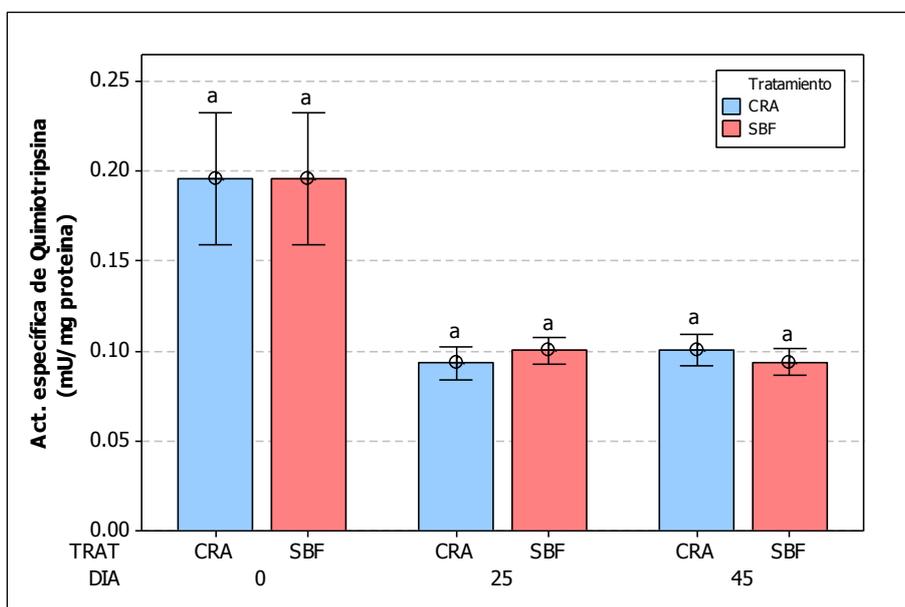
En el intestino de los peces con presencia de estómago se completa la digestión de las proteínas mediante la segregación de proteasas alcalinas como tripsina y quimiotripsina. Las que son las principales enzimas digestivas secretadas por el páncreas en la parte anterior del intestino. Son las más estudiadas porque participan en la digestión de proteínas en todos los animales tanto terrestres como acuáticos (Mathews y Van Holde, 1998). Dentro de éstas, la tripsina es la más importante porque interviene en un 50 a 60% de la hidrólisis proteica (Galgani *et al.*, 1984). En el presente experimento el extracto intestinal presentó una actividad de tripsina hasta 70 veces mayor a la de quimiotripsina (Tabla 8) en ambos tratamientos, reafirmando la actividad proteolítica de esta especie.

La actividad de tripsina y quimiotripsina se puede utilizar para la predicción de la calidad de las proteínas de la dieta o la capacidad digestiva del organismo, lo que a su vez puede conducir a diferenciar las tasas de crecimiento. Las mayores actividades de proteasas alcalinas están registrados en peces alimentados con una dieta con fuentes de proteína de origen animal, así también se ha demostrado que la tripsina tiene una relación directa con la tasa de crecimiento en especies como el bacalao del Atlántico y el salmón del atlántico

(Sunde *et al.*, 2004). En el presente experimento no se encontró una relación directa entre la actividad de tripsina del paiche y la TCE, ya que la TCE va disminuyendo con el tiempo (Figura 16) y la actividad de tripsina se mantiene constante a lo largo del periodo experimental.

**c) Actividad específica de Quimiotripsina (mU/mg proteína soluble)**

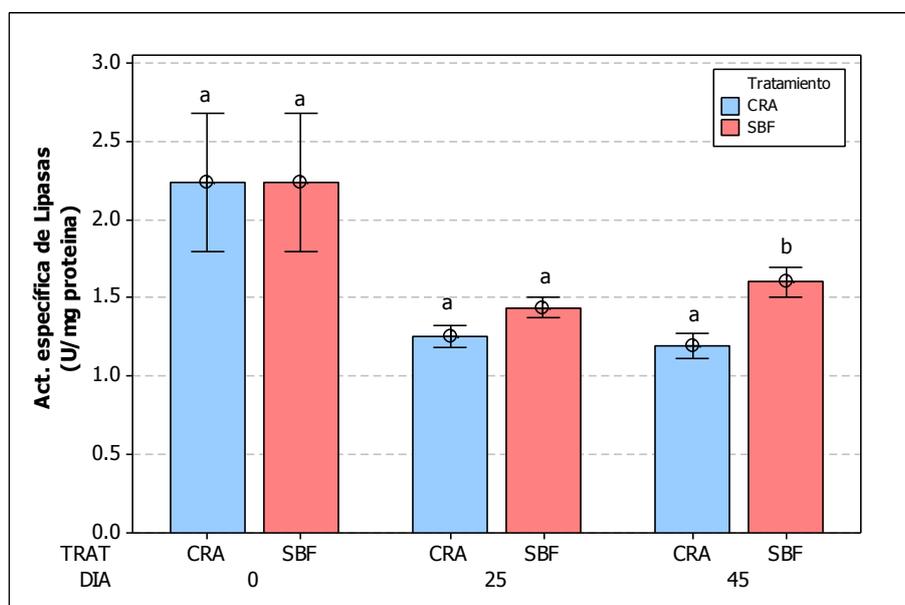
En la Tabla 8 y Figura 11 se muestra los valores de quimiotripsina del tracto intestinal de los juveniles de *Arapaima gigas*. Se observa que no se tuvo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) durante el periodo experimental entre los tratamientos. Sin embargo esta actividad tuvo un comportamiento similar al de las proteasas alcalinas totales, es decir, presentando mayores valores en el día 0 con 0,20 (mU/mg proteína soluble) para ambos sistemas, disminuyendo significativamente al día 25 con valores de 0,10 para SBF y 0,09 (mU/mg proteína soluble) para CRA y manteniéndose estos valores sin una alteración significativa hasta el final del experimento con valores de 0,09 y 0,10 (mU/mg proteína soluble) para SBF y CRA respectivamente.



**Figura 11: Actividad específica de Quimiotripsina (mU/mg proteína soluble) en el tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

#### d) Actividad específica de Lipasas

En la tabla 8 y Figura 12 se muestra los valores de la actividad enzimática específica de lipasas en el tracto intestinal de los juveniles de *Arapaima gigas*. No se tuvo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) durante el periodo experimental entre los tratamientos: sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). Sin embargo al final del experimento (día 45) se presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos con el mayor valor de 1,60 (U/mg proteína soluble) para SBF y un menor valor de 1,20 (U/mg proteína soluble) para CRA. Al inicio del experimento se observó el mayor valor de la actividad enzimática de lipasas con un valor de 2,24 para ambos tratamientos, al igual que los valores de proteasas este valor alto puede deberse a que antes de comenzar el experimento los peces tenían diferente tasas de alimentación y también presentaron menores valores de proteína soluble (Cara *et al.*, 2002).



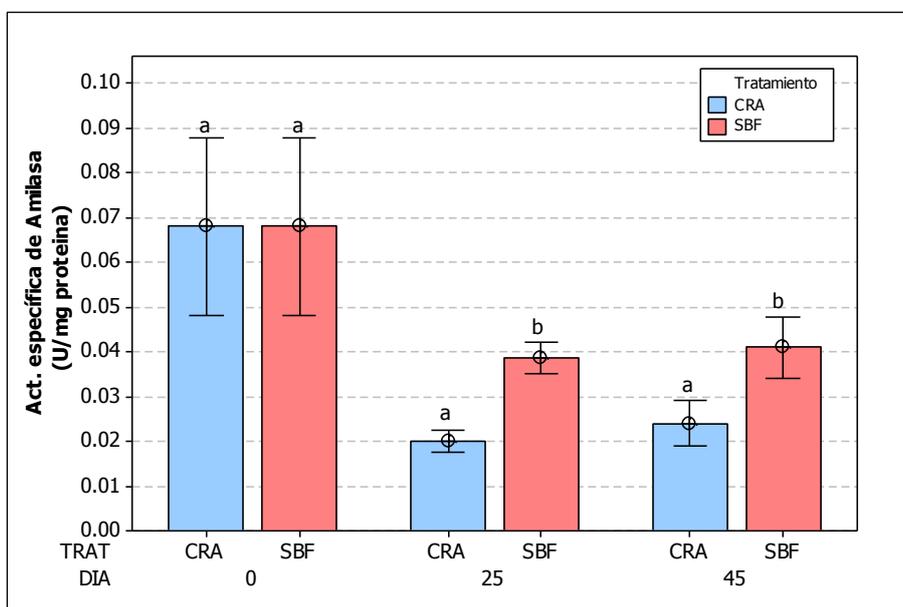
**Figura 12: Actividad específica de Lipasas en el tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

Se sabe que las lipasas son de origen pancreático, resultado de la secreción de las enzimas pancreáticas hacia la mucosa intestinal. Sin embargo Olsen y Ringoe (1997) encontraron actividad de lipasas en el bagre africano (*Clarius gariepinus*) y la carpa (*Ctenopharyngodon*

*idella*), después de 24 y 48 horas de inanición respectivamente, con lo cual indican que no se puede excluir que la actividad lipolítica sea de origen bacteriano. En el presente experimento se tuvieron valores similares de lipasa a los obtenidos por Xiong *et al.* (2011) quienes obtuvieron valores de lipasas en el intestino anterior de 0,83, en la parte media 0,48 y en la parte posterior del intestino 0,51 (U/mg proteína) para el pez carnívoro *Glyptosternum maculatum* cultivado en aguas claras.

#### e) Actividad específica de Amilasas

En la Tabla 8 y Figura 13 se muestran los valores de la actividad enzimática específica de la amilasa en el tracto intestinal de los juveniles de *Arapaima gigas*. No se tiene diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ) a los 0 días de experimento entre los tratamientos: sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). Sin embargo a mitad (25 días) y final (45 días) del experimento (día 45) se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos favoreciendo a la actividad enzimática del tratamiento SBF.



**Figura 13: Actividad específica de Amilasas en el tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc.

En la Figura 13 se observa que los valores iniciales de amilasas fueron de 0,07 (U/mg proteína soluble) para ambos tratamientos, este valor se reduce significativamente al día 25 con valores de 0,04 para SBF y 0,02 (U/mg proteína soluble) para CRA, mientras que en el día 45 la actividad específica de amilasas incrementa numéricamente para SBF y CRA con un valores de 0,04 y 0,02 (U/mg proteína soluble) respectivamente.

Los valores de amilasas obtenidos en el presente experimento fueron mayores a los obtenidos en el pez carnívoro *Glyptosternum maculatum* por Xiong *et al.* (2011) quienes reportaron valores de amilasa de 0,0062 y 0,0023 U/mg proteína en el intestino anterior y medio respectivamente, pero fueron menores a los reportados por Long *et al.* (2015) en *Oreochromis niloticus* en el que se encontraron valores de 0,1 a 0,3 U/mg proteína. Los valores de actividad específica de amilasas también fueron menores a los valores reportados por Hidalgo *et al.* (1999) quienes para otros peces carnívoros como para el besugo (*Sparus aurata* L.), trucha (*Oncorhynchus mykiss* W.), anguila (*Anguilla anguilla* L.) obtuvieron valores de amilasas 1,75; 1,30 y 1,40 (U/mg de proteína) respectivamente.

El estudio de las enzimas digestivas es esencial para la comprensión del mecanismo de la digestión y cómo los organismos se adaptan a los cambios en el entorno nutricional. La actividad de las enzimas digestivas de los peces está asociada al hábito de alimentación innato, la composición de la dieta y factores como la edad, el pH, y la temperatura y las características anatómicas- fisiológicas. Por lo general, la actividad de las proteasas es más alta en peces carnívoros mientras que las amilasas son más activas en los peces herbívoros y omnívoros. Esto estaría acorde con lo encontrado en el presente experimento en el que el paiche al tratarse de un pez carnívoro presentó una mayor actividad de proteasas, seguida de una actividad media de lipasas y una baja actividad de amilasas. Estos niveles inferiores de amilasa podrían ser indicativos de un limitado potencial de los peces carnívoros para asimilar las dietas con altos niveles de carbohidratos (Lazzari *et al.*, 2010).

### 4.3.3 Actividad enzimática extracelular o exógena del agua de cultivo.

Los valores de la actividad enzimática específica extracelular o exógena de proteasas, lipasas y amilasas presentes en el agua de cultivo de los tratamientos: sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA), luego de un periodo de 45 días se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9: Actividad enzimática extracelular del agua de cultivo en el SBF y CRA luego de 45 días experimentales.**

Actividad enzimática específica	INICIO (0 días)	Mitad (25 días)		Final (45 días)	
		SBF	CRA	SBF	CRA
Proteasas (U/mg SST)	ND	ND	ND	3,54 ± 1,96	ND
Lipasas (U/mg SST)	ND	ND	ND	8,65 ± 1,49	ND
Amilasas (U/mg SST)	ND	ND	ND	26,26 ± 9,70	ND

Media ± desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). SBF, sistema con biofloc. ND=no detectados.

Como se puede observar en el día 45 del experimento se encontró la presencia de las enzimas exógenas de proteasas (3,54 U/mg SST), lipasas (8,65 U/mg SST) y amilasas (26,26 U/mg SST) en el tratamiento SBF, mientras que en el tratamiento CRA, no se detectó la presencia de actividad enzimática. La evaluación de la actividad enzimática exógena se realizó al igual que la actividad enzimática digestiva en tres periodos de muestreo (0, 25 y 45 días). Sin embargo a la hora de realizar los ensayos enzimáticos correspondientes a los 0 y 25 días, los valores estuvieron muy por debajo del rango perceptible por los equipos, por ello es que no se presentan resultados de actividad enzimática extracelular para esos días (ND). Al respecto se puede mencionar que los parámetros de calidad de agua (Figura 2), del SBF se desestabilizaron del día 21 al día 28, lo que probablemente ocasionó que la comunidad de microorganismos antes de este periodo fuese muy fluctuante y escasa, lo que pudo haber influido en una menor concentración de enzimas extracelulares, al encontrarse estos en menor proporción. Situación similar se presentó al inicio del experimento (0 días) donde el SBF aún no se encontraba estabilizado.

Las enzimas digestivas en peces se producen en varios órganos tales como el estómago, páncreas, y las paredes del intestino. Sin embargo, las enzimas también pueden provenir del alimento vivo o de las bacterias que conforman o ingresan a la flora intestinal. Es por ello que es importante distinguir entre las enzimas endógenas y exógenas, las primeras son sintetizadas por los propios animales en este caso por los juveniles de paiche, los segundos son sintetizados por la flora intestinal residente en el tracto digestivo o se pueden obtener por liberación de microorganismos lisados u obtenidos a través de los alimentos ingeridos (Harris., 1993). Varios estudios realizados por diferentes autores informan que el aporte de las enzimas exógenas a la actividad enzimática total está dentro de un rango de 0,6 al 10% (Lazo, 2000); Aunque este aporte por partes de las enzimas exógenas puede llegar a ser mayor dependiendo del grado de eutrofización y de los microorganismos presentes en el medio ambiente en el que habite. Así Filippov *et al.* (2013) reportaron una mayor actividad de proteasas digestivas en peces capturados de ambientes eutróficos frente a los que provenían de los ambientes oligotróficos. En otro estudio en el que se quería comprobar si la actividad enzimática digestiva del bagre *Pimelodus maculatus* difería entre el estado trófico del medio ambiente, se encontró una mayor actividad de  $\beta$ -glucosidasa hepática y quimiotripsina intestinal en los peces provenientes de ambientes eutróficos (Duarte, Bemquerer y Araújo, 2015).

En el presente experimento se observó una actividad significativamente mayor de lipasas y amilasas al final del experimento en el tracto intestinal de los paiches cultivados en SBF respecto a los cultivados en CRA, la actividad enzimática significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) de amilasas y lipasas y la actividad numéricamente mayor de proteasas de los juveniles de *Arapaima gigas* criados en el sistema con biofloc (SBF), posiblemente se deba a que los juveniles hacen uso de los bioflóculos como fuente de alimento, que tal como se mencionó anteriormente se encontraron partículas de biofloc, en las disecciones del tracto digestivo, aunque en la Tabla 6 se observa que en el análisis proximal de los bioflóculos que estos presentaban un nivel de proteínas (37,83 %) y lípidos (0,58%) por debajo de los requerimientos nutricionales de los juveniles, y un valor elevado de extracto libre de nitrógeno ELN (36,47%).

El valor elevado de ELN no sería el motivo del aumento de la actividad enzimática de amilasas en el intestino de los juveniles de paiche, debido a que se conoce que los peces

carnívoros utilizan menos eficientemente los carbohidratos respecto a los herbívoros y omnívoros (Lassari *et al.*, 2011) y que la secreción de amilasas se reduce cuando la concentración de almidón es elevada en la dieta (Spannhof y Planikow, 1983).

Entonces es posible que este aumento en la actividad de amilasas fue dada por un aporte enzimático exógeno proveniente de los microorganismos asociados a los bioflóculos, puesto que en el análisis enzimático extracelular de los bioflóculos (Tabla 9) se encontró una actividad enzimática alta de las amilasas (26,26 U/mg SST), lo que podría explicar el aumento de la amilasa intestinal en los juveniles de *Arapaima gigas* (Tabla 8). Por otra parte también se obtuvo un valor relativamente alto en lipasas exógenas (8,647 U/mg SST) lo que puede explicar el aumento de la lipasa en el tracto digestivo (Tabla 8).

Esta contribución es especialmente importante en el caso de que estas enzimas adquiridas también podrían funcionar eficazmente en el tracto digestivo de los juveniles de paiche después de ingresar al tracto digestivo y servir como un suplemento exógeno de enzimas que le permitieron tener una función digestiva más efectiva. Esto está refrendado por otros autores los cuales indican que algunas especies de bacterias son capaces de producir enzimas exógenas que pueden estimular la producción de enzimas endógenas en peces y crustáceos (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009; Becerra-Dorame *et al.*, 2012 citados por Nevejan *et al.*, 2016).

En un cultivo de juveniles de *Litopenaeus vannamei* en sistema biofloc Xu *et al.*, (2012) encontraron actividad enzimática extracelular de proteasas y amilasas en los bioflóculos, así mismo mencionaron que las enzimas extracelulares sintetizadas por los microorganismos correspondientes al biofloc serían liberados en el tracto digestivo después de ser ingeridos por los juveniles de *Litopenaeus vannamei* y estas enzimas adquiridas aportan por lo menos una parte del total de las actividades de las enzimas proteasas y amilasas. También podría ser que los bioflóculos ingeridos pudieran contener algunos compuestos bioactivos potentes que podrían mejorar las actividades de las enzimas digestivas en el tracto digestivo de los juveniles de paiche *Arapaima gigas*, tal como lo menciona Xu *et al.* (2013) para el cultivo de *Litopenaeus vannamei* en sistema de cero recambio de agua.

Algunos autores encontraron que flóculos de lodo similar al biofloc, contenían enzimas extracelulares tales como proteasas y amilasas (Yu *et al.*, 2007 y Yu *et al.*, 2009 citados por

Xu *et al.*, 2013) y mencionan que a medida que estas enzimas microbianas puedan ayudar a descomponer las proteínas, hidratos de carbono y otros ingredientes nutricionales en unidades mas pequeñas, los biofloc presumible podrían facilitar la digestibilidad y absorción del alimento.

Igualmente otros autores mencionan que las bacterias que se encuentran en los cultivos, pueden metabolizar nutrientes que el hospedero no podría, tales como celulosa, lignina y convertirlos en productos como ácidos grasos de cadena corta, o pueden suplementar enzimas que mejoran la capacidad digestiva del hospedero (Becerra-Dorame *et al.*, 2012 citado por Nevejan *et al.*, 2016). Los resultados de la presente investigación concuerda con los de Najderamiet *et al.* (2015) quienes experimentaron con alevinos de *Cyprino carpio*, utilizando diferentes tasas de alimentación para propiciar la ingesta parcial del biofloc, concluyendo que los flóculos microbianos estimularon la actividad enzimática proteolítica mejorando la utilización del alimento y el crecimiento de las carpas.

Sin embargo si observamos los parámetros productivos no se ven diferencias significativas entre los tratamientos, esto se puede deber a que existe una mejor digestión pero no necesariamente una mejor absorción del alimento consumido, esto también pudo deberse al efecto que presento la calidad de agua sobre los parámetros productivos. En este orden de ideas y con los resultados obtenidos en el presente trabajo se confirmaría los efectos beneficiosos del biofloc en la actividad enzimática digestiva de los juveniles de paiche.

#### **4.4 Parámetros de producción**

En la Tabla 10 se muestran los resultados de los parámetros productivos de los paiches criados bajo los tratamientos con el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA). Se observa que no se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p>0,05$ ) entre los tratamientos a lo largo del periodo experimental.

**Tabla 10: Valores de los parámetros productivos en juveniles de *Arapaima gigas*, en el sistema con biofloc (SBF) y sistema con recambio de agua (CRA), por un período de 45 días.**

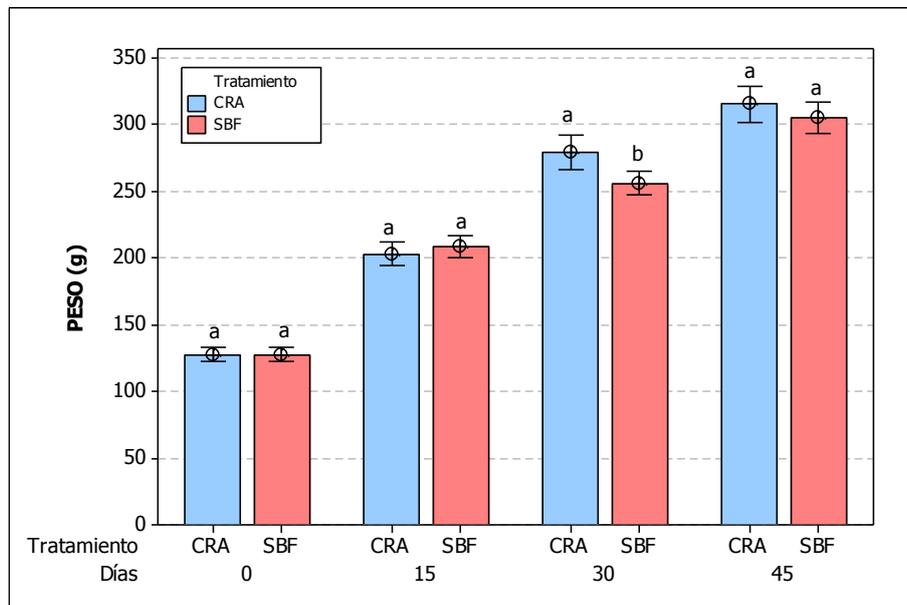
<b>Parámetros</b>	<b>SBF</b>	<b>CRA</b>
Peso inicial (g)*	127,48 ± 29,12 <sup>a</sup>	127,53 ± 28,23 <sup>a</sup>
Peso final (g)	304,90 ± 48,50 <sup>a</sup>	322,50 ± 74,30 <sup>a</sup>
Densidad inicial (Kg/m <sup>3</sup> )	6,03 ± 0,12 <sup>a</sup>	5,98 ± 0,110 <sup>a</sup>
Densidad final (Kg/m <sup>3</sup> )	14,73 ± 2,11 <sup>a</sup>	15,31 ± 0,26 <sup>a</sup>
Ganancia en peso (GP, %)	144,70 ± 36,40 <sup>a</sup>	155,57 ± 5,00 <sup>a</sup>
Factor de conversión alimenticia (FCA)	0,94 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,04 <sup>a</sup>
Tasa de crecimiento específico (TCE, %/día)	1,97 ± 0,35 <sup>a</sup>	2,07 ± 0,04 <sup>a</sup>
Sobrevivencia (S <sub>0</sub> , %)	88,89 ± 11,11 <sup>a</sup>	96,30 ± 3,70 <sup>a</sup>

Media ± desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc. \* Parámetros que presentan el efecto bloque.

#### **4.4.1 Ganancia de peso**

El desarrollo del crecimiento en peso de los juveniles de *Arapaima gigas* a lo largo del periodo experimental se muestra en la Figura 14. Los paiches fueron sembrados en los sistemas con un peso inicial promedio de 127,48 g en SBF y 127,53 en CRA. Luego de 45 días de experimento se presentó una ganancia en peso de 144,70 y 155,57 para SBF y CRA respectivamente. A lo largo del periodo experimental no se evidenció diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) de los pesos promedios entre los tratamientos, excepto en el día 30

en el que se presenta un valor significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en el peso promedio de los paiches del SBF (255,76 g) comparado a el CRA (279,30 g). Sin embargo se observa que el día 45 los paiches del tratamiento SBF se recuperan en peso (304,86 g) hasta ya no presentar diferencias significativas con el tratamiento CRA (314,90 g).



**Figura 14: Crecimiento en peso (g) de juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc. Efecto de bloque significativo en todos los períodos.

El mayor peso ganado del tratamiento CRA respecto al tratamiento SBF al día 30 del experimento pudo deberse a que entre los días 21 y 24 se registraron los picos más elevados de nitrógeno amoniacal total (NAT) y nitrógeno en nitritos ( $N-NO_2^-$ ) en el SBF (Figura 2A y 2B), lo que posiblemente ocasionó una menor ingesta de alimento que se reflejó en un menor crecimiento de los paiches del SBF durante este periodo. Patrick *et al.* (2014) mencionaron que los niveles elevados de nitritos en los sistemas de cultivo pueden causar un menor crecimiento, aumento de la susceptibilidad a las enfermedades y una muerte eventual. Así también Azim y Little (2008); Luo *et al.* (2014); Long *et al.* (2015) reportaron para los sistemas SBF una acumulación de las concentraciones de NAT y  $N-NO_2^-$ , durante las primeras semanas.

La exposición prolongada a concentraciones relativamente elevadas de  $\text{N-NO}_2^-$ , pueden causar problemas de toxicidad en el cultivo ocasionando estrés o muerte en los animales (Jensen, 2003). De esta manera en el periodo del 15 al 30 los juveniles de paiche del SBF tuvieron un periodo de estrés producto de los nitritos que afectó en el consumo y aprovechamiento del alimento. Después de la cuarta semana, los niveles de NAT y  $\text{N-NO}_2^-$  del SBF disminuyeron (Figura 2A y 2B), lo que posiblemente dio que en el día 45 del experimento, no existan diferencias significativas entre los pesos de los tratamientos, habiendo una recuperación del peso de los juveniles de paiche del tratamiento SBF (Figura 14).

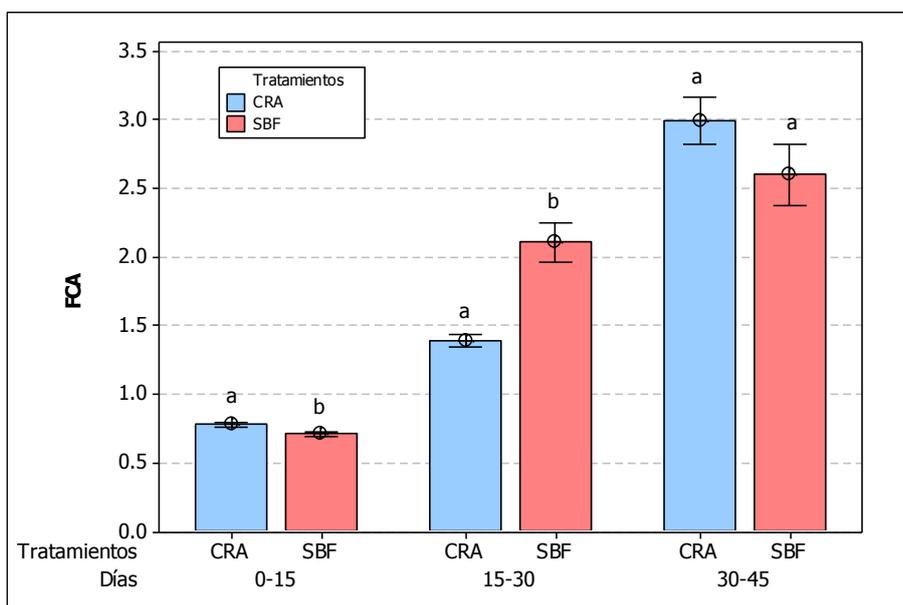
#### **4.4.2 Factor de conversión alimenticia (FCA)**

Los valores del factor de conversión alimenticia (FCA) se muestran en la Tabla 10 y Figura 15. No se presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos. El FCA presentó valores promedio de 0,94 en el SBF y 1,03 en el CRA, con una favorable diferencia numérica a favor del tratamiento SBF. Estos resultados son cercanos a los obtenidos para juveniles de paiche cultivados en jaulas reportados por otros autores, como Cavero *et al.* (2003) quienes obtuvieron un FCA de 0,80; mientras que Pereira-Filho *et al.* (2004) reportaron entre 0,71 y 1,01 para los primeros 100 días de cultivo. Por otro lado el valor del FCA obtenidos en los paiches en sistema SBF del presente experimento, fue mejor que los obtenidos por Ituassú *et al.* (2005) y Queiroz (2013) quienes obtuvieron valores de FCA de 2,3 y 3,0 respectivamente.

A una manera de comparar el FCA con otras especies que se cultivan en sistema biofloc como es la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) especie de un régimen alimentario omnívoro, se puede citar a Rakocy *et al.* (2000) quienes obtuvieron un valor de 1,7. Mientras que Azim y Little (2008) reportaron un valor de 3,44 y Long *et al.* (2015) un FCA de 0,83 mencionando que el SBF fue significativamente mejor en comparación con el FCA de 0,97 obtenido en un sistema con recambio de agua.

En la Figura 15 se observa que el FCA presentó entre el primer (0-15 días) y segundo periodo (15-30 días) diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, teniendo en el periodo 0-15 días valores de 0,7 y 0,8 para SBF y CRA, respectivamente, mientras que para el periodo 15-30 días, los valores fueron de 2,1 para SBF y 1,4 para CRA. Luego en el tercer

periodo (30-45 días) hay una diferencia numérica para SBF (2,6) con respecto al CRA (3,0). No obstante, se observa que el factor de conversión alimenticia (FCA) durante el experimento, mostró diferente tendencia al desarrollo del crecimiento en peso entre los peces de ambos tratamientos, debido a que en el día 15 del experimento, los paiches del tratamiento SBF no mostraron diferencias significativas en peso (Figura 14) lo que sí ocurrió con el FCA, donde los paiches del SBF mostraron una mejora significativa del FCA en comparación a los del tratamiento CRA.



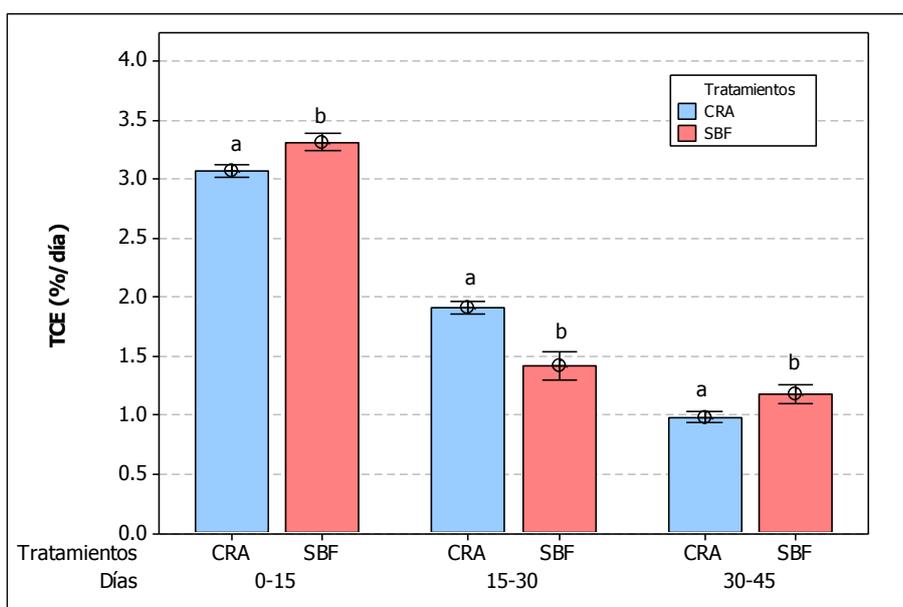
**Figura 15: Factor de conversión alimenticia (FCA) en juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media ± desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc. Efecto de bloque significativo en todos los períodos.

En resumen se podría decir que al final del experimento los paiches del SBF mostraron un FCA numéricamente mejor que el CRA, insinuando una mejor utilización del alimento, quizá debido a algún aporte adicional por parte del biofloc, ya que *Arapaima gigas* captura su alimento por succión, consumiendo restos vegetales y minerales (Franco, 2005). Por lo tanto, es probable que los juveniles del SBF hayan ingerido bioflóculos. Además cabe mencionar que durante el proceso de disección de los paiches procedentes des SBF se encontró residuos de bioflóculos en el estómago e intestino (Anexo 9).

Y si bien no existiese un aporte nutricional por parte del SBF en *A. gigas*, se ha comprobado que los microorganismos residentes en los bioflóculos producen enzimas exógenas (Xu *et al.*, 2012b), que podrían colaborar en la actividad enzimática digestiva de los peces en cultivo y por ende mejorar la utilización del alimento la que se refleja en el FCA, lo que también ayudaría a explicar los mejores resultados de este parámetro en el tratamiento SBF.

#### 4.4.3 Tasa de crecimiento específico (TCE)

Los valores promedio para la tasa de crecimiento específico (TCE) se muestran en la Tabla 10 y su desarrollo durante el periodo experimental en la Figura 16. No se presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos. Los paiches del SBF mostraron una TCE promedio de 1,97 %/día, ligeramente menor respecto al 2,07 obtenido en CRA.



**Figura 16: Tasa de crecimiento específica (TCE %/día) en juveniles de *Arapaima gigas*, durante el periodo experimental.** Media  $\pm$  desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) CRA, sistema con recambio de agua; SBF, sistema con biofloc. Efecto de bloque significativo en todos los períodos.

La TCE en los paiches en el tratamiento SBF, son muy similares a la TCE de 1,99 %/día, reportada por Crescêncio *et al.* (2005), en juveniles de paiche cultivados en jaulas bajo un régimen de alimentación continua. Sin embargo, según Oliveira *et al.* (2012) obtuvieron una TCE de 2,23%/día para juveniles de paiche también cultivados en jaula, siendo un valor superior al obtenido en la presente investigación para ambos tratamientos.

Al analizar detenidamente el desarrollo de los parámetros productivos durante todo el periodo experimental, es posible obtener información muy relevante sobre el efecto del SBF sobre los parámetros productivos del paiche. En la Figura 16 que muestra el desarrollo de la TCE a lo largo del periodo experimental se observa que en el periodo 0-15 y 30-45 días el SBF presenta valores significativamente mayores de TCE con respecto al CRA. Así se tiene que en el periodo 0-15 días el SBF presentó un valor promedio de TCE de 3,30 %/día y el CRA un valor de 3,10 %/día. Igualmente para el periodo 30-45 días el SBF presentó una TCE de 1,2 %/día y el CRA 1,0 %/día. Sin embargo en el periodo del 15-30 días el CRA presentó un valor significativamente mayor de TCE (1,9 %/día) respecto al SBF (1,4 %/día).

Los valores de crecimiento en peso, el FCA y la TCE, entre el periodo 15-30 días, mostraron la misma tendencia desfavorable para los paiches del tratamiento SBF en comparación con los paiches del tratamiento CRA (Figuras 8 y 9). Coincidiendo con las concentraciones elevadas de  $\text{NAT}$  y  $\text{N-NO}_2^-$  (Figura 2A y 2B) que influyeron en el crecimiento de los juveniles paiche en el SBF. Es a partir de la cuarta semana (entre los días 30 y 45) cuando las concentraciones de  $\text{NAT}$  y  $\text{N-NO}_2^-$  se controlaron, que los juveniles mostraron un incremento significativo en la TCE y una mejora, aunque no significativa del FCA en comparación con los paiches del tratamiento CRA (Figura 15 y 9).

#### **4.4.4 Supervivencia (S) y densidad ( $\text{Kg/m}^3$ )**

Los valores de supervivencia (%) y densidad final se muestran en la Tabla 10. La supervivencia fue calculada al final del experimento. El porcentaje de supervivencia (S) no presentó diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los tratamientos, mostrando una sobrevivencia de 88,89 % y 96,30 % para el tratamiento SBF y para el tratamiento CRA, respectivamente. Comparando el valor obtenido en el tratamiento SBF (88,89%) con el obtenido por Ituassú *et al.* (2005) quienes obtuvieron un valor de 66,7 por ciento se supervivencia en un cultivo en jaula a una densidad final de  $3,54 \text{ Kg/m}^3$ , la cual fue mucho menor a la densidad final obtenida en el presente experimento ( $15,31 \text{ kg/m}^3$ ). Con esto se puede asumir que el SBF no posee un efecto negativo en la sobrevivencia respecto a la habitual de paiches cultivados en sistema de cultivo tradicional.

Así también en un trabajo realizado con el pez amazónico *Piaractus brachipomus*, Poleo *et al.* (2011), obtuvieron un ligero incremento en la densidad y la sobrevivencia al cultivarlo

en sistema SBF en comparación con un sistema RAS. Mientras que Abad *et al.* (2014) reportaron que los sistemas SBF, ofrecen un incremento de biomasa en el cultivo sin afectar rendimiento productivo en juveniles de *Piaractus brachypomus*.

El SBF es un sistema intensivo capaz de contemplar un incremento en la densidad de cultivo (Luo *et al.*, 2014), mejorando la sostenibilidad de la acuicultura gracias al cero recambio de agua en el cultivo y al incremento de la bioseguridad (Crab *et al.*, 2012). Con los parámetros productivos obtenidos en el presente experimento en el SBF se puede afirmar que es factible el cultivo de juveniles de paiche en SBF sin afectar su rendimiento.

## V. CONCLUSIONES

1. Al final de los 45 días del periodo experimental se concluye que el SBF mejora la actividad enzimática digestiva y el comportamiento productivo de los juveniles de *Arapaima gigas*.
2. Al final del periodo experimental, los juveniles de paiche *Arapaima gigas* cultivados 45 días en el sistema con biofloc (SBF), presentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) una mayor actividad de lipasas (1,60 U/mg de proteína) y amilasas (0,04 U/mg de proteína), frente a los juveniles cultivados en el sistema sin biofloc con recambio de agua (CRA), que obtuvieron valores de 1,20 y 0,02 U/mg de proteína para lipasas y amilasas respectivamente.
3. El agua del cultivo del sistema con biofloc (SBF) presentó actividades enzimáticas de proteasas (3,540 U/mg SST), lipasas (8,647 U/mg proteína) y amilasas (26,26 U/mg SST) a diferencia del sistema sin biofloc con recambio de agua (CRA) donde no se detectó presencia de actividad enzimática.
4. Durante los periodos de 0-15 y de 30-45 días de la etapa experimental, donde no se tuvo picos elevados de nitrógeno amoniacal total (NAT) y de nitrógeno en nitritos ( $\text{N-NO}_2^-$ ), los juveniles del tratamiento SBF presentaron mejores valores en la tasa de crecimiento específico (TCE) y factor de conversión alimenticia (FCA) que los juveniles del tratamiento CRA.

## **VI. RECOMENDACIONES**

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se recomienda:

1. Identificar a los microorganismos constituyentes del sistema con biofloc (SBF) y evaluar la actividad enzimática de estos a fin de identificar los que aporten mejor y mayores enzimas exógenas para en base a un adecuado manejo propiciar su proliferación en los cultivos de paiche.
2. Realizar investigaciones futuras con respecto a diferentes fuentes de carbono y relaciones C/N relacionándolo con la actividad enzimática exógena, ya que de esto depende el tipo de microorganismos que se presenten en el SBF y por ende la calidad de los bioflóculos y la cantidad de enzimas exógenas que podrían aportar.
3. Realizar investigaciones futuras en parámetros productivos de paiche correlacionando los niveles de carbohidratos en la dieta con los niveles de amilasa presentes en los SBF.
4. Replicar el experimento e iniciar el periodo experimental en un sistema biofloc ya estabilizado.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad, D; Rincón, D; Poleo, G. 2014. Índices de rendimiento corporal en morocoto *Piaractus brachypomus* cultivados en sistemas Biofloc. *Zootecnia Tropical* 32(2): 119-130.

Abu Bakar, NS; Nasir, NM; Lananan, F; Abdul Hamid, SH; Lam, SS; Jusoh, A. 2015. Optimization of C/N ratios for nutrient removal in aquaculture system culturing African catfish, (*Clarias gariepinus*) utilizing Bioflocs Technology. *International Biodeterioration & Biodegradation* 30: 1-7.

Akifumi, E; Silva, E; Campos, J. 2008. Digestibilidad aparente de dietas prácticas com diferentes relações energia:proteína em juvenis de pirarucu. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília. 43 (2): 249-254.

Alcántara, F; Wust, H; Tello, S; Rebaza, M. 2006. Paiche el gigante del Amazonas. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú. 16 p.

Álvarez, C. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI : SERRANIDAE) tesis Doc. Cien. Mar. La Paz Baja California Sur, Instituto politécnico Nacional. p.179

APHA. 1998. Standard methods for the examination of the water and wastewater. 22 ed. American Public Health Association, Washington, EU.

Ásgeirsson, B; Bjarnasson, JB. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 99: 327-335.

Ásgeirsson, B; Hartemink, R; Chlebowski, JF. 1995. Alkaline phosphatase from atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties wich indicate adptation to low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* 110: 315-329.

- Ashe, D; Tomasso, JR; Eversole, AG. 1996. Toxicity of ammonia to fingerling white bass: effect of selected environments on uptake dynamics. *The Progressive Fish-Culturist* 58: 277-280.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227–235.
- Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264: 140-147.
- Avnimelech, Y. 2009. *Biofloc Technology – A Practical guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, p. 182
- Avnimelech, Y. 2012. *Biofloc technology-A Practical Guide Book*, 2nd ed. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA 73-91.
- Azim, ME; Little, DC. 2008. The biofloc technology (SBF) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29-35.
- Azim, ME; Little, DC; Bron, JE. 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C: N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology* 99: 3590-3599.
- Berger, C. 1972. Estudio de condición del “paiche” *Arapaima gigas* (Cuvier) en la zona reservada del río Pacaya entre los años 1959 a 1969. Lima, Perú. p.25
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *An. Biochem.* 72: 248-254.
- Cara-Torres, JB; Moyano, FJ; Fernández-Díaz, C; Yúfera, M. 2002. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*). *CIVA* 1: 110-121.
- Cavero, BAS; Ituassú, DR; Pereira-Filho, M; Roubach, R; Bordinho, AM; Fonseca, FAL; Ono, EA. 2003. Uso de alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 1011-1015.

- Cavero, BAS; Pereira-Filho, M; Roubach, R; Ituassu, DR; Gandra, AL; Crescêncio, R 2003. Stocking density effect on alimentary efficiency in juveniles pirarucu (*Arapaima gigas*) in a confined environment. *Acta Amazonica* 33: 631-637.
- Cavero, BAS; Pereira-Filho, M; Bordinhon, AM; Fonseca, FAL; Ituassú, DR; Roubach, R; Ono, EA. 2004. Tolerance of pirarucu juveniles to increasing ammonia concentration in a closed environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39 (5): 513- 516.
- Chacón, MS. 2007. Aspectos de manejo, reproducción y alimentación del paiche (*Arapaima gigas*) en la Amazonía peruana. Instituto de Investigaciones de La Amazonía Peruana (IIAP), Documento técnico N° 8 .
- Chakrabarti, I; Gani, MA; Chaki, KK; Sur, A; Mirsa, KK. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 112: 167-177.
- Chu-Koo, F; Valdivieso, M; Tello, S; Rebaza, M; Rebaza, C; Deza, S; Alcántara, FB. 2007. Análisis económico de la crianza del paiche o pirarucu (*Arapaima gigas*) en jaulas flotantes en un lago amazónico peruano. *Infopesca Internacional*, 30 (1):28-31.
- Collazos-Lasso, LF; Arias-Castellanos, JA. 2015. Fundamentos de la tecnología biofloc (BFT). Una alternativa para la piscicultura en Colombia. *ORINOQUIA - Universidad de los Llanos - Villavicencio, Meta. Colombia*. 19 (1): 77–86.
- Crab, R; Defoirdt, T; Bossier, P; Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356- 357: 351-356.
- Crab, R; Lambert, A; Defoirdt, T; Bossier, P; Verstraete, W. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *J. Appl Microbiol*, 109 (5): 1643- 1649.
- Crescêncio, R; Ituassú, DR; Roubach, R; Pereira Filho, M; Cavero, BAS; Gandra, AL. 2005. Influência do período de alimentação no consumo e ganho de peso do pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(12):1217–1222.
- Delgado, P; Delgado, J; Orbe R. 2013. Parasitic infections in juveniles of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) cultivated in the Peruvian Amazon. *Annals of parasitology* 59 (1): 43-48.

- Del Risco, M; Velásquez, J; Sandoval, M; Padilla, P; Moripinedo, L; Chu-Koo, F. 2008. Efecto de tres niveles de proteína dietaria en el crecimiento de juveniles de paiche, *Aparaima gigas* (Shinz, 1822). *Folia Amazónica* 17(1-2): 29-37.
- Dempster, P; Baird, DJ; Beveridge, MCM. 1995. Can fish survive by filter-feeding on microparticles? Energy balance in tilapia grazing on algal suspension. *Journal of Fish Biology* 47: 7–17.
- De silva, SS and Anderson, TA. 1995. *Fish Nutrition in Aquaculture*. Chapman Hall. p. 319.
- Duarte, S; Bemquerer, M; Araújo, FG. 2015. Enzymatic activity in the gastrointestinal tract of *Pimelodus maculatus* (Teleostei, Siluriformes) in two neotropical reservoirs with different trophic conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58 (4), 605–612.
- Ebeling JM; Timmons MB; Bisogni JJ. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 257: 346-358.
- Emerenciano, M; Ballester, E; Cavalli, R; Wasielesky, W. 2012, Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Aquacult. Res.* (43): 447-457.
- Emerenciano, M; Gaxiola, G; Cuzon, G. 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. INTECH open science open minds. Cap. 12: 301- 327.
- Ehren, J; Móron, B; Martin, E; Bethune, MT; Gray, GM; Khosla, C. 2009. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS ONE*, 4(7).
- Erlanger, B; Kokowsky, N; Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- Ferraris, RP; Ahearn, GA. 1984. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology* 77(3): 397-413.
- Filippov, AA; Golovanova, IL; Aminov, AI. 2013. Effects of organic pollutants on fish digestive enzymes: A review. *Int Wat Biol.*; 6: 155-160.

- Franco, RHH. 2005. Contribución al conocimiento de la reproducción del Pirarucú *Arapaima gigas* (CUVIER, 1887) (PISCES: Arapaimidae) en cautiverio. Tesis de grado en biorrecursos, Florencia, Caquetá, Colombia. Universidad de la Amazonia. p. 51.
- Franco, H; Peláez, M. 2007. Contribución al conocimiento de la cría y producción del pirarucú *Arapaima gigas* en cautiverio: Experiencia en el piedemonte caqueteño. Universidad de la Amazonía. Caquetá, Colombia. p. 50.
- Galgani, FG; Benyamin, Y y Ceccaldi, H.J. 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus japonicus*. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology* 78: 355-361.
- Green BW. 2015. Performance of a temperate-zone channel Cat fish biofloc technology production system during winter. *Aquacultural Engineering*. 64: 60-67.
- Guerra, H. 2002. Manual de producción y manejo de alevinos de Paiche. Lima: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). p.101.
- Guillaume, J; Choubert, G. 2001. Digestive physiology and nutrient digestibility in fishes. In: Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R (eds) *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*. Springer, Chichester, p.27-58.
- Hargreaves, JA. 2013. Biofloc production systems for aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center, CRAC Publication No. 4503. Stoneville, MS. p.12.
- Harris, JM. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Micro- bial Ecology* 25: 195–213.
- Hidalgo, MC; Urea, E; Sanz, A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170 (3-4): 267–283.
- Hirikado, MK; Hirata, Y; Uemarsu, Y; Hatooka, Y; Kazama, M. 1994. Assay for activities of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase used in food processing. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 35: 28-33.
- Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), memoria institucional. 2010. Programa de Investigación para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos – AQUAREC, p.27.

- Ituassú, DR; Filho, MP; Roubach, R; Crescêncio, R; Cavero, BAS; Gandra, AL. 2005. Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu Crude protein levels for juvenile pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(3): 255–259.
- Javier, F; López, M. 2006. *Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas. Aplicaciones en Nutrición. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, Monterrey, Nuevo León, México.* 396–409.
- Jensen FB (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 135: 9–24.
- Jobling, M. 1994. *Fish Bioenergetic.* Chapman & Hall, London, England. p.328.
- Ju, ZY; Forster, I; Conquest, L; Dominy, W; Kuo, WC; David Horgen, F. 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research*, 39(2): 118–133.
- Krishna, C; Van Loosdrecht, MCM. 1999. Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. *Water Research*. 33: 2374–2382.
- Krogdahl, A; Hemre, GI; Mommsen, TP. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquacult. Nutr.* 11: 103–122.
- Lazzari, R; Radünz Neto, J; Pedron, FDA; Loro, VL; Pretto, A; Gioda, CR. 2010. Protein sources and digestive enzyme activities in jundiá (*Rhamdia quelen*). *Scientia Agricola* 67 (3): 259–266.
- Lazo, JP. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. *Avances En Nutrición Acuicola. Memorias Del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola.* 300–312.
- Le Moullac, G; Van Wormhoudt; Aquacop, 1994. Adaptation of digestive enzyme to dietary protein, carbohydrate and fiber levels, and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae. *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, LA. USA.* p.587.

- Long, L; Yang, J; Li, Y; Guan, C; Wu, F. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 448: 135-141.
- Loyless, JC; Malone, RF. 1997. A Sodium Bicarbonate Dosing Methodology for pH Management in Freshwater-Recirculating Aquaculture Systems, *The Progressive Fish-Culturist* 59(3): 198-205.
- Luo, G; Gao, Q; Wang, C. 2014. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture* 422-423: 1-7.
- Lundstedt, LM. 2003. Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* arraçados com diferentes níveis de proteína e energia. Tese de Doutorado Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.
- Mathews, CK; Van Holde, KE. 1998. *Bioquímica*, Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Martínez-Córdova, LM; Martínez Porchas, J; López-Elías, A; Miranda Baeza, EB. 2011. Estado Actual del Uso de Biopelículas y Bioflóculos en el Cultivo de Camarón. *Avances En Nutrición Acuícola XI – Memorias Del Onceavo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*: 393–423.
- Monroy, DMC; De Lara, AR; Castro, MJ; Castro, MG; Emerenciano, CM. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 48(3): 511-520.
- Moyano, FJ; Diaz, M; Alarcon, KJ; Sarasquete, MC. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15: 121-130.
- Moss, SM; Divakaran, S; Kim, BG. 2001. Stimulating effects on ponds water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Bonne) *Aquacult. Res.* 32: 125-131.

- Najdegerami, EH; Bakhshi, F; Lakani, FB. 2016. Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2): 457–465.
- National Research Council NCR (U.S). 1993. Nutrient requirements of fish, p.114.
- Nevejan, N; De Schryver, P; Wille, M; Dierckens, K; Baruah, K; Van Stappen, G. 2016. Bacteria as food in aquaculture: do they make a difference? *Reviews in Aquaculture*. 0: 1–33.
- Oliveira, EG; Pinheiro, AB; de Oliveira, VQ; da Silva, ARM; de Moraes, MG; Rocha, ÍR. CB; Costa, FHF. 2012. Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in cages. *Aquaculture*. 370-371: 96–101.
- Olsen, RE; Ringoe, E. 1997. Lipid digestibility in fish: A review. *Recent Res. Devel. in Lipids Res*. 1: 199-265.
- Padilla, P; Ismiño, R; Alcántara, F; Tello, S. 2003. Efecto de la tasa de alimentación en el crecimiento del paiche, *Arapaima gigas*. 33(4): 715–718.
- Patrick, S I; Naamani, S; Ghanawi, J; Nasser, N. 2014. Effects of Acute and Chronic Nitrite Exposure on Rabbitfish *Siganus rivulatus*, Hematological parameters, and Gill histology. *Aquaculture* 5(6).
- Pereira-Filho, M. 2002. Engorda do Pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado. INPA .Manaus Brasil. *Acta Amazónica* 33(4): 715-718.
- Pereira-Filho, M; Roubach, R; Cavero, BAS; Ituassú, DR; Gandra, AL; Crescêncio, R. 2004. Intensive rearing of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in small volume cages. *J. World Aquac. Soc.* 35(1): 28-33.
- Pérez-Fuentes, JA; Hernández-Vergara, MP; Pérez-Rostro, CI; Fogel, I. 2016. C:N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation. *Aquaculture*. 452: 247–251.
- Picos-Garcia, C; Garcia-Carreno, FL. y Serviere-Zaragoza, E. 2000. Digestive proteases in juvenile Mexican green abalone, *Haliotis fulgens*. *Aquaculture*. 181: 157-170.

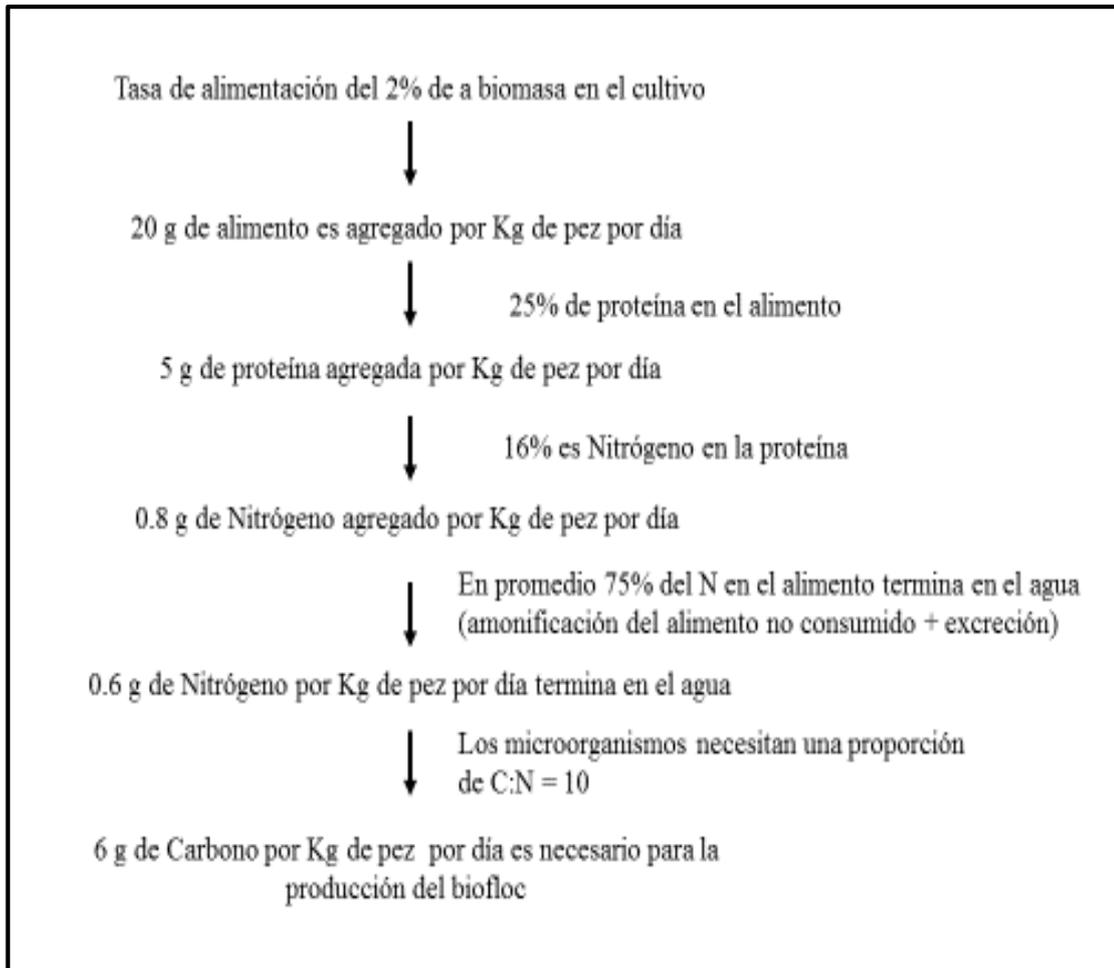
- Piedrahita, RH. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture* 226: 35–44.
- Poleo, G; Aranbarrio, JV; Mendoza, L; Romero, O. 2011. Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46 (4):429–437.
- Poli, MA; Schweitzer, R; Oliveira, N. 2015. The use of biofloc technology in a South American catfish (*Rhamdia quelen*) hatchery: Effect of suspended solids in the performance of larvae. *Aquacult. Eng.* 66:17-21.
- Queiroz, V; Barreto, A; Bezerra, T; Campos, P; Moreira, A. 2013. Preliminary Studies on the Optimum Feeding Rate for Pirarucu *Arapaima gigas* Juveniles Reared in Floating Cages. *International Journal of Aquaculture*, 3(25): 147–151.
- Rabello, D; Pereira, M; Roubach, R. 2005. Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília 40 (3): 255-259.
- Rakocy, JE; Bailey, DS; Martin, JM; Shutz, RC. 2000. Tilapia production systems for the Lesser Antilles and other resource-limited, tropical areas. In: *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Rio de Janeiro. Proceedings. Rio de Janeiro: Ministry of Agriculture p.651-662.
- Ray, AJ; Seaborn, G; Leffler, JW; Wilde, SB; Lawson, A; Browdy, CL. 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture* 310:130–138.
- Ray, JA; Lotz, JM. 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacult Eng*: 63: 54–61.
- Read, P; Fernandes, T. 2003. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture* 226:139-163.
- Rebaza, M; Alcantara, F; Valdivieso, M. 1999. Manual de piscicultura del Paiche. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, IIAP - FAO. p.72

- Robyt, JF; Whelan, WJ. 1968. Starch and its Derivates. Radley, JA.(Ed.). Chapman and Hall, London. 4 ed, p.430-476.
- Sabapathy, U; Teo, LH. 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. Journal of Fish Biology 42: 595–602.
- Sandobal, M. 2007. Aspectos de manejo, reproducción y alimentación del paiche *Arapaima gigas* en la Amazonía peruana. Documento técnico N°8 IIAP. p.30.
- Schveitzer, R; Arantes, R; Costódio, PFS; do Espírito Santo, CM; Arana, LV; Seiffert, WQ; Andreatta, ER. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. Aquacultural Engineering, 56: 59–70.
- Spannhof L, Plantikow H 1983. Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. Aquaculture 30: 95 – 108.
- Sunde, J; Eiane, SA; Rustad, A; Jensen, HB; Opstvedt, J; Nygard, E; Venturini, G; Rungruangsak-Torrissen, K. 2004. Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Aquaculture Nutrition 10: 261-277.
- Timmons, MB; Ebeling, JM; Wheaton, FW; Sommerfelt, ST; Vinci, BJ. 2002. Microbial biofloc and protein levels in green tiger shrimp. Recirculating aquaculture systems, Caruga Aqua Ventures, New York. NY. p.748.
- Toro, MDN; Garcia-Carreno, FL; Cordova-Murueta, JH. 2011. Comparison of digestive proteinases in three penaeids. Aquaculture 317: 99–106.
- Versaw, W; Cuppett, SL; Winters, DD; Williams, LE. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. J. Food Sci. 54: 232-254.
- Wasiolesky, WJr.; Atwood, H; Stokes, A; Browdy, CL. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258: 396–403.

- Wilén, BM; Balmer, P. 1999. The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research*. 33: 391-400.
- Wu, W; Yang, F; Yang, L. 2012. Biological denitrification with a novel biodegradable polymer as carbon source and biofilm carrier. *Bioresour. Technol.* 118: 136–140.
- Xiong, DM; Xie, CX; Zhang, HJ; Liu, HP. 2011. Digestive enzymes along digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(1): 56-64.
- Xu, WJ; Pan, LQ; Sun, XH; Huang, J. 2012 a. Effects of bioflocs water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Bonne) in zero exchange culture tanks. *Aquaculture Research*. 1-10.
- Xu, WJ; Pan, LQ; Zhao, DH; Huang, J. 2012 b. Preliminary investigation into the contribution of floc on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture*. 350: 147-153.
- Xu, WJ; & Pan, LQ. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*: 412-413, 117–124.
- Xu, WJ; Morris, T C; Samocha, TM. 2015. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system, *Aquaculture*. 453: 169–175.
- Yu, GH; He, PJ; Shao, LM; Lee, DJ. 2007. Enzyme activities in activated sludge flocs. *Appl Microbiol Biotechnol*. 77:605–612.
- Yu, GH; He, PJ; Shao, LM; Zhu, YS. 2009. Enzyme extraction by ultrasound from sludge flocs. *Journal of Environmental Sciences*. 21: 204–210.

## VIII. ANEXOS

**Anexo 1: Cálculo de la cantidad de Carbono necesario para la inmovilización del Nitrógeno. Tomado de Crab *et al.* (2012).**



**Anexo 2: Cultivo en sistema de tecnología biofloc, que se empleó de inóculo para la etapa experimental en sistema SBF.**



**Anexo 3: Unidades experimentales que se emplearon para el desarrollo del experimento.**



#### Anexo 4: Instrumentos para la medición de parámetros y colecta de datos

Tipo de Análisis	Parámetro	Unidad	Instrumento de medición	Marca	Método
Evaluación de parámetros físicos	Temperatura	°C	Oxímetro	YSI	-
	Oxígeno disuelto	mg./L			-
	pH	-	Potenciómetro	SCHOTT	-
	Luz	Klux	Luxómetro	-	-
	Vol. Del Floc	ml./L	Cono Imhoff	-	Métodos estandarizados para la evaluación de calidad de agua (APHA, 1998)
	SST	mg./L	Balanza analítica	-	
Evaluación de parámetros químicos	NAT	mg./L	Espectrofotómetro	HACH	HACH 8038 (Nessler)
	NO <sub>2</sub>	mg./L			HACH 8507 (diazotización)
	NO <sub>3</sub>	mg./L			HACH 8039 (Reducción de Cadmio)
	Alcalinidad	mgCaCO <sub>3</sub>	Titulador	-	Corrección de alcalinidad: Método de Clay y Malone (2011)
Evaluación parámetros productivos	Ganancia de peso	%	Balanza digital	Scout	Luo <i>et al.</i> (2014)
	Tasa de crecimiento específico	%/día	Ictiómetro	-	
	Tasa de conversión alimentaria	%	Balanza digital	Scout	
	Sobrevivencia	%	-	-	
Evaluación parámetros enzimáticos	Proteasas	U (mgPs/ml)	Procesador de ultrasonido	QSonica Sonicators	Toro <i>et al.</i> , 2011
	Lipasas		Centrífuga	centrífuga 5418 R	Versaw <i>et al.</i> , 1989
	Amilasas		Espectrofotómetro uv/visible	VARIAN 50 MPR	Robyt y Whelan, 1968

## Anexo 5: Medición de los parámetros de calidad de agua.

a) Medición de la temperatura y oxígeno disuelto



b) Medición del potencial de hidrógeno pH.



- c) Medición de los compuestos nitrogenados, nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrógeno amoniacal total (NAT).



- d) Medición de los sólidos sedimentables (SS).



e) Medición de los sólidos suspendidos totales (SST).



f) Medición de la alcalinidad como  $\text{CaCO}_3$  mg/l



**Anexo 6: Biometría de un alevín de *Arapaima gigas*.**

- a) Medición de la longitud total de un alevín de *Arapaima gigas*.



- b) Medición del peso húmedo de un alevín de *Arapaima gigas*.



**Anexo 7: Obtención del tracto digestivo de los juveniles de *Arapaima gigas*.**

- a) Disección (corte ventral) de los juveniles de *Arapaima gigas* para la extracción del tracto digestivo.



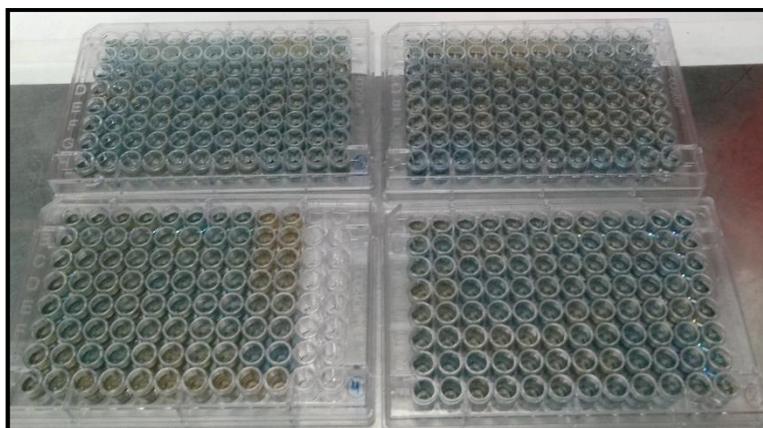
- b) Tracto digestivo de un alevín de *Arapaima gigas*.



**Anexo 8: Contenido del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*, en SBF**



**Anexo 9: Determinación de la proteína soluble, método Bradford.**



## Anexo 10: Manual del kit comercial de la marca SIGMA-ALDRICH para ensayos de actividad enzimática de amilasas.



sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA  
 Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757  
 email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

---

### Product Information

**Amylase Activity Assay Kit**

Catalog Number **MAK009**  
 Storage Temperature **-20 °C**

### TECHNICAL BULLETIN

**Sample Preparation**

Tissue (100 mg) or cells ( $4 \times 10^5$ ) can be homogenized in 0.5 mL of the Amylase Assay Buffer. Centrifuge the samples at  $13,000 \times g$  for 10 minutes to remove insoluble material.

Serum and urine samples can be directly added to wells.

Add 1–50  $\mu\text{L}$  of sample into wells of a 96 well plate. Bring samples to a final volume of 50  $\mu\text{L}$  with Amylase Assay Buffer.

**Note:** For unknown samples, it is suggested to test several sample dilutions to ensure the readings are within the linear range of the standard curve.

For the positive control (optional), add 5  $\mu\text{L}$  of the Amylase Positive Control solution to wells and adjust to 50  $\mu\text{L}$  with the Amylase Assay Buffer

**Assay Reaction**

- Prepare the Master Reaction Mix according to Table 1. 100  $\mu\text{L}$  of the Master Reaction Mix is required for each reaction (well).

**Table 1.**  
Master Reaction Mix

Reagent	Volume
Amylase Assay Buffer	50 $\mu\text{L}$
Amylase Substrate Mix	50 $\mu\text{L}$

- Add 100  $\mu\text{L}$  of the Master Reaction Mix to each of the sample, standard, and positive control wells. Mix well using a horizontal shaker or by pipetting.
- After 2–3 minutes ( $T_{\text{initial}}$ ), measure the absorbance at 405 nm ( $A_{405\text{initial}}$ ).  
**Note:** It is essential that ( $A_{405\text{initial}}$ ) is in the linear range of the standard curve.
- Incubate the plate at 25 °C, measuring the absorbance ( $A_{405}$ ) every 5 minutes. Protect the plate from light during the incubation.
- Continue taking measurements until the value of the most active sample is greater than the value of the highest standard (20 nmole/well). At this time, the most active sample is near or exceeds the end of the linear range of the standard curve.

- The final absorbance measurement [ $(A_{405})_{\text{final}}$ ] for calculating the enzyme activity would be the penultimate reading or the value before the most active sample is near or exceeds the end of the linear range of the standard curve (see step 5). The time of the penultimate reading is  $T_{\text{final}}$ .  
**Note:** It is essential the final measurement falls within the linear range of the standard curve.

**Results**

**Calculations**

Correct for the background by subtracting the final measurement ( $A_{405\text{final}}$ ) obtained for the 0 (blank) nitrophenol standard from the ( $A_{405\text{final}}$ ) measurement of the standards and samples.

**Note:** A new standard curve must be set up each time the assay is run.

Calculate the change in absorbance from  $T_{\text{initial}}$  to  $T_{\text{final}}$  for the samples.

$$\Delta A_{405} = (A_{405})_{\text{final}} - (A_{405})_{\text{initial}}$$

Compare the  $\Delta A_{405}$  of each sample to the standard curve to determine the amount of nitrophenol (B) generated by the amylase between  $T_{\text{initial}}$  to  $T_{\text{final}}$ .

The amylase activity of a sample may be determined by the following equation:

$$\text{Amylase Activity} = \frac{B \times \text{Sample Dilution Factor}}{(\text{Reaction Time}) \times V}$$

B = Amount (nmole) of nitrophenol generated between  $T_{\text{initial}}$  and  $T_{\text{final}}$   
 Reaction Time =  $T_{\text{final}} - T_{\text{initial}}$  (minutes)  
 V = sample volume (mL) added to well

Amylase activity reported as nmole/min/mL (milliunits). One unit of amylase is the amount of amylase that cleaves ethylidene-pNP-G7 to generate 1.0  $\mu\text{mole}$  of p-nitrophenol per minute at 25 °C.

## Anexo 11: Datos de calidad de agua para los tratamientos CRA y SBF

a) Datos promedio por día de temperatura °C del tratamiento CRA.

<b>Resultados por día de Temperatura °C TRAT = CRA</b>					
Variable	Día	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
T°C	1	28.917	0.549	28.200	29.600
	2	28.344	0.384	27.800	28.900
	3	28.089	0.457	27.600	28.800
	4	28.867	0.306	28.600	29.200
	5	29.050	0.437	28.400	29.700
	6	28.717	0.366	28.200	29.000
	7	28.067	0.300	27.700	28.500
	8	28.186	0.353	27.600	28.600
	9	28.367	0.333	28.000	28.900
	10	27.800	0.276	27.300	28.100
	11	28.100	0.335	27.500	28.600
	13	28.417	0.306	27.900	28.700
	14	28.133	0.398	27.600	28.600
	15	27.883	0.662	27.000	28.600
	16	27.950	0.509	27.300	28.600
	17	27.983	0.531	27.300	28.700
	18	27.883	0.649	26.600	28.400
	20	27.756	0.600	26.800	28.300
	21	27.767	0.304	27.400	28.100
	22	27.889	0.408	27.200	28.400
	23	27.978	0.412	27.300	28.500
	24	27.967	0.153	27.800	28.100
	27	28.533	0.372	27.900	28.900
	29	28.833	0.207	28.600	29.100
	30	28.500	0.173	28.400	28.700
	31	28.133	0.173	27.900	28.400
	32	27.878	0.323	27.300	28.200
	33	28.044	0.403	27.200	28.500
	34	28.189	0.401	27.500	28.700
	35	27.400	0.482	26.700	27.900
	36	28.543	0.796	27.200	29.600
	37	28.678	0.576	28.000	29.700
	38	28.892	0.772	27.700	30.000
	39	29.100	0.487	28.400	29.800
	40	29.156	0.309	28.600	29.500
	41	29.278	0.342	28.700	29.700

b) Datos promedio por día de temperatura °C del tratamiento SBF.

<b>Resultados por día de Temperatura TRAT = BF</b>					
Variable	Dia	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
T°C	1	28.100	0.721	27.000	29.100
	2	27.878	0.311	27.500	28.400
	3	28.344	0.378	27.700	28.900
	4	28.333	0.231	28.200	28.600
	5	28.783	0.445	28.200	29.300
	6	28.817	0.337	28.400	29.200
	7	28.156	0.255	27.900	28.700
	8	27.944	0.240	27.600	28.200
	9	27.833	0.163	27.600	28.000
	10	27.200	0.447	26.700	27.700
	11	27.589	0.209	27.300	27.900
	13	27.900	0.434	27.200	28.400
	14	27.633	0.266	27.300	28.000
	15	27.667	0.280	27.300	28.000
	16	27.450	0.339	27.000	27.900
	17	27.567	0.294	27.200	27.900
	18	28.033	0.674	27.300	29.000
	20	28.311	0.584	27.400	29.000
	21	28.433	0.306	28.100	28.700
	22	27.544	0.300	27.100	27.900
	23	27.689	0.586	26.600	28.400
	24	27.500	*	27.500	27.500
	27	28.150	0.817	26.700	29.100
	29	28.633	0.689	28.000	29.600
	30	28.154	0.546	27.600	28.800
	31	27.575	0.587	27.000	28.400
	32	27.533	0.632	26.600	28.300
	33	27.911	0.348	27.500	28.500
	34	28.400	0.400	27.900	29.000
	35	27.833	0.235	27.500	28.200
	36	27.644	0.274	27.200	28.000
	37	28.256	0.343	27.700	28.800
	38	28.650	0.509	28.000	29.100
	39	28.967	0.596	27.900	29.600
	40	28.867	0.527	28.000	29.400
	41	28.789	0.499	27.900	29.400

c) Datos promedio por día de Oxígeno disuelto del tratamiento CRA.

<b>Resultados por día de Oxígeno disuelto (OD) TRAT = CRA</b>					
Variable	DIA	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
OD mg/L	1	5.607	0.236	5.240	5.930
	2	5.893	0.509	5.300	6.820
	3	6.062	0.450	5.530	6.800
	4	5.190	0.480	4.720	5.680
	5	5.283	0.559	4.660	6.220
	6	6.245	0.286	5.860	6.570
	7	6.411	0.229	5.980	6.640
	8	6.216	0.442	5.750	7.060
	9	5.917	0.405	5.570	6.440
	10	6.115	0.420	5.580	6.520
	11	5.934	0.696	4.660	6.610
	13	5.790	0.448	5.310	6.390
	14	5.978	0.483	5.220	6.420
	15	5.452	0.743	4.460	6.570
	16	5.270	0.917	3.940	6.410
	17	5.742	0.434	5.180	6.270
	18	5.997	0.428	5.470	6.550
	20	5.286	0.862	4.030	6.050
	21	5.600	0.598	4.810	6.090
	22	5.734	0.470	4.830	6.270
	23	5.958	0.693	4.900	6.750
	24	5.283	0.902	4.410	6.460
	27	5.497	1.180	3.950	7.180
	29	5.225	1.138	4.100	6.700
	30	6.080	0.738	5.470	7.070
	31	5.395	0.884	4.470	6.570
	32	5.518	1.038	4.030	6.600
	33	5.808	0.532	5.180	6.400
	34	5.900	0.553	5.090	6.780
	35	6.360	0.665	4.900	7.120
	36	5.873	0.956	4.020	6.960
	37	5.598	0.673	4.230	6.600
	38	5.177	1.078	3.830	6.360
	39	5.689	0.706	4.540	6.650
	40	4.982	0.957	3.860	6.360
	41	5.212	0.863	3.810	6.340

d) Datos promedio por día de Oxígeno disuelto del tratamiento SBF.

<b>Resultados por día de Oxígeno disuelto (OD) TRAT = BF</b>					
Variable	DIA	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
OD mg/L	1	6.803	0.179	6.580	7.050
	2	6.608	0.248	6.170	6.880
	3	6.417	0.217	6.130	6.800
	4	6.400	0.121	6.290	6.530
	5	6.283	0.280	5.880	6.600
	6	6.262	0.253	5.940	6.580
	7	6.218	0.353	5.700	6.600
	8	6.624	0.454	5.670	7.050
	9	6.592	0.298	6.280	6.950
	10	6.132	0.807	4.630	6.870
	11	6.074	0.947	4.250	6.870
	13	5.388	0.560	4.860	5.960
	14	6.362	0.369	5.900	6.830
	15	6.117	0.661	5.150	6.850
	16	4.902	0.636	3.950	5.570
	17	5.117	0.341	4.590	5.580
	18	5.813	0.541	5.160	6.430
	20	5.118	0.689	3.890	5.840
	21	4.850	0.310	4.560	5.140
	22	5.376	0.418	4.480	5.850
	23	5.184	0.394	4.560	5.840
	24	6.333	0.261	6.110	6.620
	27	6.470	0.555	5.660	7.010
	29	6.792	0.200	6.530	6.990
	30	7.080	0.225	6.850	7.300
	31	6.619	0.327	6.090	7.070
	32	6.499	0.330	5.990	6.950
	33	6.398	0.299	5.710	6.730
	34	6.118	0.141	5.900	6.330
	35	6.421	0.201	5.980	6.640
	36	6.078	0.390	5.350	6.650
	37	5.761	0.493	5.040	6.360
	38	6.168	0.289	5.860	6.660
	39	6.031	0.285	5.570	6.410
	40	6.161	0.195	5.910	6.510
	41	6.194	0.234	5.840	6.520

e) Datos promedio por día de pH del tratamiento CRA.

<b>Resultados por día de pH TRAT = CRA</b>					
Variable	DIA	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
pH	1	7.1425	0.0700	7.0660	7.2620
	2	7.1827	0.2922	6.8380	7.8030
	3	7.4312	0.1740	7.2300	7.7350
	4	7.2140	0.0147	7.1980	7.2270
	5	7.2133	0.1736	6.9540	7.4160
	6	7.4462	0.1099	7.3070	7.5730
	7	7.4347	0.1229	7.2880	7.5780
	8	7.3508	0.1629	7.1720	7.6170
	9	7.2968	0.1499	7.1580	7.5300
	10	7.3920	0.0954	7.2700	7.4750
	11	7.2387	0.1809	7.0060	7.4620
	13	7.3050	0.0892	7.2100	7.3870
	14	7.3205	0.1301	7.0840	7.4300
	15	7.0780	0.1128	6.9480	7.1500
	16	7.1107	0.1470	6.9480	7.2340
	17	7.4317	0.0768	7.3430	7.4780
	18	7.5403	0.2339	7.2670	7.8230
	20	7.3477	0.1964	7.0390	7.6230
	22	7.4954	0.0953	7.3450	7.6380
	23	7.4785	0.1054	7.3010	7.6040
	24	7.3147	0.2123	7.1420	7.6000
	29	7.1485	0.1734	6.9840	7.3130
	30	7.6557	0.1724	7.5210	7.8500
	31	7.3480	0.2073	7.0820	7.6480
	32	7.5540	0.2840	7.2130	7.9120
	33	7.3420	0.297	6.9110	7.6850
	34	7.4861	0.1248	7.2600	7.6400
	35	7.6336	0.1687	7.3990	7.8920
	36	7.2356	0.1460	7.0710	7.4560
	37	7.1988	0.2141	6.9820	7.7040
	38	7.4120	0.1890	7.2240	7.6020
	39	7.6050	0.1820	7.4340	7.7970
	40	7.2790	0.1173	7.1310	7.4520
	41	7.1838	0.1389	6.9730	7.3290

f) Datos promedio por día de pH del tratamiento SBF.

<b>Resultados por día de pH TRAT = SBF</b>					
Variable	DIA	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
pH	1	7.9265	0.0415	7.8670	7.9850
	2	7.8372	0.0844	7.6910	7.9260
	3	7.8800	0.1653	7.4540	7.9960
	4	7.8350	0.0310	7.8040	7.8660
	5	7.8647	0.0965	7.7680	8.0150
	6	7.7955	0.0700	7.6990	7.8620
	7	7.7617	0.1222	7.5350	7.8760
	8	7.7593	0.1090	7.5770	7.8780
	9	7.7243	0.1282	7.5680	7.8550
	10	7.5112	0.2157	7.1830	7.7650
	11	7.7860	0.1232	7.5810	7.9330
	13	7.5273	0.1105	7.4050	7.6200
	14	7.7270	0.1491	7.5710	7.8600
	15	7.7100	0.1414	7.5470	7.7990
	16	7.5000	0.0993	7.3860	7.5680
	17	7.4727	0.0293	7.4390	7.4920
	18	7.5502	0.1944	7.3260	7.8070
	20	7.5222	0.1226	7.3160	7.6540
	22	7.6058	0.0666	7.5010	7.7170
	23	7.6398	0.0518	7.5770	7.6900
	24	7.8100	0.0147	7.7940	7.8230
	29	7.4910	0.0944	7.3900	7.5770
	30	8.0300	0.0694	7.9700	8.1060
	31	7.8881	0.0892	7.7680	8.0520
	32	7.9970	0.0604	7.9070	8.0500
	33	7.8842	0.1563	7.6430	8.0850
	34	7.8096	0.1036	7.6380	7.9520
	35	7.8597	0.0555	7.7500	7.9280
	36	7.7948	0.0936	7.6780	7.9490
	37	7.6722	0.1433	7.4570	7.8590
	38	7.7087	0.0742	7.6270	7.7720
	39	7.8447	0.0160	7.8290	7.8610
	40	7.7185	0.0735	7.6140	7.8160
	41	7.6567	0.1184	7.4940	7.7940

g) Datos de los compuestos nitrogenados NAT , N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/L).

Fila (	DIA	TRAT	BLOQ	NAT (mg/L)	N-NO <sub>2</sub> - (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> - (mg/L)
1	4	SBF	1	1.880	0.270	11.923
2	4	SBF	2	1.620	0.337	13.266
3	4	SBF	3	1.360	0.404	14.610
4	4	CRA	1	1.830	0.172	3.500
5	4	CRA	2	1.520	0.154	3.850
6	4	CRA	3	1.530	0.119	4.162
7	7	CRA	1	0.370	0.173	3.568
8	7	CRA	2	0.440	0.149	4.155
9	7	CRA	3	0.300	0.129	5.073
10	10	SBF	1	2.290	0.482	12.442
11	10	SBF	2	2.010	0.442	11.877
12	10	SBF	3	1.730	0.522	11.177
13	10	CRA	1	1.100	0.170	3.432
14	10	CRA	2	1.040	0.159	3.545
15	10	CRA	3	1.080	0.109	3.252
16	13	SBF	1	1.045	1.712	12.058
17	13	SBF	2	0.750	1.481	10.794
18	13	SBF	3	1.340	1.251	16.326
19	13	CRA	1	0.730	0.167	3.681
20	13	CRA	2	0.850	0.138	3.184
21	13	CRA	3	0.720	0.149	4.968
22	21	SBF	1	3.320	1.667	11.855
23	21	SBF	2	3.360	1.658	14.497
24	21	SBF	3	3.410	1.566	14.745
25	21	CRA	1	1.920	0.865	7.316
26	21	CRA	2	1.300	0.786	5.735
27	21	CRA	3	1.530	0.610	7.000
28	24	SBF	1	4.840	1.270	21.339
29	24	SBF	2	5.255	1.414	15.016
30	24	SBF	3	5.670	1.558	18.787
31	24	CRA	1	1.406	0.401	11.765
32	24	CRA	2	1.192	0.361	8.411
33	24	CRA	3	1.156	0.289	11.595
34	28	SBF	1	1.725	1.311	20.097
35	28	SBF	2	1.700	1.139	20.255
36	28	SBF	3	1.750	1.225	20.594
37	28	CRA	1	1.730	0.317	15.682
38	28	CRA	2	1.596	0.241	12.611
39	28	CRA	3	1.663	0.279	15.174
40	30	SBF	1	1.840	0.159	16.303
41	30	SBF	2	1.090	0.439	18.742

Continuación del cuadro

42	30	SBF	3	1.465	0.339	18.719
43	30	CRA	1	0.755	0.247	16.213
44	30	CRA	2	0.650	0.140	13.345
45	30	CRA	3	0.860	0.132	16.190
46	33	SBF	1	2.150	0.237	18.403
47	33	SBF	2	2.490	0.324	19.013
48	33	SBF	3	2.320	0.559	16.416
49	33	CRA	1	0.730	0.335	15.152
50	33	CRA	2	0.800	0.152	14.135
51	33	CRA	3	0.660	0.147	14.158
52	35	SBF	1	2.110	0.424	16.913
53	35	SBF	2	1.905	0.620	22.400
54	35	SBF	3	1.700	0.650	19.690
55	35	CRA	1	2.770	0.180	7.474
56	35	CRA	2	2.390	0.181	9.890
57	35	CRA	3	2.580	0.206	10.748
58	37	SBF	1	1.670	0.269	17.861
59	37	SBF	2	1.810	0.314	18.923
60	37	SBF	3	1.740	0.515	16.190
61	37	CRA	1	2.060	0.634	10.613
62	37	CRA	2	2.080	0.463	10.613
63	37	CRA	3	2.040	0.656	13.503
64	41	SBF	1	1.410	0.325	20.571
65	41	SBF	2	1.620	0.569	15.852
66	41	SBF	3	1.200	0.746	15.535
67	41	CRA	1	1.300	0.190	10.342
68	41	CRA	2	1.010	0.268	14.113
69	41	CRA	3	0.720	0.253	10.026

h) Datos de Alcalinidad mg (CaCO<sub>3</sub>)/L.

<b>Fila</b>	<b>DIA</b>	<b>TRAT</b>	<b>BLOQ</b>	<b>Alcalinidad</b>
1	4	SBF	1	86.680
2	4	SBF	3	86.680
3	4	SBF	2	86.680
4	7	SBF	1	86.680
5	7	SBF	3	108.350
6	7	SBF	2	97.520
7	9	SBF	1	75.850
8	9	SBF	3	86.680
9	9	SBF	2	75.850
10	13	SBF	1	75.850
11	13	SBF	3	75.850
12	13	SBF	2	97.520
13	21	SBF	1	86.680
14	21	SBF	3	86.680
15	21	SBF	2	86.680
16	23	SBF	1	108.100
17	23	SBF	3	82.360
18	23	SBF	2	108.100
19	28	SBF	1	41.180
20	28	SBF	3	41.180
21	28	SBF	2	41.180
22	30	SBF	1	92.660
23	30	SBF	3	102.950
24	30	SBF	2	61.770
25	34	SBF	1	92.660
26	34	SBF	3	92.660
27	34	SBF	2	113.250
28	36	SBF	1	102.950
29	36	SBF	3	113.245
30	36	SBF	2	102.950
31	38	SBF	1	92.655
32	38	SBF	3	97.800
33	38	SBF	2	97.800
34	41	SBF	1	77.210
35	41	SBF	3	66.920
36	41	SBF	2	66.920
37	7	CRA	1	43.340
38	7	CRA	2	43.340
39	7	CRA	3	43.340

Continuación del cuadro

40	13	CRA	1	43.340
41	13	CRA	2	32.500
42	13	CRA	3	45.180
43	21	CRA	1	65.010
44	21	CRA	2	65.010
45	21	CRA	3	65.010
46	28	CRA	1	41.180
47	28	CRA	2	41.180
48	28	CRA	3	41.180
49	30	CRA	1	82.360
50	30	CRA	2	72.070
51	30	CRA	3	51.480
52	34	CRA	1	72.065
53	34	CRA	2	82.360
54	34	CRA	3	61.770
55	36	CRA	1	51.480
56	36	CRA	2	51.480
57	36	CRA	3	51.480
58	38	CRA	1	82.360
59	38	CRA	2	82.360
60	38	CRA	3	87.510
61	41	CRA	1	41.180
62	41	CRA	2	46.330
63	41	CRA	3	25.740

i) Datos de Sólidos sedimentables (SS) mL/L.

<b>Variable</b>	<b>DIA</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
VOLUMEN	1	5.667	0.577	5.000	6.000
BIOFLOC	2	32.00	9.85	24.00	43.00
	3	51.7	24.9	33.0	80.0
	4	40.00	3.46	36.00	42.00
	5	32.67	7.37	27.00	41.00
	6	73.00	15.72	59.00	90.00
	7	62.00	7.21	56.00	70.00
	8	46.00	14.42	30.00	58.00
	9	52.00	5.29	48.00	58.00
	10	45.00	8.66	35.00	50.00
	11	44.67	5.03	40.00	50.00
	12	49.33	5.03	44.00	54.00
	13	41.67	7.64	35.00	50.00
	14	23.00	7.55	15.00	30.00
	15	36.00	4.00	32.00	40.00
	17	50.0	26.5	30.0	80.0
	18	50.0	26.5	30.0	80.0
	19	58.7	36.7	30.0	100.0
	20	48.3	32.5	15.0	80.0
	22	42.3	29.7	11.0	70.0
	23	39.0	24.6	12.0	60.0
	24	30.67	16.17	12.00	40.00
	29	29.3	18.5	8.0	40.0
	31	89.3	61.0	28.0	150.0
	32	90.0	55.7	40.0	150.0
	33	33.33	5.77	30.00	40.00
	34	56.67	15.28	40.00	70.00
	35	44.67	17.24	26.00	60.00
	36	48.0	20.8	24.0	60.0
	37	108.3	55.8	45.0	150.0

## Anexo 12: Datos de los parámetros productivos para los tratamientos CRA y SBF

Fila	Día	Bloque_1	Tratamiento	Peso g	Longitud cm
1	0	1	CRA	166.000	29.900
2	0	1	CRA	164.600	29.900
3	0	1	CRA	171.000	30.500
4	0	1	CRA	158.900	29.500
5	0	1	CRA	148.400	28.400
6	0	1	CRA	191.000	30.800
7	0	1	CRA	164.000	30.200
8	0	1	CRA	137.800	29.000
9	0	1	CRA	152.200	29.900
10	0	1	SBF	140.400	28.300
11	0	1	SBF	165.000	30.000
12	0	1	SBF	157.200	29.500
13	0	1	SBF	149.700	28.800
14	0	1	SBF	145.200	28.900
15	0	1	SBF	171.200	29.900
16	0	1	SBF	172.500	30.000
17	0	1	SBF	178.200	30.500
18	0	1	SBF	182.500	30.800
19	0	2	CRA	121.000	27.300
20	0	2	CRA	107.300	26.800
21	0	2	CRA	121.500	27.300
22	0	2	CRA	113.700	26.500
23	0	2	CRA	130.000	28.000
24	0	2	CRA	128.300	27.600
25	0	2	CRA	121.100	27.500
26	0	2	CRA	116.600	27.000
27	0	2	CRA	123.800	27.500
28	0	2	SBF	128.000	27.200
29	0	2	SBF	121.700	27.500
30	0	2	SBF	116.300	26.700
31	0	2	SBF	115.200	26.000
32	0	2	SBF	118.900	27.300
33	0	2	SBF	124.600	27.500
34	0	2	SBF	115.600	26.800
35	0	2	SBF	119.200	27.400
36	0	2	SBF	136.900	28.000
37	0	3	CRA	114.400	25.500
38	0	3	CRA	105.300	25.700
39	0	3	CRA	106.600	26.300
40	0	3	CRA	113.000	25.700
41	0	3	CRA	86.600	24.300
42	0	3	CRA	96.000	25.000
43	0	3	CRA	108.400	25.500

Continuación del Cuadro

44	0	3	CRA	95.800	24.800
45	0	3	CRA	79.900	23.500
46	0	3	SBF	99.400	25.900
47	0	3	SBF	111.600	25.900
48	0	3	SBF	101.700	25.400
49	0	3	SBF	90.300	24.500
50	0	3	SBF	109.900	25.500
51	0	3	SBF	87.700	24.000
52	0	3	SBF	98.200	25.200
53	0	3	SBF	103.800	26.000
54	0	3	SBF	81.100	23.800
55	15	1	CRA	256.600	32.800
56	15	1	CRA	240.200	32.400
57	15	1	CRA	261.300	33.800
58	15	1	CRA	251.000	32.900
59	15	1	CRA	232.200	32.300
60	15	1	CRA	249.000	33.400
61	15	1	CRA	269.000	34.200
62	15	1	CRA	249.600	33.500
63	15	1	CRA	303.500	34.800
64	15	1	SBF	253.400	33.500
65	15	1	SBF	236.400	33.500
66	15	1	SBF	284.800	34.800
67	15	1	SBF	285.600	34.400
68	15	1	SBF	270.400	34.100
69	15	1	SBF	246.700	33.600
70	15	1	SBF	231.500	32.700
71	15	1	SBF	244.600	32.700
72	15	1	SBF	236.500	33.100
73	15	2	CRA	167.400	30.000
74	15	2	CRA	186.100	30.300
75	15	2	CRA	204.900	31.500
76	15	2	CRA	194.100	30.900
77	15	2	CRA	216.800	31.700
78	15	2	CRA	187.600	30.500
79	15	2	CRA	158.900	29.100
80	15	2	CRA	216.100	31.800
81	15	2	CRA	214.700	31.100
82	15	2	SBF	186.200	30.600
83	15	2	SBF	204.400	31.200
84	15	2	SBF	188.500	30.400
85	15	2	SBF	216.300	31.400
86	15	2	SBF	182.600	30.100
87	15	2	SBF	248.400	33.100
88	15	2	SBF	205.400	31.000
89	15	2	SBF	213.600	31.300
90	15	2	SBF	213.600	31.700

Continuación del Cuadro

91	15	3	CRA	120.100	27.100
92	15	3	CRA	185.700	30.000
93	15	3	CRA	167.100	29.100
94	15	3	CRA	136.400	27.500
95	15	3	CRA	159.900	29.100
96	15	3	CRA	176.900	29.700
97	15	3	CRA	156.200	28.400
98	15	3	CRA	150.900	28.700
99	15	3	CRA	158.500	29.000
100	15	3	SBF	172.800	30.000
101	15	3	SBF	205.900	30.600
102	15	3	SBF	146.700	27.700
103	15	3	SBF	183.300	30.100
104	15	3	SBF	160.500	28.300
105	15	3	SBF	177.300	29.900
106	15	3	SBF	127.500	27.800
107	15	3	SBF	147.100	28.200
108	15	3	SBF	165.137	29.075
109	30	1	CRA	355.000	37.000
110	30	1	CRA	340.900	38.200
111	30	1	CRA	349.400	36.000
112	30	1	CRA	361.300	36.000
113	30	1	CRA	313.000	35.400
114	30	1	CRA	339.900	36.600
115	30	1	SBF	289.500	35.000
116	30	1	SBF	258.400	34.300
117	30	1	SBF	320.700	35.900
118	30	1	SBF	329.600	36.700
119	30	1	SBF	264.200	34.500
120	30	1	SBF	321.000	36.200
121	30	2	CRA	257.400	33.300
122	30	2	CRA	282.800	34.500
123	30	2	CRA	302.100	34.300
124	30	2	CRA	245.900	33.100
125	30	2	CRA	294.600	34.500
126	30	2	CRA	278.600	33.400
127	30	2	SBF	268.100	30.500
128	30	2	SBF	253.100	33.400
129	30	2	SBF	260.600	33.900
130	30	2	SBF	226.600	32.400
131	30	2	SBF	246.700	33.100
132	30	2	SBF	251.020	35.800
133	30	3	CRA	229.900	32.300
134	30	3	CRA	213.200	32.000
135	30	3	CRA	231.200	32.100
136	30	3	CRA	198.000	30.800

Continuación del Cuadro

137	30	3	CRA	231.200	32.400
138	30	3	CRA	203.600	31.700
139	30	3	SBF	228.600	32.400
140	30	3	SBF	246.600	33.000
141	30	3	SBF	210.700	32.100
142	30	3	SBF	200.500	30.800
143	30	3	SBF	211.000	33.000
144	30	3	SBF	216.800	35.300
145	45	1	CRA	406.200	38.500
146	45	1	CRA	339.400	37.500
147	45	1	CRA	322.900	37.500
148	45	1	CRA	417.900	38.900
149	45	1	CRA	402.900	39.300
150	45	1	CRA	377.860	41.100
151	45	1	SBF	360.400	37.900
152	45	1	SBF	266.900	35.800
153	45	1	SBF	340.600	37.600
154	45	1	SBF	314.600	36.500
155	45	1	SBF	393.500	39.000
156	45	1	SBF	300.600	36.200
157	45	2	CRA	345.300	36.900
158	45	2	CRA	279.700	35.500
159	45	2	CRA	295.900	35.800
160	45	2	CRA	325.200	36.800
161	45	2	CRA	280.500	34.900
162	45	2	CRA	334.600	37.000
163	45	2	SBF	283.000	35.200
164	45	2	SBF	381.700	38.800
165	45	2	SBF	303.200	36.200
166	45	2	SBF	341.000	36.700
167	45	2	SBF	330.300	37.000
168	45	2	SBF	327.840	36.780
169	45	3	CRA	241.400	34.000
170	45	3	CRA	218.200	32.600
171	45	3	CRA	269.200	33.500
172	45	3	CRA	272.700	34.500
173	45	3	CRA	286.700	35.000
174	45	3	CRA	251.900	33.900
175	45	3	SBF	237.900	33.800
176	45	3	SBF	220.900	33.900
177	45	3	SBF	270.700	34.800
178	45	3	SBF	247.300	34.600
179	45	3	SBF	269.900	35.500
180	45	3	SBF	297.100	35.200

**Anexo 13: Datos de la actividad enzimática digestiva de *A. gigas* para los tratamientos CRA y SBF**

a) Datos de mg proteína soluble/ml del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

Fila	DIA	TRAT	mg proteína soluble/ml	Unidad_1
1	0	CRA	22.395	
2	0	CRA	22.590	
3	0	CRA	33.345	
4	0	CRA	26.805	
5	0	CRA	22.890	
6	0	SBF	27.345	
7	0	SBF	22.395	
8	0	SBF	22.590	
9	0	SBF	33.345	
10	0	SBF	26.805	
11	0	SBF	22.890	
12	25	SBF	36.300	T1
13	25	SBF	22.230	T1
14	25	SBF	29.280	T1
15	25	SBF	19.200	T1
16	25	SBF	51.870	T1
17	25	SBF	41.220	T1
18	25	SBF	62.715	T1
19	25	SBF	42.765	T1
20	25	SBF	19.725	T1
21	25	SBF	52.860	T1
22	25	SBF	50.370	T1
23	25	SBF	49.965	T1
24	25	SBF	27.900	T5
25	25	SBF	32.595	T5
26	25	SBF	34.365	T5
27	25	SBF	30.495	T5
28	25	SBF	39.405	T5
29	25	SBF	45.975	T5
30	25	SBF	30.570	T5
31	25	SBF	28.155	T5
32	25	SBF	72.255	T5
33	25	SBF	68.370	T5
34	25	SBF	53.760	T5
35	25	SBF	48.135	T5
36	25	SBF	40.155	T6
37	25	SBF	67.455	T6
38	25	SBF	37.590	T6
39	25	SBF	43.020	T6
40	25	SBF	45.930	T6
41	25	SBF	56.805	T6

Continuación del cuadro

42	25	SBF	54.600	T6
43	25	SBF	41.295	T6
44	25	SBF	63.720	T6
45	25	SBF	66.030	T6
46	25	SBF	59.985	T6
47	25	CRA	51.960	T2
48	25	CRA	59.310	T2
49	25	CRA	43.845	T2
50	25	CRA	34.485	T2
51	25	CRA	60.285	T2
52	25	CRA	65.790	T2
53	25	CRA	58.065	T2
54	25	CRA	33.510	T2
55	25	CRA	50.265	T2
56	25	CRA	65.355	T2
57	25	CRA	56.550	T2
58	25	CRA	38.055	T2
59	25	CRA	55.710	T3
60	25	CRA	54.255	T3
61	25	CRA	38.310	T3
62	25	CRA	27.780	T3
63	25	CRA	49.350	T3
64	25	CRA	53.610	T3
65	25	CRA	36.555	T3
66	25	CRA	47.085	T3
67	25	CRA	62.220	T3
68	25	CRA	44.880	T3
69	25	CRA	40.665	T3
70	25	CRA	36.225	T4
71	25	CRA	35.865	T4
72	25	CRA	31.425	T4
73	25	CRA	26.595	T4
74	25	CRA	56.910	T4
75	25	CRA	42.420	T4
76	25	CRA	42.180	T4
77	25	CRA	36.225	T4
78	25	CRA	62.280	T4
79	25	CRA	35.880	T4
80	25	CRA	45.450	T4
81	45	SBF	46.410	T1
82	45	SBF	56.850	T1
83	45	SBF	36.840	T1
84	45	SBF	33.285	T1
85	45	SBF	30.135	T1

Continuación del cuadro

86	45	SBF	48.750	T1
87	45	SBF	44.370	T1
88	45	SBF	50.760	T1
89	45	SBF	46.425	T1
90	45	SBF	52.605	T1
91	45	SBF	51.195	T1
92	45	SBF	20.970	T1
93	45	SBF	38.235	T1
94	45	SBF	26.910	T1
95	45	SBF	51.510	T1
96	45	SBF	33.330	T1
97	45	SBF	45.495	T5
98	45	SBF	62.250	T5
99	45	SBF	77.145	T5
100	45	SBF	68.415	T5
101	45	SBF	71.070	T5
102	45	SBF	60.885	T5
103	45	SBF	48.120	T5
104	45	SBF	37.845	T5
105	45	SBF	55.815	T5
106	45	SBF	50.445	T5
107	45	SBF	44.595	T5
108	45	SBF	68.220	T5
109	45	SBF	74.415	T5
110	45	SBF	61.455	T5
111	45	SBF	28.140	T5
112	45	SBF	48.015	T6
113	45	SBF	51.210	T6
114	45	SBF	50.490	T6
115	45	SBF	52.695	T6
116	45	SBF	34.635	T6
117	45	SBF	50.580	T6
118	45	SBF	58.725	T6
119	45	SBF	27.630	T6
120	45	SBF	52.680	T6
121	45	SBF	42.300	T6
122	45	SBF	57.000	T6
123	45	SBF	29.670	T6
124	45	SBF	26.205	T6
125	45	SBF	52.575	T6
126	45	SBF	65.940	T6
127	45	SBF	64.005	T6
128	45	CRA	49.395	T2
129	45	CRA	40.995	T2
130	45	CRA	55.515	T2

Continuación del cuadro

131	45	CRA	55.950	T2
132	45	CRA	51.990	T2
133	45	CRA	62.475	T2
134	45	CRA	37.530	T2
135	45	CRA	52.410	T2
136	45	CRA	49.215	T2
137	45	CRA	47.745	T2
138	45	CRA	26.490	T2
139	45	CRA	54.555	T2
140	45	CRA	68.925	T2
141	45	CRA	23.070	T2
142	45	CRA	37.830	T3
143	45	CRA	46.635	T3
144	45	CRA	50.235	T3
145	45	CRA	59.235	T3
146	45	CRA	52.725	T3
147	45	CRA	53.760	T3
148	45	CRA	49.860	T3
149	45	CRA	64.305	T3
150	45	CRA	58.905	T3
151	45	CRA	64.830	T3
152	45	CRA	54.345	T3
153	45	CRA	54.495	T3
154	45	CRA	61.440	T3
155	45	CRA	44.790	T3
156	45	CRA	39.735	T3
157	45	CRA	26.670	T4
158	45	CRA	65.280	T4
159	45	CRA	30.150	T4
160	45	CRA	33.930	T4
161	45	CRA	37.185	T4
162	45	CRA	43.980	T4
163	45	CRA	33.840	T4
164	45	CRA	27.165	T4
165	45	CRA	48.990	T4
166	45	CRA	62.475	T4
167	45	CRA	40.830	T4
168	45	CRA	29.745	T4
169	45	CRA	26.730	T4
170	45	CRA	44.910	T4
171	45	CRA	27.615	T4

b) Datos de actividad específica de proteasas del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

Unidad/mg					proteina
Fila	DIA	TRAT	UNIDAD	Unidad/ml	soluble
1	0	CRA		37.2467	4.0332
2	0	CRA		71.5740	9.4633
3	0	CRA		71.0455	6.3088
4	0	CRA		61.0040	7.8913
5	0	SBF		71.5740	9.4633
6	0	SBF		35.6360	4.0332
7	0	SBF		71.0455	6.3088
8	0	SBF		61.0040	7.8913
9	25	SBF	T1	84.2580	6.8729
10	25	SBF	T1	83.1758	11.0789
11	25	SBF	T1	97.1433	9.8238
12	25	SBF	T1	40.6945	2.3230
13	25	SBF	T1	12.2813	0.8822
14	25	SBF	T1	23.5560	1.1122
15	25	SBF	T1	89.6437	6.2068
16	25	SBF	T1	14.6722	0.8219
17	25	SBF	T1	6.2917	0.3699
18	25	SBF	T1	40.0402	2.3728
19	25	SBF	T5	2.9445	0.3125
20	25	SBF	T5	7.6507	0.6950
21	25	SBF	T5	47.0868	4.0572
22	25	SBF	T5	22.3480	1.6793
23	25	SBF	T5	28.0608	1.8072
24	25	SBF	T5	93.6955	9.0753
25	25	SBF	T5	40.8958	4.3009
26	25	SBF	T5	67.4467	2.7640
27	25	SBF	T5	44.7212	1.9368
28	25	SBF	T5	24.8647	1.3695
29	25	SBF	T5	38.5050	2.3686
30	25	SBF	T6	20.6870	0.9081
31	25	SBF	T6	134.3397	10.5821
32	25	SBF	T6	43.0098	2.9603
33	25	SBF	T6	18.4472	1.1892
34	25	SBF	T6	7.4242	0.3870
35	25	SBF	T6	20.5612	1.1150
36	25	SBF	T6	32.8677	2.3567
37	25	SBF	T6	17.2392	0.8011
38	25	SBF	T6	28.4132	1.2741
39	25	SBF	T6	60.4755	7.7619
40	25	SBF	T6	7.2228	0.3565

Continuación del cuadro

41	25	CRA	T2	11.4257	0.6511
42	25	CRA	T2	15.7795	0.7878
43	25	CRA	T2	55.4422	3.7442
44	25	CRA	T2	24.3110	2.0874
45	25	CRA	T2	38.1527	1.8739
46	25	CRA	T2	55.1402	2.4817
47	25	CRA	T2	27.3813	1.3963
48	25	CRA	T2	70.3408	6.2154
49	25	CRA	T2	11.2747	0.6642
50	25	CRA	T2	10.1925	0.4618
51	25	CRA	T2	54.7375	2.8661
52	25	CRA	T2	54.5362	4.2434
53	25	CRA	T3	15.9053	0.8454
54	25	CRA	T3	16.3080	0.8900
55	25	CRA	T3	82.1188	6.3470
56	25	CRA	T3	30.6782	1.8407
57	25	CRA	T3	24.7892	1.0046
58	25	CRA	T3	36.5168	2.0169
59	25	CRA	T3	144.4063	11.6971
60	25	CRA	T3	27.1800	1.7092
61	25	CRA	T3	25.1667	1.1977
62	25	CRA	T3	31.2067	2.0589
63	25	CRA	T3	77.1610	5.6184
64	25	CRA	T4	96.4638	7.9640
65	25	CRA	T4	120.2212	11.3278
66	25	CRA	T4	44.2933	2.3046
67	25	CRA	T4	23.8077	1.6618
68	25	CRA	T4	49.7797	3.4945
69	25	CRA	T4	113.4513	9.2734
70	25	CRA	T4	43.2112	2.0544
71	25	CRA	T4	39.8640	1.3967
72	25	CRA	T4	114.5838	9.4560
73	25	CRA	T4	46.1053	3.0037
74	45	SBF	T1	46.5080	2.9673
75	45	SBF	T1	26.8025	1.3960
76	45	SBF	T1	196.5768	15.7998
77	45	SBF	T1	177.9535	15.8306
78	45	SBF	T1	219.1765	*
79	45	SBF	T1	5.5870	0.3393
80	45	SBF	T1	15.7543	1.0514
81	45	SBF	T1	47.4895	2.7702
82	45	SBF	T1	22.6248	1.4430
83	45	SBF	T1	6.0148	0.3386
84	45	SBF	T1	93.9723	5.4351
85	45	SBF	T1	127.8215	18.0486

Continuación del cuadro

86	45	SBF	T1	247.4135	19.1602
87	45	SBF	T1	93.2425	5.3600
88	45	SBF	T1	50.8367	4.5163
89	45	SBF	T5	343.1978	*
90	45	SBF	T5	38.5805	1.8351
91	45	SBF	T5	30.2755	1.1620
92	45	SBF	T5	18.3213	0.7929
93	45	SBF	T5	93.6200	3.9005
94	45	SBF	T5	52.7242	2.5641
95	45	SBF	T5	42.7078	1.4861
96	45	SBF	T5	85.1137	5.2374
97	45	SBF	T5	209.1853	16.3667
98	45	SBF	T5	55.8952	2.9653
99	45	SBF	T5	77.1610	4.5292
100	45	SBF	T5	38.5805	2.5617
101	45	SBF	T5	32.6915	1.4189
102	45	SBF	T5	30.3510	1.2077
103	45	SBF	T5	37.4732	1.8055
104	45	SBF	T6	6.7195	0.4144
105	45	SBF	T6	12.6337	0.7305
106	45	SBF	T6	11.3502	0.6656
107	45	SBF	T6	40.1408	2.2556
108	45	SBF	T6	44.7463	3.8254
109	45	SBF	T6	36.3407	2.1274
110	45	SBF	T6	33.1948	1.6737
111	45	SBF	T6	140.7572	15.0844
112	45	SBF	T6	27.2052	1.5291
113	45	SBF	T6	74.2920	5.2004
114	45	SBF	T6	300.9178	15.6319
115	45	SBF	T6	30.3762	3.0315
116	45	SBF	T6	52.5983	5.9433
117	45	SBF	T6	27.5575	1.5520
118	45	SBF	T6	13.4390	0.6035
119	45	SBF	T6	18.4472	0.8534
120	45	CRA	T2	60.6517	3.6358
121	45	CRA	T2	35.0823	2.5339
122	45	CRA	T2	14.9742	0.7987
123	45	CRA	T2	59.4437	3.1459
124	45	CRA	T2	34.8055	1.9823
125	45	CRA	T2	28.9668	1.3729
126	45	CRA	T2	28.6145	2.2576
127	45	CRA	T2	29.2940	1.6550
128	45	CRA	T2	27.4568	1.6519
129	45	CRA	T2	66.8175	4.1438
130	45	CRA	T2	10.1673	1.1365

Continuación del cuadro

131	45	CRA	T2	36.9447	2.0052
132	45	CRA	T2	34.6797	1.4898
133	45	CRA	T2	18.3465	2.3547
134	45	CRA	T3	21.8447	1.7098
135	45	CRA	T3	16.5345	1.0498
136	45	CRA	T3	78.1173	4.6045
137	45	CRA	T3	48.8988	2.4443
138	45	CRA	T3	40.3673	2.2670
139	45	CRA	T3	38.7818	2.1360
140	45	CRA	T3	49.5280	2.9413
141	45	CRA	T3	31.2318	1.4381
142	45	CRA	T3	57.0277	2.8666
143	45	CRA	T3	17.1637	0.7839
144	45	CRA	T3	30.9802	1.6880
145	45	CRA	T3	54.7627	2.9755
146	45	CRA	T3	28.7403	1.3851
147	45	CRA	T3	88.4608	5.8480
148	45	CRA	T3	98.9553	7.3740
149	45	CRA	T4	98.5023	10.9361
150	45	CRA	T4	63.3697	2.8744
151	45	CRA	T4	107.0087	10.5092
152	45	CRA	T4	71.1713	6.2110
153	45	CRA	T4	87.6555	6.9799
154	45	CRA	T4	82.9997	5.5880
155	45	CRA	T4	56.7005	4.9613
156	45	CRA	T4	60.8027	6.6275
157	45	CRA	T4	20.1585	1.2184
158	45	CRA	T4	131.0932	6.2132
159	45	CRA	T4	38.6308	2.8015
160	45	CRA	T4	54.1083	5.3863
161	45	CRA	T4	67.3208	7.4574
162	45	CRA	T4	30.3007	1.9978
163	45	CRA	T4	115.1375	12.3455

c) Datos de actividad específica de tripsina del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

Fila	DIA	TRAT	UNIDAD	BLOQUE	Unidad/mg	
					Unidad/mg proteína soluble	proteína soluble *10-
1	0	CRA		*	0.0007389	0.73888
2	0	CRA		*	0.0006766	0.67664
3	0	CRA		*	0.0006708	0.67084
4	0	CRA		*	0.0007251	0.72506
5	0	SBF		*	0.0007389	0.73888
6	0	SBF		*	0.0006766	0.67664
7	0	SBF		*	0.0006708	0.67084
8	0	SBF		*	0.0007251	0.72506
9	25	SBF	T1	1	0.0014313	1.43125
10	25	SBF	T1	1	0.0005008	0.50081
11	25	SBF	T1	1	0.0005427	0.54268
12	25	SBF	T1	1	0.0002416	0.24162
13	25	SBF	T1	1	0.0003712	0.37121
14	25	SBF	T1	1	0.0005733	0.57334
15	25	SBF	T1	1	0.0001862	0.18624
16	25	SBF	T1	1	0.0003899	0.38993
17	25	SBF	T5	3	0.0015054	1.50539
18	25	SBF	T5	3	0.0006299	0.62994
19	25	SBF	T5	3	0.0013961	1.39609
20	25	SBF	T5	3	0.0018495	1.84953
21	25	SBF	T5	3	0.0002668	0.26682
22	25	SBF	T5	3	0.0020772	2.07720
23	25	SBF	T5	3	0.0014865	1.48650
24	25	SBF	T5	3	0.0007390	0.73902
25	25	SBF	T5	3	0.0006860	0.68602
26	25	SBF	T5	3	0.0002819	0.28187
27	25	SBF	T6	2	0.0004065	0.40650
28	25	SBF	T6	2	0.0004991	0.49911
29	25	SBF	T6	2	0.0004193	0.41933
30	25	SBF	T6	2	0.0004399	0.43990
31	25	SBF	T6	2	0.0005335	0.53352
32	25	SBF	T6	2	0.0003304	0.33040
33	25	SBF	T6	2	0.0009611	0.96107
34	25	SBF	T6	2	0.0007248	0.72476
35	25	SBF	T6	2	0.0005464	0.54641
36	25	SBF	T6	2	0.0009696	0.96963
37	25	SBF	T6	2	0.0004090	0.40900
38	25	CRA	T2	2	0.0006249	0.62493
39	25	CRA	T2	2	0.0007787	0.77865
40	25	CRA	T2	2	0.0010204	1.02038

Continuación del cuadro

41	25	CRA	T2	2	0.0003976	0.39757
42	25	CRA	T2	2	0.0010773	1.07727
43	25	CRA	T2	2	0.0007349	0.73486
44	25	CRA	T2	2	0.0006338	0.63379
45	25	CRA	T2	2	0.0002584	0.25840
46	25	CRA	T2	2	0.0006317	0.63165
47	25	CRA	T2	2	0.0002539	0.25395
48	25	CRA	T2	2	0.0014419	1.44191
49	25	CRA	T2	2	0.0007205	0.72055
50	25	CRA	T3	1	0.0005311	0.53106
51	25	CRA	T3	1	0.0006517	0.65170
52	25	CRA	T3	1	0.0005651	0.56507
53	25	CRA	T3	1	0.0016669	1.66690
54	25	CRA	T3	1	0.0003358	0.33578
55	25	CRA	T3	1	0.0005788	0.57878
56	25	CRA	T3	1	0.0009080	0.90803
57	25	CRA	T3	1	0.0003065	0.30651
58	25	CRA	T3	1	0.0006726	0.67265
59	25	CRA	T3	1	0.0007878	0.78783
60	25	CRA	T3	1	0.0011889	1.18890
61	25	CRA	T4	3	0.0011267	1.12670
62	25	CRA	T4	3	0.0015155	1.51551
63	25	CRA	T4	3	0.0011124	1.11244
64	25	CRA	T4	3	0.0009510	0.95096
65	25	CRA	T4	3	0.0014799	1.47992
66	25	CRA	T4	3	0.0007527	0.75273
67	25	CRA	T4	3	0.0004382	0.43823
68	25	CRA	T4	3	0.0002086	0.20855
69	25	CRA	T4	3	0.0002135	0.21346
70	25	CRA	T4	3	0.0009653	0.96534
71	25	CRA	T4	3	0.0006986	0.69857
72	45	SBF	T1	1	0.0004198	0.41980
73	45	SBF	T1	1	0.0004316	0.43156
74	45	SBF	T1	1	0.0012732	1.27317
75	45	SBF	T1	1	0.0013658	1.36579
76	45	SBF	T1	1	0.0012582	1.25816
77	45	SBF	T1	1	0.0005855	0.58547
78	45	SBF	T1	1	0.0005260	0.52598
79	45	SBF	T1	1	0.0003419	0.34195
80	45	SBF	T1	1	0.0005487	0.54869
81	45	SBF	T1	1	0.0010853	1.08531
82	45	SBF	T1	1	0.0007144	0.71445
83	45	SBF	T1	1	0.0008227	0.82270
84	45	SBF	T5	3	0.0008926	0.89257
85	45	SBF	T5	3	0.0006641	0.66411

Continuación del cuadro

86	45	SBF	T5	3	0.0013290	1.32895
87	45	SBF	T5	3	0.0006701	0.67011
88	45	SBF	T5	3	0.0008533	0.85332
89	45	SBF	T5	3	0.0005257	0.52575
90	45	SBF	T5	3	0.0014846	1.48457
91	45	SBF	T5	3	0.0004008	0.40078
92	45	SBF	T5	3	0.0011158	1.11575
93	45	SBF	T5	3	0.0003236	0.32362
94	45	SBF	T5	3	0.0002618	0.26181
95	45	SBF	T5	3	0.0003640	0.36400
96	45	SBF	T6	2	0.0001954	0.19537
97	45	SBF	T6	2	0.0006341	0.63409
98	45	SBF	T6	2	0.0006003	0.60025
99	45	SBF	T6	2	0.0007532	0.75315
100	45	SBF	T6	2	0.0011459	1.14588
101	45	SBF	T6	2	0.0004280	0.42799
102	45	SBF	T6	2	0.0006635	0.66353
103	45	SBF	T6	2	0.0004109	0.41093
104	45	SBF	T6	2	0.0009894	0.98942
105	45	SBF	T6	2	0.0006583	0.65829
106	45	SBF	T6	2	0.0013133	1.31331
107	45	SBF	T6	2	0.0005078	0.50782
108	45	SBF	T6	2	0.0001970	0.19698
109	45	SBF	T6	2	0.0003608	0.36077
110	45	CRA	T2	2	0.0007158	0.71582
111	45	CRA	T2	2	0.0009505	0.95050
112	45	CRA	T2	2	0.0008839	0.88387
113	45	CRA	T2	2	0.0005675	0.56747
114	45	CRA	T2	2	0.0004303	0.43026
115	45	CRA	T2	2	0.0004967	0.49665
116	45	CRA	T2	2	0.0008652	0.86522
117	45	CRA	T2	2	0.0005370	0.53696
118	45	CRA	T2	2	0.0004838	0.48385
119	45	CRA	T2	2	0.0001814	0.18136
120	45	CRA	T2	2	0.0008989	0.89892
121	45	CRA	T2	2	0.0003769	0.37689
122	45	CRA	T2	2	0.0009383	0.93835
123	45	CRA	T3	1	0.0011141	1.11407
124	45	CRA	T3	1	0.0006895	0.68949
125	45	CRA	T3	1	0.0007918	0.79182
126	45	CRA	T3	1	0.0009717	0.97170
127	45	CRA	T3	1	0.0005637	0.56374
128	45	CRA	T3	1	0.0008249	0.82492
129	45	CRA	T3	1	0.0004937	0.49374
130	45	CRA	T3	1	0.0006370	0.63700

Continuación del cuadro

131	45	CRA	T3	1	0.0006901	0.69009
132	45	CRA	T3	1	0.0010858	1.08580
133	45	CRA	T3	1	0.0007164	0.71642
134	45	CRA	T3	1	0.0010794	1.07941
135	45	CRA	T3	1	0.0012894	1.28937
136	45	CRA	T4	3	0.0003095	0.30951
137	45	CRA	T4	3	0.0009813	0.98127
138	45	CRA	T4	3	0.0003828	0.38281
139	45	CRA	T4	3	0.0013584	1.35838
140	45	CRA	T4	3	0.0003774	0.37737
141	45	CRA	T4	3	0.0011422	1.14222
142	45	CRA	T4	3	0.0005450	0.54499
143	45	CRA	T4	3	0.0003119	0.31185
144	45	CRA	T4	3	0.0007069	0.70692
145	45	CRA	T4	3	0.0010258	1.02583
146	45	CRA	T4	3	0.0004660	0.46596

d) Datos de actividad específica de quimiotripsina del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

Fila	DIA	TRAT	BLOQUE	Unidad/mg proteína soluble *10-
1	0	CRA	*	0.336608
2	0	CRA	*	0.110490
3	0	CRA	*	0.235145
4	0	CRA	*	0.101745
5	0	CRA	*	0.336608
6	0	CRA	*	0.110490
7	0	CRA	*	0.235145
8	0	CRA	*	0.101745
9	0	SBF	*	0.336608
10	0	SBF	*	0.110490
11	0	SBF	*	0.235145
12	0	SBF	*	0.101745
13	0	SBF	*	0.336608
14	0	SBF	*	0.110490
15	0	SBF	*	0.235145
16	0	SBF	*	0.101745
17	25	SBF	1	0.147132

Continuación del cuadro

18	25	SBF	1	*
19	25	SBF	1	*
20	25	SBF	1	0.104759
21	25	SBF	1	0.128648
22	25	SBF	1	0.092177
23	25	SBF	1	0.103778
24	25	SBF	3	0.101825
25	25	SBF	3	0.165337
26	25	SBF	3	0.103817
27	25	SBF	3	0.111518
28	25	SBF	3	0.053472
29	25	SBF	3	0.067641
30	25	SBF	2	0.107538
31	25	SBF	2	0.039300
32	25	SBF	2	0.103913
33	25	SBF	2	0.081169
34	25	SBF	2	0.089169
35	25	SBF	2	0.103440
36	25	CRA	2	0.161838
37	25	CRA	2	0.126294
38	25	CRA	2	0.129166
39	25	CRA	2	0.131123
40	25	CRA	2	0.014066
41	25	CRA	1	0.089750
42	25	CRA	1	0.071190
43	25	CRA	1	0.105922
44	25	CRA	1	0.084787
45	25	CRA	1	0.089297
46	25	CRA	1	0.116472
47	25	CRA	3	0.094109
48	25	CRA	3	0.039777
49	25	CRA	3	0.095845
50	25	CRA	3	0.110457
51	25	CRA	3	0.083932
52	25	CRA	3	0.041173
53	45	SBF	1	0.127324
54	45	SBF	1	0.037015
55	45	SBF	1	0.079189
56	45	SBF	1	0.151105
57	45	SBF	1	0.119939
58	45	SBF	1	0.055492
59	45	SBF	1	0.050525
60	45	SBF	1	0.158839
61	45	SBF	3	0.079929
62	45	SBF	3	0.066286

Continuación del cuadro

63	45	SBF	3	0.071952
64	45	SBF	3	0.062764
65	45	SBF	3	0.051046
66	45	SBF	3	0.099118
67	45	SBF	3	0.061632
68	45	SBF	3	0.061020
69	45	SBF	2	0.099401
70	45	SBF	2	0.108032
71	45	SBF	2	0.118115
72	45	SBF	2	0.083208
73	45	SBF	2	0.146683
74	45	SBF	2	0.141547
75	45	SBF	2	0.117084
76	45	SBF	2	0.103400
77	45	CRA	2	0.069017
78	45	CRA	2	0.126911
79	45	CRA	2	0.074471
80	45	CRA	2	0.154607
81	45	CRA	2	0.158280
82	45	CRA	2	*
83	45	CRA	2	0.025739
84	45	CRA	2	0.122003
85	45	CRA	1	0.126162
86	45	CRA	1	0.076911
87	45	CRA	1	0.086211
88	45	CRA	1	0.093443
89	45	CRA	1	0.053014
90	45	CRA	1	0.077125
91	45	CRA	1	0.085496
92	45	CRA	1	0.091335
93	45	CRA	3	0.075381
94	45	CRA	3	*
95	45	CRA	3	*
96	45	CRA	3	*
97	45	CRA	3	0.120048
98	45	CRA	3	0.129892
99	45	CRA	3	0.161940

e) Datos de actividad específica de lipasas del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

Fila	DIA	TRAT	Unidad/ml	Unidad/mg proteína soluble
1	0	CRA	157.290	5.75206
2	0	CRA	119.165	5.32103
3	0	CRA	137.224	2.90054
4	0	CRA	162.372	7.18778
5	0	CRA	228.354	8.51908
6	0	CRA	85.628	3.74083
7	0	CRA	176.715	5.29960
8	0	SBF	85.627	3.74080
9	0	SBF	157.290	5.75206
10	0	SBF	119.165	5.32103
11	0	SBF	137.224	2.90054
12	0	SBF	162.372	7.18778
13	0	SBF	176.715	5.29960
14	0	SBF	228.354	8.51908
15	25	SBF	220.626	6.07785
16	25	SBF	117.128	5.26889
17	25	SBF	142.296	4.85984
18	25	SBF	243.821	4.70061
19	25	SBF	211.333	5.12697
20	25	SBF	264.642	4.21976
21	25	SBF	208.751	4.88134
22	25	SBF	212.751	4.02480
23	25	SBF	198.366	3.93818
24	25	SBF	158.550	3.17322
25	25	SBF	141.267	4.33401
26	25	SBF	98.018	3.51317
27	25	SBF	167.979	4.88808
28	25	SBF	109.788	3.60020
29	25	SBF	115.574	2.93297
30	25	SBF	199.637	4.34228
31	25	SBF	182.879	5.98229
32	25	SBF	137.855	4.89627
33	25	SBF	273.872	3.79035
34	25	SBF	229.814	3.36132
35	25	SBF	176.915	3.29082
36	25	SBF	168.420	3.49891
37	25	SBF	268.968	6.69824
38	25	SBF	169.208	2.50845
39	25	SBF	113.327	3.01480
40	25	SBF	159.506	3.70771

Continuación del cuadro

41	25	SBF	178.112	3.87789
42	25	SBF	169.029	2.97560
43	25	SBF	177.082	3.24327
44	25	SBF	193.305	4.68108
45	25	SBF	170.929	2.68251
46	25	SBF	195.510	2.96093
47	25	SBF	125.853	5.45527
48	25	SBF	158.739	2.64631
49	25	CRA	203.753	3.92133
50	25	CRA	240.282	4.05129
51	25	CRA	167.444	3.81899
52	25	CRA	89.450	2.59387
53	25	CRA	226.958	3.76474
54	25	CRA	176.190	2.67807
55	25	CRA	147.410	2.53870
56	25	CRA	147.368	4.39772
57	25	CRA	157.153	3.12650
58	25	CRA	200.886	3.07377
59	25	CRA	157.122	2.77846
60	25	CRA	142.506	3.74474
61	25	CRA	64.554	1.15875
62	25	CRA	295.586	5.44808
63	25	CRA	196.497	5.12913
64	25	CRA	236.481	4.79191
65	25	CRA	256.673	3.51293
66	25	CRA	183.099	3.41539
67	25	CRA	155.988	4.26721
68	25	CRA	114.912	2.44052
69	25	CRA	219.051	3.52059
70	25	CRA	208.215	4.63937
71	25	CRA	202.062	4.96894
72	25	CRA	210.357	5.80696
73	25	CRA	147.462	4.11159
74	25	CRA	174.500	5.55289
75	25	CRA	150.486	5.65843
76	25	CRA	175.287	3.08007
77	25	CRA	100.601	2.37153
78	25	CRA	111.384	2.64068
79	25	CRA	105.231	2.90493
80	25	CRA	136.867	2.19762
81	25	CRA	120.782	1.42920
82	25	CRA	109.683	3.05694
83	25	CRA	109.778	2.41535
84	45	SBF	273.893	5.90158
85	45	SBF	258.563	4.54815

Continuación del cuadro

86	45	SBF	198.576	5.39023
87	45	SBF	263.676	7.92177
88	45	SBF	213.318	4.37575
89	45	SBF	202.724	4.56893
90	45	SBF	234.948	4.62861
91	45	SBF	240.366	5.17751
92	45	SBF	214.515	4.07784
93	45	SBF	196.340	3.83513
94	45	SBF	186.564	8.89671
95	45	SBF	346.920	9.07336
96	45	SBF	241.626	4.69086
97	45	SBF	202.146	6.06499
98	45	SBF	419.643	9.22394
99	45	SBF	274.859	4.41540
100	45	SBF	303.366	3.93241
101	45	SBF	209.391	3.06060
102	45	SBF	338.352	4.76083
103	45	SBF	267.971	4.40126
104	45	SBF	228.627	2.68673
105	45	SBF	193.525	4.02173
106	45	SBF	195.993	5.17883
107	45	SBF	90.500	1.62142
108	45	SBF	125.937	2.49652
109	45	SBF	112.634	2.52570
110	45	SBF	218.757	3.20664
111	45	SBF	223.576	3.00445
112	45	SBF	183.330	2.98316
113	45	SBF	128.226	4.55672
114	45	SBF	155.074	3.22971
115	45	SBF	179.518	3.50554
116	45	SBF	168.105	3.32947
117	45	SBF	138.537	2.62904
118	45	SBF	194.702	5.62152
119	45	SBF	212.215	4.19564
120	45	SBF	165.007	2.80983
121	45	SBF	187.656	6.79175
122	45	SBF	170.635	3.23909
123	45	SBF	140.658	3.32525
124	45	SBF	192.570	3.37842
125	45	SBF	156.440	5.27265
126	45	SBF	221.687	8.45970
127	45	SBF	230.958	4.39292
128	45	SBF	159.653	2.42118
129	45	SBF	204.467	3.19454
130	45	CRA	157.542	3.18943
131	45	CRA	160.577	3.91698

Continuación del cuadro

132	45	CRA	152.219	2.74193
133	45	CRA	86.993	1.55483
134	45	CRA	112.644	6.71099
135	45	CRA	80.777	1.55369
136	45	CRA	72.587	1.16185
137	45	CRA	48.363	1.28865
138	45	CRA	222.621	4.24768
139	45	CRA	184.706	3.75303
140	45	CRA	174.353	3.65174
141	45	CRA	47.187	1.78131
142	45	CRA	123.281	2.25975
143	45	CRA	110.691	1.60596
144	45	CRA	86.520	3.75033
145	45	CRA	216.363	5.71935
146	45	CRA	261.019	5.59707
147	45	CRA	185.010	3.68289
148	45	CRA	139.997	2.36341
149	45	CRA	66.707	1.26518
150	45	CRA	175.098	3.25703
151	45	CRA	178.196	3.57392
152	45	CRA	167.664	2.60732
153	45	CRA	151.557	2.57291
154	45	CRA	146.391	2.25807
155	45	CRA	142.328	2.61896
156	45	CRA	114.450	2.10019
157	45	CRA	96.012	1.56270
158	45	CRA	203.501	4.54344
159	45	CRA	205.905	5.18196
160	45	CRA	121.643	4.56102
161	45	CRA	135.083	2.06928
162	45	CRA	119.532	3.96458
163	45	CRA	150.034	4.42188
164	45	CRA	161.690	4.34825
165	45	CRA	137.372	3.12350
166	45	CRA	153.479	4.53542
167	45	CRA	156.964	5.77819
168	45	CRA	160.755	3.28138
169	45	CRA	150.927	2.41580
170	45	CRA	151.347	3.70676
171	45	CRA	143.546	4.82587
172	45	CRA	167.780	6.27682
173	45	CRA	107.111	2.38500
174	45	CRA	193.158	6.99468

f) Datos de actividad específica de amilasas del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

Fila	DIA	TRAT	Unidad/mg proteína soluble
1	0	SBFT	10.189
2	0	SBFT	75.712
3	0	SBFT	117.916
4	0	SBFT	10.189
5	0	SBFT	75.712
8	0	CRA	10.189
9	0	CRA	75.712
12	0	CRA	10.189
13	0	CRA	75.712
14	0	CRA	117.916
15	25	CRA	27.156
16	25	CRA	32.077
17	25	CRA	10.035
18	25	CRA	9.204
19	25	CRA	13.913
20	25	CRA	21.313
21	25	CRA	15.902
22	25	CRA	19.547
23	25	CRA	31.681
24	25	CRA	18.063
25	25	CRA	10.858
26	25	CRA	11.051
27	25	CRA	39.222
28	25	CRA	21.112
29	25	SBFT	33.933
30	25	SBFT	19.005
31	25	SBFT	71.386
32	25	SBFT	21.108
33	25	SBFT	47.190
34	25	SBFT	*
35	25	SBFT	48.640
36	25	SBFT	62.666
37	25	SBFT	33.353
38	25	SBFT	38.535
39	25	SBFT	*
40	25	SBFT	41.944

Continuación del cuadro

41	25	SBFT	67.348
42	45	CRA	14.057
43	45	CRA	22.862
44	45	CRA	28.683
45	45	CRA	10.931
46	45	CRA	26.206
47	45	CRA	24.894
48	45	CRA	64.589
49	45	CRA	13.566
50	45	CRA	51.631
51	45	CRA	10.764
52	45	CRA	12.728
53	45	CRA	7.519
54	45	SBF	31.995
55	45	SBF	10.345
56	45	SBF	15.257
57	45	SBF	12.485
58	45	SBF	23.765
59	45	SBF	7.952
60	45	SBF	62.115
61	45	SBF	71.266
62	45	SBF	101.865
63	45	SBF	*
64	45	SBF	*
65	45	SBF	*
66	45	SBF	47.649
67	45	SBF	*
68	45	SBF	55.440

## Anexo 14: Análisis estadístico de los datos de calidad de agua.

a) Análisis estadístico de los datos de temperatura (T°C).

### Modelo lineal general: Temperatura vs. TRAT,

Factor	Tipo	Niveles	Valores
trat	fijo	2	CRA, SBF

Análisis de varianza para Temperatura, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
trat	1	0.7505	0.7505	0.7505	3.31	0.073
Error	69	15.6353	15.6353	0.2266		
Total	70	16.3858				

b) Análisis estadístico de los datos de Oxígeno disuelto (OD mg/L).

### Modelo lineal general: OD mg/L vs. TRAT , BLOQ

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT	fijo	2	SBF, CRA
BLOQ	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para OD mg/L, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT	1	16.523	16.670	16.670	38.04	0.000
BLOQ	2	40.517	40.517	20.259	46.22	0.000
Error	531	232.722	232.722	0.438		
Total	534	289.762				

c) Análisis estadístico de los datos de potencial de hidrógeno (pH).

**Modelo lineal general: pH vs. TRAT, BLOQ**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT	fijo	2	SBF, CRA
BLOQ	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT	1	16.7812	16.9967	16.9967	500.46	0.000
BLOQ	2	2.1200	2.1200	1.0600	31.21	0.000
Error	412	13.9924	13.9924	0.0340		
Total	415	32.8936				

d) Análisis estadístico de los datos de Nitrógeno amoniacal total (NAT).

**Modelo lineal general: NAT (mg/L) vs. BLOQ, TRAT**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
BLOQ	fijo	3	1, 2, 3
Tratamiento	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para NAT C, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
BLOQ	2	0.1926	0.1926	0.0963	0.10	0.902
Tratamiento	1	7.5641	7.5641	7.5641	8.10	0.006
Error	68	63.4829	63.4829	0.9336		
Total	71	71.2396				

e) Análisis estadístico de los datos de N- Nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> mg/L).

**Modelo lineal general: N-NO<sub>3</sub> – (mg/L).vs. BLOQ, TRAT**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
BLOQ	fijo	3	1, 2, 3
TRAT	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para N -Nitrito, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
BLOQ	2	0.0062	0.0062	0.0031	0.02	0.980
TRAT	1	4.5267	4.5267	4.5267	29.28	0.000
Error	65	10.0474	10.0474	0.1546		
Total	68	14.5803				

f) Análisis estadístico de los datos de N- Nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$  mg/L).

**Modelo lineal general: N-Nitrato vs. BLOQ, TRAT**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
BLOQ	fijo	3	1, 2, 3
TRAT	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para N-Nitrato, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
BLOQ	2	4.77	4.77	2.38	0.15	0.865
TRAT	1	928.68	928.68	928.68	56.67	0.000
Error	65	1065.19	1065.19	16.39		
Total	68	1998.63				

g) Análisis estadístico de los datos de Alcalinidad mg ( $\text{CaCO}_3$ )/L.

**Modelo lineal general: Alcalinidad vs. BLOQ, TRAT**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
BLOQ	fijo	3	1, 2, 3
TRAT	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para Alcalinidad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
BLOQ	2	37.9	37.9	18.9	0.06	0.946
TRAT	1	13917.0	13917.0	13917.0	40.65	0.000
Error	59	20199.7	20199.7	342.4		
Total	62	34154.6				

h) Análisis estadístico de los datos de Sólidos sedimentables (SS) mL/L.

**Modelo lineal general: VOLFLOC vs. BLOQUE**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
BLOQUE	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para VOLFLOC, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
BLOQUE	2	3462.3	3462.3	1731.1	1.89	0.157
Error	99	90913.7	90913.7	918.3		
Total	101	94376.0				

## Anexo 15: Análisis estadístico de los parámetros productivos de SBF y CRA.

a) Anova para Peso g y Longitud cm en el día 0.

<b>Modelo lineal general: Peso g 0 vs. Bloque_0, Tratamiento 0</b>							
Factor	Tipo	Niveles	Valores				
Bloque_0	fijo	3	1, 2, 3				
Tratamiento 0	fijo	2	SBF, CRA				
Análisis de varianza para Peso g 0, utilizando SC ajustada para pruebas							
Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque_0	2	36334		36334	18167	141.25	0.000
Tratamiento 0	1	0		0	0	0.00	0.989
Error	50	6431		6431	129		
Total	53	42765					
<b>Modelo lineal general: Longitud cm 0 vs. Bloque_0, Tratamiento 0</b>							
Análisis de varianza para Longitud cm 0, utilizando SC ajustada para pruebas							
Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque_0	2	188.668		188.668	94.334	184.24	0.000
Tratamiento 0	1	0.125		0.125	0.125	0.24	0.623
Error	50	25.600		25.600	0.512		
Total	53	214.393					

b) Anova para Peso g y Longitud cm en el día 15

<b>Modelo lineal general: Peso g 15 vs. Bloque 15, Tratamiento 15</b>							
Factor	Tipo	Niveles	Valores				
Bloque 15	fijo	3	1, 2, 3				
Tratamiento 15	fijo	2	SBF, CRA				
Análisis de varianza para Peso g 15, utilizando SC ajustada para pruebas							
Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque 15	2	81464		81464	40732	93.79	0.000
Tratamiento 15	1	501		501	501	1.15	0.288
Error	50	21715		21715	434		
Total	53	103679					
<b>Modelo lineal general: Longitud cm 15 vs. Bloque 15, Tratamiento 15</b>							
Análisis de varianza para Longitud cm 15, utilizando SC ajustada para pruebas							
Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque 15	2	188.308		188.308	94.154	119.95	0.000
Tratamiento 15	1	1.593		1.593	1.593	2.03	0.160
Error	50	39.248		39.248	0.785		
Total	53	229.149					

c) Anova para Peso g y Longitud cm en el día 30

<b>Modelo lineal general: Peso g 30 vs. Bloque 30, Tratamiento 30</b>							
Factor	Tipo	Niveles	Valores				
Bloque 30	fijo	3	1, 2, 3				
Tratamiento 30	fijo	2	SBF, CRA				
Análisis de varianza para Peso g 30, utilizando SC ajustada para pruebas							
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P	
Bloque 30	2	62411	62411	31206	64.82	0.000	
Tratamiento 30	1	5000	5000	5000	10.39	0.003	
Error	32	15406	15406	481			
Total	35	82817					
<b>Modelo lineal general: Longitud cm 30 vs. Bloque 30, Tratamiento 30</b>							
Análisis de varianza para Longitud cm 30, utilizando SC ajustada para pruebas							
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P	
Bloque 30	2	83.552	83.552	41.776	28.96	0.000	
Tratamiento 30	1	0.780	0.780	0.780	0.54	0.467	
Error	32	46.156	46.156	1.442			
Total	35	130.488					

d) Anova para Peso g y Longitud cm en el día 45

<b>Modelo lineal general: Peso g 45 vs. Bloque 45, Tratamiento 45</b>							
Factor	Tipo	Niveles	Valores				
Bloque 45	fijo	3	1, 2, 3				
Tratamiento 45	fijo	2	SBF, CRA				
Análisis de varianza para Peso g 45, utilizando SC ajustada para pruebas							
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P	
Bloque 45	2	57555	57555	28777	22.31	0.000	
Tratamiento 45	1	910	910	910	0.71	0.407	
Error	32	41285	41285	1290			
Total	35	99750					
<b>Modelo lineal general: Longitud cm 45 vs. Bloque 45, Tratamiento 45</b>							
Análisis de varianza para Longitud cm 45, utilizando SC ajustada para pruebas							
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P	
Bloque 45	2	83.413	83.413	41.706	30.64	0.000	
Tratamiento 45	1	0.082	0.082	0.082	0.06	0.807	
Error	32	43.551	43.551	1.361			
Total	35	127.046					

## Anexo 16: Análisis estadístico de la actividad enzimática digestiva de SBF y CRA.

### a) Análisis estadístico para mg proteína soluble /ml.

#### Modelo lineal general: mg proteína soluble/ml vs. TRAT día 0

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT_1	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para mg proteina soluble/ml\_1, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_1	1		0.23	0.23	0.23	0.01	0.917
Error	9	178.75		178.75	19.86		
Total	10	178.98					

#### Modelo lineal general: mg proteina/ml vs. TRAT día 25

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Tratamiento	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para mg proteina/ml, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	1		118.2	118.2	118.2	0.65	0.421
Error	68	12283.5		12283.5	180.6		
Total	69	12401.7					

#### Modelo lineal general: mg proteina soluble/ml vs. TRAT día 45

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT_1_1	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para mg proteina soluble/ml\_1\_1, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_1_1	1		100.2	100.2	100.2	0.58	0.449
Error	89	15427.6		15427.6	173.3		
Total	90	15527.7					

### b) Análisis estadístico de actividad específica de proteasas del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

#### Modelo lineal general: Unidad/mg proteina soluble vs. TRAT día 0

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT_3	fijo	2	CRA, SBF

Análisis de varianza para Unidad/mg proteina soluble\_3, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_3	1		0.000	0.000	0.000	0.00	1.000
Error	6	32.238		32.238	5.373		
Total	7	32.238					

**Modelo lineal general: proteasas Unidad/mg proteína soluble vs. TRAT****Día 25**

Factor Tipo Niveles Valores

TRAT\_1 fijo 2 CRA, SBF

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble\_1, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_1	1	1.35	1.35	1.35	0.13	0.720
Error	63	657.86	657.86	10.44		
Total	64	659.22				

**Modelo lineal general: Proteasas Unidad/mg proteína soluble vs. TRAT****Día 45**

Factor Tipo Niveles Valores

TRAT\_2 fijo 2 CRA, SBF

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble\_2, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_2	1	17.85	17.85	17.85	0.93	0.336
Error	86	1642.10	1642.10	19.09		
Total	87	1659.95				

c) Análisis estadístico de actividad específica de tripsina del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

**Modelo lineal general: Tripsina Unidad/mg proteína soluble \*10-3 vs. TRAT****Día 0**

Factor Tipo Niveles Valores

TRAT\_1 fijo 2 CRA, SBF

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble \*1\_1, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_1	1	0.000000	0.000000	0.000000	0.00	1.000
Error	6	0.007004	0.007004	0.001167		
Total	7	0.007004				

**Modelo lineal general: Tripsina Unidad/mg proteína soluble \*10-3 vs. TRAT****Día 25**

Factor Tipo Niveles Valores

TRAT\_2 fijo 2 CRA, SBF

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble \*1\_2, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_2	1	0.0178	0.0178	0.0178	0.09	0.768
Error	61	12.2932	12.2932	0.2015		
Total	62	12.3110				

**Modelo lineal general: Tripsina Unidad/mg proteína soluble \*10-3 vs. TRAT  
Día 45**

Factor Tipo Niveles Valores  
TRAT\_3 fijo 2 CRA, SBF

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble \*1\_3, utilizando SC  
ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_3	1	0.0029		0.0029	0.0029	0.03	0.867
Error	81	8.2767		8.2767	0.1022		
Total	82	8.2796					

d) Análisis estadístico de actividad específica de quimiotripsina del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

**Modelo lineal general: Unidad/mg proteína soluble \*10-3 vs. TRAT  
Día 0**

Factor Tipo Niveles Valores  
TRAT\_1 fijo 2 CRA, SBF

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble \*1\_1, utilizando SC  
ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_1	1	0.00000		0.00000	0.00000	0.00	1.000
Error	14	0.15000		0.15000	0.01071		
Total	15	0.15000					

**Modelo lineal general: Unidad/mg proteína soluble \*10-3 vs. TRAT  
Día 25**

Factor Tipo Niveles Valores  
TRAT\_2 fijo 2 CRA, SBF  
BLOQUE\_2 fijo 3 1, 2, 3

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble \*1\_2, utilizando SC  
ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_2	1	0.000420		0.000452	0.000452	0.38	0.543
BLOQUE_2	2	0.001228		0.001228	0.000614	0.51	0.603
Error	30	0.035821		0.035821	0.001194		
Total	33	0.037469					

**Modelo lineal general: Unidad/mg proteina soluble \*10-3 vs. TRAT****Día 45**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT_3	fijo	2	CRA, SBF
BLOQUE_3	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para Unidad/mg proteina soluble \*1\_3, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_3	1	0.000468	0.000314	0.000314	0.24	0.624
BLOQUE_3	2	0.004028	0.004028	0.002014	1.57	0.221
Error	39	0.049990	0.049990	0.001282		
Total	42	0.054486				

e) Análisis estadístico de actividad específica de lipasas del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

**Modelo lineal general: Lipasas Unidad/mg proteína soluble vs. TRAT****Día 0**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT_1	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble\_1, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_1	1	0.000	0.000	0.000	0.00	1.000
Error	12	43.888	43.888	3.657		
Total	13	43.888				

**Modelo lineal general: lipasas Unidad/mg proteína soluble vs. BLOQUE, TRAT****Día 25**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
BLOQUE_2	fijo	3	1, 2, 3
TRAT_2	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble\_2, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
BLOQUE_2	2	6.216	6.449	3.224	2.65	0.078
TRAT_2	1	4.916	4.916	4.916	4.05	0.048
Error	65	78.964	78.964	1.215		
Total	68	90.097				

**Modelo lineal general: Lipasas Unidad/mg proteína soluble vs. BLOQUE, TRAT****Día 45**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
BLOQUE_3	fijo	3	1, 2, 3
TRAT_3	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para Unidad/mg proteína soluble\_3, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
BLOQUE_3	2	12.269	13.207	6.603	2.37	0.099
TRAT_3	1	26.564	26.564	26.564	9.54	0.003
Error	87	242.338	242.338	2.785		
Total	90	281.170				

f) Análisis estadístico de actividad específica de amilasas del tracto digestivo de juveniles de *Arapaima gigas*.

**Modelo lineal general: Actividad amilasa (n mole/mim) vs. TRAT**

**Día 0**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT_1	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para Actividad amilasa( n mole/mim\_1, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_1	1		0.000	0.000	0.000	0.00	1.000
Error	12		17.712	17.712	1.476		
Total	13		17.712				

**Modelo lineal general: Actividad amilasa (n mole/mim) vs. TRAT**

**Día 25**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT_2	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para Actividad amilasa( n mole/mim\_2, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_2	1		21.464	21.464	21.464	27.05	0.000
Error	25		19.838	19.838	0.794		
Total	26		41.302				

**Modelo lineal general: Actividad amilasa (n mole/mim) vs. TRAT**

**Día 45**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
TRAT_3	fijo	2	SBF, CRA

Análisis de varianza para Actividad amilasa( n mole/mim\_3, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
TRAT_3	1		22.858	22.858	22.858	6.82	0.015
Error	25		83.839	83.839	3.354		
Total	26		106.696				