Efecto atrayente de harinas de pescado, camarón y *Spirulina* para el ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*)

Cynthia Eugenia Montoya-Martínez[1,2], Tania Yoselin Mendiola-Altamirano[1], Saúl Rogelio Guerrero-Galván[1]*, Gabriela Huerta-Ávila[1], Valeria Sarahi Ocaranza-Joya[1], Daniel Badillo-Zapata[1], Fernando Vega-Villasante[1*]

[1]*Laboratorio de Calidad de Agua y Acuicultura Experimental. Centro Universitario de la Costa. Universidad de Guadalajara.*
[2]*Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.*

Artículo recibido el 5 de septiembre de 2022 y aceptado el 15 de septiembre de 2022

Atraccting effect of fish end shimp meals and Spirulinafor the Mexican axolotl (Ambystoma mexicanum).

Abstract

The attractability of two meals of marine origin and one of unicellular origin in juveniles of *Ambystoma mexicanum* was determined, evaluating their feeding behavior using a "Y" shaped device to carry out the tests. The results showed that fish and shrimp meals were more attractive than *Spirulina maxima* meal ($p < 0.05$). In conclusion, fish and shrimp meals are good attractants for formulating specific diets for the Mexican axolotl.

Key words: Ambystoma mexicanum, ingredients, eating behavior, chemostimulants.

Resumen

Se determinó la atractabilidad de dos harinas de origen marino y una de origen unicelular en juveniles de *Ambystoma mexicanum*. El comportamiento alimentario se evaluó mediante un dispositivo en forma de "Y". Los resultados mostraron que la harina de pescado y de camarón fueron más atrayentes que la harina de *Spirulina maxima* ($p < 0.05$). En conclusión, la harina de pescado y camarón son buenos atrayentes para la formulación de dietas específicas para el ajolote mexicano.

Palabras claves: Ambystoma mexicanum, ingredientes, comportamiento alimentario, quimioestimulantes.

*Autor de correspondencia
Email: fvillasante@cuc.udg.mx; saul.ggalvan@academicos.udg.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)
DOI: https://doi.org.1033154/rlrn.2022.02.03

Introducción

México ocupa el segundo lugar en riqueza a nivel mundial en especies del orden Caudata, con un total de 137 especies, después de Estados Unidos con un total de 189 especies (Frost, 2013; Parra-Olea *et al*., 2014). Los caudatos completamente acuáticos como las larvas neoténicas del género *Ambystoma*, que habitan en ríos, lagos, corrientes de montaña, charcas y cuevas subterráneas, presentan cuerpo robusto y largos que alcanzan una longitud hocico-cloaca de hasta 34 cm, con cola comprimida lateralmente (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010; Zapata-Gutiérrez y Solís-Juárez, 2013).

En México se distribuyen 17 especies de salamandras del género *Ambystoma*, de las cuales 16 son endémicas del país y una (*A. mavortium*), comparte distribución con Estados Unidos y Canadá. De las 17 especies mexicanas, 15 están en la categoría de riesgo dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2018). Una de ellas, el ajolote mexicano (*A. mexicanum*), esta categorizada como en peligro de extinción (P), tres como amenazadas (A), y 11 como sujetas a protección especial (Pr) (SEMARNAT, 2018).

La evaluación de la quimiodetección de alimento, ingredientes y moléculas naturales y sintéticas han sido de gran importancia en el esfuerzo para diseñar alimentos más atrayentes y palatables para los organismos, ya que estos pueden ser detectados a través de la visión o de los quimiorreceptores (Jungblut *et al*., 2013). Estas propiedades deben ser tomadas en cuenta, especialmente cuando se formulan alimentos para estados postlarvarios por el cambio del tipo de alimento, de vivo a inerte. En el caso de ajolote mexicano, en etapas larvarias su alimentación se basa principalmente en alimento vivo, el cambio de alimento vivo a inerte sucede una vez que alcanzan la talla de 5 cm, y pueden comenzar a alimentarse de pequeños pellets (Mena y Servín, 2014).

El uso de atrayentes en alimentos formulados se incrementó por la necesidad de optimizar la conservación en los costos de producción. La adición de moléculas puras o ingredientes atrayentes, no solo promueven la rápida localización del alimento, sino también, una vez que se inicia la ingesta generalmente tienen efectos fagoestimulantes (Montemayor-Leal *et al*., 2005). Se han desarrollado técnicas de medición de atractabilidad de alimentos, ingredientes y moléculas, con la finalidad de incrementar la calidad del alimento dirigido a los organismos acuáticos en cultivo.

Los estudios de atractabilidad han sido desarrollados para varias especies de peces y crustáceos (Montemayor-Leal *et al*., 2005; Suresh *et al*., 2011; Barroso *et al*., 2013; Sacristán *et al*., 2014; Montoya-Martínez *et al.*, 2019; Sanches-Alves *et al*., 2019). Para el ajolote mexicano, el único estudio que evalúa la atractabilidad de ingredientes para la elaboración de dietas específicas, es de Ocaranza-Joya *et al.* (2021), en el que determinaron la atractabilidad de aceites de pescado, pollo, krill y langostilla roja *(Pleuroncodes planipes*).

El presente trabajo evalúa la atractabilidad de dos harinas de origen marino (pescado y camarón), y *Spirulina maxima* para alimentación del ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*).

Materiales y Métodos

Los juveniles de *A. mexicanum* utilizados para los bioensayos de atractabilidad fueron del stock de Laboratorio de Calidad de Agua y Acuicultura Experimental, previamente donados por el centro de producción AXOS-PIMVS ubicado en Tepic, México, acostumbrados a alimentarse con pellets. Las condiciones de mantenimiento previas a la experimentación se establecieron en una temperatura de 18 ± 1 °C y alimentación a saciedad con pellets de alta proteína para peces de agua fría (Silvercup®, 42% proteína, 15% grasa).

Se evaluó la atractabilidad de harina de pescado y de camarón (Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V.®), de uso convencional en la formulación de alimentos comerciales para organismos acuáticos y de *Spirulina máxima* deshidratada (Ocean Star International ®).

Se prepararon geles con las harinas ya mencionadas siguiendo el método propuesto por Nolasco-Soria (2014). Se utilizaron 5 g de grenetina disolviéndola en 80 mL de agua, a la mezcla se añadieron 15 g de harina y se homogenizaron con un agitador magnético en una placa de calentamiento. Una vez homogenizada la mezcla se vació en cajas Petri de 6 cm de diámetro, hasta alcanzar los 5 mm de altura de llenado, posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 4° C por 24 h para su gelificación. Adicionalmente, se prepararon geles sin harina para ser usados como blancos o controles.

Para la evaluación de la atractabilidad se utilizó un dispositivo en forma de Y (Fig. 1. Nolasco-Soria, 2014; Montoya-Martínez *et al*., 2018; Ocaranza-Joya *et al*., 2021), elaborado con material acrílico. Para las pruebas, el dispositivo se llenó con agua a la misma temperatura que los tanques de mantenimiento y se reemplazó por completo para cada prueba. Se usaron cinco ajolotes por prueba, con ayuno de 48 horas, que se colocaron en la región R del dispositivo y se dejaron aclimatar durante una hora. Entre las regiones R y N, se colocó una barrera para evitar que los ajolotes ingresen al resto del sistema. En la cámara de alimentación del brazo A o B, se colocó la harina gelificada, en la cámara de alimentación contraria se colocó el control y se dejaron reposar durante 15 minutos. Se realizó la grabación de la prueba con dos cámaras de video (GoPro®). Una se colocó enmarcando ambos brazos del dispositivo y una fracción de la zona "N", y la segunda se instaló enmarcando el costado de la cámara de alimentación donde se encontraba la harina gelificada. La grabación del video comenzó una vez terminados los 15 minutos de permanencia de los geles, cuando se retiró la barrera para que los ajolotes pudieran moverse por el resto del dispositivo (se abandonó la habitación para evitar la interferencia humana). Todas las pruebas se realizaron por 30 min, dentro de la misma sala cerrada con temperatura controlada. Los ajolotes utilizados en los bioensayos se dejaron en reposo durante al menos 48 horas antes de volver a utilizarse para otra prueba.

Después de haber realizado seis réplicas para cada tratamiento, se revisaron los videos y se cuantificó: i) el tiempo (s), del primer ingreso (es el tiempo que tarda el primer ajolote en entrar a cada brazo una vez que se quitó la barrera); ii) número de ajolotes que ingresaron a cada brazo; iii) tiempo (s), de permanencia del ajolote en la cámara de alimentación cerca del gel; iv) número de ajolotes que ingresaron a la cámara de alimentación.

Las observaciones de las respuestas del comportamiento alimentario se basaron en las sugeridas por Lindstedt (1971), y se clasifican según su efecto sobre sus patrones de conducta (Cuadro 1).

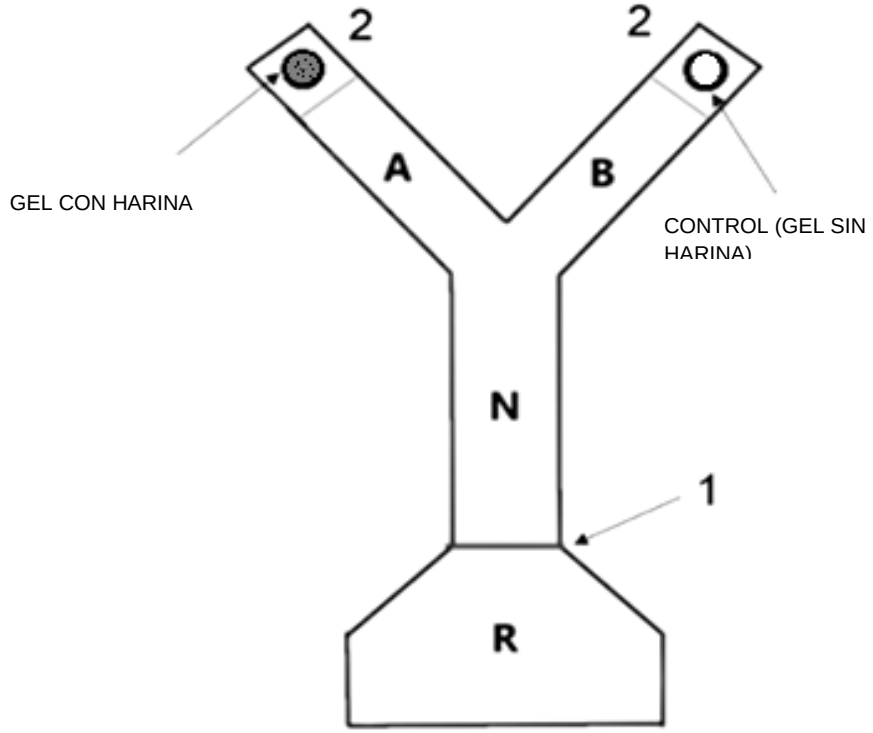


Figura 1. Sistema Y para pruebas de atractabilidad (Nolasco-Soria, 2014; Montoya-Martínez *et al*., 2018). R: Cámara de aclimatación, N: Zona de tránsito, A y B: Brazos, 1: Barrera, 2: Cámaras de alimentación.

Todos los bioensayos se llevaron a cabo de conformidad con los protocolos de bienestar animal. Los animales no fueron sometidos a ningún tipo de sufrimiento de forma programada o imprevista. Una vez finalizado el estudio, los ajolotes fueron reubicados en sus reservorios originales en condiciones óptimas de mantenimiento.

La comparación entre la harina y el blanco se realizó con la prueba de U de Mann-Withney de dos maneras: (i) con los valores en sus dimensiones originales, es decir, primer ingreso y tiempo de permanencia en segundos, e ingresos al brazo y a la cámara de alimentación en número de veces y (ii) como proporciones del total del tiempo o de eventos, es decir, se calculó el total del tiempo que tardaron los animales en ingresar a cada brazo y se determinó a qué proporción correspondía cada ingreso y para el tiempo de permanencia, el total fue la suma de las permanencias en ambas cámaras de alimentación y a cada caso se calculó la proporción correspondiente. En el caso de número de veces de ingreso al brazo con la harina se determinó el total de veces en ambos brazos y para cada caso se calculó la proporción correspondiente.

Resultados y discusión

Los resultados demuestran que, en relación con el control, la atractabilidad de las harinas de camarón y pescado mostraron diferencias significativas ($p < 0.050$), pero para *Spirulina maxima*, no se encontró alguna.

En la cuadro 2 se describen las respuestas de conducta alimenticia de *A. mexicanum* ante los estímulos de los ingredientes evaluados (harina de pescado, camarón y *S. maxima*), donde las pruebas estadísticas indican que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$), en el número de organismos que entraron al brazo en donde se encontraba el gel (orientación lejana), y número de organismos que entraron a la cámara de alimentación permaneciendo cerca del gel (orientación cercana).

Al examinar los resultados totales, se puede observar que en el tratamiento con harina de camarón se encontró una diferencia significativa

Cuadro 1. Tipos de estímulos químicos que afectan el patrón de respuesta de conducta alimenticia. Tabla de Beck (1965), modificada por Lindstedt (1971).

Respuesta	Estímulo que provoca	
	Positivo	**Negativo**
Orientación (lejana)	Atrayente	Repelente
Orientación (cercana)	Llamativo	Repelente
Iniciación de la alimentación	Incitante	Supresor
Seguimiento de la ingestión	Estimulante	Disuasivo

Cuadro 2. Medianas de las variables estudiadas en sus dimensiones originales y como proporción del tiempo o número de los eventos del comportamiento alimentario de A. mexicanum inducido por las harinas de pescado, camarón y Spirulina maxina en 30 min.

Variables evaluadas	Pescado		Camarón		*Spirulina*	
	harina	blanco	harina	blanco	harina	blanco
Tiempo al primer ingreso (s)	384.50	874.00	235.50	760.00	415.50	413.50
Número de organismos que entraron a los brazos	8.00	4.50	7.50	2.50	5.00	6.50
Tiempo de permanencia cerca del gel (s)	809.00*	211.50	745.00	387.50	862.50	785.00
Número de organismos que ingresan a la cámara de alimentación	6.50*	2.00	7.50*	3.00	8.50	7.00
Tiempo primer Ingreso (proporción)	0.34*	0.66	0.26*	0.74	0.49	0.51
Número de organismos que entraron a los brazos (proporción)	0.63	0.37	0.60*	0.40	0.45	0.55
Tiempo de permanencia cerca del gel (proporción)	0.82*	0.18	0.71*	0.29	0.63	0.37
Número de organismos que ingresan a la cámara de alimentación (proporción)	0.77*	0.23	0.78*	0.23	0.59	0.41

El asterisco indica diferencias significativas por el método de U de Mann-Whitney $p < 0.05$.

con respecto al brazo con el control en el número de ingresos a la cámara de alimentación, por lo que, podemos decir que la harina de camarón es atrayente para el ajolote mexicano. En cambio, en el caso de la harina de pescado, además de atrayente es llamativo, ya que no solo se determinó una diferencia en el número de ingresos a la cámara de alimentación sino también en el tiempo de permanencia de los ajolotes en la cámara de alimentación cerca del gel con harina.

En el análisis tomando en cuenta el cálculo de la proporción del número total de eventos, se encontraron diferencias significativas en todas las variables evaluadas en la harina de camarón, al igual que en la de pescado, con excepción en el número de organismos que entraron al brazo con la harina, con respecto del brazo con el control. Lo anterior significa que, en el caso de la harina de camarón, tardaron del tiempo total de llegar a los brazos, solamente una proporción de 0.26 del tiempo (26 %), en el número de ingresos a los brazos fue de 0.60 (60 %), en el tiempo de permanencia duraron el 71 % cerca del gel con la harina, y el 77 % de las veces los ajolotes ingresaron en la cámara de alimentación. En el caso de *Spirulina*, el comportamiento de los ajolotes corresponde al azar, pues casi todos los valores están alrededor del 50%. Es decir, la *Spirulina* no provoca un estímulo positivo ni, aparentemente, los repele.

Solo existe un estudio similar al presente en la familia Ambystomatidae, y este se refiere a la atractabilidad de aceites de origen animal (langostilla roja, krill, pescado y pollo), en el ajolote mexicano (Ocaranza-Joya *et al.*, 2021). Los resultados, con el mismo sistema "Y", demostraron que los aceites de pollo y pescado son buenos atrayentes para ser incluidos en dietas para la especie. Pero también, se han hecho pruebas con otros organismos acuáticos, bajo condiciones similares y el mismo sistema (Montoya-Martínez *et al*., 2018a, b), con diversos ingredientes como potenciales atrayentes para langostinos del género *Macrobrachium*.

Tanto el trabajo de Ocaranza-Joya *et al*. (2021), como los de Montoya-Martínez *et al*. (2018a, b), se basan en la observación de las respuestas del comportamiento alimentario para todo tipo de especies descrito por Lindstedt (1971), quien menciona que existen diferentes efectores químicos que pueden afectar positiva o negativamente a los animales y se clasifican según su efecto sobre sus patrones de conducta. Mediante la observación de los videos, es posible identificar las cuatro respuestas conductuales, comenzando por la orientación lejana hacia el alimento, movimiento para orientación cerca del alimento, inicio de la alimentación y continuación de la ingesta hasta su finalización. Lo anterior confirma lo expuesto por Ocaranza-Joya *et al.* (2021), que mencionan que el dispositivo en forma de "Y" puede considerarse adecuado para obtener resultados favorables en las pruebas de atractabilidad con *A. mexicanum*.

Los ingredientes de origen marino contienen sustancias de bajo peso molecular solubles en agua (aminoácidos, péptidos pequeños, compuestos cuaternarios de amonio, trimetilamina, betaína, nucleótidos, aminas biogénicas y ácidos orgánicos), que han demostrado ser los principales estimulantes alimentarios (Nunes *et al*., 2006).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman el potencial de la harina de pescado y de camarón como estimulantes alimentarios para *A. mexicanum*, lo que sugiere que la inclusión de estas harinas puede ser efectiva cuando se busca una formulación alimenticia, no solo basada en su composición nutricional sino también en su capacidad de atracción para que los ajolotes la consuman.

Referencias

Barroso, F.G.; Rodiles, A.; Vizcaino, A.J.; Martínez, T.F. & Alarcón, F.J., 2013. "Evaluation of feed attractants in juvenile *Senegalese sole, Solea senegalensis".* Journal of the World Aquaculture Society, 44(5):682-693, ISSN: 1749-7345, DOI: 10.1111/jwas.12068.

Canseco-Márquez, L. & Gutiérrez-Mayén, G., 2010. *Anfibios y reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.* Conabio, Fundación para la Reserva de la Biosfera Cuicatlán, A.C. y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, 302 p, Available: <https://www.academia.edu/32991624/Anfibios_y_Reptiles_del_Valle_de_Tehuac%C3%A1n_Cuicatl%C3%A1n>, [Consulted: August 15, 2022].

Jungblut, L.D.; Pozzi, A.G. & Paz, D.A., 2013. "El sistema vomeronasal y su posible funcionalidad en larvas de anuros". Cuadernos de Herpetología 27(1):47-56, ISSN: 1852-5768.

Lindstedt, K.J., 1971. "Chemical control of feeding behavior". Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 39(3):553-581, ISSN: 0010-406X, DOI: 10.1016/0300-9629(71)90319-7.

Mena-González, H. & Servín-Zamora, E., 2014. *Manual básico para el cuidado en cautiverio del axolote de Xochimilco (Ambystoma mexicanum).* Laboratorio de Restauración ecológica, Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 35 p., ISBN: 978-607-02-

5513-7. Available: <http://www.librosoa.unam.mx/handle/123456789/1952>, [Consulted: August 15, 2022].

Montemayor-Leal, J.; Mendoza-Alfaro, R.; Aguilera-González, C. & Rodríguez-Almaraz, G., 2005. "Moléculas sintéticas y extractos animales y vegetales como atractantes alimenticios para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*". Revista AquaTIC, 22:1–10, ISSN: 1578-4541.

Montoya-Martínez, C.; Nolasco-Soria H.; Vega-Villasante, F.; Carrillo-Farnés, O.; Álvarez-González, A. & Civera-Cerecedo, R., 2018. "Attractability and palatability of ingredients in longarm river prawn *Macrobrachium tenellum* feed". Latin American Journal of Aquatic Research, 46(3):615–620, ISSN: 0718-560X, DOI: 10.3856/vol46-issue3-texto-completo-17.

Nolasco-Soria, H. 2014. Manual de atractabilidad de ingredientes y alimentos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Laboratorio de Fisiología Comparada. La Paz, Baja California Sur. México.

Nunes, A.J.; Sá, M.V.; Andriola-Neto, F.F. & Lemos, D., 2006. "Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*". Aquaculture, 260(1-4):244-254, ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.027.

Ocaranza-Joya, V.S.; Martínez-Cárdenas, L.; Badillo-Zapata, D.; Montoya-Martínez, C.E.; López-Félix, E.F. & Vega-Villasante, F., 2021. "First attempt to fill gaps in the feeding of the axolotl". AgroProductividad, 14(10):37-45, ISSN: 2594-0252, DOI:10.32854/agrop.v14i10.2056.

Parra-Olea, G.; Flores-Villela, O. & Mendoza-Almeralla, C., 2014. "Biodiversidad de anfibios en México". Revista Mexicana de Biodiversidad, 85:460–466, ISSN: 1870-3453, DOI:10.7550/rmb.32027.

Sacristán, H.J.; Nolasco-Soria, H. & Greco, L.S.L., 2014. "Effect of attractant stimuli, starvation period and food availability on digestive enzymes in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (*Parastacidae*)". Aquatic Biology, 23(1):87-99, ISSN: 1864-7790, DOI:10.3354/ab00611.

Sanches-Alves, D.R.; Silva, T.C.D.; Rocha, J.; Oliveira, S.R.D.; Señor, A. & Boscolo, W.R., 2019. "Compelling palatability of protein hydrolysates for Nile tilapia juveniles". Latin American Journal of Aquatic Research, 47(2):371-376, ISSN: 0718-560X, DOI:10.3856/vol47-issue2-texto-completo-19.

SEMARNAT, 2018. *Programa de Acción para la Conservación de las Especies Ambystoma* spp. SEMARNAT/CONANP, México, Available: <https://www.gob.mx/conanp/acciones-y-programas/programas-de-accion-para-la-conservacion-de-especies-pace-123484>, [Consulted: August 15, 2022].

Suresh, A.V.; Kumaraguru-Vasagam, K.P. & Nates, S., 2011. "Attractability and palatability of protein ingredients of aquatic and terrestrial animal origin, and their practical value for blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* fed diets formulated with high levels of poultry byproduct meal". Aquaculture, 319(1-2):132–140, ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.06.039.

Zambrano, L.; Vega, E.; Herrera, G.; Prado, E.A. & Reynoso, V.H., 2007. "A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of an endangered species in a highly managed water system". Animal Conservation, 10:297–303, ISSN:1469-1795, DOI: 10.1111/j.1469-1795.2007.00105.x.

Zapata-Gutiérrez, M.C. & Solís-Juárez, L.G., 2013. "Axolotl: el auténtico monstruo del lago de Xochimilco". Kuxulkab´ Revista de Divulgación, 19(36):41-46, ISSN: 2448-508X, DOI: 10.19136/kuxulkab.a19n36.336.