



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 491**

51 Int. Cl.:
A23K 1/18 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05741736 .2**
96 Fecha de presentación : **12.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1744638**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Método y alimentación para la reducción del contenido de nutrientes no deseados en agua descargada a partir de una piscifactoría.**

30 Prioridad: **13.05.2004 NO 20041973**
25.04.2005 NO 20051993

73 Titular/es: **TROUW INTERNATIONAL B.V.**
Veerstraat 38
NL-5831 JN Boxmeer, NL

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

72 Inventor/es: **Koppe, Wolfgang M.;**
Brinker, Alexander y
Roem, Andries, Jan

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 308 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y alimentación para la reducción del contenido de nutrientes no deseados en agua descargada a partir de una piscifactoría.

La invención se relaciona con un método para reducir el contenido de nutrientes indeseados en el agua liberada de una piscifactoría; más particularmente mediante la cría de pescado que se alimenta con un pienso para la cría, al cual se le ha añadido un ingrediente, que aumenta el tamaño de partícula de las heces de la trucha, las heces que posteriormente se extraen del agua descargada por filtración mecánica. La invención también incluye un pienso para la cría para utilizar en la práctica del método.

La cría de peces en agua dulce representa una fuente de contaminación de aquellos residuos del pienso y de las heces en forma sólida y disuelta, que pueden traer nutrientes indeseados en un sistema de ríos adyacentes a través del agua descargada de la cría. El suministro de fósforo, en particular, se considera que es un área problema en el comercio.

El contenido de nutrientes se intenta reducir, empleando pienso digerible fácilmente, previniendo la pérdida del pienso, por una buena calidad, técnicamente de la cría y por el tratamiento del agua descargada.

Aunque muchas medidas han demostrado su eficacia, un nuevo potencial de mejora se considera que es relativamente pequeño debido a las restricciones físicas, biológicas y económicas.

El agua descargada de una típica cría de trucha en agua dulce muestra las siguientes características:

- las heces, presentes en gran medida como las partículas suspendidas, contienen la mayor parte del fósforo, la mayoría del material degradable biológicamente y una parte considerable del contenido de nitrógeno total. El tratamiento mecánico del agua descargada todavía muestra grandes variaciones en el efecto del tratamiento. (Cripps, S. J. (1994): Minimizing outputs: treatment. Journal of Applied Ichthyology, 10, 284-294):

TABLA 1

Porcentaje de sustancias contaminantes unidas a las partículas, en proporción a la cantidad total, y efectividad de la filtración de tambor del agua descargada a partir de los criaderos de truchas

	Fracción unida a la partícula	Eliminado a través de tratamiento	
		Límite inferior	Límite superior
Cantidad total de fósforo	Hasta 90 %	47 %	84 %
Cantidad total de nitrógeno	Hasta 32 %	7 %	32 %
BOD ₅	Sobre 80 %	21 %	80 %
Sólidos	-	19 %	91 %
BOD ₅ = Demanda Biológica de Oxígeno			

Una razón principal de estas diferencias es la desintegración de las partículas de heces suspendidas en partículas más finas y solubles. La desintegración ocurre debido a las fuerzas de cizallamiento en las zonas turbulentas del agua, formadas por ejemplo por el movimiento del pescado, las bombas, disminución de la velocidad de flujo etc., romperán las partículas.

La invención tiene como objetivo remediar los inconvenientes del oficio precedente.

El objetivo se logra a través de las características especificadas en la descripción a continuación y en las siguientes Reivindicaciones.

El objetivo se logra mediante el incremento de la resistencia de cizallamiento de las partículas de las heces, de manera que la descomposición en partículas de tamaño más pequeño se previene.

En la cría industrial de pescado, el así llamado pienso seco, es el tipo de alimento más utilizado. Este pienso seco fue primero así llamado alimento comprimido, pero se ha ido reemplazando más y más por el así llamado pienso extruido. Común a ambos tipos de pienso es que se venden como partículas secas o pedazos de pienso. Estos pedazos de pienso hacen referencia a los pellets. Los pellets son principalmente de una forma cilíndrica, con una relación diámetro/longitud que usualmente es de 1:1 a 1:2. El pescado de diferentes tamaños requiere contrariamente pellets de clasificados según el tamaño. De esta manera, el diámetro puede variar de 1 mm a 12 mm. También existen, pellets de otros tamaños y formas.

ES 2 308 491 T3

En la producción del alimento del pescado es usual adicionar una mezcla de aglutinante al pienso antes de formarlo en una prensa o una extrusora. Esto es ventajoso para impartir a los pellets una mayor fuerza mecánica, lo suficiente para que ellos mantengan su forma hasta la alimentación. También una fuerza pobre tendrá como consecuencia en el rompimiento del pellet o que se aplaste durante el almacenamiento y transporte, y esto se traducirá en una pérdida como polvo y los fragmentos pequeños del alimento para el pescado no se pueden dar al pescado. La fuerza mecánica también es necesaria, con el fin de que el pellet soporte la manipulación en la planta de alimentación y para que no se disuelva en el agua antes de que el pescado se lo coma.

El aglutinante más utilizado comúnmente es el almidón. Cuando se calienta junto con el agua y el vapor, los gránulos de almidón se inflan y formarán una red de almidón. Esto ocurre parcialmente en un así llamado pre-acondicionador, parcialmente en la prensa si se utiliza, y parcialmente en la extrusora si se utiliza. Algunas extrusoras se operan sin un pre-acondicionador, de manera que el proceso total se lleva a cabo en la extrusora.

La fuente de almidón utilizada por la mayoría es el trigo. Por razones económicas se utiliza trigo entero, el cual se muele junto con el resto de las materias primas incluidas en la receta para el alimento del pescado. Si la receta es "apretada", se puede utilizar harina de trigo. Otros almidones que proporcionan el enlace son el almidón de patata y el almidón de maíz, pero también se pueden utilizar, otros almidones, tales como el de la tapioca. El trigo contiene la proteína del gluten. Esta proteína particular también contribuirá al enlace junto con los otros ingredientes del alimento del pescado.

Muchas especies de pescado se pueden utilizar de almidón crudo solo a un grado limitado. Los salmónidos, por ejemplo, tienen baja digestibilidad del almidón crudo, pero pueden, a un grado mayor, digerir almidón cocido. Por consiguiente, la técnica de extrusión es particularmente ventajosa, debido a que la mayoría del almidón será cocida en el curso del proceso.

El contenido de almidón varía del tipo de alimento al tipo de alimento. En las recetas, en las cuales se desea, un alto contenido de tanto proteína digestible como grasa digestible, el contenido de trigo es bajo. Un contenido de trigo de cerca de 8% (base en peso seco) es representativo de tales recetas. En otras recetas existe un deseo de cantidades proporcionalmente más pequeñas de ambas proteínas digestibles y grasas digestibles. En tales recetas se requieren rellenos, y el trigo entero es apropiado para este propósito debido a que el trigo es un material crudo barato para la industria de alimentación de peces. En tales recetas el contenido de trigo puede exceder el 20% (base en peso seco).

También se conoce que el uso de otros aglutinantes para la preparación de alimentos para pescado. En algunas conexiones es deseable utilizar masa de pescado fresco o congelado como un ingrediente. En tales piensos es usual utilizar polímeros como alginatos y goma guar como un aglutinante. Tales polímeros se consideran que son indigeribles por el pescado. Esto es un inconveniente por sí mismo, y además, se conoce que el alginato y la goma guar reducen la digestibilidad de la proteína y de la grasa. De esta manera, Storebakken (Storebakken, T. (1985): Binders in fish feeds. I. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture*, 47, 11-26) muestra que la digestibilidad de la proteína y la digestibilidad de la grasa disminuye con el incremento de cantidades de estos aglutinantes en el pienso. El efecto negativo fue mayor para la goma guar. En este trabajo la mezcla inferior fue del 2% de ya sea el alginato o la goma guar, mientras que la mezcla mayor fue del 10%. En los experimentos que conciernen la digestibilidad, ningún otro aglutinante fue utilizado. Storebakken también reporta que el contenido de agua en las heces de los pescados incrementa con el uso de un aglutinante, relativo al alimento que no incluyó un aglutinante. En el posterior trabajo, en el cual Storebakken investiga la importancia de la viscosidad del aglutinante, seis diferentes tipos de alginatos se utilizaron como aglutinantes. En este estudio se utilizó, el 5% de alginato. Las conclusiones fueron las mismas: La digestibilidad de la proteína y la digestibilidad de la grasa fueron inferiores que para el pienso control sin un aglutinante, y el contenido de sustancia seca en las heces de los pescados fue inferior que cuando la alimentación con el pienso control. (Storebakken, T. (1987): Binders in fish feeds. II. Effect of different alginates on the digestibility of macronutrients in rainbow trout. *Aquaculture*, 60, 121-131).

Ahora es sorprendentemente ha cambiado que mezclando cantidades más pequeñas de aglutinantes indigestibles del tipo no-almidón (*a partir de ahora también llamados aglutinantes fecales*), tales como alginatos y goma guar, en el alimento para pescado, en los cuales el almidón se utiliza como el aglutinante *ordinario*, se logra que las partículas de heces consigan una mejor resistencia de cizallamiento. Al mismo tiempo, sorprendentemente cambia que la digestibilidad de la proteína y digestibilidad de la grasa no se afectan negativamente y que el contenido de sustancia seca de las heces no cambia tampoco. Los aglutinantes fecales pueden afectar la viscosidad, elasticidad y estabilidad estructural de sustancias de pienso durante la digestión y defecación. La adición de aglutinantes fecales a un alimento para pescado, también puede ser utilizada para ajustar la estabilidad de las partículas fecales cuando estas están en el agua. Para este propósito solo muy pequeñas cantidades de uno o más aglutinantes indigestibles se requieren, ya que este/estos se concentrarán durante la digestión y logran su/sus concentración más activa en el tracto intestinal.

Esto es ventajoso por razones biológicas, como los efectos negativos en la digestibilidad se previenen o minimizan.

Basándose en estos efectos, la adición de ciertos aglutinantes fecales al pienso para la cría de pescado en agua dulce, especialmente salmónidos, producirá un incremento en la estabilidad hidromecánica de las partículas fecales, es decir que las partículas resistirán, a un grado mayor, el efecto de desintegración del movimiento del agua, debido a que aumenta la resistencia de cizallamiento. El incremento de la resistencia de cizallamiento reduce la desintegración

ES 2 308 491 T3

de las partículas cuando se exponen a las fuerzas de cizallamiento, es decir como cuando las partículas de diferente resistencia de cizallamiento se someten a la misma carga hidromecánica, las partículas estabilizadas mantendrán una mayor dimensión. Las partículas grandes se separarán más eficientemente mediante el tratamiento mecánico en, por ejemplo, un filtro o tazón de sedimentación. Además, una porción más grande del contenido total de nutrientes se unirá en las partículas debido a la pérdida de las partículas más grandes se reduce debido a una superficie de contacto de agua reducida.

De esta manera, la invención se relaciona con un pienso para la cría de pescado en agua dulce, el pienso que es de tipo comprimido o extruido y que contiene almidón como un aglutinante ordinario, que se adiciona al pienso hasta 25 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso de una harina de algas, un alginato de calcio o goma guar como un aglutinante fecal de tipo no-almidón.

La concentración de harina de algas es ventajosamente de 1 a 20 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso, más ventajosamente de 1 a 5 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso.

La concentración del alginato de calcio es ventajosamente de 5 a 15 g, más ventajosamente de 8 a 12 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso.

La concentración de goma guar es ventajosamente de 1 a 10 g, más ventajosamente de 1 a 5 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso.

El aglutinante fecal de tipo no-almidón puede ser una combinación de dos o más de los aglutinantes en el grupo que consiste de harina de algas, alginato de calcio y goma guar.

La invención también incluye un método para reducir el contenido de nutrientes indeseados en el agua descargada de una piscifactoría, en donde se ha adicionado a la mezcla de ingredientes de alimentación para un pienso para la cría de tipo comprimido o extruido y que contiene almidón como un aglutinante ordinario, una adición de hasta 25 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso del citado aglutinante fecal de tipo no-almidón; el pescado se alimenta del pienso para la cría comprimido o extruido y las heces se retiran de la piscifactoría.

El aglutinante fecal, que se utiliza en dicho método, es ventajosamente una combinación de dos o más de los aglutinantes en el grupo que consiste de harina de algas, alginato de calcio y goma guar.

Por la expresión “ingredientes constitutivos del pienso” se entiende las cantidades actuales de diferentes ingredientes de material crudo sobre una base en peso húmedo, incluyendo grasas como aceite de pescado y aceite vegetal, que se incluyen en la mezcla del pienso para la producción del pienso comprimido o extruido, antes de una posible, necesaria adición de agua para el proceso de compresión o extrusión y antes de una posible, necesaria eliminación del agua en el proceso de secado, después del proceso de compresión o extrusión.

El término “mezcla de ingredientes del pienso” conduce a las mismas condiciones que se describen para “ingredientes constitutivos del pienso”.

A continuación, hay descritos ejemplos no-limitantes de modalidades preferidas, que se visualizan a través de la descripción de experimentos de laboratorio y las figuras anexas; en las cuales:

Figura 1 muestra la diferencia visual en la estabilidad de las heces de trucha alimentada con una dieta básica (A) y de la trucha alimentada con la misma dieta básica con la adición de goma guar como un aglutinante fecal (B), las heces que han sido recolectadas por disección del tracto intestinal;

Figura 2 muestra los módulos de viscosidad y elasticidad en muestras fecales de trucha, dependiendo del contenido de aglutinante fecal utilizado en las dietas;

Figura 3 muestra distribución del tamaño acumulativo dependiente del tamaño de las partículas suspendidas después de la desintegración por la carga hidromecánica definida, dependiendo del contenido de aglutinante fecal utilizado en las dietas; y

Figura 4 muestra contenido particulado de nitrógeno y fósforo en sólidos suspendidos con el aumento del tamaño de partícula después de lavado por 1 hora (media + desviación estándar).

60 *Materiales y métodos*

Dietas y aglutinantes fecales - experimentos preliminares

En los experimentos preliminares la dieta básica se compara con diferentes tratamientos, en los cuales diferentes aglutinantes en ciertas concentraciones han sido adicionados a una dieta básica. Los siguientes aglutinantes se utilizaron: Lignina sulfonato, harina de algas, almidón modificado (no-gelatinizado), alginato de calcio, gelatina de pescado, goma guar, almidón sólido y polvo de celulosa.

ES 2 308 491 T3

La dieta se dio a grupos de trucha arco iris por 5 semanas, mínimo. Se utilizó, pienso extruido de un tamaño de pellet de 3.0 mm o 4.5 mm. Las composiciones de dieta básica fueron comparables con mezclas de piensos de mercancías comerciales comunes. Por disección de muestras fecales se eliminaron de la parte inferior del recto, y el análisis macroscópico de estas y de las heces depositadas en el fondo del recipiente, y se realizaron experimentos de sedimentación en conos Imhoff se utilizaron con el fin de encontrar los efectos de aglutinantes en la estabilidad de las partículas fecales. La digestibilidad aparente (proteína cruda, lípido crudo), crecimiento específico y utilización del pienso se midieron con el fin de encontrar posibles efectos negativos de los aglutinantes en la calidad del pienso.

Las concentraciones de aglutinante fecal que dieron las partículas fecales más estables sin afectar la digestibilidad, crecimiento y absorción del alimento, se utilizaron en los otros dos experimentos de alimentación.

Explotación de la Trucha Arco Iris

La Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*, todas hembras del Hofer stock) se alimentaron en recipientes de fibra de vidrio verdes circulares (diámetro 1 m, altura 0.7 m) con un volumen de agua de 0.5 m³.

Los pescados fueron de una condición microbiológica convencional, sin especificar. El agua libre de patógeno de pescado se suministró de un pozo de agua subterránea. La corriente de agua se trató por aireación con pequeñas burbujas para remover el nitrógeno elemental y el dióxido de carbono así como para adicionar oxígeno hasta lograr saturación. El agua se suministró a cada recipiente a través de una tubería de acceso de PVC vertical a un ángulo de 45°. La entrada se orientó tangencialmente cerca de la pared del recipiente para proporcionar un flujo circular ligero, en el cual los peces se podrían orientar. La forma de auto= limpieza del recipiente proporcionado por todas las heces que se llevan a un tubo de desagüe central, que se cubrió con una placa perforada (diámetro de la placa 0.2 m con un diámetro de hueco de 0.01 m). Fue, por consiguiente, innecesario limpiar los recipientes. La velocidad de flujo del agua se ajustó a 7-9 l/min. Los recipientes se alumbraron diariamente por 12 horas (entre 0700 y 1900) sin penumbra. Contenido de oxígeno (± 0.1 mg O₂/l), pH (± 0.1) y temperatura ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) se midió diariamente una hora y media después de la alimentación manual en la entrada de agua. Los parámetros del agua se midieron de acuerdo con el Método estándar Alemán para análisis de agua, aguas residuales y lodos (modificado de acuerdo con Gewässerschutzkommission, Dem Bodensee in den Abflussjahren 1996 und 1997 zugeführte Stofffrachten, p. 42. Internationale Gewässerschutzkommission für den Bodensee, 2000), se realizaron como se describen anteriormente, pero solo en el inicio y el final de cada experimento. Los parámetros del agua estuvieron todos dentro del área recomendada para la cría de trucha arco iris. Las cifras promedio fueron:

Parámetro	Experimento 1	Experimento 2
Oxígeno (mg/l) (pt)	8.1	7.8
pH (pt)	8.1	8.1
Temperatura °C	11.7	13.2

Experimentos 1 y 2								
NH ₄ -N (mg/l)	NO ₂ -N (mg/l)	NO ₃ -N (mg/l)	Cloruro (mg/l)	Sulfato (mg/l)	PO ₄ -P (mg/l)	Conductividad (PS/cm)	Capacidad reguladora (mmol/l)	iones alcalinotérreos (mmol/l)
164.8	2.6	1889	7.4	18.8	72	580	6.5	19.7

En el Experimento 1 un total de 75 truchas por recipiente se alimentaron con dietas experimentales, y en el Experimento 2 un total de 99 truchas por recipiente. Para los diferentes grupos de experimentos de truchas se seleccionaron, anestesiaron y mataron (n = 15, 25 o 30 por recipiente). El peso promedio inicial de las truchas en el Experimento 1 fue 184 g y en el Experimento 2 191 g.

ES 2 308 491 T3

Composición de la Dieta y la alimentación

TABLA 2

Aglutinantes fecales utilizados

Aglutinante fecal	Especificación del Producto	Características (solubilidad*, viscosidad, fuerza del gel*, digestibilidad)	Nivel del precio	Cantidad adicionada
Algae meal	ALGIBIND (p.c. 5221025), Algae a.s.	Soluble en agua fría, baja viscosidad, baja fuerza del gel, parcialmente digerible	Bajo	0.1-2 %
Alginato de calcio	ALGINATE (Scogin HV Alginato-2205000, FMC BioPolymer	Soluble en agua fría, viscosidad media, fuerza del gel media, indigerible	Alto	1 %
Goma guar		Soluble en agua fría, muy alta viscosidad, fuerza de gel alta, indigerible	Medio	0.1-1.0 %
*) Concentración-dependiente de la viscosidad y fuerza del gel de acuerdo con la información del distribuidor.				

El pescado se alimentó 1.2% de su peso corporal seis días por semana (Lunes a Sábado). Aproximadamente 40% de la ración diaria se dio manualmente bajo observación continua del comportamiento en la entrada entre 0730 y 0900. El pienso remanente se dio por medio de una máquina de alimentación que alimenta continuamente hasta 1800. Con este patrón de alimentación los experimentos iniciales dieron una excreción de heces de cerca de 1000.

Seis dietas se formularon (ver la Tabla 2). Se diferenciaron de cada una, solo en el contenido de aglutinante fecal. Todas las dietas contuvieron las mismas cantidades de proteína y energía. Contuvieron niveles balanceados de aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales y son recomendados los niveles anteriores (Council N.R.: Nutrient requirements of fish, Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture, 1993). El aglutinante fecal se adicionó como polvo seco a los otros ingredientes secos antes de la extrusión de la masa. Las dietas se sometieron a extrusión (valores máximos en la extrusora matriz 120°C, 22 bares) con un diámetro de 4.5 mm.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 308 491 T3

La dieta básica contenida por kg de pienso:

	Comida de pescado	305.09 g
5	Soja Semi-concentrada (Hamlet proteína):	200.00 g
	Gluten de maíz:	192.80 g
10	Trigo	122.23 g
	Fosfato monocalcico ^a :	6.61 g
	Aceite de pescado:	168.00 g
15	Mezcla de minerales ^b :	2.35 g
	Mezcla de vitaminas ^c :	2.35 g
	Licina HCl:	3.00 g
20	Rosa de Carophyll:	0.60 g
	Itrio oxidado:	0.10 g

a) Fósforo disponible 4.71 g/kg.

b) La mezcla de minerales se compone de:

25 Calcio 150 g/kg, magnesio 8000 mg/kg, potasio 120 mg/kg; hierro 10000 mg/kg, zinc 35000 mg/kg, manganeso 4000 mg/kg, cobre 800 mg/kg, selenio 25 mg/kg, yodo 50 mg/kg.

c) La mezcla de vitaminas se compone de:

30 Vit A 550000 IU/kg, Vit D 420000 IU/kg, Vit E 45000 mg/kg, Vit K 2500 mg/kg, Vit B1 2200 mg/kg, Vit B2 4100 mg/kg, Vit B6 4500 mg/kg, Vit B5 13000 mg/kg, Niacina 15000 mg/kg, Folato 900 mg/kg.

d) óxido de Itrio se adicionó como un marcador para medir la digestibilidad.

35

TABLA 3

40

Adición de un aglutinante fecal a las dietas experimentales

45

Aglutinante Fecal	Unidad de medición	Dieta 1 BD	Dieta 2 GG 0.1	Dieta 3 GG 0.3	Dieta 4 AB1	Dieta 5 AB2	Dieta 6 AT1
Goma guar (GG)	g/kg		1.00	3.00	-	-	-
Algibind (AD)	g/kg	-	-	-	3.00	6.00	-
Alginato (AT)	g/kg	-	-	-	-	-	10.00

55

Digestibilidad, crecimiento específico, uso del pienso

60

Para la medición de la digestibilidad, 54 truchas por tratamiento en el Experimento 1 y 75 truchas por tratamiento en el Experimento 2 se anestesiaron con aceite de clavo (concentración 0.1 ml/l, tiempo de exposición aproximadamente 1 min.) y las heces se eliminaron del orificio anal. Las heces se congelaron inmediatamente en criógeno, liofilizaron y homogenizaron. El contenido de sustancia seca, proteína, grasa, fósforo y óxido de itrio se determinó. La digestibilidad de la proteína, grasa y fósforo de las diferentes dietas se estimó.

65

El contenido de sustancia seca se determinó como la relación de peso húmedo y peso seco después de liofilizar. La proteína en bruto se analizó de acuerdo con la Directrices de la Comisión EU 93/28/EEC (el método de Kjeldahl), pero con selenio como catalizador. El lípido en bruto se analizó de acuerdo con las Directrices de la Comisión EU 84/4EEC

(método B), pero con dietiléter como el solvente. El fósforo y el itrio se determinaron externamente (Jordforsk, Ås, Norway). A las muestras se le adicionaron 10 ml de ácido nítrico 6M (p.a.) y 0.5 ml de peróxido de hidrógeno (p.a.) en un horno de microondas y se diluyeron con agua destilada. Finalmente las muestras se analizaron en un ICP-AES (Espectrómetro de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente). El peso húmedo del pescado se determinó individualmente (1 g) directamente después de la muerte para las posteriores muestras de heces disecadas. La velocidad de crecimiento específica se determinó como:

$$SGR [\%] = 100 * \frac{\ln(\text{Peso final}) - \ln(\text{Peso inicial})}{T(\text{Fecha final}) - T(\text{Fecha inicial})}$$

La velocidad de conversión del pienso se calculó como

$$FCR = \frac{\text{Pienso [kg]}}{\text{Crecimiento [kg]}}$$

La recolección de muestras fecales

Para la reología y tamaño de partícula que registran ciertos grupos de truchas se tomaron de cada recipiente, se anestesiaron con aceite de clavo (0.1 ml/l, 1 min.) y mataron por un golpe en la cabeza. Las partículas fecales más cercanas al orificio anal se eliminaron por disección. Solamente las partículas fecales claramente cubiertas de mucosidad se utilizaron. Las heces se colocaron en platos de aluminio, herméticamente sellados con una película plástica con el fin de prevenir la deshidratación, y luego se enfriaron a 4°C para disminuir los procesos de descomposición microbiana. Todas las mediciones se terminaron dentro de 8 horas después de la disección. Las heces y los intestinos se examinaron macroscópicamente para detectar las membranas mucosas en los intestinos, enteritis exudativa (inflamación intestinal activa) y enteritis hemorroidal (inflamación intestinal con hemorragia).

Medición reológica

Para la medición reológica 15 truchas (Experimento 1) y 25 truchas (Experimento 2) se seleccionaron como se indica anteriormente. Dependiendo del tamaño, tres a cuatro partículas fecales (volumen necesario para medir $\approx 3 \text{ cm}^3$) se combinaron y transfirieron a un reómetro (Paar Physica UDS 200). El método de medición aplicado fue MP 313 (diámetro de la placa 50 mm, 0°) con una abertura de 1 mm. El factor de carga de cizallamiento fue 2.0371833 y el factor de velocidad de cizallamiento fue 2.6179939. El tiempo de medición fue 12 segundos. En el tiempo de registro se utilizó una deformación con una amplitud de $\gamma = 60\%$ a una frecuencia de 1 Hz. Para registrar la frecuencia se utilizó una deformación con una amplitud de $\gamma = 40\%$ a las frecuencias de 50; 32.1; 20.6; 13.2; 8.47; 5.43; 3.49; 2.24; 1.43; 0.92; 0.59; 0.38; 0.24; 0.16 y 0.10 Hz. El tiempo de medición fue 30 segundos. La temperatura en la unidad del experimento se ajustó a 4°C y humedad atmosférica se ajustó a 100% de saturación. Todas las mediciones se comprobaron por deformación. Cada medición se inició con un tiempo de barrido de 50 deformaciones sencillas, seguidas por una frecuencia de barrido después de una espera de 60 segundos.

Distribución del tamaño de partícula

Para la determinación del tamaño de partícula 15 truchas (Experimento 1) y 30 truchas (Experimento 2) se seleccionaron como se indica anteriormente. Primero las partículas fecales del control, que tienen un peso de 2 g, se fraccionaron bajo las condiciones prescritas hasta que mostraron la misma distribución del tamaño de partícula (PSD) como se observa en el agua descargada de los criaderos de truchas. Esto se realizó mediante un método en el cual la turbulencia se proporciona por un flujo constante de aire desde abajo en 2 l de agua destilada. El ajuste predeterminado, es decir 0.05 MPa y un tiempo de exposición de 8 minutos, se utilizó en todos los experimentos. La cantidad de heces fue 2 g (± 0.01 g) peso húmedo para el Experimento 1 y 3 g (± 0.01 g) peso húmedo para el Experimento 2. La determinación del tamaño de partícula se realizó con el uso de un calibrador de partículas laser no-invasivo (GALAI: CIS-1) equipado con un control de flujo (GALAI:LFC-100) y un flujo-a través de la célula (GALAI: GM-7). Como el límite de medición superior para un calibrador de partículas laser es 600 μm , todos los valores se corrigieron por el porcentaje de partículas más grandes que 600 μm . Este valor se determinó por el uso de un tamiz.

ES 2 308 491 T3

Resultados

Experimento 1

5 Digestibilidad, velocidad de crecimiento específico, utilización del pienso

- La velocidad de crecimiento específica fue $1.13\% \pm 0.069\%$ (desviación estándar promedio \pm recipiente promedio).
- 10 • La velocidad de conversión del pienso promedio fue de 0.90 ± 0.046 .
- En el final el peso promedio fue 257 a 292 g.
- Las trazas no determinables macroscópicamente del aglutinante fecal se podrían dirigir en el tracto intestinal.
- 15 • En hasta dos individuos por tratamiento irritación intestinal ligera (rubor) se observó, pero esto también se observó en los grupos control.
- Tres individuos alimentados con diferentes dietas mostraron la presencia de enteritis hemorroidal.
- 20 • El aglutinante fecal no afectó la digestibilidad observada de la proteína, lípido y fósforo (ver Tabla 4).

TABLA 4

25 *El efecto del tratamiento con aglutinante fecal sobre el coeficiente de digestibilidad (%) de la proteína, lípido y fósforo*

Pienso	Proteína	Lípido	Fósforo
Dieta básica	87.2 %	90.1 %	48.2 %
+ Guar goma (0.1 %)	87.3 %	91.6 %	47.9 %
+ Guar goma (0.3 %)	85.6 %	89.0 %	51.0 %
+ Algibind (0.3 %)	86.9 %	92.5 %	47.0 %
+ Algibind (0.6 %)	86.6 %	90.7 %	53.3 %
+ Alginato (1.0 %)	88.3 %	90.8 %	56.5 %

Experimento 1

45 *Medición reológica*

Al menos tres repeticiones se realizaron. La medición del tratamiento de la goma guar (0.1%) dio valores incorrectos debido a un error en el programa control del reómetro. Estas mediciones se eliminaron de los análisis.

50 La adición de todos los aglutinantes fecales utilizados dio una mejora significativa en la viscosidad y los módulos de elasticidad en heces del pescado (Figura 2, Tabla 5). Este es el más claro en el Experimento 1. La dieta básica dio en el Experimento 1 menos partículas fecales estables que en el Experimento 2 (Figura 2). Comparado con la dieta básica, la goma guar condujo al mayor incremento en la viscosidad (183%) y el Alginato condujo al mayor incremento en el módulo de elasticidad (173%). En una combinación de ambos parámetros de visco-elasticidad, la goma guar dio en mejor resultado (155.5%) seguido por el Alginato (136%).

Todas las funciones de visco-elásticas muestran un debilitamiento en el tiempo, que es en la mayoría evidente para el módulo de elasticidad del miembro Alginato.

60 Algibind se utiliza en dos diferentes cantidades en el Experimento 1. El módulo de viscosidad así como el módulo de elasticidad incrementado significativamente con el contenido incrementado,

65

ES 2 308 491 T3

TABLA 5

Valor promedio ajustado para los módulos de viscosidad y elasticidad en heces de truchas alimentadas con una dieta básica o una dieta básica con aglutinante fecal adicionado

Dieta	Viscosidad		Módulo de elasticidad	
	Promedio	Mejora	Promedio	Mejora
Dieta básica	38.6 Pas	-	110.7 Pa	-
+ Guar goma (0.3 %)	109.3 Pas	+183 %	252.5 Pa	+128 %
+ Algibind (0.1 %)	59.6 Pas	+54 %	197.2 Pa	+78 %
+ Algibind (0.3 %)	72.4 Pas	+88 %	235.2 Pa	+112 %
+ Alginato (1.0 %)	77.4 Pas	+100 %	302.5 Pa	+173 %

Experimento 1

Distribución del tamaño de partícula

Toda la distribución del tamaño de partícula observada en las heces del pescado alimentado con dietas que contienen un aglutinante fecal mostró un incremento en el tamaño de partícula (ver Figura 3). El efecto sobre el tamaño de partícula se aumentó con un incremento en el contenido del aglutinante fecal respectivo (Figura 4, Tabla 6). La goma guar dio la mejor mejora. En general el efecto fue más evidente con el aumento del tamaño de partícula.

La tabla 6 muestra los porcentajes de la cantidad total de las partículas debajo de 100 μm y debajo de 600 μm , respectivamente, dependiendo del tratamiento. La goma guar y el Alginato resultaron en una cantidad de partículas significativamente más pequeña debajo de ambos tamaños, mientras que Algibind no dio el mismo efecto. Por medio del potencial filtrado conectado con una suspensión de estas características de tamaño, el efecto en el contenido de partículas en el agua descargada se puede calcular por proporcionalidad. Con la adición de goma guar (0.3%) la cantidad de partículas hasta el tamaño de 100 μm en el agua descargada fue reducido por 40.2% y 600 μm por 24.6%, mientras que para el Alginato (1.0%) una reducción del 30.6% se encontró por el tamaño 100 μm y 13.3% para 600 μm .

TABLA 6

Porcentaje del volumen de partícula total debajo de 100 μm y debajo de 600 μm de partículas de heces de pescado suspendidas del pescado alimentado con la misma dieta básica con diferentes contenidos de aglutinante fecal.

Mejora = porcentaje de mejora relativo a una dieta básica en carga de desechos remanente después de filtrar a 100 μm y 600 μm

Dieta	A 100 μm		A 600 μm	
	% Acumulativo	Mejora	% Acumulativo	Mejora
Dieta básica	38.8	-	92.0	-
+ Goma guar (0.1 %)	27.8	-28.3 %	75.2	-18.3 %
+ Goma guar (0.3 %)	23.2	-40.2 %	69.4	-24.6 %
+ Algibind (0.1 %)	36.3	-6.4 %	90.4	-1.7 %
+ Algibind (0.3 %)	35.1	-9.5 %	89.1	-3.2 %
+ Alginato (1.0 %)	26.9	-30.6 %	79.8	-13.3 %

ES 2 308 491 T3

Experimento 2

Digestibilidad, velocidad de crecimiento específico, utilización del pienso

- 5 • La velocidad de crecimiento específica fue del $1.11\% \pm 0.082\%$ (desviación estándar \pm promedio del recipiente promedio).
- La velocidad de conversión del pienso promedio fue de 0.73 ± 0.026 .
- 10 • En el final el peso promedio fue de 417 a 490 g.
- Ninguna traza determinable macroscópicamente del aglutinante fecal se podría apuntar en el tracto intestinal.
- En hasta dos individuos por tratamiento, se observó irritación intestinal ligera (rubor), pero esta también se observó en los grupos control.
- 15 • Tres individuos alimentados con diferentes dietas mostraron la presencia de enteritis hemorroidal.
- El aglutinante fecal no afectó la digestibilidad observada de la proteína, lípido y fósforo (ver Tabla 7).
- 20

TABLA 7

El efecto del tratamiento del aglutinante fecal sobre el coeficiente de digestibilidad (%) de la proteína, lípido y fósforo

Pienso	Proteína	Lípido	Fósforo
Dieta básica	$89.7\% \pm 0.17\%$	$95.7\% \pm 0.25\%$	$46.7\% \pm 0.23\%$
+ Goma guar (0.3 %)	$89.1\% \pm 0.23\%$	$94.6\% \pm 0.45\%$	$51.5\% \pm 0.90\%$
+ Alginato (1.0 %)	$89.4\% \pm 0.09\%$	$95.98\% \pm 0.13\%$	$50.4\% \pm 0.36\%$

Experimento 2

Medición reológica

40 Al menos nueve repeticiones se realizaron. La medición del miembro de goma guar (0.1%) dio valores incorrectos debido a un error en el programa control del reómetro. Estas mediciones se eliminaron del análisis.

45 La adición de todos los aglutinantes fecales utilizados dio una mejora significativa en la viscosidad y los módulos de elasticidad en las heces del pescado (Figura 2, Tabla 8). Esto es más evidente en el Experimento 1 que en el Experimento 2. La dieta básica dio en el Experimento 2 más partículas fecales estables que en el Experimento 1 (Figura 2). Comparada con la dieta básica, la goma guar condujo al mayor incremento en viscosidad (140%) y el Alginato condujo al mayor incremento en el módulo de elasticidad (125%). En una combinación de ambos parámetros de visco-elasticidad, la goma guar dio un mejor resultado (108.5%) seguido por el Alginato (86.5%).

50 Todas las funciones visco-elásticas mostraron un debilitamiento en el tiempo, que es la más evidente para el módulo de elasticidad por el miembro Alginato.

TABLA 8

Valor promedio ajustado para los módulos de viscosidad y elasticidad en heces de truchas alimentadas con una dieta básica o una dieta básica con aglutinante fecal adicionado

Dieta	Viscosidad		Módulo de elasticidad	
	Promedio	Mejora	Promedio	Mejora
Dieta básica	49.4 Pas	-	161.2 Pa	-
+ Goma guar (0.3 %)	118.3 Pas	+140 %	284.6 Pa	+76 %
+ Alginato (1.0 %)	72.5 Pas	+47 %	362.6 Pa	+125 %

Experimento 2

Distribución del tamaño de partícula

5 Toda la distribución del tamaño de partícula observada en las heces del pescado alimentado con dietas que contienen aglutinantes fecales mostraron un tamaño de partícula incrementado (ver Figura 3). El efecto sobre el tamaño de partícula se aumentó con un incremento del contenido del aglutinante fecal respectivo (Figura 4, Tabla 9). El efecto reducido del aglutinante fecal en el Experimento 2 es en concordancia con el efecto reducido correspondiente sobre los parámetros de visco-elasticidad en el Experimento 2. La goma guar dio la mejor mejora. El efecto es menos evidente en el Experimento 2, en el cual el Alginato mostró el mejor efecto para el tamaño de partícula debajo de 128 μm .
10 Generalmente, el efecto fue más evidente con el tamaño de partícula incrementado.

15 La Tabla 9 muestra el porcentaje de la cantidad total de las partículas debajo de 100 μm y debajo de 600 μm , respectivamente, dependiendo del tratamiento. La goma guar y el Alginato resultaron en una cantidad significativamente más pequeña de las partículas debajo de ambos tamaños, mientras que el Algibind no dio el mismo efecto. Por medio del potencial filtrado conectado con una suspensión con estas características de tamaño, el efecto sobre el contenido de las partículas en el agua descargada se puede calcular por la proporcionalidad. Con la adición de goma guar (0.3%) la cantidad de partículas hasta el tamaño de 100 μm en el agua descargada se redujo por 18.2% y 600 μm por 14.7%, mientras que para el Alginato (1.0%) una reducción del 23.3% se encontró para el tamaño de 100 μm y 2.9% para
20 600 μm .

TABLA 9

25 *Porcentaje del volumen de partícula total debajo de 100 μm y debajo de 600 μm de las partículas de pescado suspendidas de las heces del pescado alimentado con la misma dieta básica con diferentes contenidos de aglutinante fecal. Mejora = porcentaje de mejora relativo a una dieta básica en la carga de desechos remanente después de la filtración a 100 μm y 600 μm*

Dieta	A 100 μm		A 600 μm	
	% Acumulativo	Mejora	% Acumulativo	Mejora
Dieta básica	35.1	-	93.4	-
+ Goma guar (0.3 %)	28.7	-18.2 %	79.7	-14.7 %
+ Alginato (1.0 %)	26.9	-23.3 %	90.7	-2.9 %

40 *El efecto del tamaño de partícula sobre los procesos de lavado*

Los experimentos de lavado con 125 suspensiones fecales de un primer experimento mostraron un incremento significativo en contenido de nitrógeno y fósforo con un incremento tamaño de partícula (ver Figura 4), lo que indica
45 que las partículas más grandes tienen un potencial más grande para retener estas sustancias.

Con el fin de investigar los efectos de lavado de la adición del aglutinante fecal, el material inicial de las heces debe ser idéntico con respecto al peso seco y contenido de nutrientes. El peso seco de las heces de 75 truchas por recipiente se determinó con una repetición por el miembro aglutinante. El peso seco del miembro control (dieta básica) fue 11.4% (0.2%) (Desviación estándar promedio), para la goma guar (0.3%) 11.6% 0.3%, y para el Alginato (1.0%) 10.9% 0.1% sin ninguna diferencia estadísticamente significativa. Tampoco existen diferencias significativas en el contenido de los nutrientes.
50

Para el miembro control y la goma guar (0.3%) (n=15) y para el Alginato (1.0%) (n=16) muestras de 3 g de heces se lavaron por 1 hora. Los sólidos remanentes no mostraron una diferencia significativa en el contenido de nitrógeno o fósforo (ver Tabla 10). Un contenido significativamente más alto de la sustancia seca (+ 5%) y fósforo particulado (+ 14.9%) se podrían observar en heces del miembro goma guar comparados con la dieta básica. El tratamiento con Alginato no mostró un incremento significativo en la retención de sólidos en la forma de sustancia seca, nitrógeno o fósforo comparados con el miembro control (dieta básica).
55

60

65

TABLA 10

Valores Promedio para el remanente total de la sustancia seca (TS), nitrógeno particulado (N) y fósforo particulado (P) después de la suspensión de 3 g de muestras de heces de la trucha por 1 hora en agua destilada con diferentes tratamientos (desviación estándar promedio)

Dieta	TS [mg]	Mejora	NH ₄ -N [mg]	Mejora	PO ₄ [mg]	Mejora	P [%]	N [%]
Dieta Básica n=15	236.9 ± 4.4	-	6.452 ± 0.205	-	7.717 ± 0.265	-	3.3 ± 0.89	2.7 ± 0.94
+ Goma guar (0.3 %); n=15	249.5 ± 3.3	+5.1 %	6.324 ± 0.328	-1.99 %	8.863 ± 0.353	+14.9 %	3.3 ± 0.12	2.3 ± 0.12
+ Alginato (0.1 %); n=16	238.0 ± 3.0	+0.8 %	5.524 ± 0.184	-14.4 %	7.872 ± 0.219	+2.0 %	3.6 ± 0.76	2.5 ± 0.76

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Literatura no-patente citada en la descripción

- CRIPPS, S. J. Minimizing outputs: treatment. *Journal of Applied Ichthyology*, 1994, vol. 10, 284-294 [0005]
- STOREBAKKEN, T. Binders in fish feeds. I. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture*, 1985, vol. 47, 11-26 [0016]
- STOREBAKKEN, T. Binders in fish feeds. II. Effect of different alginates on the digestibility of macronutrients in rainbow trout. *Aquaculture*, 1987, vol. 60, 121-131 [0016]
- COUNCIL N.R. Nutrient requirements of fish, Committee on Animal Nutrition. *Board of Agriculture*, 1993 [0037]

ES 2 308 491 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un pienso para la cría de peces de agua dulce, el pienso que es de tipo comprimido o extruido y que contiene almidón como un aglutinante ordinario, **caracterizado** porque además del contenido de almidón como un aglutinante ordinario, se han añadido al pienso, hasta 25 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso, una harina de algas, un alginato de calcio, o goma guar como un aglutinante fecal de tipo no-almidón.

10 2. Un pienso de la cría de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene de 1 a 20 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso de una harina de algas.

3. Un pienso de la cría de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la concentración de harina de algas es de 1 a 5 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso.

15 4. Un pienso de la cría de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene de 5 a 15 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso de alginato de calcio.

5. Un pienso de la cría de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la concentración de alginato de calcio es de 8 a 12 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso.

20 6. Un pienso de la cría de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene de 1 a 10 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso de goma guar.

25 7. Un pienso de la cría de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la concentración de goma guar es de 1 a 5 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso.

8. Un pienso de la cría de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el aglutinante fecal de tipo no-almidón, es una combinación de dos o más de los aglutinantes en el grupo que consiste de harina de algas, alginato de calcio y goma guar.

30 9. Un método para la reducción del contenido de nutrientes indeseados en el agua liberada de una piscicultura, **caracterizado** porque

35 - a la mezcla del pienso de ingredientes para un pienso de la cría de tipo comprimido o extruido que contiene almidón como un aglutinante ordinario, se le ha añadido un suplemento de hasta 25 g por kg de los ingredientes constitutivos del pienso de un aglutinante fecal de tipo no-almidón, el cual es una harina de algas, un alginato de calcio, o goma guar;

- el pescado se alimenta del pienso de la cría, comprimido o extruido y

40 - las heces se retiran de la piscicultura.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el aglutinante fecal es una combinación de dos o más de los aglutinantes en el grupo que consiste de harina de algas, alginato de calcio y goma guar.

45

50

55

60

65



A) Dieta Básica



B) Dieta básica + Goma guar

Fig. 1

Experimento 1:

Experimento 2:

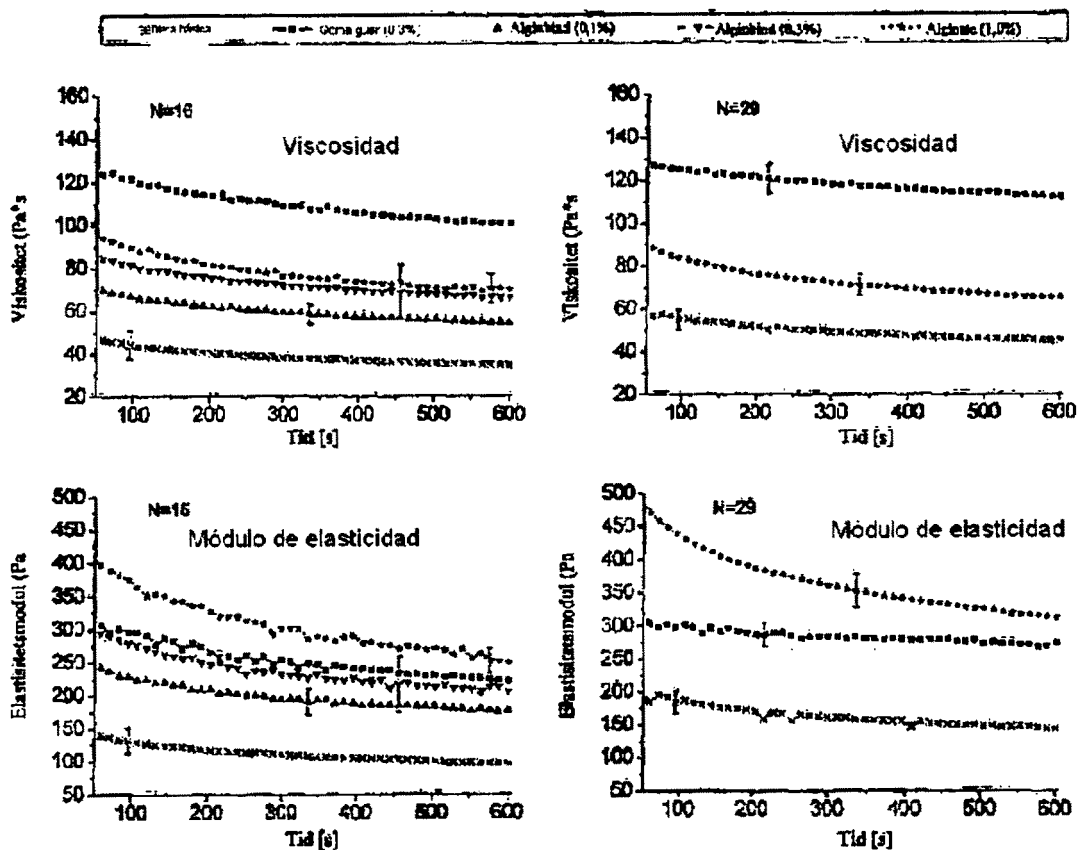


Fig. 2

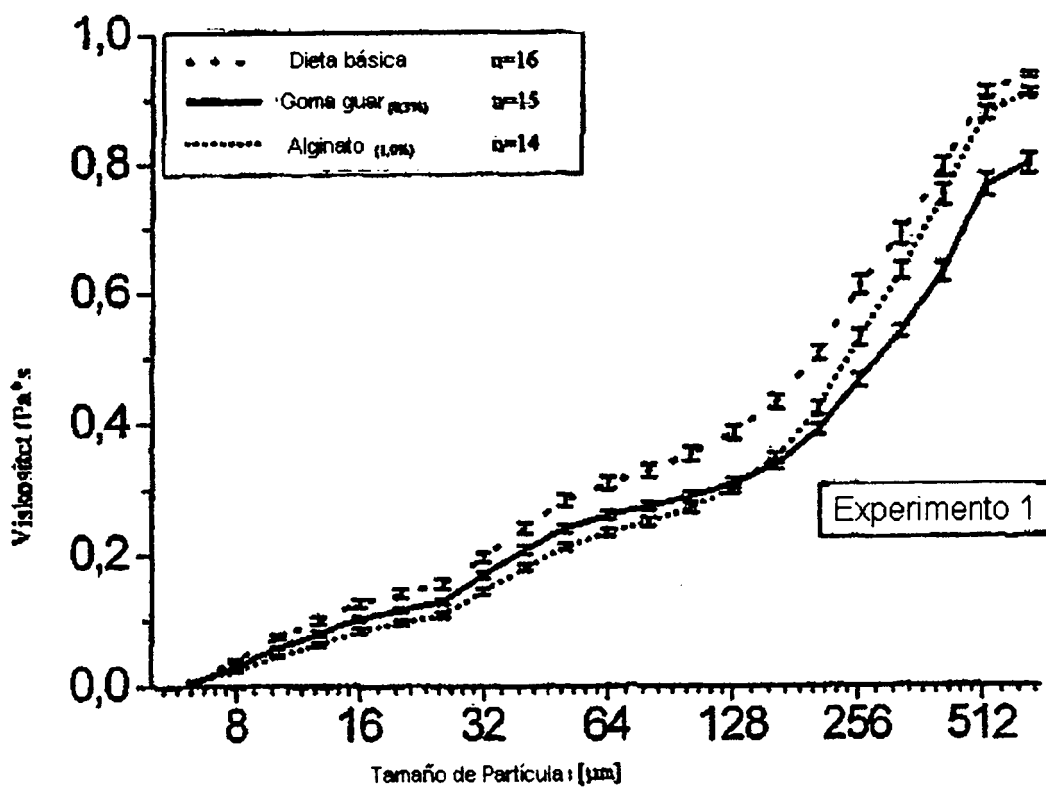
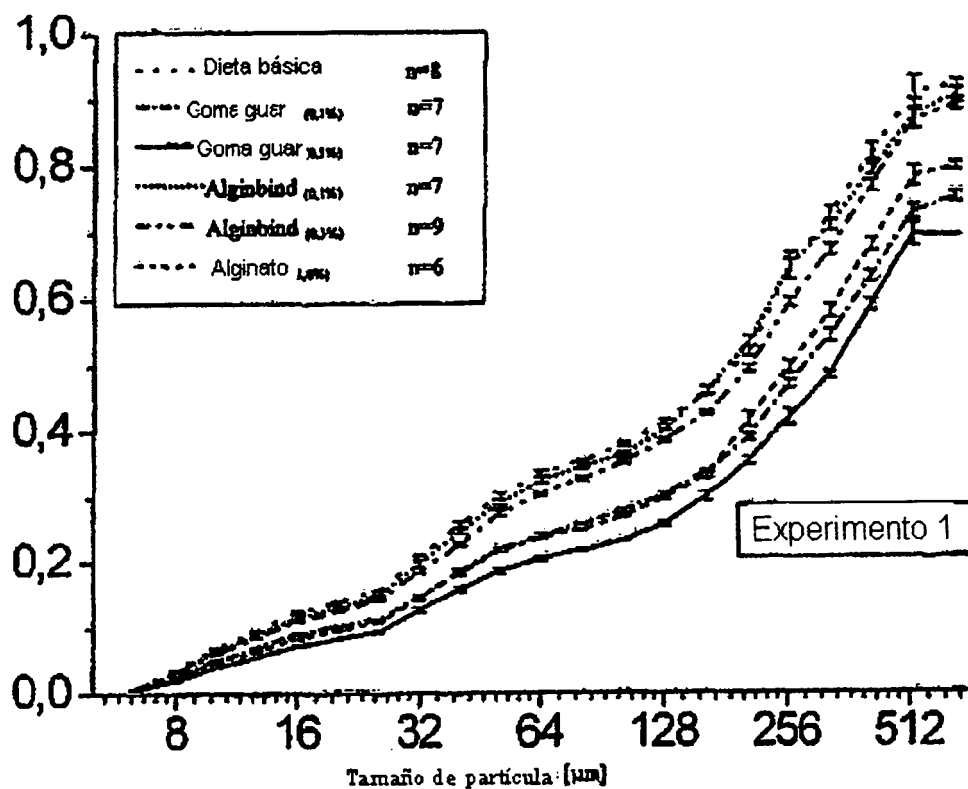


Fig. 3

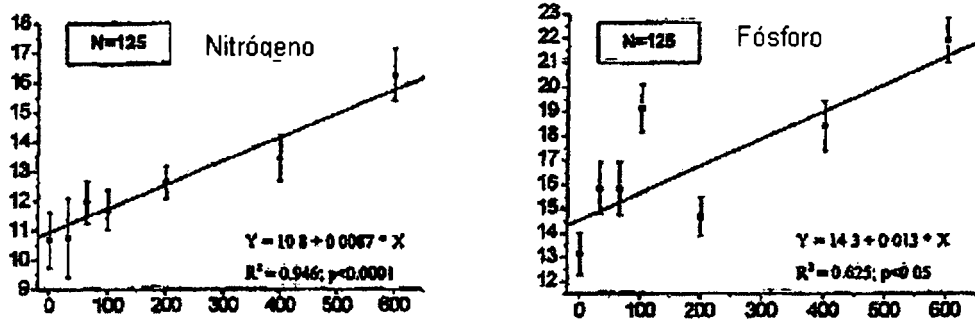


Fig. 4