

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 552**

51 Int. Cl.:

A23K 20/142 (2006.01)

A23K 20/22 (2006.01)

A23K 20/24 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2015 PCT/EP2015/071684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16046182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2015 E 15766520 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3197290**

54 Título: **Un alimento para peces y su uso en la profilaxis y tratamiento del síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en salmónidos**

30 Prioridad:

23.09.2014 US 201462053826 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.10.2019

73 Titular/es:

**EUROPHARMA AS (100.0%)
P.O Box 344
8376 Leknes, NO**

72 Inventor/es:

**NORDLY, JIM, ROGER;
LYNGØY, ARTHUR y
MANSILLA, CLAUDIO, RETAMAL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 728 552 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

Un alimento para peces y su uso en la profilaxis y tratamiento del síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en salmónidos

5

Campo de la invención

La invención se refiere a la piscicultura, en particular a la piscicultura de Salmónidos, más particularmente a un nuevo alimento para peces y su uso en un método profiláctico y tratamiento del síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en Salmónidos, preferiblemente durante un método de formación del esguín y prevención de la no formación del esguín.

10

Antecedentes de la invención.

Las *Salmo* sp., *Onchorhynchus* sp. y *Salvelinus* sp. son cepas dentro de la familia Salmónidos, que tienen un ciclo de vida anádromo. Ciclo de vida anádromo significa que los peces durante su vida permanecen en agua dulce y en agua de mar. Los salmónidos en agua dulce, que deciden migrar al agua de mar, se someten a un proceso fisiológico llamado formación del esguín.

15

En la naturaleza, el proceso de formación del esguín está dirigido por procesos endógenos dentro del pez, y estos se sincronizan con señales externas del entorno del pez (ejemplos son oscuridad, luz, temperatura del agua, etc.). Smolt es el nombre de un pez salmón en agua dulce, listo para migración al agua de mar. El proceso de formación del esguín incluye varias sustancias de señal endocrina, tales como melatonina, hormonas liberadoras de la glándula pituitaria, hormona estimulante de la tiroides (TSH), prolactina (PRL), hormona del crecimiento (GH) y hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Estas sustancias tienen un impacto sobre varios órganos objetivo dentro del cuerpo de los peces (ejemplos son la glándula tiroides y las glándulas suprarrenales), que secretan sustancias de señal que de nuevo cambian la apariencia, comportamiento, crecimiento y metabolismo, composición corporal y capacidad para mantener el equilibrio osmótico en el agua de mar.

20

25

En los salmónidos de agua dulce se bombean iones (Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) desde el entorno en el cuerpo (ejemplo es a través de las branquias), se reabsorben los iones de la orina (ejemplos son Ca^{2+} , Mg^{2+}), y se excreta simultáneamente la orina muy diluida, con el fin de manejar un exceso de agua en el cuerpo. Cuando los peces se adaptan al agua de mar, esta actividad fisiológica debe girar en la dirección opuesta. A través del proceso de formación del esguín, los salmónidos se vuelven capaces de bombear sal fuera del cuerpo (ejemplos son Na^+ y Cl^- a través de las branquias), excretan el exceso de iones a través de la orina concentrada (ejemplos son Ca^{2+} , Mg^{2+}), y reabsorben el agua de la orina en el riñón.

30

35

Se observa de vez en cuando en el salmón cultivado, que en el agua dulce se somete a formación del esguín, un comportamiento letárgico, escamas dérmicas protuberantes, branquias pálidas y numerosas hemorragias en los órganos internos, como el músculo cardíaco y esquelético, hígado y tejido adiposo visceral. El grupo de peces podría tener un aumento moderado de la mortalidad. La condición descrita, se denomina síndrome del esguín hemorrágico (HSS). La causa de la enfermedad, no se entiende completamente. La literatura científica sugiere malnutrición, trastornos genéticos, así como la presencia de partículas de virus en el tejido, como posibles explicaciones.

40

El esguín que permanece en el agua dulce después de que se lleva a cabo el proceso de formación del esguín tiende a desarrollar escamas dérmicas flojas (escamas flojas). Las escamas flojas son un desafío en el manejo y transporte de los peces, ya que facilitan las lesiones en la piel. Dichas lesiones pueden ser una entrada para infecciones (ejemplos son *Saprolegnia* sp, *Moritella* viscosa, *Tenacibaculum maritimum*) y pueden provocar úlceras y un desequilibrio osmótico alterado, en agua dulce y en agua de mar.

45

En caso de que los peces permanezcan en agua dulce cuando hayan alcanzado el estado del esguín, el proceso de formación del esguín se revertirá y los peces intentarán restablecer el equilibrio fisiológico, adecuado para una vida en agua dulce. El proceso, que se llama la no formación del esguín, puede ir acompañado de una disminución del apetito, escamas flojas y, de vez en cuando, un aumento moderado de la mortalidad.

50

El uso de la señal de invierno tradicional (fotomanipulación con luz de 12 horas, 12 horas de oscuridad al día) en la producción del esguín de salmón, enfrenta varios desafíos. La señal de invierno reduce la absorción diaria de alimento y el crecimiento en aproximadamente un 30%. La señal de invierno se da durante aproximadamente 7 semanas, seguida de la señal de verano (24 horas de luz al día) hasta que se alcanza el estado del esguín. Adicionalmente, los tanques con alta densidad de peces (ejemplo $>70 \text{ kg/m}^3$), como se observa en los criaderos con condiciones de producción intensiva, llevan a que los peces reciban una cantidad diferente de señal de verano, lo que de nuevo hace que los peces formen el esguín en diferentes momentos. Los peces que viven en el fondo de los tanques profundos, con paredes de colores oscuros, tienen más probabilidades de recibir una señal de verano insuficiente.

55

60

La biomasa demasiado alta en los tanques podría afectar negativamente la calidad del agua (por ejemplo, un aumento en el nivel de CO_2 , $>15 \text{ mg/litro}$), si no se logra un tratamiento o intercambio de agua insuficiente. La mala calidad del agua afecta negativamente el proceso de formación del esguín.

65

Adicionalmente, los peces grandes forman esguín antes que los peces más pequeños, y similares para la no formación del esguín. En los criaderos con condiciones de producción intensiva, es un desafío mantener peces de tamaño aproximadamente similar en cada tanque, debido a la cantidad limitada de tanques disponibles. Por lo tanto, un grupo de peces suele contener peces de diferente tamaño, y la formación del esguín y la no formación del esguín ocurren en diferentes momentos dentro del grupo.

A medida que avanza el proceso de formación del esguín, los peces se vuelven más y más incapaces de permanecer en agua dulce, porque la fisiología de los peces se adapta al agua de mar. La manifestación de esto puede ser un aumento moderado de la mortalidad dentro del grupo de peces. En esta etapa de la producción, es común encontrar peces con HSS, así como observaciones de reducción en el apetito y crecimiento.

En general, estas condiciones desafían tanto la producción en agua dulce como en agua de mar. En la producción en agua dulce, disminución del crecimiento y algo de mortalidad, y la producción en agua de mar, la transferencia de grupos del esguín a agua de mar con un estado del esguín no homogéneo. Esto significa que algunos peces en el agua de mar mueren por problemas de osmorregulación, o los peces pueden sobrevivir, pero comen mal y son más susceptibles al estrés prolongado, seguido de enfermedades secundarias. La tasa de mortalidad promedio en la producción de salmón noruego, desde el momento de la transferencia hasta la cosecha, durante varios años, ha sido aproximadamente, del 20%. Las encuestas realizadas por la Autoridad Noruega de Seguridad Alimentaria (2013) muestran que aproximadamente el 40% de esta tasa de mortalidad se debe a la calidad del esguín reducida.

Los órganos que están incluidos en el proceso de formación del esguín (por ejemplo, cuerpo pineal, hipotálamo, glándula pituitaria, riñón, intestino, branquias y piel) tienen en el lado externo de la pared celular un tipo de receptor llamado Receptores de Detección de Calcio (CaSR). El CaSR puede verse afectado por diferentes moduladores, que incluyen iones (tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Na^+ , H^+) y los aminoácidos libres (tales como triptófano). La estimulación del CaSR proporciona una regulación ascendente o descendente de la variedad de la actividad intracelular de la célula. Una estimulación controlada del CaSR puede proporcionar una respuesta que corresponda al proceso de formación del esguín.

Un ejemplo de dicha estimulación controlada es el método SuperSmolt®, en el cual los iones se agregan al agua de operación (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), en combinación con alimento para peces que contiene iones de Na^+ , iones de Cl^- y triptófano agregados. El método SuperSmolt® se describe en la solicitud de patente internacional WO 02/30182. El término "alimento para peces", como se entiende en relación con el método SuperSmolt®, y como se utiliza en la presente solicitud, se entiende que significa un alimento compuesto de proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales, destinados a parr y esguín de salmónidos en agua dulce. Una composición de dicho alimento de crecimiento puede contener estas o partes de estas materias primas. Los expertos en la técnica están familiarizados con los tipos de alimento que están destinados para este propósito, en comparación con el alimento que está destinado para otras especies o etapas de crecimiento. Un ejemplo del alimento para peces utilizado en el método SuperSmolt® se ilustra en la hoja del producto que se muestra en la Figura 1.

El método SuperSmolt® hace posible la formación del esguín de salmónidos sin utilizar la señal de invierno y de verano (oscuro/claro), sino el uso de luz continua (24 horas/día) hasta el momento de transferir el tiempo al agua de mar, evitando de esta manera el uso del crecimiento reduciendo la señal de invierno. Adicionalmente, el uso de este método permite mantener a los peces en la ventana del esguín, evitando la no formación del esguín, lo que permite un crecimiento normal también durante el proceso de formación del esguín en agua dulce.

El método SuperSmolt® proporciona ventajas obvias en general en la eficiencia de producción, en la producción tanto en agua dulce como agua de mar. Se puede mantener un crecimiento normal tanto agua dulce como en agua de mar, transferir los grupos del esguín al mar cuando los peces tienen un estado del esguín homogéneo y, por lo tanto, reducir las pérdidas de producción debido a la mortalidad, falta de apetito y mayor riesgo de enfermedad.

Sin embargo, el método SuperSmolt® tiene varias desventajas. Ese método requiere la adición de grandes cantidades de sales (iones) en el agua de operación, durante un largo período de tiempo (3-6 semanas). Este es un tema práctico exigente y aumenta considerablemente el coste en la producción. Por lo tanto, el método rara vez se utiliza para mantener los peces en agua dulce durante un largo período de tiempo (<6 semanas), ya que los costes y las condiciones prácticas lo hacen inadecuado.

Resumen de la invención

Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo, de acuerdo con un aspecto, proporcionar un alimento para peces y un método que elimine o reduzca las desventajas del método SuperSmolt®. Esto se realiza mediante la formulación de un alimento para peces que solo es capaz de formar el esguín los peces sin el uso de sales en el agua de proceso y, al mismo tiempo, permite mantener a los peces en la ventana del esguín durante un largo período de tiempo. La presente divulgación proporciona un proceso de formación del esguín simplificado en comparación con el SuperSmolt®, ya que no hay necesidad de agregar sales en el agua de proceso, y se puede implementar fácilmente como un estímulo adicional al uso de señales de invierno y verano, o de señales de invierno y verano inadecuadas, en el proceso de

formación del esguín. Adicionalmente, es probable que uno pueda mantener al salmón en agua dulce sin que el pez no forme el esguín, perezca o experimente una baja tasa de crecimiento, sin la aparición del síndrome del esguín hemorrágico o escamas flojas en la piel, hasta que alcanza el tamaño de para cosecha (>200 gramos, más a menudo 4-6 kg).

5

También se divulga un método en el que los peces se pueden mantener en agua dulce hasta que alcanzan el tamaño de la cosecha.

10

De acuerdo con un aspecto, la invención proporciona un alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende proteína, grasa, carbohidrato, vitaminas, minerales y agua, Na⁺ desde 3.934 - 39.340 g/kg en peso, con modulador de receptor de catión polivalente agregado (PVCR), en la forma de, triptófano o fenilalanina, 1-10 g/kg, Mg²⁺ desde 0.026 - 25.530 g/kg en peso, y Ca²⁺ desde 0.036 - 36.110 g/kg en peso, en el que el modulador de receptor de catión polivalente está en la forma de aminoácidos libres. La invención se refleja adicionalmente en las reivindicaciones dependientes.

15

Breve descripción de los dibujos

20

La Figura 1 es una hoja de producto de un alimento para alimentos de la técnica anterior utilizada en el método SuperSmolt®.

Descripción detallada de la invención

25

De acuerdo con un aspecto, la presente solicitud i.a. divulga un alimento para peces al que se agregan sales (iones) y moduladores de PVCR (aminoácidos libres) de acuerdo con la siguiente tabla 1. Se debe considerar que todos los rangos numéricos especificados incluyen los diversos rangos intermedios como si estos fueran mencionados explícitamente, por ejemplo, se debe considerar que un rango de 1-10 también incluye 1-9, 1-8, 1-7 (etc.); 2-10, 3-10, 4-10 (etc.); 1-9, 2-8, (etc.).

30

Tabla 1

| Modulador de PVCR libre Aminoácidos libres | 1-10 g/kg de alimento |
|---|---------------------------------|
| Na ⁺ | 3.934 -39.340 g/kg de alimento |
| Cl ⁻ | 6.202 -199.020 g/kg de alimento |
| Ca ²⁺ | 0.036 -36.110 g/kg de alimento |
| Mg ²⁺ | 0.026 -25.530 g/kg de alimento |

35

Los moduladores de PVCR incluyen los aminoácidos libres como se menciona en este documento, ya sea utilizados solos o en combinación: Triptófano, Tirosina, Fenilalanina, Serina, Alanina, Arginina, Histidina, Leucina, Isoleucina, ácido Aspártico, ácido Glutámico, Glicina, Lisina, Metionina, Prolina, Glutamina, Asparagina, Treonina, Valina, y Cisteína, en concentraciones entre 1-10 gramos/kg de alimento para peces.

40

“Alimento para peces” se entiende aquí como un alimento compuesto de proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales, pigmentos y agua, adecuados para parr y esguín de salmónidos en agua dulce. Una composición de dicho alimento para el crecimiento puede contener estas o partes de estas materias primas:

Fuentes de proteínas

45

Concentrado de proteína de soja (por ejemplo, SPC65), proteína de soja (por ejemplo, HiPro Soy), harina de proteína de guisante, harina de girasol, gluten de trigo, gluten de maíz, frijol de espada/frijol forrajero, harina de colza, lupinos, harina de pollo, harina de hueso, harina de sangre, harina de guar gum, proteínas microbianas (de la fermentación de diferentes sustratos), proteína de algas, harina de concha en general, harina de krill, hidrolizado de krill, hidrosilato de pescado, harina de pescado (ejemplo de arenque NVG, caballa, jurel, lanzones, capelina, anchovetas, lacha tirana y más).

50

Fuentes de carbohidratos

Trigo u otra fuente de hidratos de carbono adecuada conocida en la técnica

55

Fuentes de grasas:

Aceite de pescado (ejemplo de arenque NVG, caballa, jurel, lanzones, capelina, anchovetas, lacha tirana y más), aceite de semilla de colza, aceite de semilla de lino

Minerales y vitaminas:

Agregados después del consejo nutricional actual para salmónidos parr y esguín en agua dulce.

Pigmentos:

5

Astaxantina u otros pigmentos conocidos en la técnica.

Un experto en la técnica está familiarizado con dicho alimento y la composición necesaria, con el fin de calcular para proporcionar el crecimiento de parr y esguín de salmónidos en agua dulce.

10

El alimento para peces de acuerdo con la invención, sorprendentemente permite:

- Producir esguín de salmónidos anádromos para transferir al agua de mar (10-150 g)
- Mantener el equilibrio iónico normal y la osmorregulación para salmónidos anádromos en agua dulce, que incluyen, pero no se limitan a:
 - Prevenir la no formación del esguín de salmónidos en agua dulce,
 - Prevenir y/o tratar del trastorno del síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en salmónidos anádromos,
 - Prevenir y/o tratar de edema de escamas que provoca pérdida de escamas.
- Producir esguín posterior de salmónidos anádromos en agua dulce, para transferirlos a agua de mar (>150 g).
- Producir salmónidos anádromos en agua dulce hasta que se alcanza el tamaño de mercado para consumo (>100 gramos, la mayoría de las veces 5000 g)
- Producción de criaderos de salmónidos anádromos en agua dulce, con respecto a la crianza de huevos/huevas.

25

30

La invención comprende, de acuerdo con un aspecto, combinar un equivalente de alimento del alimento SuperSmolt®, con sales de magnesio y/o sales de calcio agregadas en el alimento, sin mezclar estas sales en operación con el agua, como en el método SuperSmolt®.

35

La presente divulgación proporciona un método para:

- Producir esguín de salmónidos anádromos para transferirlos a agua de mar (10-150 g)
- Mantener el equilibrio iónico normal y la osmorregulación para salmónidos anádromos en agua dulce, con el fin de alcanzarlo, que incluye, pero no se limita a,
 - Prevenir la no formación del esguín de salmónidos en agua dulce,
 - Prevenir, curar o tratar el trastorno del síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en salmónidos anádromos,
 - Prevenir, curar o tratar el de edema de concha que provoca la pérdida de conchas.
- Producir esguín posterior de salmónidos anádromos en agua dulce, para transferirlos a agua de mar (>150 g).
- Producción de salmónidos anádromos en agua dulce hasta que se alcanza el tamaño para consumo (>100 gramos, más a menudo 5000 g)
 - • Producción de reproductores de cría de salmónidos anádromos en agua dulce, con respecto a la crianza de huevos/huevas.

40

45

50

55

El método comprende realizar las siguientes etapas:

a. Proporcionar un alimento para peces para parr o esguín, que comprende proteína, grasa, carbohidrato, vitaminas, minerales y agua, NaCl desde 10-100 g/kg, con modulador de receptor de catión polivalente agregado (PVCR), en la forma de triptófano o fenilalanina, 1-10 g/kg, y sales de calcio agregadas (Ca^{2+}), por ejemplo, el CaCl_2 entre 0.1-100 g/kg, y sales de magnesio (Mg^{2+}), tales como MgCl_2 entre 0.1-100 g/kg.

60

b. Administrar el alimento a lo peces de acuerdo con el apetito, mientras está en agua dulce o agua de mar, hasta que ocurre la formación del esguín.

65

c. Transferir los peces al agua de mar después de formación del esguín.

Alternativamente, los peces se pueden mantener en agua dulce después de la formación del esguín, en cuyo caso el método puede comprender después de las etapas a y b:

- d. Mantener a los peces en agua dulce después de que haya ocurrido la formación del esguín,
- e. Continuar administrando el alimento para peces hasta que haya alcanzado el peso deseado en agua dulce y sea adecuado para el consumo humano, o hasta que haya alcanzado una edad/peso adecuado para la introducción de la maduración sexual, que puede dar huevos de pescado para la nueva producción de pescado o para el consumo.

La invención se describirá más detalladamente, con referencia a los siguientes ejemplos.

Materiales y métodos

Material biológico, condiciones ambientales y configuración experimental.

Se realizaron seis ensayos de campo, utilizando especies de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*). Los peces estaban en el momento de inicio vacunados con una vacuna a base de aceite y habían recuperado el apetito después de la vacunación. El peso promedio de los peces al inicio fue de un mínimo de 40 gramos, y al final en agua dulce de un máximo de 180 gramos. Las dietas de prueba se utilizaron bajo condiciones de producción normales, en Noruega y Chile en 2012 y 2013. Las dietas de prueba se proporcionaron a los peces, durante un mínimo de 3 semanas, hasta un máximo de 11 semanas, y solo mientras estaban en agua dulce. Las tablas 2 y 3 muestran la información sobre la especie, etapa, condiciones de iluminación, temperatura del agua, cantidad de peces, tamaño de los peces, alimento de prueba y configuración experimental.

Tabla 2: Resumen de los ensayos de campo, las condiciones de iluminación, temperatura del agua y tipo de dietas de prueba.

| Ensayo de campo No | Especies | Fecha | Señal de invierno/verano | Temperaturas de agua | Tipo de dieta de prueba |
|--------------------|--|-----------------------|---|----------------------|-------------------------|
| 1 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | 19.Mar-09.May 2012 | Peces fotomanipulados. Peces reciben alimento de prueba después de señal de invierno, en combinación con luz las 24 horas del día (señal de verano) | 1 -5°C | 1 |
| 2 | Trucha arco iris (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) Chile | 23.Ago - 20. Sep 2012 | Peces fotomanipulados. Peces reciben alimento de prueba después de señal de invierno, en combinación con luz las 24 horas del día (señal de verano) | 11 -12°C | 2 |
| 3 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | 9. Sep -6. Dic 2012 | Luz continua las 24 horas del día | 8 -9°C | 2 |
| 4 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | 20.Sep - 20. Oct 2012 | Condiciones de luz natural después del equinoccio de otoño. Condiciones de luz diurna decrecientes | 12 -8°C | 2 |
| 5 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | 15.Oct -27. Dic 2012 | Peces fotomanipulados. Peces reciben alimento de prueba después de señal de invierno, en combinación con luz las 24 horas del día (señal de verano) | 8 -3°C | 2 |
| 6 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | 29.Ago - 24.Oct 2013 | Prueba: Luz continua las 24 horas del día Contr: Señal de invierno/verano | 15-14°C | 2 |

Tabla 3: Resumen de los ensayos de campo, las condiciones de iluminación, temperatura del agua y tipo de dietas de prueba.

| Ensayo de campo No | Especies | Cantidad total de peces en grupo de prueba (T) y de control (C) | Pesos de inicio en grupo de prueba (T) y de control (C) | Cantidad de unidades de prueba en prueba (T) y de control (C) |
|--------------------|--|---|---|---|
| 1 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | | | T: 4 C: 4 |
| 2 | Trucha arco iris (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) Chile | T: 240 000 C: 240 000 | T: 63 g C: 63 g | T: 4 C: 4 |
| 3 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | T: 750 C: 750 | T: 45 g C: 45 g | T: 3 C:3 |
| 4 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | T: 2 500 C: 80 000 | T: 100 g C: 80 g | T: 1 C: 1 |
| 5 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | T: 353 000 C: 178 000 | T: 81, 82 og 108 g C: 83 og 105 g | T: 3 C: 2 |
| 6 | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Noruega | T: 80 000 C: 80 000 | T: 70 g C: 60 g | T: 1 C:1 |

Composición de las dietas de prueba

5 El alimento para peces se entiende en este documento como un alimento compuesto de proteína, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales, adecuados para parr y esguín de salmónidos en agua dulce.

Dieta de prueba 1 (que corresponde un alimento SuperSmolt®):

- 10 a. Alimento para peces agrega NaCl al 7%
b. Alimento para peces agrega L-triptófano al 0.4%

Dieta de prueba 2 (que corresponde a una realización del alimento para peces de acuerdo con la presente invención):

- 15 a. Alimento para peces agrega NaCl al 6%
b. Alimento para peces agrega CaCl₂ al 0.75%
20 c. Alimento para peces agrega MgCl₂ al 0.25%
d. Alimento para peces agrega L-triptófano al 0.4%

Dietas de control:

- 25 a. Alimento de crecimiento para parr y esguín producido por Skretting AS
b. Alimento de crecimiento para parr y esguín producido por Ewos AS

Parámetros para monitorizar el efecto de la dieta de prueba y control.

30 Se realizó el muestreo, justo antes de que los peces recibieran la dieta de prueba/dieta de control e inmediatamente antes de la transferencia de peces al agua de mar. Adicionalmente, el muestreo se realizó entre el inicio y el criterio de referencia del muestreo.

35 Actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en el tejido branquial

Se realizó el muestreo, justo antes de que los peces se alimentaran con una dieta de prueba y justo antes de la transferencia de los peces al agua de mar. El muestreo también se realizó en diversos grados, se realizó entre, el inicio y el punto de referencia del muestreo.

40 Durante la formación del esguín, es normal observar un aumento en la cantidad de enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en el tejido branquial. La función principal de esta enzima es bombear sales fuera del cuerpo de los peces, necesarias para mantener el equilibrio osmótico en el agua de mar. El tejido branquial del segundo arco branquial se transfirió a un tubo, luego se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido (-180°C), para luego analizar la cantidad de enzima branquial en FishGuard AS, Leknes (anteriormente MultiLab AS), siguiendo el método descrito por McGormick (1993).

45

Cantidad de copias del ARNm alfa 1a (ATPasa en agua dulce):

Se realizó el muestreo, justo antes de que los peces recibieran dieta de prueba e inmediatamente antes de la transferencia de peces al agua de mar. El muestreo también se realizó en diversos grados, se realizó entre, el inicio y el punto de referencia del muestreo.

5 La función principal de la enzima, que codifica el ARNm alfa 1a, es bombear las sales del agua dulce en el cuerpo del pez. La adaptación a la vida en el agua de mar significa que esta actividad de enzima debe disminuir, y es similar para la expresión génica. Durante el proceso de formación del esguín, disminuye la cantidad de copias de ARNm alfa 1a en las branquias de los peces. El tejido branquial del tercer arco branquial se transfirió a un tubo con ARNm más tarde, para analizar la cantidad de copias del ARNm alfa 1a, de acuerdo con un método desarrollado por FishGuard AS (2013).

10 Índice del esguín

15 A través del proceso de formación del esguín, se observó que la apariencia del pez cambia (cambios morfológicos). Este cambio se mide con la ayuda de la puntuación del índice del esguín y se basa en una puntuación visual de 1-4 para cada uno de los parámetros, plateado en la piel, marcas de parr y bordes de aleta negros, véase tabla 4. La puntuación del índice del esguín es el promedio de las puntuaciones de estos tres parámetros juntos. Se registró el índice del esguín, al mismo tiempo que se tomaron muestras de tejido branquial para el análisis de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa.

20 Tabla 4 Descripción general del índice del esguín

| Parámetro | Ninguno | Débil | Visible | Fuerte |
|---|---------|-------|---------|--------|
| Puntuación de plateado | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Puntuación de marca Parr | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Puntuación de bordes de aleta negro | 1 | 2 | 3 | 4 |
| El promedio de la puntuación total de plateado, marca parr, bordes de aleta negros, da la puntuación de índice del esguín | 1 | 2 | 3 | 4 |

Cloruro en plasma sanguíneo de peces en prueba de agua de mar

25 Cuando uno tenía la oportunidad de realizar una prueba el agua de mar, se muestrearon los peces para transferir el 34‰ de agua de mar y se mantuvieron allí durante 96 horas, durante el proceso de formación del esguín. Luego, se recolectaron muestras de sangre de los peces y se analizó el contenido de iones de cloruro en el plasma sanguíneo (Cl⁻) después el método se utilizó en el Laboratorio Central de la Escuela Noruega de Ciencias Veterinarias (2012). Este es un método para determinar si el salmón en agua dulce ha formado el esguín satisfactoriamente. Si el pez tiene una osmorregulación normal en el agua de mar (nivel de cloruro en plasma sanguíneo entre 120-150 mmol/l) en un 34‰ de agua de mar después de 96 horas, esto es una señal de que el pez está en la ventana del esguín.

30 Iones en el plasma sanguíneo de peces en agua dulce

35 Mediante dos ensayos de campo, se recolectaron muestras de sangre de los peces en agua dulce, para el análisis de Ca, Mg y Cl en el plasma sanguíneo. El Laboratorio Central del Colegio Noruego de Ciencias Veterinarias (2012) realizó el análisis.

40 Tasa de mortalidad en agua dulce y agua de mar

45 En agua dulce, se realizó el registro del porcentaje de muertes durante el uso de alimentos de prueba y alimentos de control hasta la transferencia de peces al agua de mar. Observación de la tasa de mortalidad en el agua de mar en el grupo del alimento de control frente al grupo del alimento de prueba en agua dulce. Registro de las tasas de mortalidad después de 30, 60 y 90 días, así como la mortalidad total al momento de la cosecha (una granja marina).

Las estadísticas

50 Parte del material se procesó estadísticamente, para determinar si el cambio entre dos puntos de medición en el grupo de prueba fue estadísticamente significativo ($p = 0.05$ y $p = 0.01$). Se realizó examen similar del grupo control del grupo.

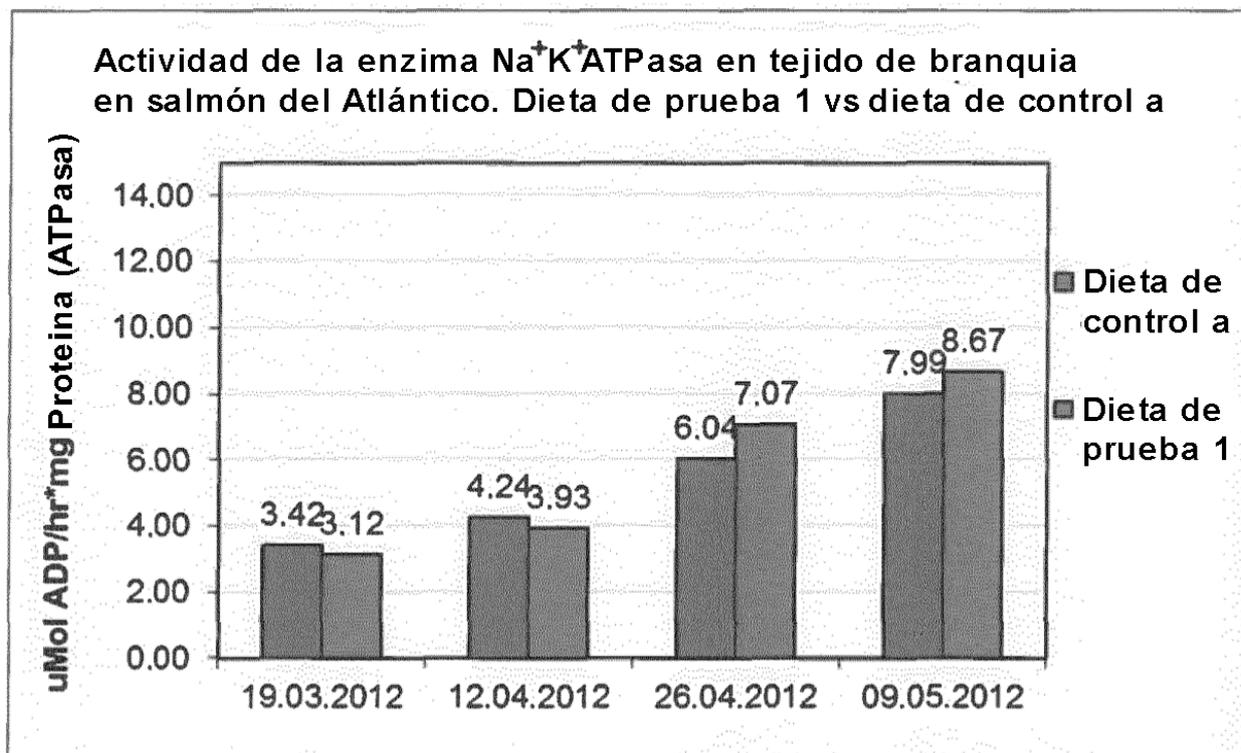
Resultados

Ensayo de campo 1

55 Actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido branquial

El diagrama 1 muestra el desarrollo de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en el tejido branquial en el ensayo de campo 1, en el que el uso de la dieta de prueba 1 se compara con la dieta de control a, que es alimento de crecimiento para juveniles

producido por Skretting AS. Los resultados son el promedio de los resultados de muestreo de 4 tanques de la prueba (n = 24/muestreo) y 4 tanques como los controles (n = 24/muestreo).



5

Diagrama 1: Desarrollo de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa promedio en tejido de branquias después de la señal de invierno, en alimentación del salmón del Atlántico alimentado con la dieta de prueba 1 y alimentación de control a n= 24/muestreo en cada grupo)

10

Entre el 19.03.12 y el 12.04.12, hubo un cambio significativo en la ATPasa (p = 0.05) en el grupo control, mientras que el grupo de prueba no tuvo un cambio significativo en la ATPasa (p = 0.05). Entre el 26.04.12 y el 09.05.12, hubo un cambio significativo en la ATPasa en el grupo de control dentro del intervalo de confianza del 99% (p = 0.05 y p = 0.01), mientras que el grupo de prueba solo tuvo un cambio significativo en la ATPasa dentro del intervalo de confianza del 95% (p = 0.05). La Tabla 5 proporciona una visión general del tema.

15

Tabla 5: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo (p = 0.05 o p = 0.01). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba no dieron dicha diferencia en la significación observada.

| Dieta de control a | | | | | Dieta de prueba 1 | | | | |
|--------------------|------------|---------|---------------|---------------|-------------------|------------|---------|---------------|---------------|
| ATPasa | | Valor P | Sig CI al 95% | Sig CI al 99% | ATPasa | | Valor P | Sig CI al 95% | Sig CI al 99% |
| 19.03.2012 | 12.04.2012 | 0.02 | Sí | No | 19.03.2012 | 12.04.2012 | 0.48 | No | No |
| 26.04.2012 | 09.05.2012 | 0.01 | Sí | Sí | 26.04.2012 | 09.05.2012 | 0.02 | Sí | No |

20

La cantidad de copias del ARNm alfa 1a (ATPasa en agua dulce)

No se sacaron muestras para el análisis de la cantidad de copias del ARNm alfa 1a, agua dulce ATPasa.

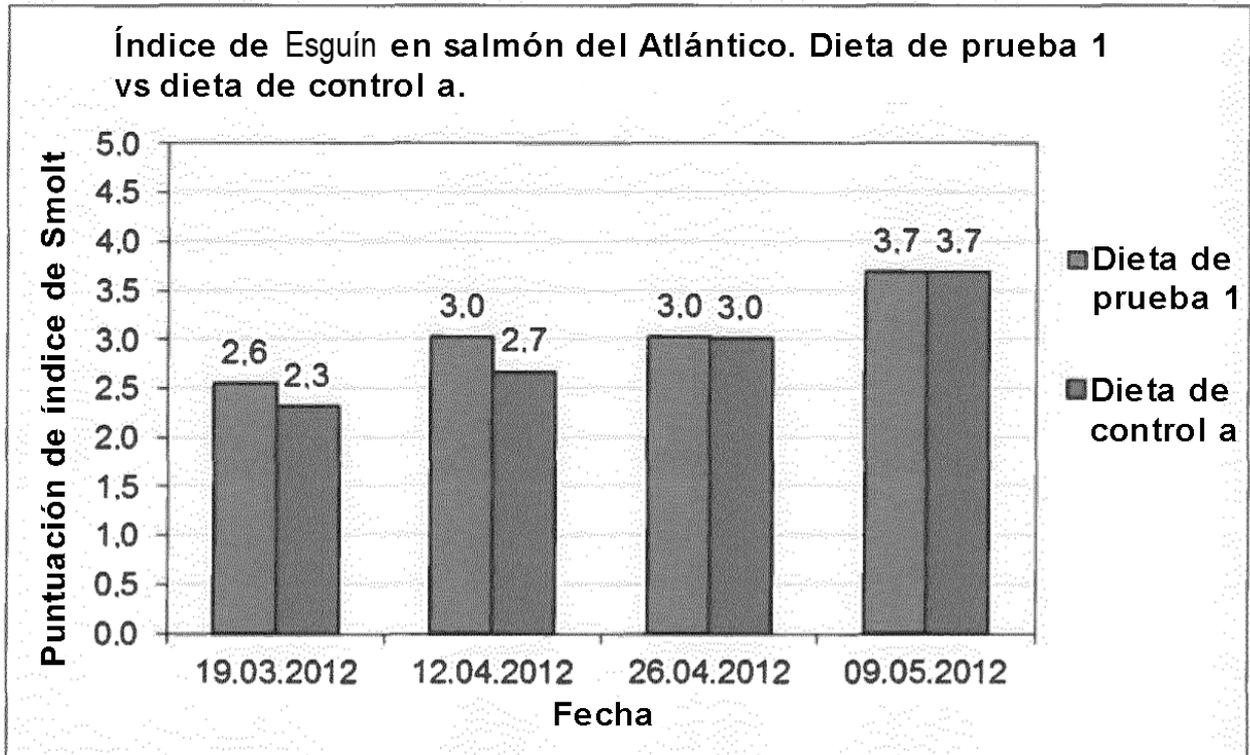
25

Índice del esguín

El diagrama 2 muestra el desarrollo del índice del esguín en el ensayo de campo 1, en el que la dieta de prueba 1 se compara con la dieta de control a, un alimento de crecimiento para juveniles producido por Skretting AS. Los resultados son el promedio del retiro de la muestra de los 4 tanques de la prueba (n = 24/muestreo) y 4 tanques como el control (n = 24/muestreo). Entre 19.03.12 y 26.04.12, hubo un cambio significativo en el índice del esguín (p = 0.01) en el grupo de control, mientras que el grupo de prueba no tuvo ningún cambio significativo en el índice del esguín (p = 0.01). Entre 12.04.12 y 26.04.12, hubo un cambio significativo en el índice del esguín (p = 0.05 y 0.01) en el grupo de control,

30

mientras que el grupo de prueba no tuvo ningún cambio significativo en el índice del esguín ($p = 0.05$ y 0.01). La Tabla 6 proporciona una visión general del tema.



5

Diagrama 2: Desarrollo de índice del esguín después de la señal de invierno en salmón del Atlántico alimentado con la dieta de prueba 1 y alimentación de control a ($n = 24$ /muestreo en cada grupo)

10

Tabla 6: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para índices del esguín dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba no dieron dicha diferencia en la significación observada.

| Dieta de control a | | | | | Dieta de prueba 1 | | | | |
|--------------------|----------|---------|---------------|---------------|-------------------|----------|---------|---------------|---------------|
| Índice del esguín | | Valor P | Sig Cl al 95% | Sig Cl al 99% | Índice del esguín | | Valor P | Sig Cl al 95% | Sig Cl al 99% |
| 19.03.12 | 26.04.12 | 0.00 | Sí | Sí | 19.03.12 | 26.04.12 | 0.04 | Sí | no |
| 12.04.12 | 26.04.12 | 0.00 | Sí | Sí | 12.04.12 | 26.04.12 | 0.55 | no | no |

15

Cloruro en plasma sanguíneo de peces en Challenge test en agua de mar.

El diagrama 3 muestra el desarrollo de cloruro en plasma en el ensayo de campo 1, con el uso de la dieta de prueba 1, y en comparación con la dieta de control a, un alimento de crecimiento para juveniles producido por Skretting AS. Los resultados son el promedio del retiro de la muestra de los 2 tanques en la prueba ($n = 15$ /muestreo) y 2 tanques como control ($n = 15$ /muestreo).

20

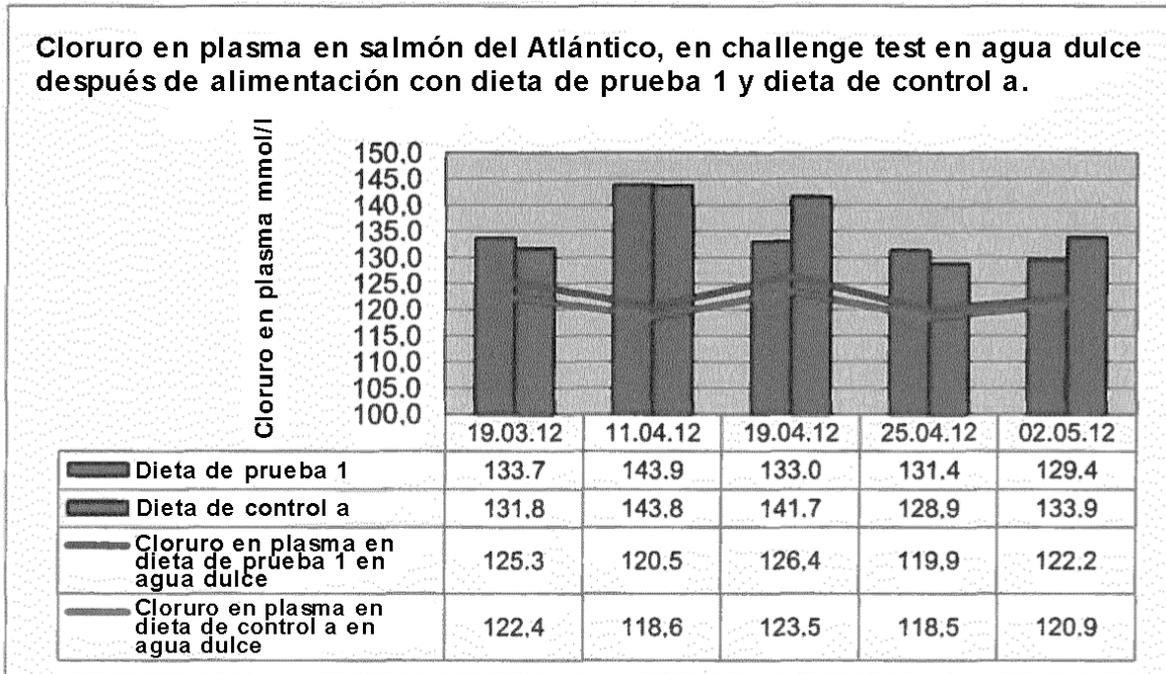


Diagrama 3: Desarrollo de cloruro en plasma promedio en agua de mar (34‰, 96 horas) después de la señal de invierno, en peces alimentados con la dieta de prueba 1 y dieta de control a (n= 15/por muestreo en cada grupo).

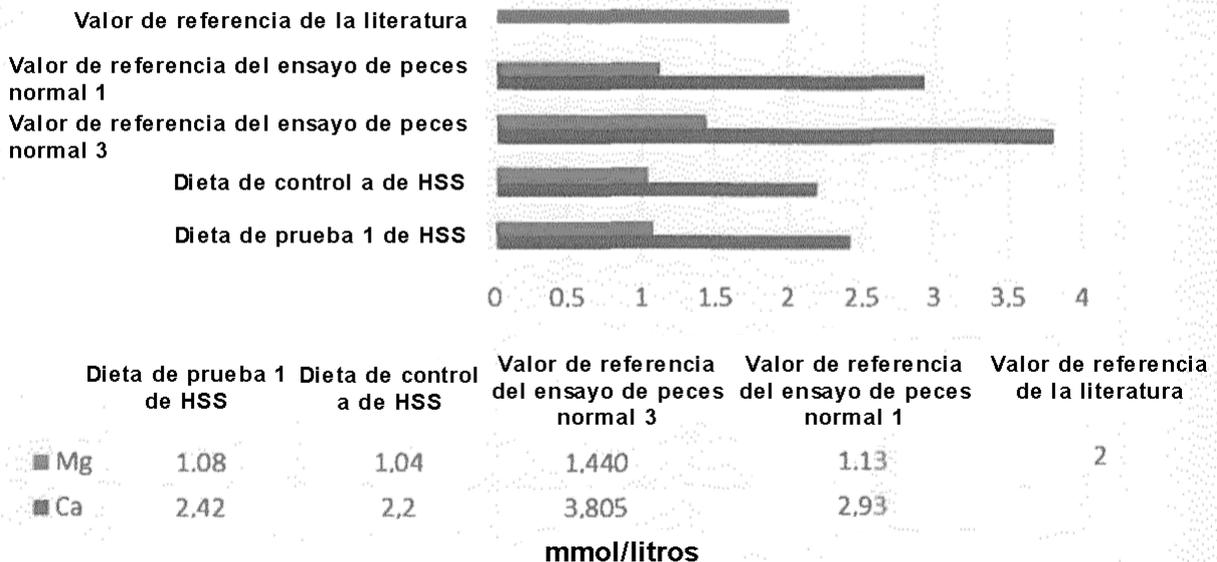
5

iones en el plasma sanguíneo de peces en agua dulce

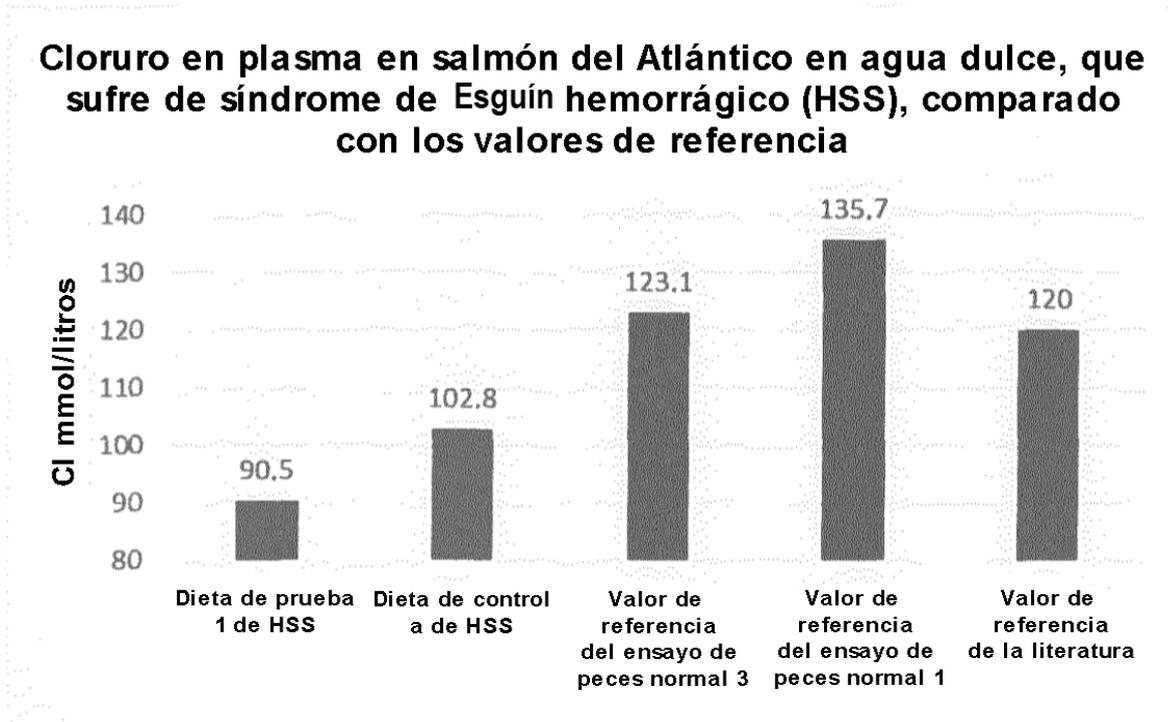
Los diagramas 4 y 5 del 11 de abril de 2012, para magnesio en plasma, calcio en plasma y cloruro en plasma, en agua dulce en el ensayo de campo 1, para la dieta de prueba 1 en comparación con la dieta de control a. Los resultados se promedian a partir de peces que sufren de síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en los tanques de prueba (n = 6) y tanques de control (n = 6). Esto se compara con el promedio de los peces normales en el grupo de control (n = 6), peces normales en agua dulce a partir del ensayo de campo 3 (n = 19) y el valor de referencia de la literatura (Jakobsen, 2013). No ha logrado encontrar valores de referencia para el calcio en plasma normal en Salmón del Atlántico, en la literatura.

15

Magnesio/calcio en plasma en salmón del Atlántico en agua dulce, que sufre de síndrome de Esguín hemorrágico (HSS), comparado con los valores de referencia



5 Diagrama 4: Medición de enclave 11. abril 2012, para magnesio en plasma y calcio en plasma en agua dulce en ensayo de campo 1, cuando se utiliza dieta de prueba 1 y se compara con la dieta de control a. Los resultados se promedian de los peces que sufren de síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en los tanques de prueba (n=6) y los tanques de control (n=6) estos valores se comparan con el promedio de los peces normales en el grupo de control (n=6), peces normales en agua dulce del ensayo de campo 3 (n= 19) y el valor de referencia de la literatura (Jacobsen 2013)



10 Diagrama 5: Medición de enclave 11. abril 2012 para cloruro en plasma en agua dulce en el ensayo de campo 1, cuando se usa dieta de prueba 1 y se compara con la dieta de control a. Los resultados se promedian de los peces que sufren de síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en los tanques de prueba (n=6) y los tanques de control (n=6). Estos se comparan con el promedio de los peces normales en el grupo de control (n=6), peces normales en agua dulce del ensayo de campo 3 (n=19) el valor de referencia de la literatura (Jacobsen, 2013),

15 Tasa de mortalidad en agua dulce

20 La mortalidad durante el periodo experimental en agua dulce, se ilustra en el diagrama 6. La tasa de mortalidad más alta fue de alrededor del 10 de abril de 2012. Los peces presentaron los hallazgos clásicos, compatibles con el síndrome del esguín hemorrágico (HSS), que incluyeron branquias pálidas y órganos internos pálidos, sangrado múltiple de petequias en músculos, tejido adiposo abdominal y vísceras (Halse, 2012).

Mortalidad cuando se usa la dieta de prueba 1 vs la dieta de control a

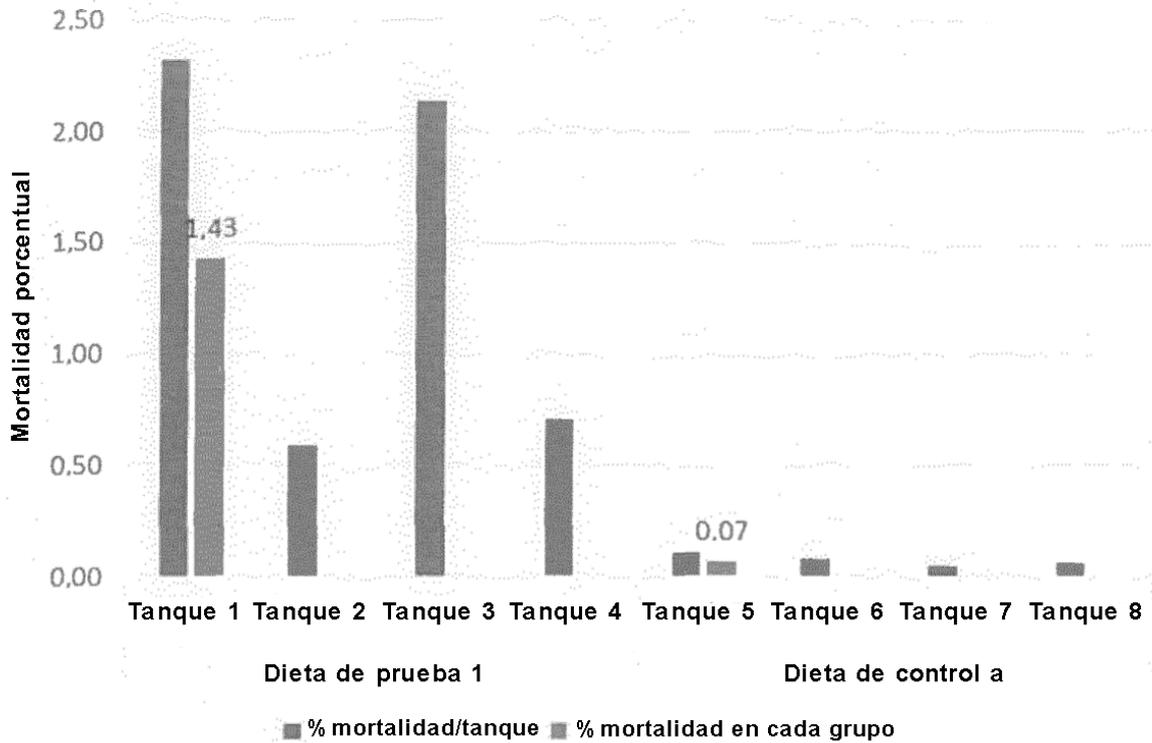


Diagrama 6: Tasa de mortalidad en agua dulce en el grupo que recibió dieta de prueba 1, comparado con el grupo que recibió dieta de control a. El aumento de la tasa de mortalidad es causado por síndrome del esguín hemorrágico (Halse, 2012)

Ensayo de campo 2

Actividad de enzima de Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido branquial.

El diagrama 7 muestra el desarrollo de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido branquial en el ensayo de campo 2, con el uso de la dieta de prueba 2, en comparación con la dieta de control a, que es un alimento de crecimiento para juveniles producido por Skretting as. Los resultados son el promedio del muestreo de 4 jaulas en agua dulce del grupo de prueba (n = 25/muestreo) y 4 jaulas en agua dulce como el grupo de control (n = 25/muestreo).

Actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido de branquia en trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*). Dieta de prueba 2 vs dieta de control a

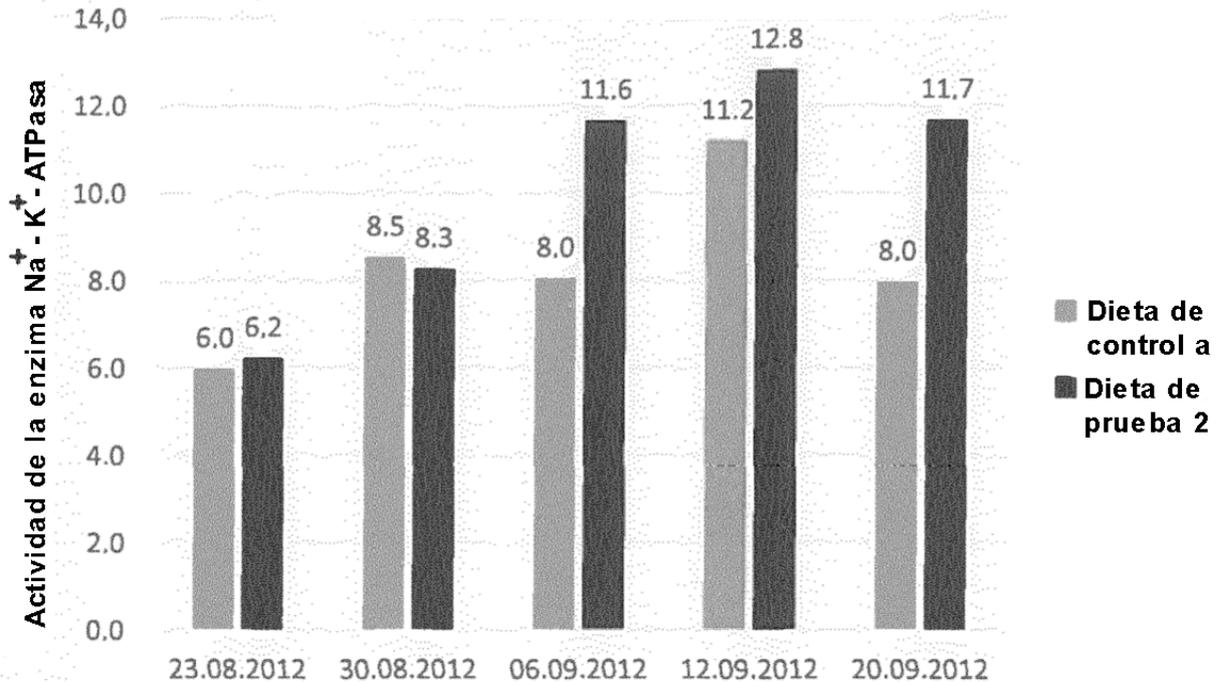


Diagrama 7: Desarrollo de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa promedio en tejido de branquias después de la señal de invierno (12 horas de luz/12 horas de oscuridad), en trucha arcoiris que recibió la dieta de prueba 2 y la dieta de control a. (n=25/muestreo en cada grupo). El ensayo es de jaulas en lago de agua dulce (4 jaulas por ensayo y 4 jaulas de control), Chile. Remoción por clasificación, de los peces más pequeños antes de entrega, hecho entre 12 y 20 de septiembre de 2012.

Entre los puntos de muestreo 30.08.12 y 06.09.12, 30.08.12 y 20.09.12, 30.08.12 y 27.09.12, hubo un aumento significativo en la ATPasa (p = 0.01) en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control no hubo cambio significativo en la ATPasa ni dentro de los intervalos de confianza del 99% o 95% (p = 0.01 y p = 0.05). Entre 06.09.12 y 12.09.12, hubo un aumento significativo en la ATPasa en el grupo de control dentro del intervalo de confianza del 99% (p = 0.01), observado una semana después del grupo de prueba. Entre el 12.09.12 y 20.09.12, ocurrió una caída significativa en la ATPasa en el grupo de control dentro del intervalo de confianza del 99%, mientras que el grupo de prueba no hubo cambio significativo en la ATPasa. La Tabla 7 proporciona una visión general del tema.

Tabla 7: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo (p = 0.05 o p = 0.01). Estos luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba, no dieron dicha diferencia en el significado observado.

| ATPasa dieta de control a | | Valor P | Sig Cl al 95% | Sig Cl al 99% | ATPasa dieta de prueba 2 | | Valor P | Sig Cl al 95% | Sig Cl al 99% |
|---------------------------|------------|---------|---------------|---------------|--------------------------|------------|---------|---------------|---------------|
| 30.08.2012 | 06.09.2012 | 0.55 | no | no | 30.08.2012 | 06.09.2012 | 0.00 | Sí | Sí |
| 30.08.2012 | 20.09.2012 | 0.47 | no | no | 30.08.2012 | 20.09.2012 | 0.00 | Sí | Sí |
| 30.08.2012 | 27.09.2012 | 0.49 | no | no | 30.08.2012 | 27.09.2012 | 0.00 | Sí | Sí |
| 06.09.2012 | 12.09.2012 | 0.00 | Sí | Sí | 06.09.2012 | 12.09.2012 | 0.06 | no | No |
| 12.09.2012 | 20.09.2012 | 0.00 | Sí | Sí | 12.09.2012 | 20.09.2012 | 0.16 | no | no |

Cantidad de copias del ARNm alfa 1a (ATPasa en agua dulce)

No se sacaron muestras para el análisis de la cantidad de copias del ARNm alfa 1a, ATPasa en agua dulce.

Índice del esguín

No hay muestreo para la revisión del índice del esguín en este ensayo.

5

Cloruro en plasma sanguíneo de peces en Challenge test en agua de mar

El criadero del esguín no tuvo oportunidad de realizar una prueba de agua de mar. No se tomaron muestras.

10

Iones en el plasma sanguíneo de peces en agua dulce

No se realizaron muestras de iones en el plasma de peces en agua dulce.

15

Tasa de mortalidad en agua dulce y agua de mar

La mortalidad en fase de agua dulce fue normal. Después de 60 días en el mar, la tasa de mortalidad fue del 0.62% para los peces que recibieron la dieta de prueba 2 y del 0.71% para los peces que recibieron la dieta de control a, en agua dulce.

20

Ensayo de campo 3

El diagrama 8 muestra el desarrollo promedio de la enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ en tejido branquial en el ensayo de campo 3, con el uso de la dieta de prueba 2, en comparación con la dieta de control a. Los resultados son promedio del muestreo de 3 tanques en agua dulce en el grupo de prueba (n = 30/muestreo) y 3 tanques en agua dulce en el grupo de control (n = 30/muestreo).

25

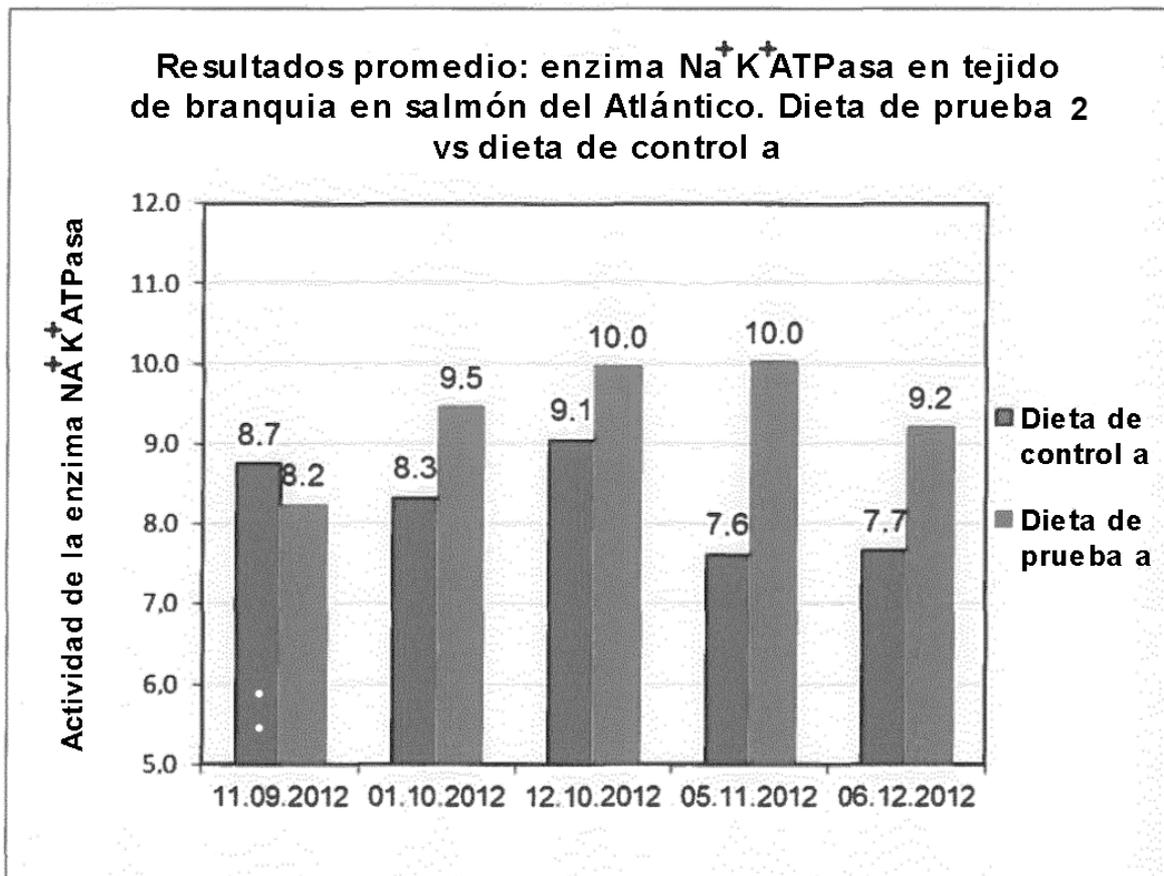


Diagrama 8: Desarrollo de la actividad de la enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ promedio en tejido de branquias cuando se usa continuamente luz, en salmón del Atlántico que recibió dieta de prueba 2 y dieta de control a. (n=30/muestreo en cada grupo) el ensayo de los tanques con agua dulce, con una disposición experimental por triplicado

30

Entre los puntos de muestreo 11.09.12 y 12.10.12, 11.09.12 y 05.11.12, hubo un aumento significativo en la ATPasa ($p = 0.05$) en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control no hubo cambio significativo en la ATPasa dentro del intervalo de confianza del 95% ($p = 0.05$). Entre 12.10.12 y 05.11.12, hubo disminuciones significativas en la ATPasa en el grupo de control dentro de los intervalos de confianza del 95% ($p = 0.05$), mientras que el grupo de prueba no tuvo un cambio significativo. La Tabla 8 proporciona una visión general del tema.

Tabla 8: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Estos se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba, no mostraron ninguna diferencia en el significado observado.

| Puntuación general | | | | | Puntuación general | | | | |
|--------------------|------------|---------|---------------|---------------|--------------------|------------|---------|---------------|---------------|
| Dieta de control a | | | | | Dieta de prueba 2 | | | | |
| ATPasa | | Valor P | Sig Cl al 95% | Sig Cl al 99% | ATPasa | | Valor P | Sig Cl al 95% | Sig Cl al 99% |
| 11.09.2012 | 12.10.2012 | 0.68 | No | No | 11.09.2012 | 12.10.2012 | 0.04 | Si | No |
| 11.09.2012 | 05.11.2012 | 0.14 | No | No | 11.09.2012 | 05.11.2012 | 0.02 | Si | No |
| 12.10.2012 | 05.11.2012 | 0.03 | Si | No | 12.10.2012 | 05.11.2012 | 0.94 | No | No |

La cantidad de copias del ARNm alfa 1a (ATPasa en agua dulce)

El muestreo se realizó en parte para el análisis de la cantidad de copias del ARNm alfa 1a, ATPasa en agua dulce, en la réplica 1 y las réplicas 2. Los resultados se revelan en el diagrama 9 y 10. La réplica 1 muestra que la dieta de prueba 2 proporciona, después de dos semanas de uso (01.10.12), una variación entre 441 000- 501000 copias de ARNm alfa 1a (ATPasa en agua dulce). Esto está claramente por debajo del valor límite de 1186000 copias. Para la dieta de control a, vemos que los peces expresan una alta cantidad de copias del ARNm alfa 1a 12.10.12, y luego de esto se regula por disminución la expresión al mismo nivel que la dieta de prueba 2.

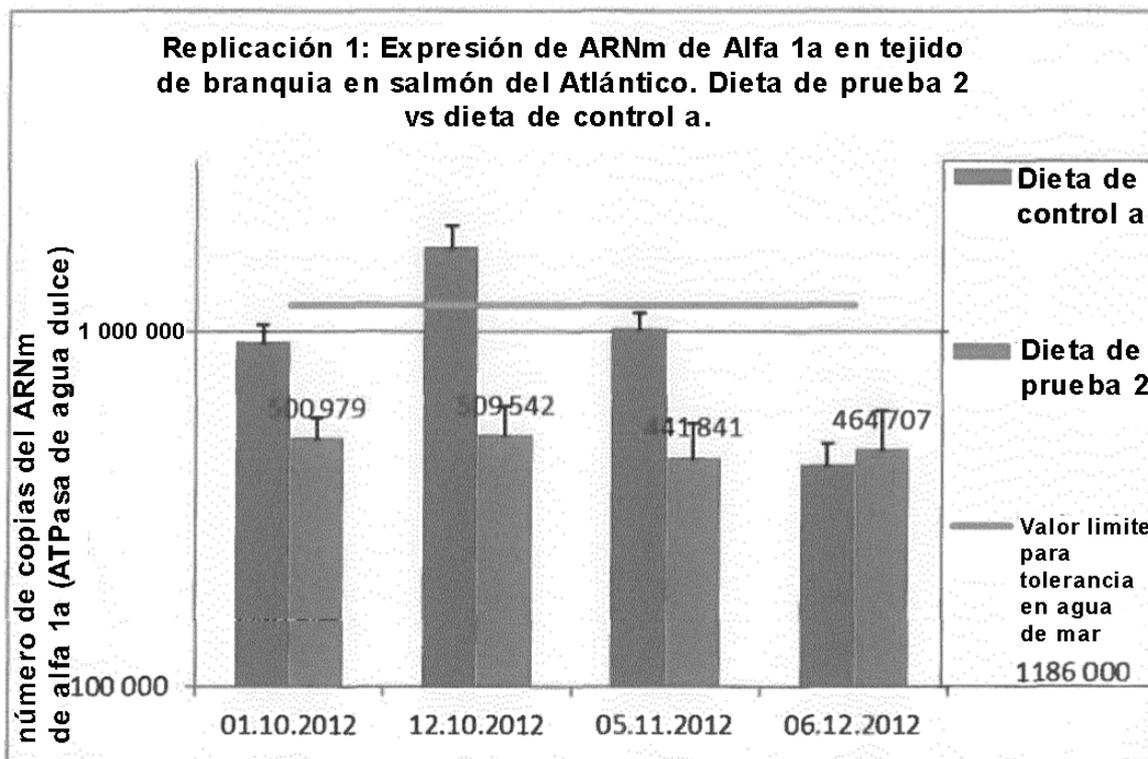


Diagrama 9: Desarrollo de la expresión de ARNm de alfa 1a promedio en tejido de branquias cuando se usa continuamente luz en el salmón del Atlántico, cuando se usa dieta de prueba 2 y dieta de control a. ($n=30$ /muestreo en cada grupo). El primer muestreo se perdió, segundo muestreo es del 01.10.2012.

Entre los puntos de muestreo 01.10.12 y 12.10.12, hay un aumento significativo en el ARNm alfa 1a expresado ($p = 0.05$) en el grupo de control, mientras que en el grupo de prueba no hubo cambio significativo en el ARNm alfa 1a dentro

de los intervalos de confianza del 95% ($p = 0.05$). Entre 01.10.12 y 06.12.12 hay una disminución significativa en la cantidad de copias de ARNm alfa 1a en el grupo de control dentro del intervalo de confianza del 99% ($p = 0.01$), mientras que en el grupo de prueba no hubo un cambio significativo. Lo mismo aplica entre 12.10.12 y 05.11.12 (dentro del intervalo de confianza del 95%), 12.10.12 y 06.12.12, así como entre 05.11.12 y 06.12.12. El grupo de prueba no reveló ningún cambio similar entre los puntos de muestreo. La Tabla 9 proporciona una visión general del tema.

5

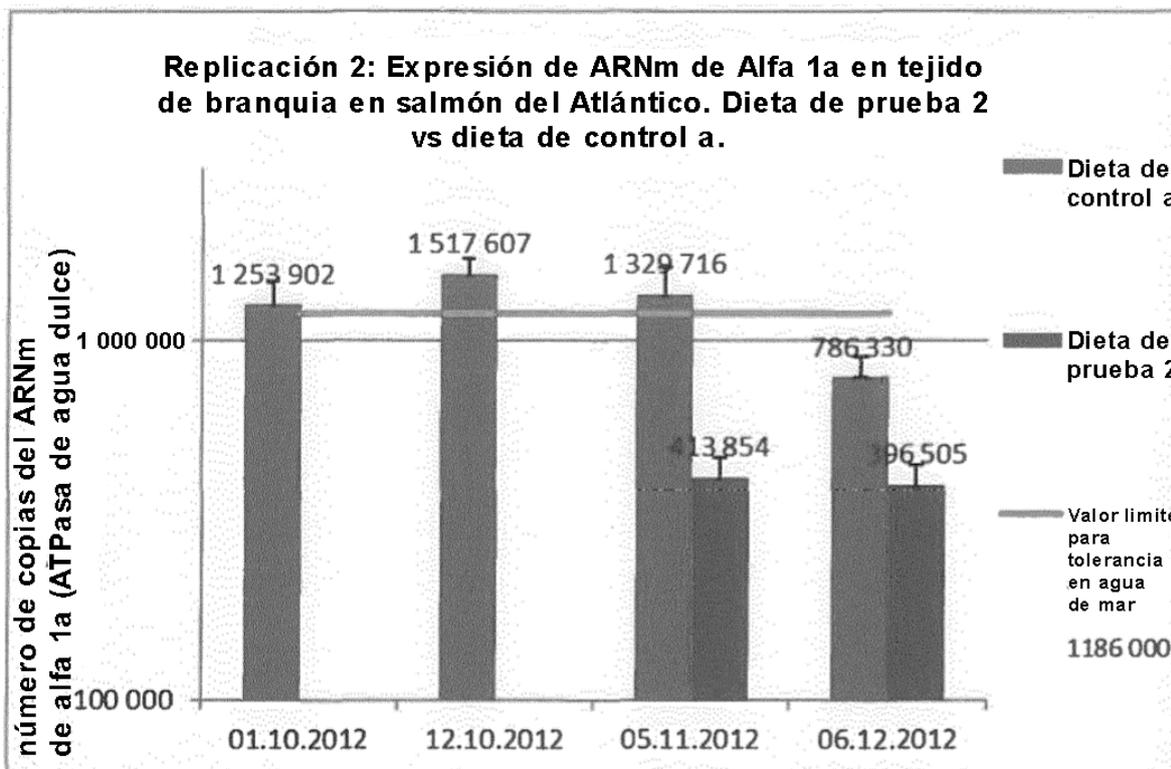
Tabla 9: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la cantidad de copias del ARNm alfa 1a dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Estos luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba, no mostraron ninguna diferencia en el significado observado.

10

| Réplica 1 | | | | | Réplica 1 | | | | |
|--------------------|------------|---------|---------------|---------------|-------------------|------------|---------|---------------|---------------|
| Dieta de control a | | | | | Dieta de prueba 2 | | | | |
| ARNm | | Valor P | Sig Cl al 95% | Sig Cl al 99% | ARNm | | Valor P | Sig Cl al 95% | Sig Cl al 95% |
| 01.10.2012 | 12.10.2012 | 0.03 | Sí | No | 01.10.2012 | 12.10.2012 | 0.95 | No | No |
| 01.10.2012 | 06.12.2012 | 0.00 | Sí | Sí | 01.10.2012 | 06.12.2012 | 0.83 | No | No |
| 12.10.2012 | 05.11.2012 | 0.04 | Sí | No | 12.10.2012 | 05.11.2012 | 0.68 | No | No |
| 12.10.2012 | 06.12.2012 | 0.00 | Sí | Sí | 12.10.2012 | 06.12.2012 | 0.81 | No | No |
| 05.11.2012 | 06.12.2012 | 0.00 | Sí | Sí | 05.11.2012 | 06.12.2012 | 0.91 | No | No |

La réplica 2 muestra que la alimentación de control a partir de la segunda semana de uso (01.10.12), proporciona una variación entre 1 517 000 y 786 000 copias de ARNm de alfa 1a (ATPasa en agua dulce). Esto está por encima del valor límite para la tolerancia al agua de mar (establecido en 1 186 000 copias) para las tres primeras muestras, mientras que la última muestra está por debajo del valor límite. Para la dieta de prueba 2, vemos que los peces expresan una baja cantidad de copias del ARNm alfa 1a, 05.11.12 y 06.12.12, entre 413 000 y 396 000 copias. El diagrama 10 proporciona una visión general de los resultados.

15



20

Diagrama 10: Desarrollo de la expresión de ARNm de alfa 1a promedio en tejido de branquias cuando se utiliza luz continuamente en salmón del Atlántico, y se alimenta con la dieta de prueba 2 y la dieta de control a. ($n=30$ /muestreo en cada grupo). El primer punto de muestreo se perdió para ambos grupos, así como también el segundo y tercero para el grupo de prueba

25

Entre los puntos de muestreo 12.10.12 y 06.12.12, hay una disminución significativa en la expresión de la cantidad de copias de ARNm alfa 1a ($p = 0.01$) en el grupo de control. Entre 05.11.12 y 06.12.12, no hay disminución significativa en la cantidad de copias de ARNm alfa 1a en el grupo de control dentro de los intervalos de confianza del 95% ($p = 0.01$), ni en el grupo de prueba. La Tabla 10 proporciona una visión general del tema.

5

Tabla 10: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la cantidad de copias del ARNm alfa 1a dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Estos luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba.

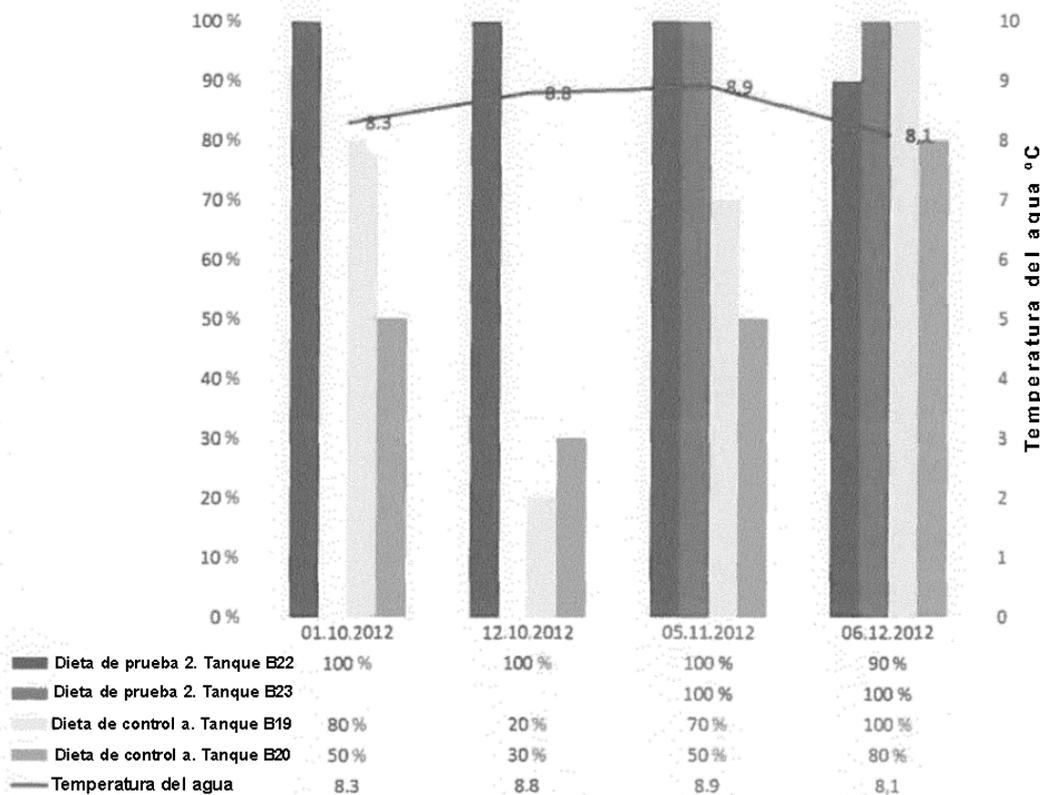
| Réplica 2 | | | | | Réplica 2 | | | | |
|--------------------|------------|---------|---------------|---------------|-------------------|------------|---------|---------------|---------------|
| Dieta de control a | | | | | Dieta de prueba 2 | | | | |
| ARNm | | Valor P | Sig CI al 95% | Sig CI al 99% | ARNm | | Valor P | Sig CI al 95% | Sig CI al 99% |
| 01.10.2012 | 12.10.2012 | 0.37 | No | No | | | | | |
| 01.10.2012 | 05.11.2012 | 0.83 | No | No | | | | | |
| 01.10.2012 | 06.12.2012 | 0.08 | No | No | | | | | |
| 12.10.2012 | 05.11.2012 | 0.57 | No | No | | | | | |
| 12.10.2012 | 06.12.2012 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 05.11.2012 | 06.12.2012 | 0.09 | No | No | 05.11.2012 | 06.12.2012 | 0.84 | No | No |

10 La cantidad de copias del ARNm alfa 1a (ATPasa en agua dulce) se relaciona con la temperatura del agua

Los resultados del ARNm alfa la del grupo de prueba y el grupo de control se correlacionan con la temperatura del agua dulce. El diagrama 11 muestra el porcentaje de estas muestras que están por debajo del valor límite para la tolerancia al agua de mar, 1186 000 copias del ARNm alfa 1a. El gráfico también muestra la temperatura del agua en el mismo período. A temperaturas del agua entre 8.1 y 8.9°C, 90 y 100% de los valores en las muestras en el grupo de prueba, están bajo el límite de tolerancia del agua de mar. Esta participación fue estable durante todo el proceso de formación del esguín, de la misma manera que la temperatura del agua fue estable. Los valores correspondientes en el grupo de control, fueron entre 20% y 100%, y la participación más baja, se observó al inicio del período de observación.

15

**Dieta de prueba 2 y dieta de control a:
% de proporción de muestras con
< 118 6 000 copias de ARNm de Alfa 1a vs temperatura del agua**



20

Diagrama 11: Proporción de las muestras con valor inferior de 1186000 copias de expresión de ARNm de alfa 1a en tejido de branquia, cuando se utiliza continuamente luz. La gráfica está correlacionada con la temperatura del agua, y es salmón del Atlántico alimentado con dieta de prueba 2 y dieta de control a. (n=8-10 por muestreo en cada uno de los dos grupos/grupos de control)

Índice del esguín

El diagrama 12 muestra el desarrollo del índice del esguín en el ensayo de campo 3, con el uso de la dieta de prueba 2, en comparación con la dieta de control a, un alimento de crecimiento para juveniles producido por Skretting. Los resultados son el promedio del muestreo de 3 tanques en la prueba (n = 30/muestreo) y 3 tanques en el control (n = 30/muestreo).

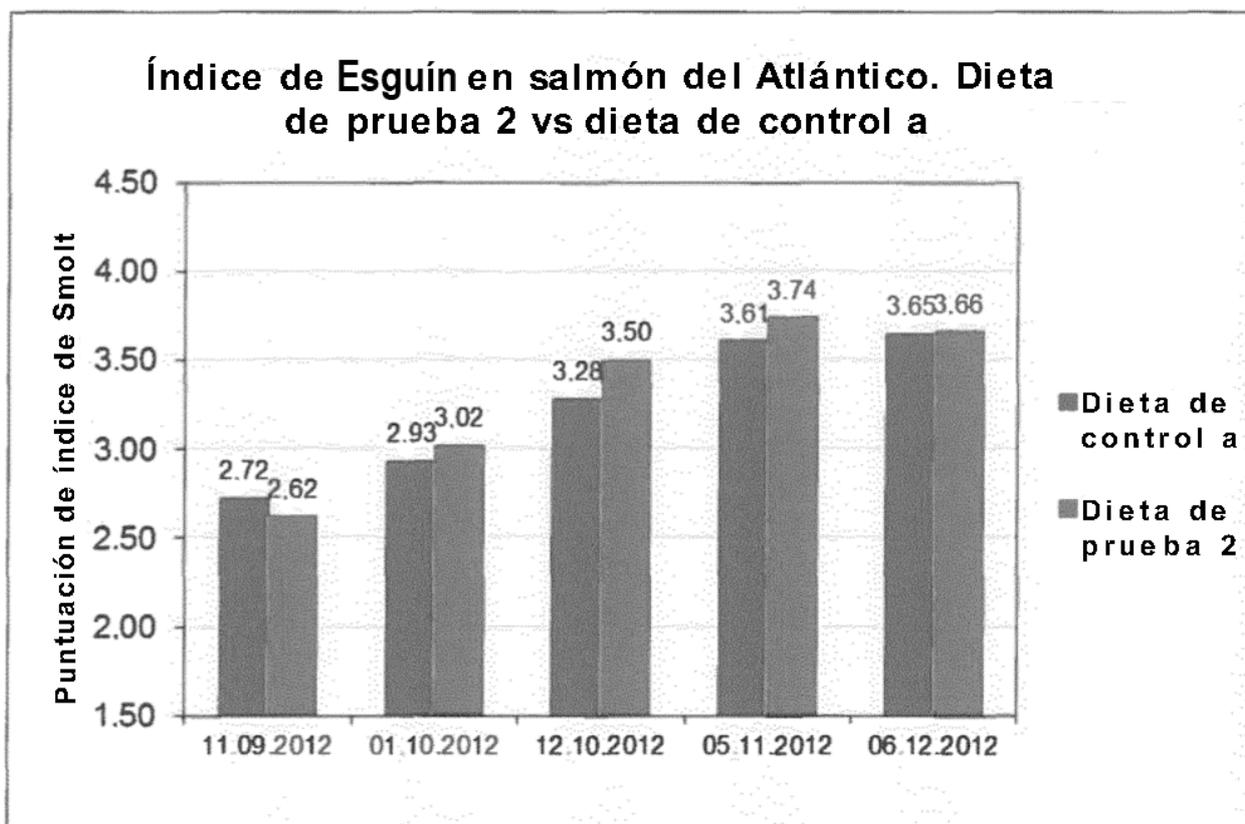


Diagrama 12: Desarrollo del índice del esguín promedio mediante luz continua, en peces que recibieron dieta de prueba 2 y dieta de control a. (n=30/muestreo en cada grupo/punto de muestra). El ensayo de los tanques en agua dulce con una disposición experimental por triplicado

Entre el 11.09.12 y el 01.10.12, hubo un aumento significativo en el índice del esguín ($p = 0.01$) en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control no tuvo un cambio significativo en el índice del esguín ($p = 0.05$). Entre el 01.10.12 y 12.10.12, hubo un aumento significativo en el índice del esguín ($p = 0.05$) en el grupo control, mientras que el grupo de prueba tuvo un aumento significativamente mayor en el índice del esguín ($p = 0.01$). Entre el 12.10.12 y 06.12.12, hubo un aumento significativo en el índice del esguín ($p = 0.01$) en el grupo control, mientras que el grupo de prueba no tuvo un cambio significativo en el índice del esguín ($p = 0.05$). La Tabla 11 proporciona un panorama del tema.

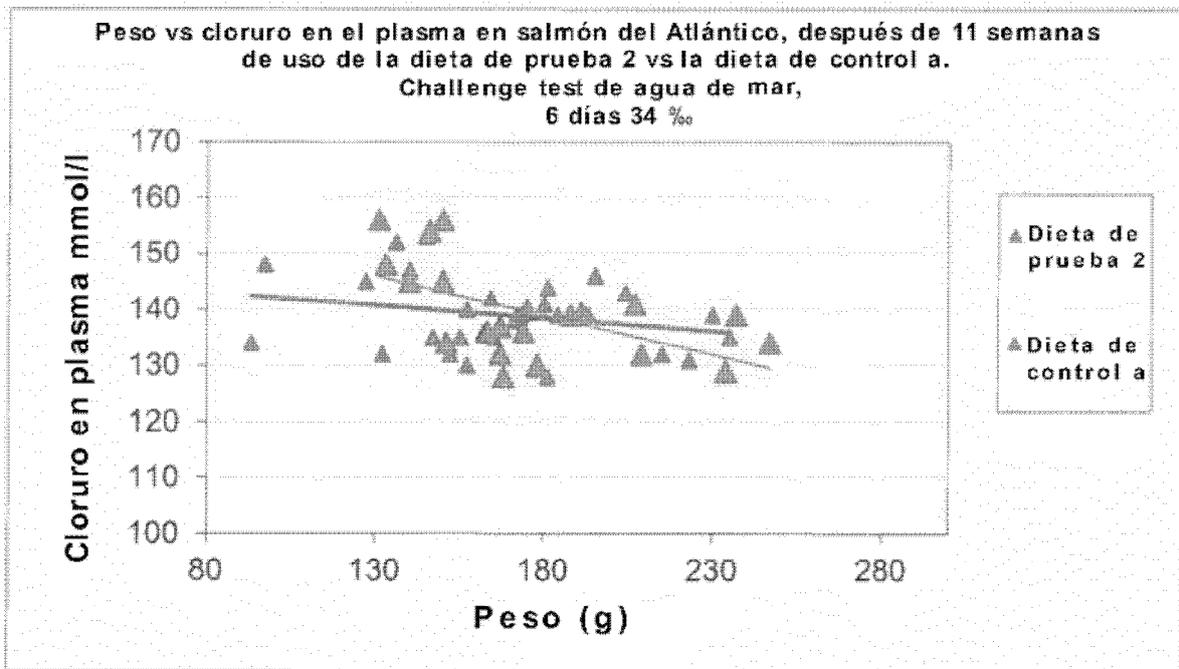
Tabla 11: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para el índice del esguín dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba no dieron tal diferencia en la significancia observada.

| | |
|--------------------|--------------------|
| Puntuación general | Puntuación general |
| Dieta de control a | Dieta de prueba 2 |

| Índice del esguín | | Valor P | Sig 95% Cl | Sig 99% Cl | Índice del esguín | | Valor P | Sig 95% Cl | Sig 99% Cl |
|-------------------|------------|---------|------------|------------|-------------------|------------|---------|------------|------------|
| 11.09.2012 | 01.10.2012 | 0.08 | No | No | 11.09.2012 | 01.10.2012 | 0.00 | Sí | Sí |
| 01.10.2012 | 12.10.2012 | 0.02 | Sí | No | 01.10.2012 | 12.10.2012 | 0.00 | Sí | Sí |
| 12.10.2012 | 06.12.2012 | 0.00 | Sí | Sí | 12.10.2012 | 06.12.2012 | 0.12 | No | No |

Cloruro en plasma sanguíneo en peces en el Challenge test de agua de mar

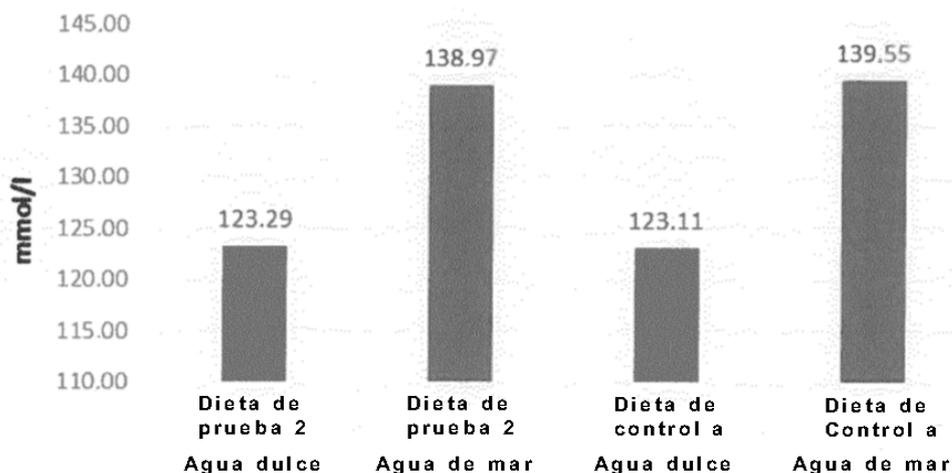
5 Los diagramas 13 y 14 muestran el estado del cloruro en plasma en el ensayo de campo 3, después de la exposición de peces en agua de mar a 34‰ en 144 horas, con el uso de la dieta de prueba 2, en comparación con la dieta de control a, en 11 semanas antes de la exposición al agua de mar. Los resultados son el promedio del muestreo de los 3 tanques en la prueba (n = 30/muestreo) y 3 tanques del control (n = 20/muestreo). Los valores promedio en el grupo de control fueron 139.6 mmol/l en cloruro en plasma y para el grupo de prueba 139.0 mmol/l en cloruro en plasma.



10 Diagrama 13: gráfica de dispersión para salmón del atlántico que muestra cloruro en plasma (mmol/l) después de la exposición en agua de mar (34‰, 144 horas) en peces que recibieron la dieta de prueba 2 y la dieta de control a en 11 semanas, correlacionado con el peso (g). Los materiales de muestreo son n = 30 para el grupo de prueba, y n=20 para el grupo de control.

15

Cloruro en plasma en salmón del Atlántico en agua dulce y agua de mar. Dieta de prueba 2 vs dieta de control a



5 Diagrama 14: cloruro en plasma (mmol/l) para salmón del Atlántico después de exposición en agua de mar (34‰, 144 horas) en peces alimentados con dieta de prueba 2 y dieta de control a durante 11 semanas en agua dulce, materiales de muestreo son n=30 para el grupo de prueba, y n=20 para el grupo de control. Se muestran los valores de referencia para el cloruro de plasma en agua dulce (n=17/prueba y n=19/control)

Otros iones en el plasma sanguíneo de peces en agua dulce y agua de mar

10 No se observaron peces con síndrome del esguín hemorrágico en el ensayo de campo 3. El diagrama 15 muestra los niveles promedio de magnesio y calcio en el plasma sanguíneo del salmón en agua dulce y agua de mar.

Magnesio/calcio en plasma en salmón del Atlántico en agua dulce y agua de mar. Dieta de prueba 2 vs dieta de control a

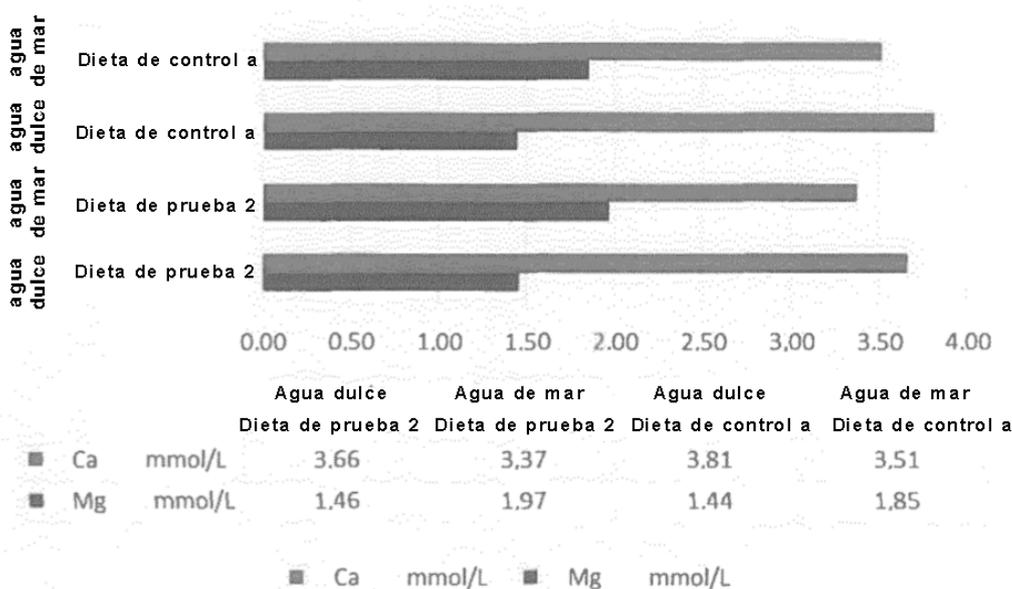


Diagrama 15: magnesio y calcio en plasma sanguíneo (mmol/l) en salmón del Atlántico después de la exposición en agua de mar (34‰, 144 horas) en peces alimentados con la dieta de prueba 2 y la dieta de control a durante 11 semanas en agua dulce. El material de muestreo es n=30 para el grupo de prueba y n=20 para el grupo de control. Se muestran los valores para agua dulce, así como también (n=17/prueba y n=19/control)

5

Tasa de mortalidad en agua dulce y agua de mar

No se observó mortalidad anormal. Después de 144 horas en agua de mar, los peces fueron destruidos.

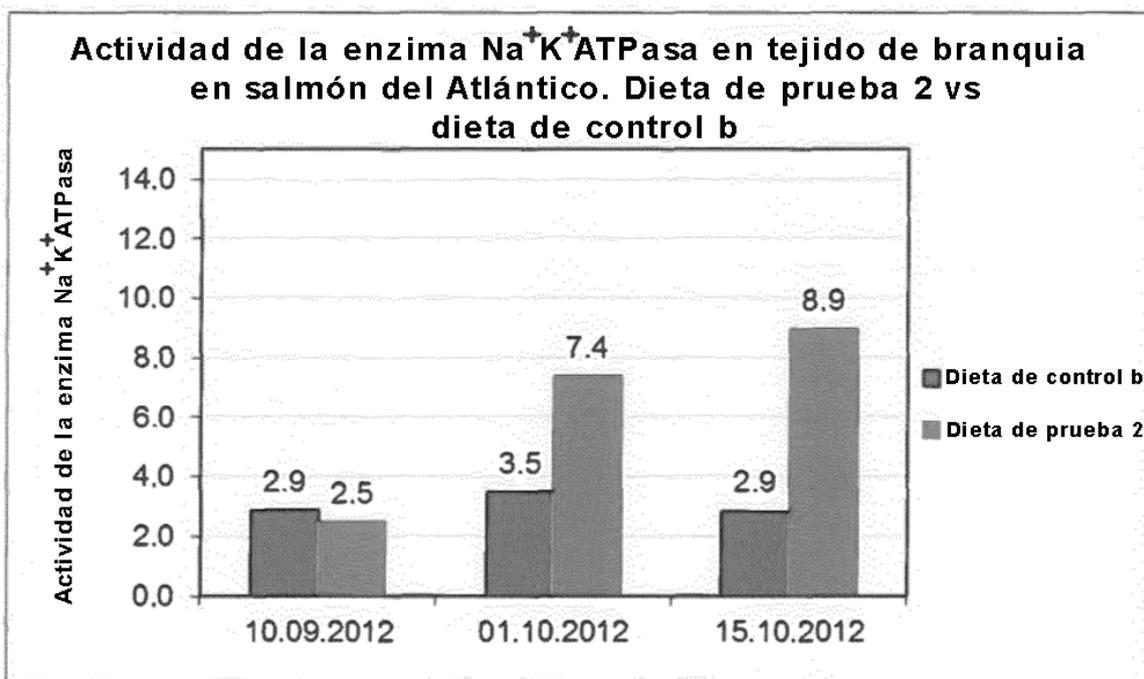
10

Ensayo de campo 4

Actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido de branquia

15

El diagrama 16 muestra el desarrollo de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en el tejido de branquias en el ensayo de campo 4, donde el uso de la dieta de prueba 2 se compara con la dieta de control b, que es alimento de crecimiento para juveniles, producido por Ewos AS. Los resultados son el promedio del material de muestreo de una jaula en el agua dulce en la prueba (n = 20/muestreo), frente a una jaula en agua dulce como control (n = 20/muestreo). El experimento se lleva a cabo en condiciones de luz natural, principalmente después del equinoccio de otoño.



20

Diagrama 16: Desarrollo de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa promedio de tejido de branquias bajo condiciones de luz natural, cuando se alimenta salmón del Atlántico con a dieta de prueba 2, versus la dieta de control b. (n=20/punto de muestreo en cada grupo)

25

Entre el 10.09.12 y el 01.10.12, hubo un cambio significativo en la ATPasa (p = 0.01) en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control durante el mismo período no tuvo un cambio significativo en la ATPasa (p = 0.05). Entre el 10.09.12 y el 15.10.12, hubo un cambio significativo en la ATPasa en el grupo de prueba dentro del intervalo de confianza del 99% (p = 0.01), mientras que el grupo de control no tuvo un cambio significativo en la ATPasa dentro del intervalo de confianza del 95% (p = 0.05). La Tabla 12 proporciona un panorama del tema.

30

Tabla 12: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo (p = 0.05 o p = 0.01). Estos se compararon entonces entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el control y el grupo de prueba no dieron tal diferencia en la significación observada.

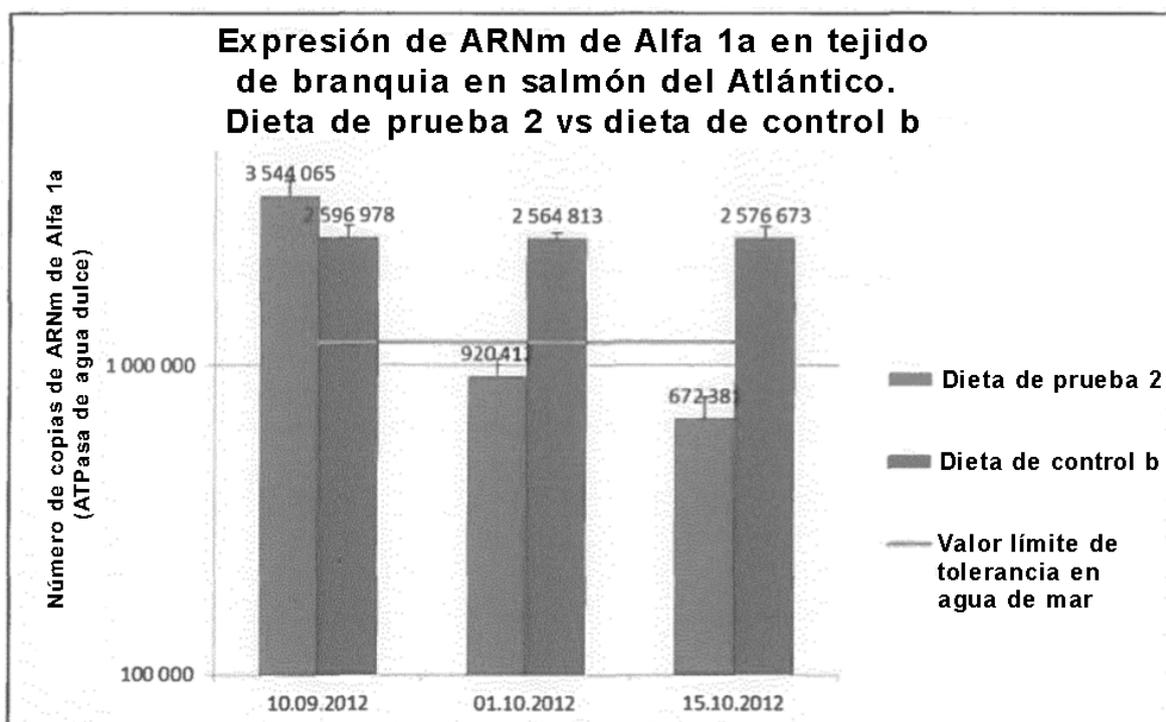
35

| Dieta de Control b | | | | Dieta de prueba 2 | | | |
|--------------------|---------|------------|------------|-------------------|---------|------------|------------|
| ATPasa | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | ATPasa | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|------------|------------|------|----|----|------------|------------|------|----|----|
| 10.09.2012 | 01.10.2012 | 0.11 | No | No | 10.09.2012 | 01.10.2012 | 0.00 | Sí | Sí |
| 11.09.2012 | 15.10.2012 | 0.99 | No | No | 11.09.2012 | 15.10.2012 | 0.00 | Sí | Sí |

Número de copias del ARNm de alfa 1a (ATPasa de agua dulce)

5 Se realizó el muestreo, para el análisis del número de copias de ARNm de alfa 1a, ATPasa de agua dulce. Los resultados se revelaron en el diagrama 17. Esto muestra que la dieta de prueba 2 da una expresión reducida de la ATPasa de agua dulce, en comparación con la dieta de control b. Para la dieta de prueba 2, observamos una reducción en el número de copias del ARNm de alfa 1a de 2.59 millones a 0.67 millones de copias, claramente por debajo del valor límite de 1186 000 copias. La diferencia entre los puntos de muestreo es significativa dentro del intervalo de confianza del 99% ($p = 0.01$). El uso de la dieta de control b proporciona una disminución marginal en el número de copias, de 2.59 millones a 2.57 millones de copias en el último punto de muestreo. La disminución no es significativa entre los puntos de muestreo. La Tabla 13 proporciona un panorama del tema.



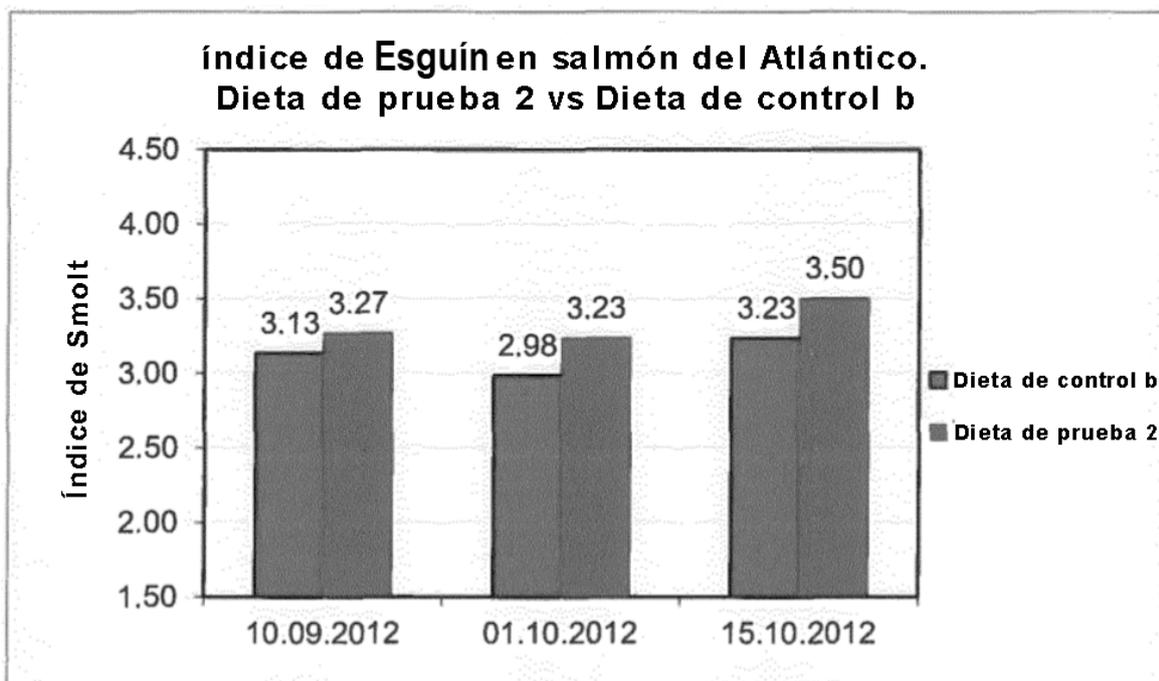
15 Diagrama 17: desarrollo de la expresión de ARNm de alfa 1a promedio en tejido de branquias bajo condiciones de luz natural, cuando se alimenta salmón del Atlántico con la dieta de prueba 2, versus la dieta de control b. ($n=14$ /punto de muestreo en cada grupo)

20 Tabla 13: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para el número de copias del ARNm alfa 1a dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba.

| Dieta de control b | | | | | Dieta de prueba 2 | | | | |
|--------------------|------------|---------|------------|------------|-------------------|------------|---------|------------|------------|
| ARNm | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | ARNm | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| 10.09.2012 | 01.10.2012 | 0.89 | No | No | 10.09.2012 | 01.10.2012 | 0.00 | Sí | Sí |
| 10.09.2012 | 15.10.2012 | 0.95 | No | No | 10.09.2012 | 15.10.2012 | 0.00 | Sí | Sí |
| 01.10.2012 | 15.10.2012 | 0.96 | No | No | 01.10.2012 | 15.10.2012 | 0.00 | Sí | Sí |

Índice del esguín

5 El diagrama 18 muestra el desarrollo en el índice del esguín en el ensayo de campo 4, con el uso de la dieta de prueba 2, en comparación con la dieta de control b. Los resultados son el promedio del material de muestreo de una jaula en la prueba (n = 20/muestreo) y una jaula como control (n = 20/muestreo).



10 Diagrama 18: Desarrollo del índice del esguín promedio del salmón del Atlántico bajo condiciones de luz natural, cuando se alimenta el salmón del Atlántico con la dieta de prueba 2, versus la dieta de control b (n=20/punto de muestreo en cada grupo)

15 Entre el 10.09.12 y el 15.10.12, hubo un aumento significativo en el índice del esguín (p = 0.05) en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control durante el mismo período no tuvo un cambio significativo en el índice del esguín (p = 0.05). La Tabla 14 proporciona una visión general del tema.

20 Tabla 14: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para el índice del esguín dentro de un grupo (p = 0.05 o p = 0.01). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el control y el grupo de prueba no dieron tal diferencia en la significación observada.

| Dieta de control b | | | | | Dieta de prueba 2 | | | | |
|--------------------|------------|---------|------------|------------|-------------------|------------|---------|------------|------------|
| Índice del esguín | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | Índice del esguín | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| 10.09.2012 | 15.10.2012 | 0.38 | No | No | 10.09.2012 | 15.10.2012 | 0.01 | Sí | No |

Cloruro en el plasma sanguíneo de peces en el Challenge test de agua de mar

25 No se realizó un Challenge test de agua de mar en este ensayo de campo.

Iones en el plasma sanguíneo de peces en agua dulce

30 No se extrajo ninguna muestra para el análisis de iones en el plasma sanguíneo, mientras que los peces permanecieron en agua dulce.

Tasa de mortalidad en agua dulce y agua de mar

No se observó mortalidad anormal en agua dulce. Los peces que habían recibido la dieta de prueba 2, se marcaron previamente recortando la aleta grasa. Estos peces se transfirieron a la misma jaula en el mar, como un grupo fotomanipulado (diferente del grupo de control de agua dulce). Se observó una tasa de mortalidad del 0.08% por exposición al sacrificio de los peces. La tasa de mortalidad se produjo inmediatamente después de la exposición al agua de mar.

Ensayo de campo 5

Actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido de branquia

El diagrama 19 muestra el desarrollo de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido branquial en el ensayo de campo 5, con el uso de la dieta de prueba 2, versus la dieta de control b, que es un alimento de crecimiento para juveniles producido por Ewos AS. Los resultados son el promedio del material de muestreo de 3 tanques en la prueba y 2 tanques en el control. En la tabla 15 se puede encontrar un panorama del número de tanques y el número de peces en cada muestreo.

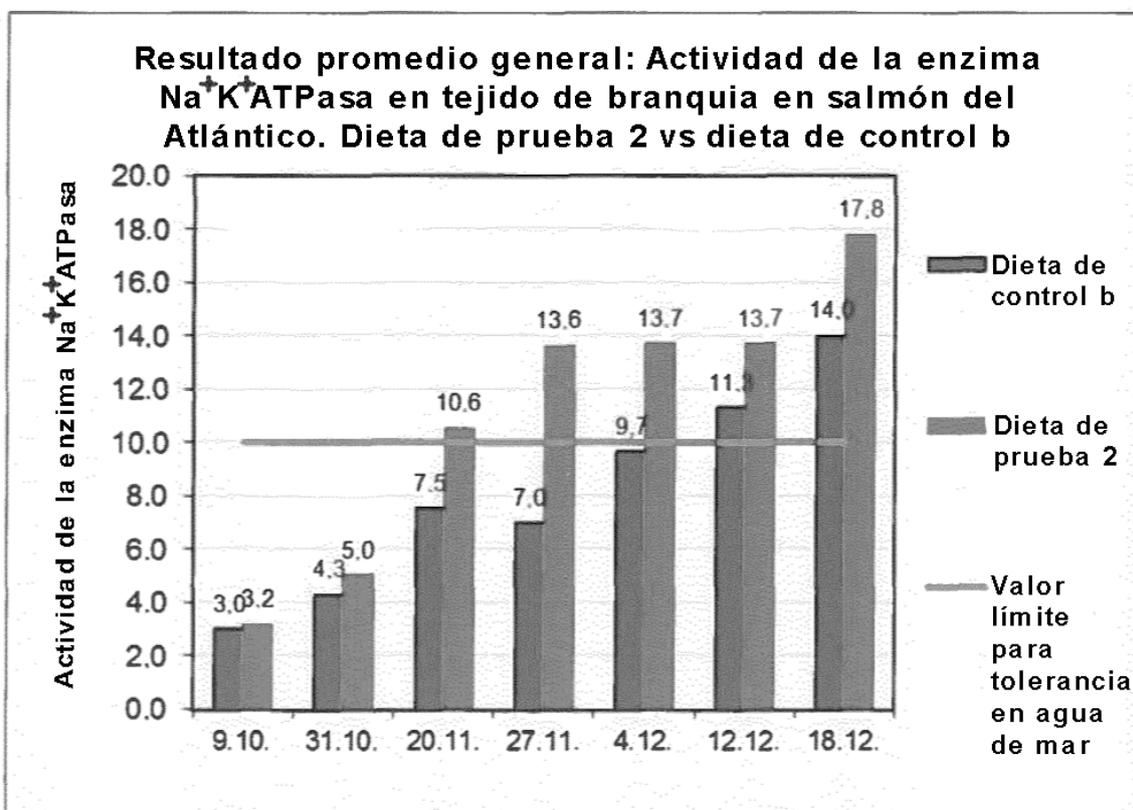


Diagrama 19: Desarrollo promedio de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido de branquias después de la señal de invierno, en salmón del Atlántico alimentado con la dieta de prueba 2 y la dieta de control b. El número de muestras de cada punto de muestreo, se listan en la tabla 14

Tabla 15: Panorama del número de tanques y el número de peces, en cada punto de muestreo en el ensayo de campo 5.

| Fecha de muestreo | No. de tanques en el grupo de control | No. de muestras en el grupo de control | No. de tanques en el grupo de prueba | No. de muestras en el grupo de prueba |
|-------------------|---------------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 09.10.2012 | 2 | 20 | 3 | 30 |
| 31.10.2012 | 2 | 20 | 3 | 30 |
| 20.11.2012 | 2 | 20 | 3 | 30 |
| 27.11.2012 | 1 | 10 | 1 | 10 |

ES 2 728 552 T3

| | | | | |
|------------|---|----|---|----|
| 04.12.2012 | 2 | 20 | 2 | 20 |
| 12.12.2012 | 1 | 10 | 1 | 10 |
| 18.12.2012 | 1 | 10 | 1 | 10 |

5 Entre el 09.10.12 y el 31.10.12, hubo un aumento significativo más alto ($p = 0.01$) en la ATPasa en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control tuvo un aumento significativo más bajo en la ATPasa ($p = 0.05$). Del mismo modo entre los puntos de muestreo 20.11.12 y 04.12.12. Entre 20.11.12 y 04.12.12, hubo un aumento significativo de la ATPasa en el grupo control dentro de los intervalos de confianza del 95% ($p = 0.05$), mientras que el grupo de prueba no tuvo un aumento significativo de la ATPasa dentro del intervalo de confianza del 95% ($p = 0.05$). Entre el 04.12.12 y el 18.12.12, ambos grupos tienen un valor p que es bastante similar ($p = 0.01$), pero solo el grupo de control tiene un aumento significativo de ATPasa dentro del intervalo de confianza del 99%. El grupo de prueba tiene un aumento significativo entre los puntos de muestreo dentro de los intervalos de confianza del 95% ($p = 0.05$). Además, vemos que el grupo de prueba tiene un aumento significativo ($p = 0.01$) en ATPasa entre 12.12.12 y 18.12.12, mientras que el grupo de control no tiene un aumento significativo ni dentro de los intervalos de confianza del 95 o 99% ($p = 0.05$ y 0.01). La Tabla 16 proporciona un panorama del tema.

15 Tabla 16: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba no dieron tal diferencia en la significación observada

| Resultados generales. Promedio | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------|---------|---------------|---------------|-------------------|------------|---------|---------------|---------------|--|
| Dieta de control b | | | | | Dieta de prueba 2 | | | | | |
| Atpasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | Atpasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | |
| 09.10.2012 | 31.10.2012 | 0.03 | Sí | No | 09.10.2012 | 31.10.2012 | 0.00 | Sí | Sí | |
| 20.11.2012 | 04.12.2012 | 0.05 | Sí | No | 20.11.2012 | 04.12.2012 | 0.00 | Sí | Sí | |
| 20.11.2012 | 12.12.2012 | 0.01 | Sí | No | 20.11.2012 | 12.12.2012 | 0.06 | No | No | |
| 04.12.2012 | 18.12.2012 | 0.01 | Sí | Sí | 04.12.2012 | 18.12.2012 | 0.01 | Sí | No | |
| 12.12.2012 | 18.12.2012 | 0.11 | No | No | 12.12.2012 | 18.12.2012 | 0.04 | Sí | No | |

20 Actividad de la enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en tejido branquial en cada réplica

El diagrama 20 muestra el desarrollo de la actividad de la enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en el tejido de branquias en la replicación 1, con el uso de la dieta de prueba 2, en comparación con la dieta de control b.

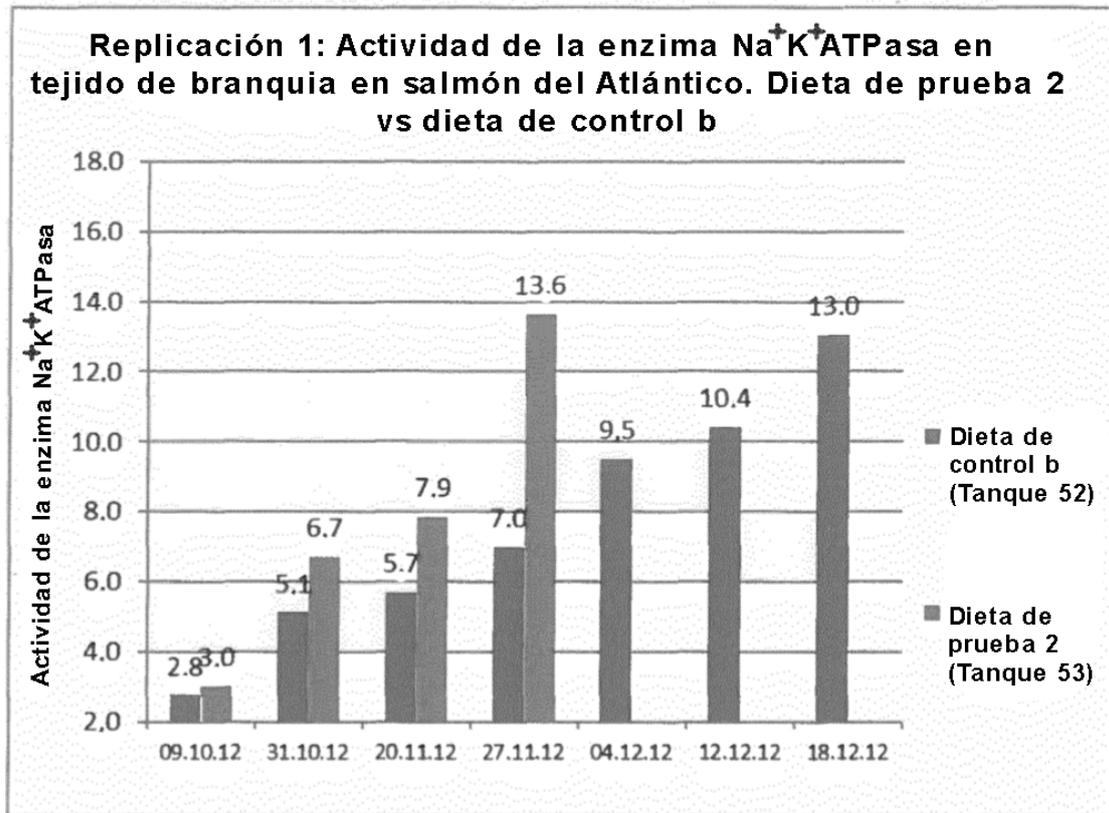


Diagrama 20: Desarrollo de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa promedio en tejido de branquias después de la señal de invierno, en el salmón del Atlántico alimentado con la dieta de prueba 2 y la dieta de control b.

5

Entre el 09.10.12 y el 31.10.12, hubo un aumento significativo ($p = 0.01$) en la ATPasa en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control solo tuvo un aumento significativo en la ATPasa dentro del intervalo de confianza del 95% ($p = 0.05$). Entre los puntos de muestreo 31.10.12 y 27.11.12, así como entre 20.11.12 y 27.11.12, hubo un aumento significativo dentro del intervalo de confianza del 99% en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control no tuvo ningún aumento significativo. La Tabla 17 proporciona un panorama del tema.

10

Tabla 17: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba, no dieron tal.

15

| Replicación 1 | | | | | | | | | |
|--------------------|------------|---------|------------|------------|-------------------|------------|---------|------------|------------|
| Dieta de control b | | | | | Dieta de prueba 2 | | | | |
| ATPasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | ATPasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| 09.10.2012 | 31.10.2012 | 0.02 | Sí | No | 09.10.2012 | 31.10.2012 | 0 | Sí | Sí |
| 31.10.2012 | 27.11.2012 | 0.1 | No | No | 31.10.2012 | 27.11.2012 | 0 | Sí | Sí |
| 20.11.2012 | 27.11.2012 | 0.22 | No | No | 20.11.2012 | 27.11.2012 | 0 | Sí | Sí |

El diagrama 21 muestra el desarrollo de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido de branquias en la replicación 2a, con el uso de la dieta de prueba 2 y en comparación con la dieta de control b.

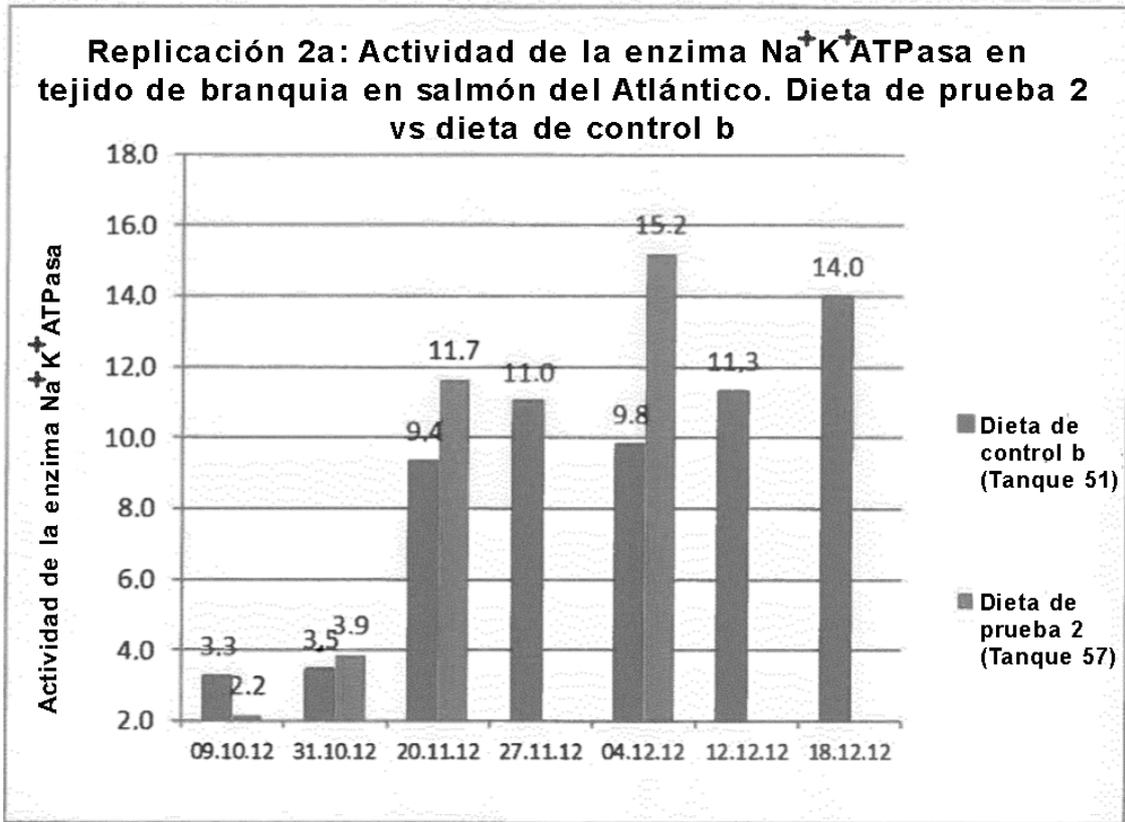


Diagrama 21: Desarrollo de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa promedio de tejido de branquias después de la señal de invierno, en salmón del Atlántico alimentado con dieta de prueba 2 y dieta de control b

5

Entre el 09.10.12 y el 31.10.12, hubo un aumento significativo ($p = 0.05$) en la ATPasa en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control no tuvo un aumento significativo en la ATPasa ($p = 0.05$). Del mismo modo entre los puntos de muestreo 20.11.12 y 04.12.12. La tabla 18 proporciona un panorama del tema.

10

Tabla 18: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el control y el grupo de prueba no dieron tal diferencia en la significación observada.

| Replicación 2a | | | | | | | | | |
|--------------------|------------|---------|------------|-------------------|------------|------------|---------|------------|------------|
| Dieta de control b | | | | Dieta de prueba 2 | | | | | |
| ATPasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | ATPasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| 09.10.2012 | 31.10.2012 | 0.75 | No | | 09.10.2012 | 31.10.2012 | 0.02 | Sí | |
| 20.11.2012 | 04.12.2012 | 0.76 | No | | 20.11.2012 | 04.12.2012 | 0.03 | Sí | |

15

El diagrama 22 muestra el desarrollo de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido de branquias en la replicación 2b, con el uso de la dieta de prueba 2, en comparación con la dieta de control b.

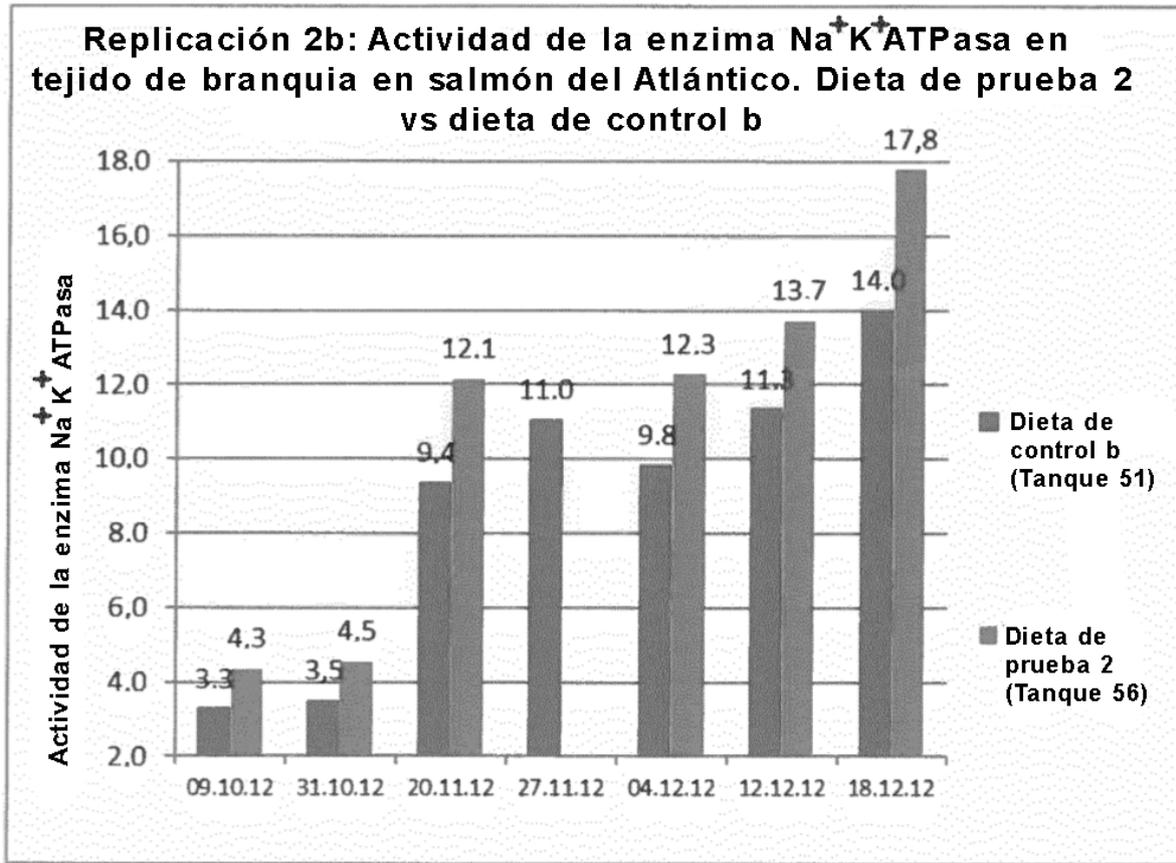


Diagrama 22: Desarrollo de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa promedio en tejido de branquias después de la señal de invierno, en salmón del Atlántico alimentado con la dieta de prueba 2 y la dieta de control b

5

Entre el 20.11.12 y el 18.12.12, hubo un aumento significativo dentro del intervalo de confianza del 99% (p = 0.01) en la ATPasa en el grupo de prueba, mientras que el grupo de control tuvo un aumento significativo en la ATPasa dentro del intervalo de confianza del 95%. (p = 0.05). Para los puntos de muestreo 12.12.12 y 18.12.12, el grupo de prueba tuvo un aumento significativo dentro del intervalo de confianza del 95% (p = 0.05), mientras que no hubo un aumento significativo en el grupo de control (p = 0.05). La Tabla 19 proporciona panoramas del tópic.

10

Tabla 19: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo (p = 0.05 o p = 0.01). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el control y el grupo de prueba no dieron tal diferencia en la significación observada.

15

| Replicación 2b | | | | | | | | | |
|--------------------|------------|---------|------------|------------|-------------------|------------|---------|------------|------------|
| Dieta de control b | | | | | Dieta de prueba 2 | | | | |
| ATPasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | ATPasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| 20.11.2012 | 18.12.2012 | 0.01 | Sí | No | 20.11.2012 | 18.12.2012 | 0 | Sí | Sí |
| 12.12.2012 | 18.12.2012 | 0.11 | No | No | 12.12.2012 | 18.12.2012 | 0.04 | Sí | No |

Número de copias del ARNm de alfa 1a (ATPasa de agua dulce) relacionadas con la temperatura del agua

20

La toma de muestras solo se realizó en el grupo de prueba, que recibió la dieta de prueba 2. Se analizó el número de copias del ARNm de alfa 1a (ATPasa de agua dulce). El diagrama 23 muestra la proporción de estas muestras que están por debajo del valor límite para la tolerancia al agua de mar, 1186 000 copias del ARNm de alfa 1a. El diagrama

también muestra la temperatura del agua en el mismo período. Las primeras dos semanas, la temperatura del agua fue superior a 6°C. Después de 2 semanas de alimentación, 83 y 100% de las muestras estaban por debajo del límite de tolerancia del agua de mar. Esta proporción fue disminuyendo aún más a través del proceso de formación del esguín, congruente con la disminución de la temperatura del agua.

5

Dieta de prueba 2: Proporción de observaciones con < 1186 000 copias de ARNm de Alfa 1a vs temperatura del agua dulce

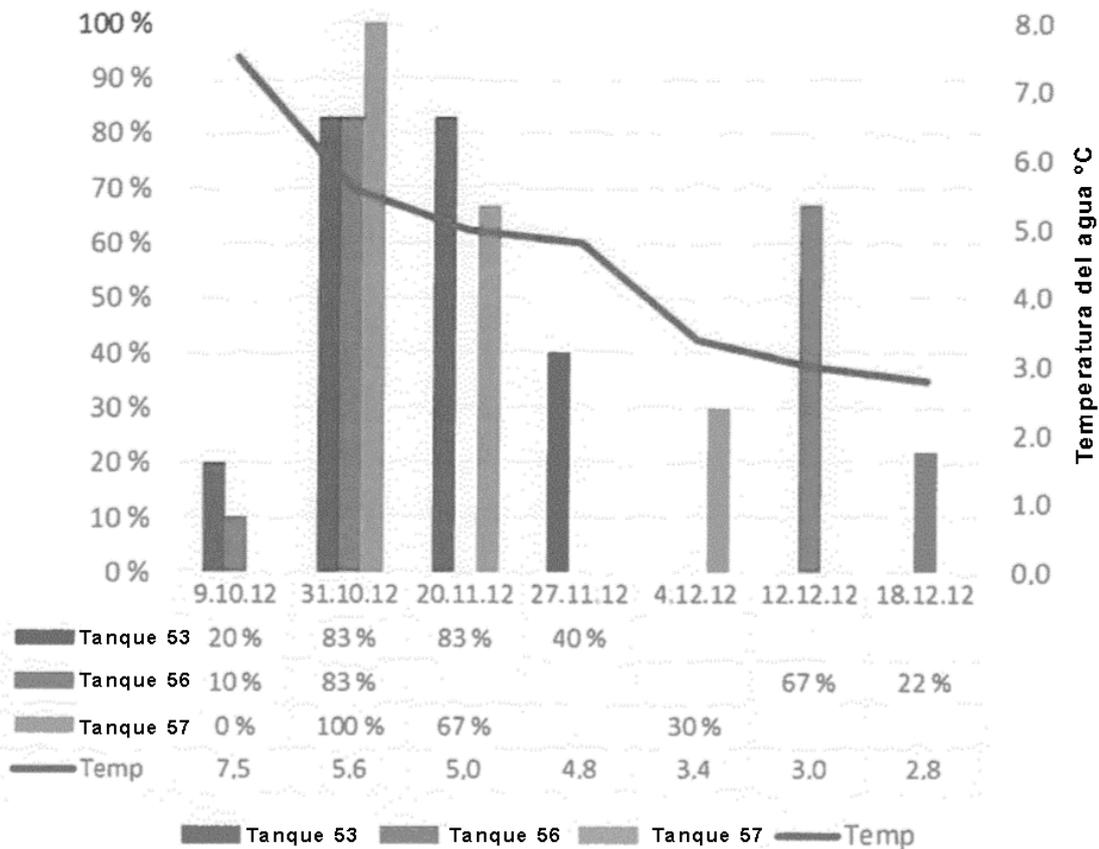


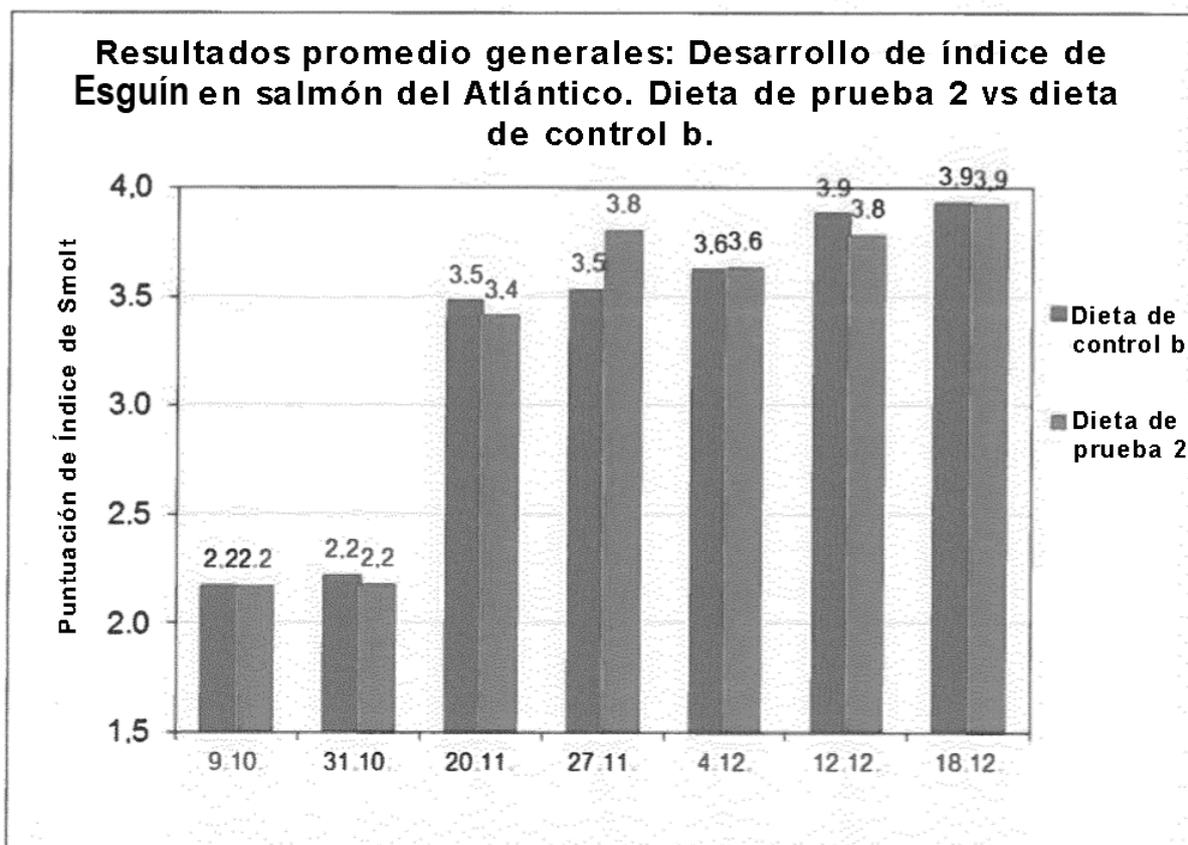
Diagrama 23: Proporción de observaciones con valores inferiores de 1186000 copias de ARNm de alfa 1a, expresión en tejido de branquia después de la señal de invierno. La gráfica está correlacionada con la temperatura del agua, es salmón del Atlántico alimentado con la dieta de prueba 2 y la dieta de control b, (n=6-10/muestreo en cada uno de los tres grupos de prueba)

10

Índice del esguín

15

El diagrama 24 muestra el desarrollo en el índice del esguín en el ensayo 5 de campo, cuando se usa la dieta de prueba 2, comparado con la dieta de control b. Los resultados son el promedio de muestreo de los 3 tanques en la prueba y 2 tanques en el control. La Tabla 14 ofrece una visión general de la cantidad de tanques y la cantidad de peces en cada punto de muestreo.



5 Diagrama 24: Desarrollo del índice del esguín promedio en salmón del Atlántico después de la señal de invierno, cuando se usa la dieta de prueba 2 y la dieta de control b. Se hace referencia a la Tabla 14, que da un panorama del número de muestras en cada uno de los puntos de muestreo.

10 Entre el 20.11.12 y el 12.12.12, hubo un aumento significativo en el índice del esguín dentro del intervalo de confianza del 99% ($p = 0.01$) en el grupo de control, mientras que el grupo de prueba en el mismo período tuvo un aumento significativo en el índice del esguín, dentro del intervalo de confianza del 95% ($p = 0.05$). Entre 04.12.12 y 12.12.12, hubo un aumento significativo en el índice del esguín dentro del intervalo de confianza del 99% ($p = 0.01$) en el grupo de control, mientras que el grupo de prueba en el mismo período no tuvo un aumento significativo en el índice del esguín dentro de El intervalo de confianza del 95% ($p = 0.05$). La tabla 20 proporciona una visión general del tema.

15 Tabla 20: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para el índice del esguín dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$). Luego se comparan entre el grupo de control y el grupo de prueba. Otras comparaciones entre los puntos de muestreo en el grupo de control y de prueba, no dio tal diferencia en la significancia observada.

| Resultados totales. Promedio. | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------|---------|------------|-------------------|-------------------|------------|---------|------------|------------|
| Dieta de Control b | | | | Dieta de Prueba 2 | | | | | |
| Índice del esguín | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | Índice del esguín | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| 20.11.2012 | 12.12.2012 | 0.00 | Sí | Sí | 20.11.2012 | 12.12.2012 | 0.02 | Sí | No |
| 04.12.2012 | 12.12.2012 | 0.00 | Sí | Sí | 04.12.2012 | 12.12.2012 | 0.33 | No | No |

Cloruro en el plasma sanguíneo de peces en el Challenge test de agua de mar

En este ensayo, no se llevó a cabo el Challenge test de agua de mar.

Iones en el plasma sanguíneo de peces en agua dulce

5 En este ensayo, no hubo muestreo para el análisis de iones en el plasma sanguíneo.

Tasa de mortalidad en agua dulce y agua de mar

10 No se observó mortalidad anormal en el agua dulce. Tampoco hubo observación de peces con la enfermedad HSS. El resumen de la mortalidad por la producción de agua de mar se encuentra en la tabla 21, para aquellos tanques que podrían rastrearse hasta el uso de la dieta de prueba y control en agua dulce.

15 Tabla 21: Resumen de mortalidad en agua de mar después de transferencia, para parte del material experimental en agua dulce.

| | Agua dulce de Dieta de Prueba 2 | Agua dulce de Dieta de Control b | % de diferencia con la dieta de control b |
|---|---------------------------------|----------------------------------|---|
| | Jaula 5 en agua de mar. | Jaula 9 en agua de mar. | |
| | Tanque 53 de agua dulce | Tanque 52 de agua dulce | |
| % de mortalidad después de 30 días después de la transferencia al agua de mar | 0.07 | 0.12 | 41.7 |
| % de mortalidad después de 60 días después de la transferencia al agua de mar | 0.16 | 0.45 | 64.4 |
| % de mortalidad después de 90 días después de la transferencia al agua de mar | 0.32 | 1.12 | 71.4 |

Ensayo de campo 6

20 Actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en tejido de branquias

25 El diagrama 25 muestra el desarrollo de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en el tejido de branquias en el ensayo 6 de campo, con el uso de la dieta de prueba 2, en comparación con la dieta de control b, que es el alimento de crecimiento para los juveniles producidos por Ewos AS. Los resultados son el promedio de muestreo de una jaula en agua dulce en la prueba (n = 20/muestreo), versus una jaula en agua dulce como control (n = 20/muestreo). El experimento es una comparación de dos métodos de producción, ya que los peces en el grupo de prueba que reciben continuamente la dieta ligera y la dieta de prueba 2, mientras que los peces en el grupo de control reciben la foto manipulación clásica (primera señal de invierno, seguida de la señal de verano) en combinación con la dieta de control b (alimento de crecimiento ordinario).

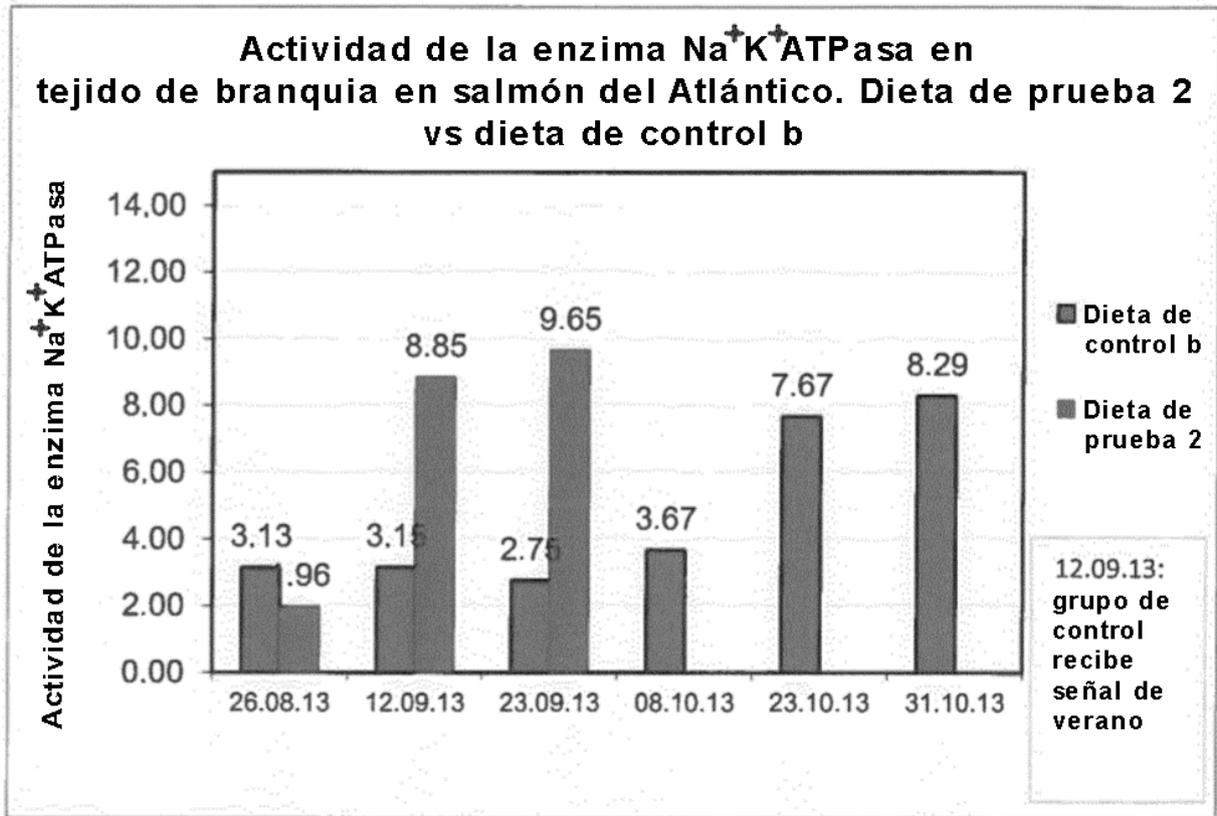


Diagrama 25: Comparación de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa en promedio en tejido de branquia de salmón del Atlántico. Los grupos de prueba recibieron continuamente luz y la dieta de prueba 2, mientras que el grupo de control recibió fotomanipulación clásica y dieta de control b. (n=20/punto de muestreo en cada grupo)

El valor de ATPasa promedio medido más alto se produjo aproximadamente 5 semanas antes en el grupo de prueba que en el grupo de control. El grupo de prueba reacciona con el aumento significativo (p = 0.01) en la ATPasa, dos semanas después de haber recibido la dieta de prueba 2. El grupo de control respondió con un aumento significativo (p = 0.01) en la ATPasa 6 semanas después de recibir la señal de verano. La tabla 22 proporciona un resumen.

Tabla 22: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para la ATPasa dentro de un grupo (p = 0.05 o p = 0.01).

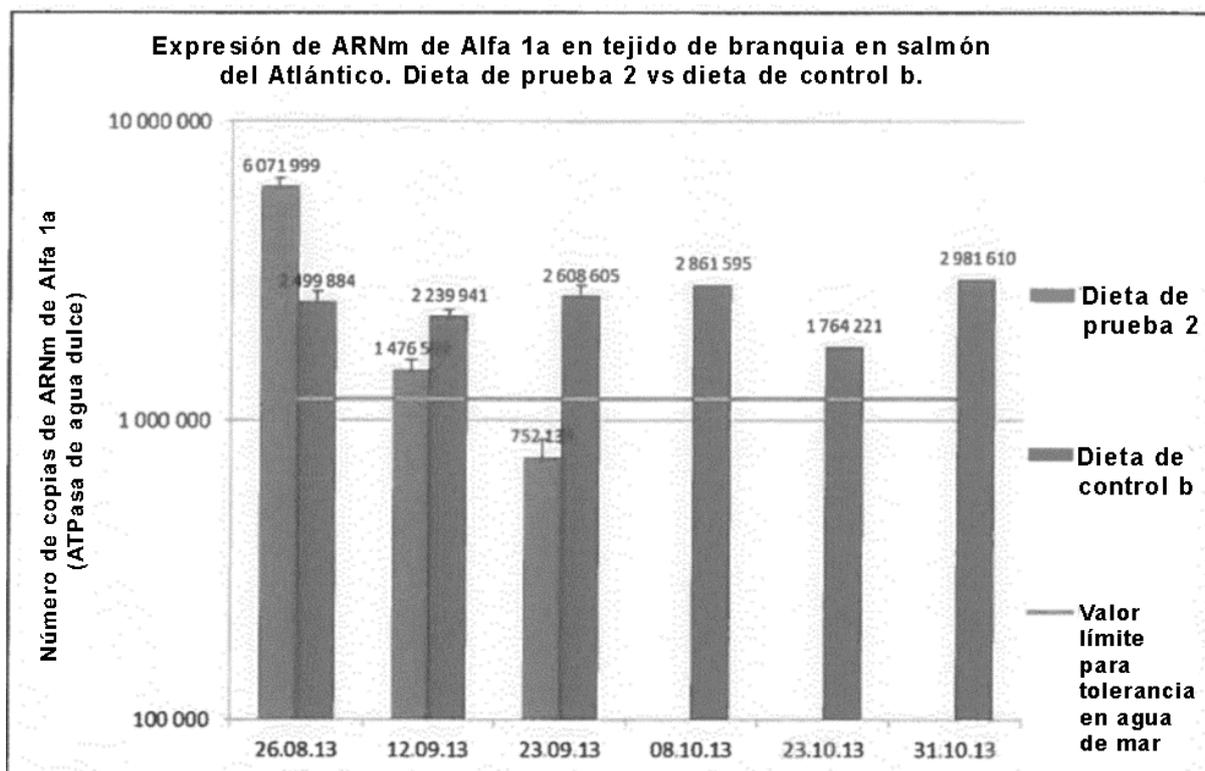
| Dieta de Control b | | | | | Dieta de Prueba 2 | | | | |
|--------------------|----------|---------|------------|------------|-------------------|----------|---------|------------|------------|
| ATPasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI | ATPasa | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| 26.08.13 | 12.09.13 | 0.97 | No | No | 26.08.13 | 12.09.13 | 0.00 | Sí | Sí |
| 26.08.13 | 23.09.13 | 0.24 | No | No | 27.08.13 | 23.09.13 | 0.00 | Sí | Sí |
| 26.08.13 | 08.10.13 | 0.34 | No | No | | | | | |
| 26.08.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 26.08.13 | 31.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 12.09.13 | 23.09.13 | 0.32 | No | No | 12.09.13 | 23.09.13 | 0.30 | Sí | Sí |
| 12.09.13 | 08.10.13 | 0.39 | No | No | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|----------|----------|------|----|----|--|--|--|--|--|
| 12.09.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 12.09.13 | 31.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 23.09.13 | 08.10.13 | 0.12 | No | No | | | | | |
| 23.09.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 23.09.13 | 31.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 08.10.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 08.10.13 | 31.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 23.10.13 | 31.10.13 | 0.59 | No | No | | | | | |

El número de copias del ARNm alfa 1a (ATPasa de agua dulce)

5 Se realizó un muestreo para el análisis del número de copias de ARNm alfa 1a (ATPasa de agua dulce). Los resultados revelados en el diagrama 26. Esto muestra que la dieta de prueba 2 combinada con una dieta ligera continuamente, da una expresión más baja de la ATPasa de agua dulce, en comparación con la dieta de control b y la foto manipulación clásica. Para la dieta de prueba 2, observamos una reducción en el número de copias del ARNm alfa 1a de 6.07 millones en el primer muestreo, a 0.75 millones de copias en el último muestreo, claramente por debajo del valor límite de tolerancia del agua de mar en 1,186 millones de copias. Las diferencias entre los puntos de muestreo en el grupo de prueba son significativas dentro del intervalo de confianza del 99% ($p = 0.01$) y coinciden con el aumento en la actividad de la enzima ATPasa.

15 El uso de la dieta de control b proporciona un aumento en el número de copias, de 2.49 millones en el primer muestreo, a 2.98 millones de copias en el último muestreo. El valor promedio más bajo se registró en 23.10.13, con 1.76 millones de copias, coincidiendo con un aumento significativo en la actividad de la enzima ATPasa. La disminución entre 26.08.13 y 23.10.13 está dentro del intervalo de confianza del 99% ($p = 0.01$), mientras que la disminución de 12.09.13 (que es el inicio de la señal de verano) a 23.10.13 no es significativa ($p = 0.05$). La Tabla 23 proporciona descripciones generales del tema.



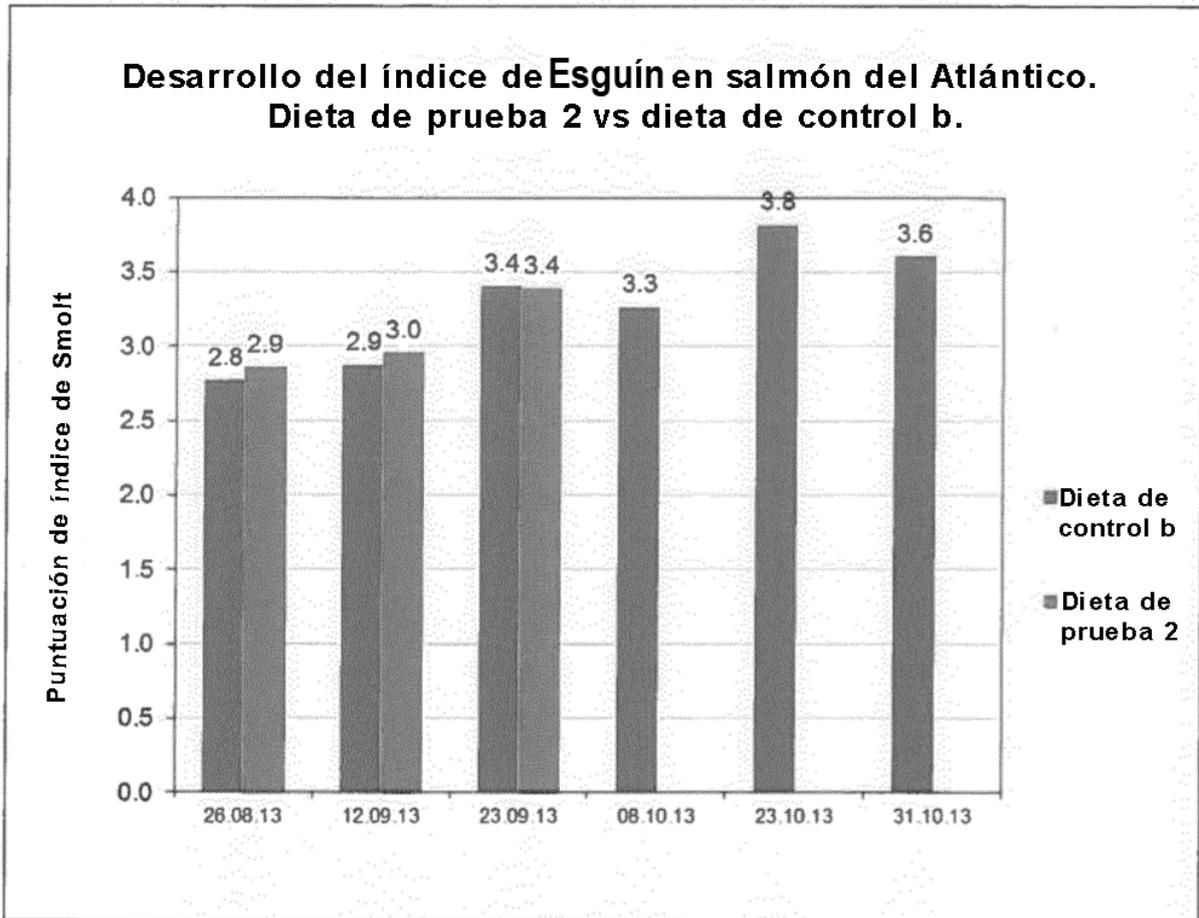
5 Diagrama 26: Desarrollo de la expresión de ARNm del alfa 1a promedio en tejido de branquia de salmón del Atlántico. El grupo de prueba recibió continuamente luz y la dieta de prueba 2, mientras que el grupo de control había recibido fotomanipulación clásica y la dieta de control b. El grupo de control recibió señal de verano desde el 12.09.13. n=20/punto de muestreo en cada grupo)

Tabla 23: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para el número de copias del ARNm alfa 1a dentro de un grupo (p = 0.05 o p = 0.01).

| Dieta de Control b | | | | | Dieta de Prueba 2 | | | | |
|--------------------|----------|---------|---------|---------|-------------------|------------|---------|------------|------------|
| ARNm | | Valor P | 95 % CI | 99 % CI | ARNm | | Valor P | Sig 95% CI | Sig 99% CI |
| 26.08.13 | 12.09.13 | 0.00 | Sí | Sí | 26.08.2013 | 12.09.2013 | 0.00 | Sí | Sí |
| 26.08.13 | 23.09.13 | 0.04 | Sí | No | 26.08.2013 | 23.09.2013 | 0.00 | Sí | Sí |
| 26.08.13 | 08.10.13 | 0.07 | No | No | | | | | |
| 26.08.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 26.08.13 | 31.10.13 | 0.09 | No | No | | | | | |
| 12.09.13 | 23.09.13 | 0.09 | No | No | 12.09.2013 | 23.09.2013 | 0.00 | Sí | Sí |
| 12.09.13 | 08.10.13 | 0.02 | Sí | No | | | | | |
| 12.09.13 | 23.10.13 | 0.09 | No | No | | | | | |
| 12.09.13 | 31.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 23.09.13 | 08.10.13 | 0.64 | No | No | | | | | |
| 23.09.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 23.09.13 | 31.10.13 | 0.36 | No | No | | | | | |
| 08.10.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 08.10.13 | 31.10.13 | 0.67 | No | No | | | | | |
| 23.10.13 | 31.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |

10 Índice del esguín

15 El diagrama 27 muestra el desarrollo del índice del esguín en el ensayo de campo 6. Los resultados son el promedio del muestreo de una jaula en agua dulce como prueba (n = 20/muestreo), versus una jaula en agua dulce como control (n = 20/muestreo).



5 Diagrama 27: Comparación del índice del esguín promedio en salmón del Atlántico. El grupo de prueba recibió continuamente luz y dieta de prueba 2, mientras que el grupo de control recibió fotomanipulación clásica y dieta de control b. (n=20/punto de muestreo en cada grupo)

10 Tanto el grupo de prueba como el grupo de control tienen un aumento significativo en el índice del esguín dentro del intervalo de confianza del 99% ($p = 0.01$) entre los puntos de muestreo 26.08.13 y 23.09.13. El grupo de prueba se transfirió al agua de mar después del 23.09.13, mientras que el grupo de control se transfirió al agua de mar cinco semanas después del grupo de prueba. Durante este período, hay observaciones de varios aumentos significativos en el índice del esguín entre un número de puntos de muestreo en el grupo de control. La Tabla 24 proporciona una visión general del tema.

15 Tabla 24: Cambio significativo entre dos puntos de muestra para el índice del esguín dentro de un grupo ($p = 0.05$ o $p = 0.01$).

| Dieta de Control b | | | | | Dieta de Prueba 2 | | | | |
|--------------------|----------|---------|--------|--------|-------------------|----------|---------|--------|--------|
| Índice del esguín | | Valor P | 95% CI | 99% CI | Índice del esguín | | Valor P | 95% CI | 99% CI |
| 26.08.13 | 12.09.13 | 0.37 | No | No | 26.08.13 | 12.09.13 | 0.48 | No | No |
| 26.08.13 | 23.09.13 | 0.00 | Sí | Sí | 26.08.13 | 23.09.13 | 0.00 | Sí | Sí |
| 26.08.13 | 08.10.13 | 0.11 | No | No | | | | | |
| 26.08.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | 12.09.13 | 23.09.13 | 0.00 | Sí | Sí |
| 26.08.13 | 31.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |
| 12.09.13 | 23.09.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | | |

| | | | | | | | | |
|----------|----------|------|----|----|--|--|--|--|
| 12.09.13 | 08.10.13 | 0.25 | No | No | | | | |
| 12.09.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | |
| 12.09.13 | 31.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | |
| 23.09.13 | 08.10.13 | 0.15 | No | No | | | | |
| 23.09.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | |
| 23.09.13 | 31.10.13 | 0.15 | No | No | | | | |
| 08.10.13 | 23.10.13 | 0.00 | Sí | Sí | | | | |
| 08.10.13 | 31.10.13 | 0.03 | Sí | No | | | | |
| 23.10.13 | 31.10.13 | 0.15 | No | No | | | | |

Cloruro en el plasma sanguíneo de peces en el Challenge test de agua de mar.

En este ensayo, no se llevó a cabo el Challenge test de agua de mar.

5

Iones en el plasma sanguíneo de peces en agua dulce

En este ensayo, no hubo muestreo para el análisis de iones en el plasma sanguíneo.

10

Tasa de mortalidad en agua dulce y agua de mar

No se observó ninguna mortalidad anormal en el agua dulce. Tampoco hubo observaciones de peces con la enfermedad HSS. La Tabla 25, da una visión general de mortalidad por producción de agua de mar.

15

Tabla 25: Resumen de la mortalidad en agua de mar después de la transferencia de agua dulce.

| | Agua dulce de Dieta de Prueba 2 | Agua dulce de Dieta de Control b | % de diferencia con la dieta de control b |
|--|---------------------------------|----------------------------------|---|
| | Jaula en 01 en agua de mar | Jaula 5 y 10 en agua de mar. | |
| % de mortalidad 30 días después de la transferencia al agua de mar (acumulada) | 0.15 % | 1.43 % | 89.5 % |
| % de mortalidad 60 días después de la transferencia al agua de mar (acumulada) | 0.18 % | 1.61 % | 88.8 % |
| % de mortalidad 90 días después de la transferencia al agua de mar (acumulada) | 0.25 % | 1.69 % | 85.2 % |

Discusión

20

Elección del método y evaluación del proceso de formación del esguín

25

La presencia de CaSR en los diversos órganos asociados con la osmorregulación y la actividad endocrina relacionada con el proceso de formación del esguín, se ha demostrado en el método SuperSmolt®, y se sabe cómo influir en la actividad de estas células mediante el uso de iones y aminoácidos que estimulan el CaSR. El método SuperSmolt® también proporciona un aumento en la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa, un aumento en el índice del esguín, el comportamiento del esguín en agua dulce, la osmorregulación normal en agua de mar (34%) y una buena supervivencia (1% de mortalidad < después de 30 días) y crecimiento en la producción de agua de mar. Todos estos son parámetros tradicionales para evaluar si se han formado o no satisfactoriamente los esguines. La experiencia de 2002 a 2014, con más de 300 millones de salmones que han sobreformado el esguín, apoya este método que emplea la adición de sales a las obras de agua en funcionamiento puede funcionar como un proceso de formación del esguín.

30

En la evaluación de la efectividad del alimento para peces de la presente invención, se ha aplicado un enfoque similar al utilizado para evaluar la efectividad del método SuperSmolt®, utilizando el conocimiento relacionado con el CaSR, combinado con parámetros de formación del esguín tradicional.

5 En tres de los seis experimentos de campo, las alimentaciones de prueba se utilizan en combinación con la foto manipulación tradicional. En estos casos, debemos suponer que el pez tiene una actividad endocrina que corresponde a un proceso de formación del esguín normal. Para el resto de los experimentos, se emplea luz continua o luz natural después del equinoccio otoñal, ambas condiciones representan un desafío para obtener un proceso satisfactorio de formación del esguín y capacidad para la osmorregulación normal, la supervivencia y el crecimiento después de la transferencia al agua de mar.

10 Cuando se usa el término “formación del esguín” relacionado con el uso de la dieta de prueba 2, esto implica que no se examina la actividad endocrina en el material experimental, sino que se apoya en los cambios en los parámetros tradicionales del esguín. Por lo tanto, la naturaleza del trabajo tiene un enfoque práctico para la formación del esguín en la producción del esguín, más que un estudio completo de los factores fisiológicos relacionados con el proceso de formación del esguín real.

15 El efecto de la dieta de prueba 1 y 2 en el proceso de formación del esguín, en comparación con la foto manipulación clásica

20 En el ensayo de campo 1, la dieta de prueba 1 se usa en combinación con la foto manipulación normal, mientras que en los ensayos de campo 2 y 5, la dieta de prueba 2 se usa en combinación con la foto manipulación normal.

25 Prueba de campo 1:

La dieta de prueba 1 no dio aumentos significativos en la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa, y de manera similar en el grupo de control. Se observaron resultados similares para el aumento del índice del esguín. No se observaron cambios significativos en el cloruro en plasma, después de 96 horas de Challenge test con agua de mar en 35% de agua de mar. Tanto el grupo de control como el grupo de prueba estaban dentro del rango normal de cloruro en plasma, 120-150 mmol/l. Sin embargo, la observación de peces que recibieron la dieta de prueba 1 en el período de formación del esguín, tuvo en promedio, más de 20 veces mayor mortalidad asociada con la enfermedad HSS, en comparación con el grupo de control. Los experimentos, llevados a cabo a una temperatura del agua de 3-5°C, deberían proporcionar un consumo dietético promedio de 0.2-0.4% diario, para peces de este tamaño (tabla de alimentación de Skretting, 2009).

35 Sin embargo, el consumo de alimento es lo suficientemente grande como para observar una mayor mortalidad en el grupo de prueba, y no es probable que un aumento de la temperatura del agua, con una mayor ingesta de alimento, sea beneficioso para la supervivencia en el grupo de prueba. En general, las observaciones proporcionan la base para argumentar que el alimento de prueba 1 por sí solo no es una dieta adecuada para estimular el proceso de formación del esguín en salmónidos. La dieta de prueba 1 es el tipo de alimento utilizado en el método SuperSmolt®, pero en combinación con Ca²⁺ y Mg²⁺ agregado al agua de funcionamiento.

40 Prueba de campo 5:

45 La dieta de prueba 2 se usó en el ensayo de campo 5. En este experimento, la temperatura del agua estaba entre 8 y 6°C las primeras dos semanas en el proceso de formación del esguín (después de la señal de verano dada), luego la temperatura del agua bajó primero a 4°C, luego 3°C. La caída de temperatura es considerada como una señal ambiental, lo que dificulta el proceso de formación del esguín. La disminución de la temperatura del agua dio como resultado una reducción en la ingesta de alimento, pero parece que las primeras dos semanas con las temperaturas más altas del agua y la ingesta relativamente alta de alimento de la dieta de prueba 2, han sido críticas sobre cómo se llevó a cabo el proceso de formación del esguín. El aumento en la actividad de la enzima ATPasa fue significativamente más fuerte entre los puntos de muestreo, al inicio del proceso de formación del esguín, en los peces que recibieron la dieta de prueba 2 (significativamente dentro del intervalo de confianza del 99%), en comparación con el grupo de control (significativamente dentro del intervalo de confianza del 95%). El índice del esguín no mostró el aumento correspondiente a favor de la dieta de prueba 2. El puntaje del índice del esguín se evalúa subjetivamente hasta cierto punto y puede haber jugado una variación en los puntajes entre los diferentes muestreadores en el criadero anfitrión. Material de muestra en la última parte del período de formación del esguín también fue limitado (n = 10) en cada grupo. El índice del esguín se usa raramente para decidir el momento de la transferencia al agua de mar, pero es más un parámetro adicional en el proceso de formación del esguín.

60 Debido al estado satisfactorio del esguín en los peces que recibieron la dieta de prueba 2, el grupo de prueba en las réplicas 1 y 2a se transfirió al agua de mar, respectivamente 3 y 2 semanas antes, que los grupos de control. El grupo de prueba en la réplica 2b se transfirió al mismo tiempo que el grupo de control. Sin embargo, según los valores de ATPasa, la transferencia al agua de mar del grupo de prueba fue posible 4 semanas antes del control de los peces.

65

El porcentaje de participación de muestras de ARNm alfa 1a (ATPasa de agua dulce) en el grupo de prueba, con un valor inferior a 1,186 millones de copias, aumenta significativamente desde el inicio hasta el segundo punto de muestreo (aproximadamente 2 semanas) (diagrama 23). Este es un período con una temperatura del agua de 6°C. A medida que la temperatura del agua desciende, el porcentaje de peces con el ARNm alfa 1a (ATPasa de agua dulce) menos de 1,186 millones de copias, también disminuye. Esta observación puede relacionarse directamente con la ingesta de alimento de los peces, ya que la disminución de la temperatura del agua reducirá la ingesta de alimento. Al mismo tiempo, vemos que la dieta de prueba 2 proporciona un estímulo adicional para los peces en el grupo de prueba, que se revela como un aumento adicional en la producción de enzimas ATPasa, en comparación con el grupo de control.

En la agricultura práctica, las transferencias de fines de otoño pueden ser problemáticas en relación con el logro de un tamaño satisfactorio de los peces en el mar antes de la temporada de invierno. Tales peces son más propensos a las heridas de invierno, que los peces que llegaron al mar antes en el otoño. Las transferencias de principios de otoño permiten, en mayor medida, utilizar las altas temperaturas del agua de mar a principios de otoño, y obtener mayores tasas de crecimiento y tiempo de producción reducido desde la transferencia hasta el sacrificio. Las transferencias de finales de otoño, relacionadas con la disminución de la temperatura del agua dulce y las dificultades con el proceso de formación del esguín, son comunes en la producción del esguín. La dieta de prueba 2 es una herramienta para lograr el tiempo de transferencia más temprano, sobre la caída de las temperaturas del agua en el otoño.

La tasa de mortalidad en el agua de mar, respectivamente, 30, 60 y 90 días después de la transferencia, fue satisfactoria tanto para el grupo de prueba como para el grupo de control. Sin embargo, los peces a los que se les había administrado la dieta de prueba 2 en agua dulce, tenían tasas de mortalidad más bajas que el grupo de control. A mayor tiempo en el agua de mar, mayor diferencia porcentual de mortalidad ocurrió. El estado del esguín puede tener un impacto en la supervivencia en el agua de mar, y existe un mayor riesgo de problemas secundarios asociados con una capacidad de osmorregulación deficiente. Además, estos resultados apoyan que la dieta de prueba 2 es segura en el uso y no interfiere negativamente con la producción.

Prueba de campo 2:

Prueba de campo 2, se realizó sobre trucha arco iris. Este pez había recibido la señal de invierno al utilizar luz natural en invierno en el hemisferio sur (antes del equinoccio de primavera). Después de esto recibió luz extra, que sirvió de señal de verano. La dieta de prueba 2, se usó como un estímulo adicional en el período de señal de verano. No es habitual hablar de un proceso de formación del esguín en la trucha arco iris, pero es un hecho que la trucha arco iris debe responder con las mismas respuestas fisiológicas que el salmón, cuando se transfiere al agua de mar. Una preadaptación en agua dulce, antes de transferir los peces al agua de mar, parece una estrategia acertada para reducir el estrés por osmorregulación en la trucha arco iris. El grupo de prueba muestra una semana antes un aumento significativo en la actividad de la enzima ATPasa, en comparación con el grupo de control.

El criadero tuvo un procedimiento con la clasificación de los peces más pequeños en un grupo de peces, antes de la entrega al mar. Esta práctica estresa a los peces y causa la caída de la actividad de la enzima ATPasa, confirmando así la experiencia previa. Tanto el grupo de prueba como el grupo de control respondieron con una reducción numérica en la cantidad de enzima ATPasa después del factor estresante. Sin embargo, solo el grupo de control tiene una caída en la ATPasa, que es significativa dentro del intervalo de confianza del 99%. La caída en la actividad de la enzima ATPasa en el grupo de prueba no es significativa. El aumento de la ATPasa la última semana antes de la transferencia al agua de mar en el grupo de control no es significativo, pero se puede considerar como una posible recuperación después del factor estresante. Las truchas arco iris se exponen a la emaciación (cabezas de alfileres) la primera vez después de la transferencia al mar. Tales peces pueden sobrevivir durante un largo período en el agua de mar, pero comen mal y no crecen normalmente. No son fáciles de sacar de la jaula; Normalmente siguen la producción hasta el momento de la cosecha. Luego se cuentan todos los peces y se revela el número real del problema de la cabeza de alfiler. Esta condición de enfermedad no se entiende completamente. Sin embargo, se supone que la mala osmorregulación en el agua de mar es un factor importante. En este ensayo de campo, la tasa de mortalidad en el agua de mar 60 días después de la transferencia fue satisfactoria tanto en el grupo de prueba como en el de control, pero la mortalidad más baja se observó en el grupo de prueba.

La prueba de campo 2 indica que la dieta de prueba 2 es una herramienta para una mejor adaptación previa de la trucha arco iris a una vida en agua de mar, en comparación con el método de producción tradicional.

El efecto de la dieta de prueba 2 en el proceso de formación del esguín sin el uso de foto manipulación, así como el efecto de la dieta de prueba 2 en la no formación del esguín.

Los ensayos de campo 3, 4 y 6 son experimentos realizados sin el uso de foto manipulación en el proceso de formación del esguín.

Prueba de campo 3

El pez en la prueba de campo 3, colocado en un tanque fuera del edificio del criadero, fue expuesto a luz artificial continuamente. Luego, los peces se trasladaron al interior y continuaron recibiendo luz artificial las 24 horas del día. El

experimento se llevó a cabo mientras los peces estaban en el interior. La luz continua normalmente es insuficiente para lograr un proceso satisfactorio de formación del esguín, pero se sabe que tales condiciones combinadas con una alta temperatura del agua ($>8^{\circ}\text{C}$) pueden proporcionar a los peces una alta actividad de la enzima ATPasa en las branquias. Dichos peces pueden realizar normalmente la osmorregulación en agua de mar. Sin embargo, tales grupos de peces a menudo se desempeñan con un estado del esguín no homogéneo dentro del grupo, no apto para ser transferido al mar.

Un aspecto que puede ser importante es que los peces se destacaron en agosto y septiembre bajo un cielo oscuro y nocturno. Esto podría haber sido percibido como una señal de invierno, a pesar del suministro de una cantidad relativamente modesta de luz artificial agregada en el tanque, en comparación con la oscuridad del cielo nocturno. Cuando se transfiere al criadero en casa y las condiciones de luz continuamente estables sin variación, el estímulo se ha percibido como la señal de verano en los peces. Probablemente, ha contribuido a un proceso de formación del esguín. Independientemente de las condiciones de iluminación, es con una certeza razonable, que este pez ha recibido un régimen de manejo de luz subóptimo, en comparación con lo que es estándar para el manejo de la luz del esguín.

La dieta de prueba 2 proporciona una actividad enzimática ATPasa más temprana y más alta, en comparación con el grupo de control. Esto es válido durante todo el período experimental de 11 semanas. Hay un aumento significativo en el grupo de prueba al inicio del proceso de formación del esguín (entre el primer y el tercer punto de muestreo), mientras que el único cambio significativo en el grupo de control es la caída en la ATPasa entre el tercer y el cuarto punto de muestreo. Para la dieta de prueba 2, hay una respuesta ATPasa correspondiente a la observada en los ensayos de campo 2 y 5.

Además, vemos que el índice del esguín en el grupo de prueba aumenta significativamente entre el primer y el segundo punto de muestreo, mientras que el grupo de control no tuvo ningún cambio significativo. Entre el segundo y el tercer punto de muestreo hay un aumento significativo más fuerte en el grupo de prueba (dentro del intervalo de confianza del 99%), que en el grupo de control (dentro del intervalo de confianza del 95%). En este caso, el aumento en el índice del esguín en el grupo de prueba, aparece antes que en el grupo de control y coincide con el aumento en la actividad de la enzima ATPasa. La evaluación del índice del esguín es realizada por la misma persona cada vez que se realiza el muestreo (con la excepción del primer muestreo) y el material de datos es 3 veces más grande que en la prueba de campo 5 ($n = 30$ vs. $n = 10$). Esto refuerza esta observación, cuando se compara con el efecto faltante de la dieta de prueba 2, aparentemente tuvo en el índice del esguín en la prueba de campo 5.

En los materiales que se analizaron para el número de copias del ARNm alfa 1a (ATPasa de agua dulce), vemos que la proporción de pruebas que tienen números más bajos que 1.186 millones de copias, es prácticamente estable durante el período experimental de 11 semanas. En comparación con el grupo de control (gráfico 11). Desafortunadamente, no hay un muestreo de inicio en el experimento, pero el segundo muestreo de la réplica 2 indica el alto número de copias antes del inicio de la prueba. En contraste con las pruebas de campo 5, que tuvieron una caída de la temperatura del agua por debajo de 6°C , aquí tenemos una temperatura del agua estable entre 8.3 - 8.9°C . La temperatura del agua influye en la ingesta de alimento y, a 8°C , la ingesta de alimento es estable, algo que no se logró en una prueba de campo 5. Es razonable suponer que esto es de importancia significativa para el porcentaje estable de muestras, que tiene un valor inferior a 1,186 millones de copias de ARNm alfa 1a (el valor límite para la tolerancia al agua de mar). Este resultado parece estar directamente relacionado con la ingesta de la dieta de prueba 2, y no se puede lograr con el uso de alimentos de crecimiento común. Esto ilustra que será posible mantener a los peces en la ventana del esguín, mientras permanece en el agua dulce durante un período más largo. Esto tiene su aplicación específica en la producción práctica del esguín, por el hecho de que los peces no forman el esguín, seguido de un estado del esguín sincronizado en toda la población de peces en el tanque. Este aspecto es importante para el crecimiento y la supervivencia en el agua de mar, pero también proporciona un tiempo de transferencia flexible del esguín al agua de mar. Dada la temperatura adecuada del agua, el medio ambiente acuático y la buena salud de los peces, probablemente será posible producir un post esguín (1-2 kg) en agua dulce para su entrega a instalaciones marinas, o la producción de salmón en agua dulce hasta el tamaño de la cosecha (>2 kg).

Vemos que el grupo de control durante el período experimental tuvo un aumento y una disminución significativos en la ATPasa de agua dulce, mientras que el grupo de prueba no tuvo ningún cambio significativo. Esto se debe probablemente al hecho de que falta el primer punto de muestreo para las repeticiones 1 y 2 para este tipo de análisis, y que la dieta de prueba 2 mantiene a los peces en un nivel bajo y estable de ATPasa de agua dulce (tablas 9 y 10). Sin embargo, el grupo de control reduce el nivel de ATPasa de agua dulce a casi el mismo nivel que el grupo de prueba después de 11 semanas en el experimento. Esto puede deberse a que los peces se han sometido a un proceso de formación del esguín que ha tomado aproximadamente 654 días desde el momento en que se movieron los peces en la casa del criadero (el supuesto inicio de la señal de verano). Normalmente, los peces alcanzan la ventana del esguín después de 350 días en la señal de verano. Al comparar la actividad de la enzima ATPasa con la ATPasa de agua dulce en el mismo período, vemos que la actividad de la enzima ATPasa es 7.7 en el grupo de control, mientras que el grupo de prueba tiene 9.2 en el último muestreo. El nivel del grupo de control indica la no formación del esguín, alternativamente, los peces han estado expuestos a un impacto ambiental negativo y, en tales casos, es común con una disminución significativa en la actividad de la enzima ATPasa. Los niveles de ATPasa de agua dulce no admiten una no formación del esguín, sino todo lo contrario. La razón más probable de la caída de la actividad de la enzima ATPasa es un factor estresante. Dicho factor estresante puede ser de alta densidad en pequeños tanques experimentales. Esta es una observación similar a la observada cuando se califica la trucha arco iris en los ensayos de campo 2, donde los

peces alimentados con la dieta de prueba 2, mantienen una ATPasa más alta a pesar del factor estresante agregado, en comparación con el grupo de control.

5 No hubo transferencia al agua de mar para la producción adicional de los peces en la prueba de campo 3. Sin embargo, se realizó un Challenge test de agua de mar antes de la destrucción del grupo de peces. Esta prueba muestra niveles satisfactorios de cloruro plasmático (120-150 mmol/l) tanto en el grupo de control como en el grupo de prueba (diagrama 14). Vemos que la tendencia en el material del grupo de control muestra de manera importante que el tamaño de los peces afecta el nivel de cloruro en plasma positivo, en comparación con lo observado en el grupo de prueba (diagrama 10 13). Esta es una observación que apoya que la dieta de prueba 2 mejora la capacidad de los peces para la osmorregulación en el agua de mar.

Prueba de campo 4

15 La prueba de campo 4, se lleva a cabo bajo la temperatura de la caída del agua y en la longitud del día después del equinoccio de otoño. Los peces están obteniendo más oscuridad que la exposición a la luz a lo largo del día, y la proporción de oscuridad cada día durante el período de prueba, está aumentando. Tanto la temperatura del agua como la duración reducida del día son señales negativas del proceso de formación del esguín. Hay un aumento significativo dentro del intervalo de confianza del 99% en la actividad de la enzima ATPasa en peces alimentados con la dieta de prueba 2, mientras que los peces de control no tienen ningún cambio significativo en la actividad de la enzima ATPasa. Para la dieta de prueba 2, estos hallazgos son similares a los observados en el ensayo de campo 3.

Hay un aumento significativo en el índice del esguín entre la primera y la última muestra en peces alimentados con la dieta de prueba 2, mientras que los peces de control no están modificados en el índice del esguín en el mismo período. Para la dieta de prueba 2, esta es una respuesta similar a la observada en los ensayos de campo 3.

Las muestras analizadas para el ARNm alfa 1a (ATPasa de agua dulce), muestran para la dieta de prueba 2, una disminución significativa en el intervalo de confianza del 99% entre los puntos de muestreo. Este descenso no se observa en el grupo de control. El segundo muestreo en el grupo de prueba (aproximadamente 2 semanas después del inicio) está por debajo del valor límite para la tolerancia al agua de mar, en 1,186 millones de copias de ATPasa de agua dulce. Esta respuesta se observa en las pruebas de campo 3, así como en la prueba de campo 5.

Mientras se transfiere al agua de mar, la tasa de mortalidad fue muy baja durante toda la producción, y fuera de la cosecha.

En general, este experimento demuestra que la dieta de prueba 2 es segura en uso en la producción ordinaria, así como que muestra el efecto sobre la formación del esguín, a pesar de la ausencia de señales comunes de formación del esguín. En la práctica de la agricultura, los peces recibirán de vez en cuando señales de formación del esguín incompletas (señal de invierno y señal de verano incompletas o faltantes), y en tales situaciones, la dieta de prueba 2 se puede usar para compensar esto.

Prueba de campo 6:

La prueba de campo 6 se lleva a cabo para comparar dos métodos de producción diferentes, luz continua en combinación con la dieta de prueba 2, en comparación con la foto manipulación tradicional y la alimentación de crecimiento normal. Esta producción se realiza al aire libre, en jaulas en agua dulce. El pez en el grupo de prueba ha recibido luz continua. Además, el proceso de formación del esguín finaliza antes del equinoccio de otoño. Así, los peces se hacen más grandes los días que las noches. Los peces en el grupo de control recibieron las condiciones de luz natural hasta el 12 de septiembre de 2012, y la oscuridad de la noche en el período sirvió como señal de invierno. Cuando se expone a la luz artificial, esto se percibirá como la señal de verano en los peces. El objetivo principal de este experimento es evaluar si es posible transferir peces al agua de mar en una etapa anterior, en comparación con lo que es posible con la foto manipulación. Además, examine el efecto de la dieta de prueba 2 sobre la formación del esguín y la supervivencia de los peces después de la transferencia al agua de mar.

El experimento muestra que la dieta de prueba 2 en este caso es capaz de realizar la transferencia del esguín a agua de mar, 5 semanas antes de la producción del esguín foto manipulada. La razón principal de esto es que los peces no reciben señal de invierno y, por lo tanto, pueden mantener la ingesta normal de alimento. Por lo tanto, los peces alcanzan el tamaño de vacunación antes que los peces que reciben la señal de invierno. La formación del esguín se realiza después de la vacunación. Esta planta del esguín no puede dar una señal artificial de invierno, ya que tiene jaulas exteriores en un lago de agua dulce. La planta del esguín tiene que esperar el número suficiente de días que pueden dar oscuridad durante la noche (en agosto y septiembre), y la señal de luz artificial de verano en el proceso de formación del esguín se modificará en el mes de septiembre, después de la señal de invierno. Entre el primer y el segundo muestreo en el grupo de prueba, hay un aumento significativo en la actividad de la enzima ATPasa dentro del intervalo de confianza del 99%, mientras que el grupo de control no tuvo ningún cambio significativo en la ATPasa, en el mismo período (diagrama 25). Para la dieta de prueba 2, esta es una respuesta similar a la observada en los ensayos de campo 3 y 4.

El índice del esguín tuvo un desarrollo igual en el grupo de prueba y control en este experimento. Esto puede deberse al hecho de que tanto el grupo de prueba como el grupo de control recibieron más luz natural del día que en las pruebas de campo 3, 4 y 5. Se sabe que la intensidad de la luz afecta el grado de índice del esguín. La luz brillante produce un índice del esguín más alto que la luz tenue.

Las muestras analizadas para el ARNm alfa 1a (ATPasa de agua dulce) muestran la dieta de prueba 2, una disminución significativa dentro del intervalo de confianza del 99%, entre los puntos de muestreo. Esta disminución también ocurre en el grupo de control, entre la primera y la segunda muestra, pero la disminución en el grupo de prueba es numéricamente mayor que en el grupo de control. La disminución en el grupo de prueba es de 6.07 millones a 1.48 millones de copias entre la primera y la segunda muestra. Comparable, la disminución en el grupo de control es de 2.5 millones a 2.23 millones de copias. Entre el segundo y el tercer punto de muestreo, no hay un cambio significativo en el grupo de control, pero el grupo de prueba continúa la caída hasta 0.75 millones de copias. El cambio en el grupo de prueba corresponde al observado en los ensayos de campo 3, 4 y 5, pero se retrasa un poco en comparación con el otro. Esto puede deberse a la gran cantidad de copias del ARNm alfa 1a que se observó al comienzo en el grupo de prueba, y que toma más tiempo regular hacia abajo esta expresión. El grupo de control no estuvo por debajo del valor límite para la tolerancia al agua de mar, 1,186 millones de copias de ARNm alfa 1a, cuando se transfirió al agua de mar. Se sabe que la correlación entre la actividad de la enzima ATPasa y el ARNm alfa 1a en peces foto manipulados forma una curva en forma de u. A partir de la ATPasa 1-9, se produce un número reducido de copias de ARNm, mientras que a partir de la ATPasa 9-22, se produce un número creciente de copias de ARNm. Es probable que los peces operen con una estrategia dual en el área entre 9-20 de la ATPasa, y manejen tanto la no formación del esguín en agua dulce como la vida en el agua de mar. Esto provoca dificultades para encontrar el nivel inferior de la ATPasa de agua dulce cuando se realiza el muestreo y este podría ser el caso en este experimento. Al mismo tiempo, vemos que los peces no tienen más de 8.29 en el nivel de enzima ATPasa, y esto indica que no estaba listo para el agua de mar en el momento de la transferencia. Sin embargo, el grupo de control mostró buena supervivencia y crecimiento en el agua de mar. Entonces es probable que crea que la actividad de la enzima ATPasa ha sido suprimida por un factor estresante y "liberada" cuando se transfiere al agua de mar.

La tasa de mortalidad de peces alimentados con la dieta de prueba 2 en agua dulce fue muy baja durante los primeros 8 meses en agua de mar, 0.36% en mortalidad.

En general, este experimento muestra que la dieta de prueba 2 es segura en el uso en la producción regular, y que los peces pueden formar el esguín sin el uso de foto manipulación, solo con la ayuda de la dieta de prueba 2. Sin embargo, la experiencia de este tipo de La producción es limitada, en comparación con el uso del método SuperSmolt®, que combina el uso de luz continua. Por lo tanto, es natural usar precaución, elegir condiciones de producción favorables (alta temperatura del agua, peces saludables y buena calidad del agua) y ganar la experiencia gradual con el método descrito antes de que se vuelva más grande en uso.

Evaluaciones fisiológicas asociadas con el síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en el salmón del Atlántico y el uso de la dieta de prueba 2 contra HSS

HSS es un trastorno que es relativamente común durante la etapa de la formación del esguín en el salmón del Atlántico. Nylund et al. (2003) asociaron la enfermedad con infección viral, pero no se han demostrado agentes causales. También se sugiere que la malnutrición o la enfermedad genética pueden ser causas posibles (Rodgers y Richards, 1998). Por lo general, es el pez más grande que sufre de HSS en un grupo de peces, y es el pez el que más ha avanzado en el proceso de formación del esguín.

Fisiológicamente, el esguín en agua dulce bombeará activamente el Na^+ y el Cl^- sobre las branquias, y excretará el Mg^{2+} y el Ca^{2+} sobre los riñones. Si el salmón se encuentra en la etapa parr, absorberá Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} y Mg^{2+} del medio ambiente. Los problemas de HSS surgen cuando los peces son esguín adaptados al agua de mar, pero aún se encuentra en agua dulce, y son más cuando los peces se alimentan con un forro que aumenta la tasa de consumo. La dieta de prueba 1 causa un aumento en la prevalencia de HSS, al proporcionar una tasa de mortalidad 20 veces mayor que la de los peces que recibieron alimento de crecimiento normal. La dieta de prueba 1 incluye solo el Na^+ y Cl^- , no el Mg^{2+} y el Ca^{2+} libres. Es probable que se suponga que el contenido de 7% de NaCl en el alimento proporciona a los peces una mayor tasa de consumo de agua dulce, y aumenta una tasa de consumo ya establecida en el grupo de peces. Por ejemplo, vemos que los peces HSS del ensayo de campo 1, alimentados con la dieta de prueba 1, tienen 90.5 mmol/l en cloruro plasmático, mientras que los peces HSS alimentados con dieta de control tienen 102.8 mmol/l en cloruro plasmático. Los valores normales para el cloruro en plasma en agua dulce en peces sanos están entre 120-135 mmol/l. Esto indica que la secreción de cloruro en plasma de los peces con HSS, alimentados con la dieta de prueba 1, se amplifica, en relación con los peces con HSS alimentados con alimento de crecimiento. El cloruro en plasma en peces HSS en comparación con los peces normales, es claramente menor, lo que indica que el aumento de la excreción de Cl^- es parte del patrón patológico. Probablemente debido a esto, la actividad de la enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ se estimula mediante el suministro de iones cloruro, para los peces que obtienen una adición adicional de esto en el alimento. Los peces con HSS tienen valores de enzima ATPasa compatibles con el estado del esguín (ATPasa aproximadamente 10 o más), que se corresponden con una buena capacidad para bombear las sales fuera del cuerpo (MultiLab, 2012).

Al mismo tiempo que el pez secreta activamente las sales del cuerpo en el riñón y en las branquias, el gradiente osmótico entre el pez y el agua funciona de manera que el agua fluye hacia el pez y las sales salen del pez. La pérdida de sales a través del gradiente osmótico viene sobre los peces, incluso bombea activamente las sales. En los riñones, los peces tienen una diuresis alta para separar el exceso de agua, al mismo tiempo tienen una menor capacidad para reabsorber iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} , correspondientes a lo que hace el salmón en el agua de mar. Por lo tanto, estos iones se pierden, lo cual es una desventaja cuando el pez está en agua dulce. De ello se deduce que entra en un estado de hipocalcemia e hipomagnesemia. Esto se ilustra en los diagramas 4 y 15. Los peces con HSS (grupo de prueba y control) tienen, respectivamente, 1.04 y 1.08 mmol/l en plasma de magnesio. El valor normal para el agua dulce de la literatura es de 2 mmol/l (Jakobsen, 2013), mientras que los peces en el ensayo de campo 3 mostraron 1.44 mmol/l.

De manera similar, para el calcio plasmático, el valor de referencia de los peces sanos en el ensayo de campo 3, es de 3.8 mmol/l, mientras que los peces HSS (grupo de prueba y control) tienen respectivamente 2.42 y 2.2 mmol/l. Ca^{2+} y Mg^{2+} son parte de la capacidad del pez para llevar a cabo las contracciones musculares normales. Por otras especies, como el ganado, sabemos que la hipocalcemia/hipomagnesemia produce debilidad muscular, reducción de la frecuencia cardíaca y letargo. El suministro de calcio y magnesio por vía intravenosa puede reparar este trastorno. Al observar el cuadro clínico de los peces con HSS, puede observar el letargo como un hallazgo típico. El pez nada lentamente, y esto podría interpretarse como debilidad muscular (en los músculos del corazón y del esqueleto) debido a la hipocalcemia/hipomagnesemia. La experiencia empírica muestra que la adición de agua de mar al agua dulce, reduce o elimina este tipo de mortalidad. El agua de mar es muy rica en magnesio.

Otro hallazgo importante de autopsia en el HSS es la ascitis (líquido en la cavidad abdominal). Si el músculo cardíaco no puede realizar contracciones normales y la frecuencia cardíaca disminuye, el fluido sanguíneo se obstruye en el sistema de vasos sanguíneos. Esto puede provocar transudado en la cavidad abdominal de los peces, que vemos como ascitis. En una situación en la que los peces carecen de sales, se adaptan fisiológicamente a una vida en el agua de mar, pero en agua dulce, comenzará a beber para compensar la pérdida de sales. Esto podría aplicarse a Ca^{2+} , Mg^{2+} , así como a Na^+ o Cl^- . Lo que se suponía que era agua de mar (ya que es un esguín), es agua dulce sin sales. Esto permite que la tasa de consumo sea imparable, y gradualmente desarrolla una hipervolemia. Típicamente, una mirada a la autopsia de los peces con HSS, el edema en los músculos esqueléticos, indica un exceso de líquido en la circulación periférica. Clínicamente, puede ver peces con escamas sobresalientes, y es probable que esto se deba al edema de la cavidad de la piel/escamas, causado por la hipervolemia. Otro hallazgo importante en la autopsia de peces con el trastorno es el sangrado petequeial múltiple en las vísceras y en los músculos. Los vasos sanguíneos tienen músculos lisos que dependen de Ca^{2+} y Mg^{2+} para contraerse normalmente. La falta de estos iones, reduce la capacidad de contracción, y en una condición con hipervolemia, es probable que esto pueda conducir a la ruptura de vasos sanguíneos y hemorragias. En la trucha arco iris en el agua de mar, el daño de la función del esfínter pilórico (obstrucción) podría provocar un desequilibrio en la osmorregulación, ya que el intestino no recibe suficiente agua del estómago. Esta condición desencadena la necesidad de agua y, para evitar que se seque, comienza a beber agua de mar. Beberá en cantidades tales que cause un trastorno llamado "barriga de agua". Este es un estómago anormalmente agrandado, lleno de agua de mar. El trastorno puede tener tal alcance que los músculos abdominales se desgarran, mientras el pez aún está vivo. Este es un análogo al HSS, donde el salmón está bebiendo agua dulce para adquirir sales, hasta el punto de que crea hipervolemia, que provoca la ruptura de los vasos sanguíneos y un sangrado extenso en varios órganos. Un pez que tiene una condición de hipervolemia puede mejorar el transudado (ascitis) que se puede encontrar por HSS, aparentemente provocado por la capacidad reducida del corazón para bombear la sangre entrante.

El alimento para peces de acuerdo con la presente invención contiene Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} y Mg^{2+} , y se puede utilizar en relación con la formación del esguín, el período en el que más a menudo ocurre la HSS. El alimento para peces de acuerdo con la presente invención es para uso en un método para prevenir y tratar la condición de HSS en salmónidos. Al alimentar el alimento para peces de acuerdo con la presente invención, los peces no tienen la necesidad de beber agua dulce para reemplazar estos iones mencionados aquí, y por lo tanto no aparece la hipervolemia, sangrado, ascitis, debilidad muscular o edema de las conchas, y evitar HSS como un problema de producción. Esto se aplicará también en la producción de salmón grande en agua dulce (hasta el tamaño de la cosecha) donde la pérdida de apetito, HSS, edema de conchas y pérdida de conchas son trastornos de la producción regular.

Diferencias entre el método SuperSmolt y el alimento para peces según la presente invención

De acuerdo con el método SuperSmolt®, los moduladores de cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} se agregan al agua de operación, en combinación con Na^+ , Cl^- y triptófano libre en el alimento para peces de los salmónidos. El propósito del método SuperSmolt® es transferir los peces de salmón al agua de mar.

En contraste con el método SuperSmolt®, el alimento para peces de acuerdo con la presente invención tiene todos los moduladores de cationes en el alimento en sí, y no requiere la adición por separado de moduladores al agua de operación del pescado. El propósito del alimento para peces y el método de la presente invención es transferir los peces de salmón al agua de mar, pero también mantenerlos en la ventana del esguín para producir salmónidos grandes en agua dulce durante un largo período, y al mismo tiempo de control del desorden HSS y la no formación del esguín. El alimento para peces, el método de la formación del esguín y las áreas de aplicación son nuevos en relación con el método SuperSmolt®.

5 Además, vemos que mediante el uso de solo los moduladores Na^+ , Cl^- y triptófano en la alimentación (como es el caso de la alimentación según el método SuperSmolt®), aumentan los brotes del trastorno HSS en el salmón del Atlántico. Esto destaca que la dieta provista por el alimento SuperSmolt® no es suficiente para llevar a cabo un proceso de formación del esguín satisfactorio, sin la adición de ese método de los moduladores Ca^{2+} , Mg^{2+} en agua dulce.

Área de aplicaciones para el alimento para peces de acuerdo con la presente invención.

10 El alimento para peces de acuerdo con la presente invención se puede usar como:

1. Señal adicional para la formación del esguín en combinación con la foto manipulación tradicional en salmónidos.
2. Método para la formación del esguín en combinación con luz continua, luz natural o foto manipulación incompleta en la formación del esguín.
- 15 3. Sincronizar grupos del esguín en agua dulce.
4. Prevención de la no formación del esguín en salmónidos en agua dulce.
- 20 5. Profilaxis y tratamiento del HSS, edema de escamas y pérdida de escamas.
6. Composición de los piensos para la producción de peces de post-esguín y de tamaño de la cosecha en agua dulce, con diversas especies de salmónidos, con respecto a la prevención de la aparición de las enfermedades mencionadas en los puntos 4 y 5 anteriores, así como a un crecimiento normal, similar a lo que se ve en el agua de mar.
- 25 7. Composición del alimento para la producción de reproductores de cría en agua dulce, con varias especies de salmónidos, hasta el tamaño en que sea deseable/posible darle la señal de maduración sexual y cosechar los huevos de pescado para consumo, o para una mayor producción de pescado, y evitar la aparición de las enfermedades mencionadas en los puntos 4 y 5 anteriores, así como mantener un crecimiento normal, similar al observado en el agua de mar.
- 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un alimento para peces, que comprende proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, CARACTERIZADO PORQUE el alimento para peces comprende además Na⁺ de 3.934 - 39.340 g/kg en peso, modulador del receptor de catión polivalente (PVCR) en forma de triptófano o fenilalanina de 1-10 g/kg en peso, Mg²⁺ de 0.026 a 25.530 g/kg en peso y Ca²⁺ a partir de 0.036 - 36.110 g en peso, en donde el modulador del receptor de catión polivalente está en forma de amino libre ácidos
- 10 2. El alimento para peces según la reivindicación 1, en el que el modulador del receptor de catión polivalente es triptófano.
3. El alimento para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el Na⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ se proporcionan como sales en los rangos de 10-100 g/kg, 0.1-100 g/kg y 0.1-100 g/kg respectivamente.
- 15 4. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las sales de sodio son NaCl.
5. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las sales de magnesio son MgCl₂.
- 20 6. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las sales de calcio son CaCl₂.
7. El alimento para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el alimento para peces comprende de 6.202 - 199.020 g/kg en peso de Cl⁻.
- 25 8. El alimento para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende 6% en peso de NaCl, 0.75% en peso de CaCl₂, 0.25% en peso de MgCl₂ y 0.4% en peso de L-triptófano.
9. El alimento para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el alimento para peces es adecuado para inducir la formación del esguín y/o la prevención de la no formación del esguín en Salmónidos.
- 30 10. El alimento para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso como medicamento.
11. El alimento para peces para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el uso es en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome del esguín hemorrágico (HSS) en Salmónidos.
- 35 12. El alimento para peces para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el uso es durante un método de la formación del esguín de Salmónidos, comprendiendo el método administrar la composición en forma de un alimento para peces parr o en esguín, en ausencia de señal de foto manipulación artificial en invierno.
- 40 13. El alimento para peces para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el uso es durante un método para prevenir la no formación del esguín en Salmónidos, el método que comprende administrar la composición en forma de un alimento a una población de peces en esguín, en agua dulce.



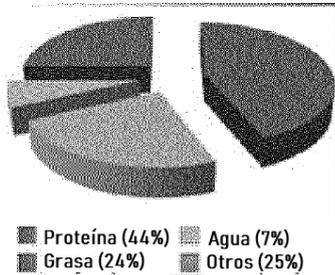
SuperSmolt Xcelerator SuperSmolt Xcelerator Plus 2.5 mm

SuperSmolt Xcelerator y SuperSmolt Xcelerator Plus es un alimento especializado. Hace parte del programa SuperSmolt, y solo se debe utilizar en este contexto, bajo la directriz de ACD Pharmaceuticals. SuperSmolt es un método de Smoltificación alternativo patentado para salmónidos.

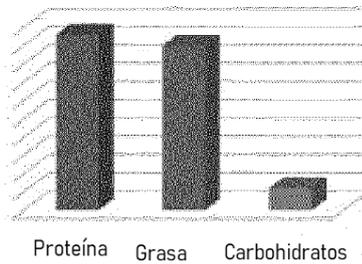
Polarfeed garantiza:

- Solo aceite de pescado como fuente de grada
- Harina de krill agregada como un potenciados de sabor extra
- Nivel de pigmento de acuerdo con los requerimientos del cliente
- No contiene GMO
- Completa trazabilidad
- Productos básicos de calidad comprobada

Composición de alimento



Energía



Fórmula nutricional

Aceite de pescado
Harina de pescado
Trigo
Gluten de trigo
Soja
Girasol
Vitaminas y minerales
Pigmento

Energía bruta MJ/kg: min 21
Proteína marina: min. 7596

| | | |
|-----------------------|--------|--------|
| Tamaño de gránulo | 2.5 mm | 3.0 mm |
| Tamaño de pescado (g) | 25-60 | 40-150 |



STORGATA 9 | PB 344 | N-8376 LEKNES | NORWAY | PHONE +47 76 06 40 69 | WWW.POLARFEED.NO

GLOBALG.A.P.
The Global Standard for Good Agricultural Practice

FIG 1 (técnica anterior)