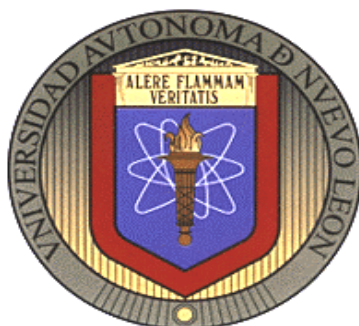


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO**



**EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE BIOMASA
PIGMENTADA (*Xanthophyllomyces dendrorhous* Y
Saccharomyces exiguus) EN DIETAS EXPERIMENTALES
PARA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) Y SU TOLERANCIA
AL ESTRÉS POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS (HAPs)**

**TESIS COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN RECURSOS ALIMENTICIOS Y
PRODUCCIÓN ACUÍCOLA PRESENTA**

BIÓL. JULIO CÉSAR CRUZ VALDEZ

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE BIOMASA PIGMENTADA
(*Xanthophyllomyces dendrorhous* Y *Saccharomyces exiguus*) EN DIETAS
EXPERIMENTALES PARA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) Y SU
TOLERANCIA AL ESTRÉS POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS (HAPs)**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS
ALIMENTICIOS Y PRODUCCIÓN ACUÍCOLA PRESENTA:**

BIÓL. JULIO CÉSAR CRUZ VALDEZ

APROBADA POR LA H. COMISIÓN DE TESIS

PRESIDENTE:



DRA. GRACIELA GARCÍA DÍAZ

SECRETARIO:



DR. CARLOS JAVIER AGUILERA GONZÁLEZ

VOCAL:



DR. DENIS RICQUE MARIE

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO**

**EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE BIOMASA PIGMENTADA
(*Xanthophyllomyces dendrorhous* Y *Saccharomyces exiguus*) EN
DIETAS EXPERIMENTALES PARA TILAPIA (*Oreochromis
niloticus*) Y SU TOLERANCIA AL ESTRÉS POR HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs)**

TESIS

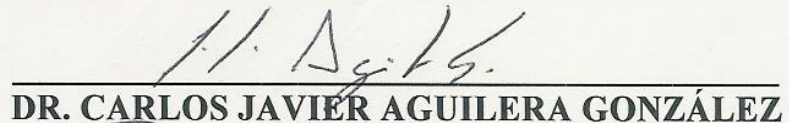
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS
ALIMENTICIOS Y PRODUCCIÓN ACUÍCOLA PRESENTA:**

BIÓL. JULIO CÉSAR CRUZ VALDEZ

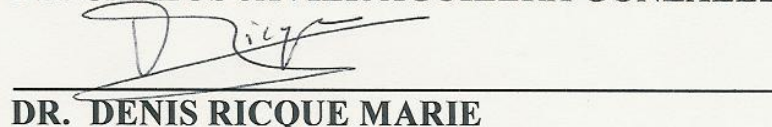
DIRECTOR:


DRA. GRACIELA GARCÍA DÍAZ

CO-DIRECTOR:


DR. CARLOS JAVIER AGUILERA GONZÁLEZ

ASESOR:


DR. DENIS RICQUE MARIE

DEDICATORIA

Especialmente a mi madre María Elva Valdez Hernández por todo tu amor, cariño y apoyo a lo largo de toda mi vida, por ser para mi un ejemplo de trabajo, coraje y valor, por ser mi maestra en la vida, por ser mi heroína favorita, por todo ese amor que me das aún cuando no lo he merecido, porque sin ti no hubiera podido llegar a la meta y este trabajo no existiría, por ser mi amiga y la mejor. Te quiero gracias mamá!

A mi padre Juan Manuel Cruz Villarreal y a mi hermana Brenda.

A Prisci, Dixi, Gina y Wawis amigas y compañeros en mi vida.

A mis abuelitos y mis tías Taty (Lucy), Cointa, Licha, Titawa (Rosalva) y Olinda que tanto me chiflaron y tanto amor que me dieron, jamás lo podré olvidar.

A mi tío Guillermo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Graciela García Díaz quien planteó el desarrollo de la tesis y siempre brindó todo su apoyo para la realización y culminación de la misma, por sus acertados consejos, e infinita paciencia.

Al Dr. Carlos Aguilera González por el inmenso apoyo incondicional que me brindó, sus acertados consejos en el escrito de la tesis y asesoría en los análisis de actividad enzimática, por facilitarnos el apoyo del laboratorio de ecofisiología.

Al Dr. Dennis Ricque Marie por sus acertados consejos en la revisión de la tesis y su apoyo durante mis estudios de postgrado.

Al Dr. Jesús Montemayor Leal por su apoyo durante el desarrollo de los experimentos.

Al M.C. Pablo San Martín del Angel por brindarme apoyo bibliográfico y su amistad.

A la Dra. Mireya Tapia Salazar por facilitarme apoyo bibliográfico.

Al Dr. Sergio Moreno Limón por su apoyo en los análisis estadísticos.

Al M.C. Antonio Leija Tristán por su amistad incondicional, por motivarme a seguir adelante siempre y aconsejarme en mi desarrollo profesional.

Al CONACyT por otorgarme una beca sin la cual no hubiese sido posible realizar mis estudios de postgrado.

A mi padre Juan Manuel Cruz Villarreal por estar siempre apoyándome durante los bioensayos.

A Olga por tanto apoyo que me brindó durante los análisis de actividad enzimática y el desarrollo de los bioensayos.

A Almendra por todo su apoyo durante los bioensayos e Israel por su ayuda en los análisis de actividad enzimática.

A Alma y Bertoldo por apoyarme en el cultivo de levaduras y liofilización de la biomasa pigmentada.

Al PAICYT por su apoyo económico para la realización del presente estudio a través del proyecto CA-380-00.

A Claudia por su amistad y apoyo en la tesis.

A Rocío Morales Rodríguez por su amistad durante la maestría, a Claudia Cobio Nagao, Raquel y Jorge por su amistad.

GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
Lista de tablas	i
Lista de figuras	iii
Lista de abreviaturas	v
Resumen	vi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	4
2.1 Inclusión de pigmentos en dietas para peces	4
2.2 Producción de biomasa pigmentada	7
2.3 Bioindicadores	9
2.4 Estudios de la actividad enzimática	10
2.5 Incorporación de pigmentos	15
3 OBJETIVO	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 HIPÓTESIS	19
5 MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Obtención de biomasa pigmentada	20
5.2 Realización de bioensayos	21
5.2.1 Dietas experimentales	21
5.2.2 Diseño experimental	23
5.2.3 Exposición a estresores HAPs	26
5.3 Evaluación de los parámetros biológicos	27
5.4 Evaluación de la actividad enzimática	28
5.4.1 Elaboración de extractos enzimáticos	28
5.4.2 Evaluación de la cinética enzimática	29
5.4.3 Determinación de la concentración de proteína en extractos enzimáticos	30

5.4.4 Actividad enzimática	30
5.5 Diseño estadístico	30
6 RESULTADOS	31
6.1 Obtención de biomasa pigmentada	31
6.2 Análisis proximal de las dietas experimentales	32
6.3 Tasa de crecimiento específico	33
6.4 Índice de longitud específico	36
6.5 Tasa de sobrevivencia	39
6.6 Efecto de los HAPs (diesel) en la actividad enzimática de acetilcolinesterasa	41
7 DISCUSIONES	45
8 CONCLUSIONES	48
9 LITERATURA CITADA	50
APÉNDICES	58
APÉNDICE A.- Análisis estadístico: tasa de crecimiento específico e índice de longitud específico	59
APÉNDICE B.- Análisis estadístico: actividad enzimática de acetilcolinesterasa	61

1 INTRODUCCIÓN

Los colores son algo presente en la vida acuática y sus diferentes manifestaciones cumplen funciones de atracción sexual, reconocimiento de especie y sistema defensivo, por mencionar algunas.

Dentro de los agentes pigmentantes naturales, se reconoce a los derivados tetrapirrólicos, benzopiranos y carotenoides, siendo estos últimos quizá la fuente más importante de color y la más ocurrente en el reino animal, sin embargo, los organismos heterótrofos no pueden sintetizarlos, pero los transforman en metabolitos activos para cumplir funciones bioquímicas tales como protección de membranas, activación de genes o pigmentación.

Dentro del grupo de los carotenoides encontramos a las xantofilas (carotenoides hidroxilados), las cuales son utilizadas por los organismos como agentes pigmentantes y en menor grado como antioxidantes o precursores de vitamina A, siendo la astaxantina la más importante para los organismos acuáticos.

La actividad de pro vitamina A de carotenoides como la astaxantina es de indudable importancia, puesto que los animales son incapaces de sintetizar vitamina A, la cual es esencial para diversos procesos fisiológicos como la visión, crecimiento, desarrollo normal de los tejidos epidérmicos y mucosa, desarrollo de resistencia a enfermedades bacterianas o fúngicas y para la reproducción; estos pigmentos también pueden afectar el

sistema endocrino influyendo así en el desarrollo y maduración gonadal, fertilización y crecimiento particularmente en peces y crustáceos.

Como ya se ha explicado, a pesar de su importancia funcional y de la abundancia de estos pigmentos en las diversas especies animales, estas no pueden sintetizarlos, por lo que deben ser adquiridos a través de la dieta.

El poder antioxidante de los carotenos, proporciona una indicación del uso potencial de los mismos para aminorar el efecto dañino de los radicales libres ocasionados por contaminación con hidrocarburos aromáticos policíclicos como el diesel; de ahí la necesidad de realizar evaluaciones de la inclusión de pigmentos en dietas para peces de importancia comercial acuícola en México.

Los sistemas homeostáticos de los peces están continuamente cambiando o son estresados por las demandas normales del medio acuático. En la naturaleza los peces pueden ser expuestos a niveles subletales de contaminantes además de fluctuaciones infavorables de la temperatura, velocidad de las corrientes de agua, concentraciones de oxígeno disuelto, disponibilidad de alimento y otras variables. Estos factores, individualmente o juntos, pueden causar un considerable estrés sobre los sistemas fisiológicos de los peces.

Los indicadores biológicos fueron definidos originalmente como medidas de fluidos corporales, células, tejidos u otras variables bióticas que indican la presencia y magnitud de una respuesta ocasionada por un estresor. Por tal motivo son una herramienta útil para evaluar o medir los efectos de diversos estresores en organismos como los peces. Los primeros estudios de la toxicología moderna se realizaron a principios de 1920

utilizándose diversos mamíferos como modelo de estudio para evaluar los efectos que podrían producir algunas drogas, plaguicidas y aditivos en los alimentos para humanos.

Los estudios de toxicología acuática en peces, hasta la actualidad han usado como modelo a peces pequeños de ornato y peces de climas templados, sin embargo, existen muy pocos estudios en peces tropicales.

En México existe una gran diversidad de peces tropicales, dentro de esta variedad se encuentra la mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus*), la cual representa un excelente modelo para estudios toxicológicos por las características que presenta, es una especie tropical con amplia distribución geográfica; habita en agua dulce y soporta altas variaciones de salinidad; posee una gran variedad de nichos ecológicos; sobrevive muy bien en condiciones de laboratorio como en naturales; es resistente a la manipulación; tiene un ciclo reproductivo alto; sobrevive en zonas muy contaminadas; tiene un alto valor proteínico; tiene una gran importancia económica y comercial en nuestro país.

Por todo lo anterior se señala la importancia de realizar estudios encausados a evaluar la producción de pigmentos con función antioxidante y su evaluación posterior en dietas para peces de importancia comercial en México.

2 ANTECEDENTES

La distribución cuantitativa y cualitativa de los carotenos en los animales acuáticos es primariamente un resultado de los hábitos dietarios de la especie, además de las características de absorción y la capacidad para transformar los metabolitos; la presencia y distribución de estos pigmentos en dichos organismos ha sido revisada por Fox (1953, 1966, 1976), Fox y Hopkins (1968), Goodwin (1951, 1952, 1960, 1971, 1968a, 1968b, 1972), Vevers (1966), Simpson *et al.* (1981) y Latscha (1990).

2.1 Inclusión de pigmentos en dietas para peces

Se ha comprobado que el costo de incluir pigmentos en la dieta es justificado por un mayor beneficio en la comercialización del producto (Cortés, 1993). En la naturaleza los peces adquieren los carotenos en cantidad y calidad suficiente a partir de su dieta natural, sin embargo, en sistemas de cultivo, el medio no provee los pigmentos en cantidades adecuadas, por lo que deben ser suplementados en las dietas artificiales para cumplir con los requerimientos adecuados (Latscha, 1990). En los salmónidos, los carotenoides se han estudiado con mayor detalle y se ha encontrado que presentan diversas funciones biológicas destacando su actividad como agente de color para el camuflaje y el cortejo de los peces reproductores (tabla 1). Su actividad como agentes amortiguadores es importante en el desarrollo de larvas y juveniles, encontrándose que tienen un efecto

sobre el sistema inmune, lo cual se ha reflejado en una mayor sobrevivencia de las especies en explotación comercial (García, 2000).

Tabla 1. Funciones biológicas de los carotenoides en salmónidos.

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS CAROTENOIDES EN LOS SALMÓNIDOS
En piel para pigmentación durante la reproducción
Agente protector en huevos (luz, temperatura, oxígeno, etc.)
Como pigmentador para camuflaje de formas juveniles
Incrementa el crecimiento de los peces
Precursor de vitamina A1 y A2 en dietas deficientes
Mantenimiento de un sistema respiratorio endógeno
Evaluándose:
Como inmunoestimulador
Factor madurador de oocistos
Agente protector de la fertilización

La disponibilidad de la astaxantina incluida en la dieta para salmón atlántico (*Salmo salar*) ha sido calculada mediante la concentración de carotenoides presentes en el plasma sanguíneo. Salmones alimentados con diferentes niveles de inclusión de astaxantina en su dieta, mostraron una alta correlación ($r = 0.90$) entre la concentración de astaxantina plasmática y la concentración de astaxantina dietaria; de la misma forma hubo una alta correlación ($r = 0.92$) entre la concentración de astaxantina plasmática y los mg de astaxantina asimilados por kg de peso corporal aumentado; igualmente hubo una alta correlación (r de 0.95) entre la concentración de astaxantina plasmática y la concentración de carotenoides en la sangre (Storebakken y Goswami, 1996).

Por otra parte, se ha evaluado el efecto de la astaxantina extraída de la langostilla (*Pleuroncodes planipes*) en el desarrollo y pigmentación de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Para esto se utilizó un extracto lipídico de langostilla, el cual fue adicionado en la dieta a razón de 75 mg/kg de pigmento y comparado con un testigo sin pigmento. Los resultados no mostraron efecto del carotenoide sobre el desarrollo de los organismos, a pesar del bajo contenido de astaxantina libre en la dieta (8 %), sin embargo, los peces presentaron una buena concentración de astaxantina en el músculo (3.60 ± 0.78 mg/kg) y coloración roja ($H^{\circ}_{ab} = 44.13 \pm 2.36$). Estos parámetros mostraron una alta correlación ($r = 0.98$) (Coral *et al.*, 1997).

La tasa de depositación de xantofilas suministradas en el alimento puede variar desde un 5 a un 20 %. La variación en este valor depende de factores como las diferencias en los tejidos. En el músculo de los salmónidos la astaxantina representa del 80 al 100 % de los carotenoides, siendo la tasa de fijación más alta en comparación con la piel en donde la astaxantina es sólo del 5 al 10 % del total de carotenos. Las diferencias

genéticas entre especies de salmones modifican la concentración de astaxantina encontrada en el músculo y el ciclo de vida también afecta el nivel de astaxantinas asimiladas. De esta forma, durante la fase de maduración sexual de los salmones, la astaxantina depositada en músculo presenta concentraciones de 12-14 ppm, mientras que durante la fase de crecimiento previa a la migración se encuentra en valores menores a 2 ppm. La cantidad de grasa en la dieta y la calidad de la misma tienen un efecto importante en la fijación de pigmento en los peces, cantidades entre 20 y 30 % de grasas en el alimento resultan más adecuadas para estimular este proceso; además no todas las astaxantinas son biodisponibles y estables a los procesos de fabricación de alimentos en acuicultura (Cortés, 1993). El periodo de suplementación del pigmento en la dieta también causa variación en los niveles de asimilación, así tenemos que diferentes tiempos de suplementación de astaxantinas en la dieta de salmón coho *Oncorhynchus kisutch*, generaron diferencias significativas en el nivel de pigmentación de la carne (Muñoz, *et al.*, 2000).

2.2 Producción de biomasa pigmentada

Recientemente se ha encontrado que es preferible utilizar astaxantinas obtenidas de fuentes naturales, principalmente de microorganismos, siendo la levadura (*Phaffia rhodozyma*) uno de los pocos que pueden llevar a cabo la biosíntesis de astaxantina. Esta levadura fue aislada de exudados de árboles en Japón y Alaska (Miller *et al.*, 1976; Johnson y Lewis, 1979; Calo *et al.*, 1995). El ciclo biosintético del pigmento fue sugerido por primera vez por Andrewes *et al.* (1976) y posteriormente por Johnson (1992). Lo anterior ha generado una serie de estudios encaminados a establecer la producción masiva

a partir de la levadura *Phaffia rhodozyma*. La detección espectrofotométrica (474 nm) reveló variaciones en el contenido de pigmento en las diferentes cepas mutantes y el análisis realizado mediante cromatografía líquida de alta resolución, mostró que las cepas mutantes hiperpigmentadas tuvieron contenidos más altos de β -carotenos y un incremento considerable en el contenido de astaxantina (232 %) en comparación con la cepa silvestre (Calo *et al.*, 1995).

Otros estudios se han realizado para encontrar fuentes de carbono menos caras y más efectivas para la producción de pigmentos. Yamane *et al.* (1997) diseñaron un sistema de cultivo de dos etapas en el cual el crecimiento celular fue optimizado mediante un medio de glucosa y se mejoró la producción de astaxantina mediante la suplementación de un substrato seleccionado de etanol. Estos autores también estudiaron la influencia del oxígeno y la glucosa sobre el metabolismo primario (fermentación, respiración y anabolismo) y la producción de astaxantina en *P. rhodozyma*. En los análisis observaron que la tasa de respiración está positivamente correlacionada con la tasa de producción de astaxantina, por lo que para analizar el efecto de la glucosa utilizaron un medio con alta concentración de oxígeno y mediante análisis cinético y estequiométrico, pudieron desarrollar un sistema de cultivo basado en dos etapas. En la primera etapa fue posible mejorar el crecimiento celular mediante una baja tasa de carbono/nitrógeno, mientras que en la segunda etapa se mejoró la producción de astaxantina por una baja tasa de carbono/nitrógeno, siendo 16.0 mg/L la más alta producción de astaxantina mediante este sistema.

2.3 Bioindicadores

Diversos estudios han demostrado que algunas variables bioquímicas tales como la concentración de serocortisol o glucosa pueden cambiar en segundos o minutos en respuesta al estímulo de un estresor, sin embargo, la respuesta en las poblaciones o comunidades puede no ser evidente en años o se presenta después de varias generaciones, por lo que resulta evidente que los indicadores bioquímicos tienen una relevancia toxicológica alta (Marshall, 1990).

Algunos cambios bioquímicos específicos asociados con efectos patológicos causados por un determinado estresor han mostrado ser índices biológicos potenciales. Por ejemplo una disminución marcada del ácido ascórbico hepático ha sido observada en el pez gato *Ictalurus punctatus* expuestos a un hidrocarburo clorinado (Mayer *et al.*, 1978) y en peces colectados en aguas contaminadas con aceite (Neff and Haensley, 1982); la inhibición de la actividad de eritrocito δ -amino levulinico ácido dehidratasa es una respuesta específica a la exposición con plomo (Hodson *et al.*, 1984; Thomas y Wofford, 1984), mientras que los pesticidas órgano fosforados inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa (Neff, 1985). En diversos tejidos de peces expuestos a xenobióticos se han encontrado variaciones en la concentración de ácido ascórbico, glutation y otros antioxidantes (Thomas *et al.*, 1987).

Las lesiones en hígado analizadas en tres especies de pez lagarto (*Lepisosteus osseus*, *L. oculatus* y *L. platostomus*) en áreas contaminadas del Río Mississippi, registraron abundante melanización y centros de macrófagos, pancreatitis y proliferaciones ductales en el páncreas exócrino. Otras lesiones observadas fueron parasitismo, inflamación y necrosis multifocal. El análisis pigmentario de los centros de

melanomacrófagos (MMC) en *L. oculatus* indicaron un incremento en los niveles de hierro hepatocelular y los grandes MMC pudieron ser debidos a cuerpos cargados de contaminantes (Hartley *et al.*, 1996).

Algunos contaminantes químicos y pesticidas órgano fosforados pueden afectar la actividad de esterasas (Olson y Christensen, 1980; Devi y Fingerman, 1995; Labrot *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997).

Tres especies de peces estuarinos (*Platichthys flesus*, *Pomatoschistus minutus* y *Zoarces viviparus*), capturados de cuatro estuarios británicos (the Tyne, Tees, Mersey y Alde) impactados por diferentes contaminantes incluyendo HAPs, fueron sometidos a un análisis histopatológico. Lesiones inflamatorias e inclusiones fibrilares hepatocelulares fueron predominantes en *P. flesus* capturados en the Tyne, Tees y Mersey. La presencia de lesiones toxipatológicas pre-neoplásticas y neoplásticas fue mayor en *P. flesus* en comparación con los peces colectados en Alde. La predominancia de alteraciones celulares hepáticas (43.3 %) y adenomas hepatocelulares (10 %) fue mayor en *P. flesus* colectados en el estuario Mersey. Intersex (ovotestis) se observó solamente en machos *P. flesus* del estuario Mersey (8.3 %) y en machos *Z. viviparus* del estuario the Tyne (25 %). Patologías asociadas con riñón y branquias fueron más comunes en peces de los estuarios the Tyne, Tees y Mersey (Stentiford *et al.*, 2003).

2.4 Estudios de la actividad enzimática

Un ensayo para carbamil fosfato sintetasa en hígado de peces dulceacuícolas primitivos *Scaphirhynchus platyrhynchus*, *Polyodon spathula*, *Lepisosteus platostomus* y

Amia calva mostró la presencia de esta enzima en todas las especies examinadas en un rango de 0.008 ± 0.002 (*P. spathula*) a 0.029 ± 0.008 (*L. platostomus*) (Cvancara, 1974).

Un estudio de la variación de esterasas de suero en poblaciones del pez lagarto (*Lepisosteus osseus*) muestreados en Carolina del Norte y Carolina del Sur, mostró que las poblaciones de Carolina del Norte son monomórficas con respecto a la actividad de esterasas en suero y todas las poblaciones de Carolina del Sur demostraron ser polimórficas; cada individuo poseía uno de dos perfiles fenotípicos (Frankel, 1982).

Las respuestas de algunas enzimas que metabolizan xenobióticos en peces han mostrado su uso potencial como bioindicadores para monitorear niveles inaceptables de contaminantes ambientales. Ethoxiresorufin O-deethylasa, un citocromo específico monooxigenasa P₄₅₀-dependiente, es utilizado como bioindicador de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (Payne *et al.*, 1987). Otra clase de enzimas potenciales para utilizarse como bioindicadores son las esterasas (Labrot *et al.*, 1996). Estas enzimas son sensibles a la inhibición por organofosforados e incluyen a las colinesterasas (ChE) y carboxilesterasas. Adicionalmente las ChEs son subdivididas en acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. La inhibición de la actividad de colinesterasas ha sido asociada con la exposición a insecticidas organofosforados, carbamatos y otros xenobióticos neurotóxicos (Habig y Di Giulio, 1991). Las carboxilesterasas representan un grupo heterogéneo de isoenzimas que pueden catalizar la hidrólisis de un amplio rango de ésteres xenobióticos, amidas y tioésteres (Huang *et al.*, 1996).

En un estudio para evaluar la actividad de esterasas en hígado y cerebro del pez lagarto (*Lepisosteus oculatus*) como bioindicadores de contaminantes múltiples en la región baja del río Mississippi, se observó una disminución significativa de la actividad

enzimática de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en zonas contaminadas con hidrocarburos clorinados tales como hexaclorobenzeno, hexaclorobutadieno y metales pesados (Huang *et al.*, 1997).

Un estudio comparativo de actividad específica e inhibición *in vitro* de acetilcolinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7) en suero y cerebro y butirilcolinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8) en suero por un pesticida organofosforado (DDVP) fue conducido en 11 especies de peces teleósteos pertenecientes a cuatro familias (Cyprinidae: *Cyprinus carpio*, *Abramis brama*, *A. ballerus*, *Blicca bjoerkna*, *Rutilus rutilus*, *Alburnus alburnus*, *Leuciscus idus*; Percidae: *Perca fluviatilis*, *Stizostedion lucioperca*; Esocidae: *Esox lucius* y Coregonidae: *Coregonus albula*). La actividad de AChE en cerebro varió entre las especies de peces, en un rango de 192.6 a 1353.2 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$, en *P. fluviatilis* y *C. albula* respectivamente. Los ciprinidos tuvieron una mayor actividad de AChE en cerebro en comparación con las otras familias de peces. La actividad de AChE en suero fue menor que en cerebro. Solamente los ciprinidos con excepción de *C. carpio* presentaron actividad de BChE en suero, con una variación de 163.8 a 970.3 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ en *R. rutilus* y *A. alburnus* respectivamente. Se calcularon las constantes de la tasa de inhibición enzimática bimolecular (k_{IIS}) y pI_{50} para DDVP. La sensibilidad de AChEs en cerebro y suero de peces fue similar a la sensibilidad reportada en mamíferos. El rango de k_{IIS} fue $3.4\text{-}51.7 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ l min}^{-1}$ (pI_{50} s fueron 5.3-6.5) en *B. bjoerkna* y *L. idus* respectivamente. En contraste, BChE en suero fue más sensible a la inhibición que los valores de sensibilidad de BChE y AChE reportados en mamíferos. Los valores de k_{II} para BChE fueron $1.0\text{-}2.5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ l min}^{-1}$ (pI_{50} s fueron 8.8-9.2) en *L. idus* y *A. alburnus* respectivamente (Chuiko, 2000).

La trucha café *Salmo trutta* expuesta a metales pesados (principalmente Cd y Zn) por al menos 2 años en el Río Eagle, Colorado, fue sometida a un análisis de volumen de hígado, actividad de la enzima promotora del crecimiento ornitina decarboxilasa (ODC) y una comparación con truchas que habitan en un sitio no contaminado. El índice hepatosomático (LSI) fue más alto en truchas de sitios no contaminados siendo el LSI en las hembras significativamente más alto que en los machos; el LSI de las hembras de sitios no contaminados fue más alto que el de las hembras de sitios contaminados, pero los machos no presentaron diferencias estadísticas. La actividad de ODC en hígado de machos y hembras fue menor en el sitio contaminado, sin embargo, machos y hembras no difirieron en la actividad de ODC. Los resultados sugirieron que la exposición crónica a metales pesados puede tener importantes implicaciones en el crecimiento, reproducción y posiblemente la supervivencia; la actividad de ODC en hígado puede servir como un potencial bioindicador cuando se este evaluando la toxicidad crónica de metales en poblaciones de peces reproductores naturales (Norris *et al.*, 2000).

Las actividades enzimáticas de catalasa (EC 1.11.1.6), glutathion-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18) y el nivel de malondialdeído (MDA) en hígado de *Oreochromis niloticus* expuestos a 2,4-D y azinfosmetil individualmente y en combinación no fueron afectados por la exposición a los pesticidas. Sin embargo, las actividades de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PD, EC 1.1.1.49) y glutathion reductasa (GR, EC 1.6.4.2) se incrementaron significativamente en los tratamientos individuales y combinados. Adicionalmente, la actividad de peroxidasa glutathion (GPx, EC 1.11.1.9) se incrementó en los tratamientos individuales, mientras que decreció en la combinación. 2,4-D no afectó la actividad de superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), pero hubo un

decremento en el tratamiento con azinfosmetil y la actividad se incrementó en el tratamiento combinado. El tratamiento combinado de los pesticidas ejerció un efecto sinérgico en la actividad de SOD y tubo un efecto antagonístico en actividades de G6PD, GPx y GR. Estos resultados demostraron que *O. niloticus* resiste el estrés oxidativo a través de mecanismos antioxidantes e impidiendo incrementos en la peroxidación de lípidos (Oruç y Üner, 2000).

Se realizó una evaluación del ensayo de retención lisosomal rojo neutral (NRR) en hemocitos y la actividad de colinesterasas (AChE) en hemolinfa, glándula digestiva, branquias y el complejo gónada/manto en mejillones *Mytilus galloprovincialis* colectados en los golfos de Thermaikos y Strymonikos al norte de Grecia, de acuerdo a los resultados obtenidos es necesario realizar más estudios de estos índices de estrés para validar pruebas de monitoreo (Dailianis *et al.*, 2003).

La actividad de colinesterasas en fracciones subcelulares en varios tejidos de mejillón *Mytilus edulis* se evaluó mediante un estudio comparativo de sustratos alternativos de alkylthiocholina e inhibidores competitivos. Se observó que existe un tipo simple de enzima colinesterasa en esta fracción. La inhibición de la hidrólisis de alkylcholina por BW284C51 específico a acetilcolinesterasa en vertebrados, mostró que la actividad de colinesterasas en la fracción “microsomal” de branquias es inhibida por este compuesto, pero a una menor amplitud en comparación con los vertebrados. La inhibición de la actividad de colinesterasas por azamethiphos en la fracción “microsomal” de branquias mostró un valor de IC₅₀ de aproximadamente 100 µM y una dependencia a la concentración. Sin embargo, estos valores indican una baja potencia en

comparación a otros animales y es discutible si la actividad de colinesterasas en mejillón tenga potencial como bioindicador de exposición en el campo (Brown, 2004).

Rodríguez y Gold (2004) caracterizaron la actividad de colinesterasas (ChE) en diferentes tejidos de la mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus*) usando tres sustratos, acetiltiocolina iodada, propioniltiocolina iodada y butiriltiocolina iodada. Se utilizó eserina como un inhibidor total de ChE; BW284c51 e iso-OMPA fueron usados como inhibidores selectivos para acetilcolinesterasas (AChE) y butirilcolinesterasas (BuChE) respectivamente. Los resultados indicaron que la enzima AChE está presente en cerebro, mientras que en hígado y músculo se sugiere la presencia de ChEs atípicas.

Se han analizado las características cinéticas de acetilcolinesterasa cruda y purificada y su resistencia a la inhibición por organofosfatos en tres especies de agua dulce (*Pseudorasbora parva*, *Carassius auratus auratus* y *Oncorhynchus mykiss*). La enzima cruda extraída del cerebro de la trucha *O. mykiss* mostró diferencias en actividad específica, curva cinética, V_{max} y sensibilidad a la inhibición por malatión oxidado y triazopos en comparación con los dos ciprínidos. Las enzimas purificadas de las tres especies no mostraron diferencias significativas en ningún aspecto (Shaonan *et al.*, 2004).

2.5 Incorporación de pigmentos

Se evaluaron los efectos de vitamina E suplementaria (200, 400 y 600 mg/kg de alimento) sobre la peroxidación de lípidos (LPX) y el sistema de defensa antioxidante en branquias y hepatopáncreas de *Macrobrachium rosenbergii*. Se observó que la vitamina E inhibió la LPX en hepatopáncreas en una dosis comparativamente más baja que en branquias; la actividad de superóxido dismutasa (SOD) decreció significativamente en

branquias en respuesta a las tres dietas suplementadas, pero en hepatopáncreas esta disminución solo se observó en las dosis altas de vitamina E (400 y 600 mg/kg); la actividad de catalasa (CAT) se redujo significativamente solo en branquias; la actividad de glutatión peroxidasa (GPX) se elevó significativamente en hepatopáncreas y permaneció inalterada en branquias; contrariamente, la actividad de glutatión reductasa (GR) decreció en branquias pero fue constante en hepatopáncreas; el contenido de glutatión (GSH) fue sustancialmente elevado en branquias y hepatopáncreas de los organismos sometidos a las dietas con vitamina E; el contenido de ácido ascórbico (ASA) en branquias no fue alterado por la vitamina E, pero la cantidad se elevó significativamente en hepatopáncreas. Los resultados sugirieron que la vitamina E es capaz de reducir el nivel de LPX y puede modular sistemas de defensa antioxidantes en branquias y hepatopáncreas, sin embargo, la respuesta es altamente específica a tejidos (Dandapat *et al.*, 2000).

Estudios preliminares sobre las características químicas y físicas de los principios de absorción de astaxantina en escamas de peces, han mostrado el desarrollo de superficies altamente desarrolladas en escamas con una distintiva formación esclerosa donde se estuvo aplicando una suspensión de agua de desecho conteniendo astaxantina, lo cual se cree es un primer paso o estado para la retención de pigmento en este material. Adicionalmente, se ha estudiado la extracción de la fracción pigmentada de las escamas usando diversos solventes como eluentes y la influencia del pH y fuerzas iónicas en los procesos de extracción. Los resultados obtenidos han mostrado que los procesos de absorción de astaxantina en las escamas incluyen más de un mecanismo de enlace (Stepnowski *et al.*, 2004).

La levadura roja (*Xanthophyllomyces dendrorhous*, anteriormente *Phaffia rhodozyma*) fue sometida a tres grados de ruptura enzimática de pared celular y fue incluida en dietas experimentales extruidas a 102 y 137 °C para evaluar sus efectos en la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*. Las truchas doblaron su peso durante el experimento y la tasa de conversión alimenticia fluctuó de 0.8 a 0.9 kg de consumo por kg de ganancia. El incremento del grado de ruptura enzimática de la pared celular incrementó las concentraciones de astaxantina en músculo de 2.2 a 6.7 mg/kg, la CIE valor a* (color rojo) de 5.5 a 10.7 y valor b* (color amarillo) de 11.7 a 16.7, Roche SalmoFan® valores de 22.6 a 28.6 y retenciones de astaxantina en músculo de 3.7 % a 17.4 %. La temperatura de extrusión no afectó significativamente la asimilación de la astaxantina dietaria o el color del músculo, pero la ruptura de la pared celular de las levaduras es crucial para optimizar la asimilación de carotenoides (Storebakken *et al.*, 2004).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la inclusión de biomasa pigmentada (*Xanthophyllomyces dendrorhous* y *Saccharomyces exiguus*) en una dieta experimental sobre la tolerancia al estrés por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en tilapia (*Oreochromis niloticus*).

3.2 Objetivos específicos

1. Obtener biomasa pigmentada (carotenoides) a partir de un cultivo mixto de levaduras (*X. dendrorhous* y *S. exiguus*).
2. Elaborar dietas experimentales con inclusión de biomasa pigmentada.
3. Determinar el efecto de una dieta experimental con biomasa pigmentada de *X. dendrorhous* y *S. exiguus* en el crecimiento y sobrevivencia de tilapia (*O. niloticus*).
4. Determinar el efecto de una dieta experimental con biomasa pigmentada de *X. dendrorhous* y *S. exiguus* en la actividad de acetilcolinesterasa en hígado de tilapia como respuesta al estrés causado por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

4 HIPÓTESIS

Si los carotenoides producen una mejor respuesta fisiológica a estresores, entonces su inclusión en la dieta producirá una mejor respuesta en peces cultivados en zonas con bajas concentraciones de HAPs.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de biomasa pigmentada

Para la producción de biomasa se utilizó una muestra de biomasa pigmentada de color rojo obtenida a partir del proyecto CA – 380 – 00. Las levaduras se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio de cultivo MM-LRM-ETOH (García, 2000). Los cultivos se mantuvieron a 22 °C hasta alcanzar un volumen de 250 ml en cada matraz, la biomasa producida se almacenó en refrigeración a 4 °C para posteriormente ser liofilizada, se registró el peso de biomasa producida por matraz y nuevamente se almacenó a 4 °C (figura 1).

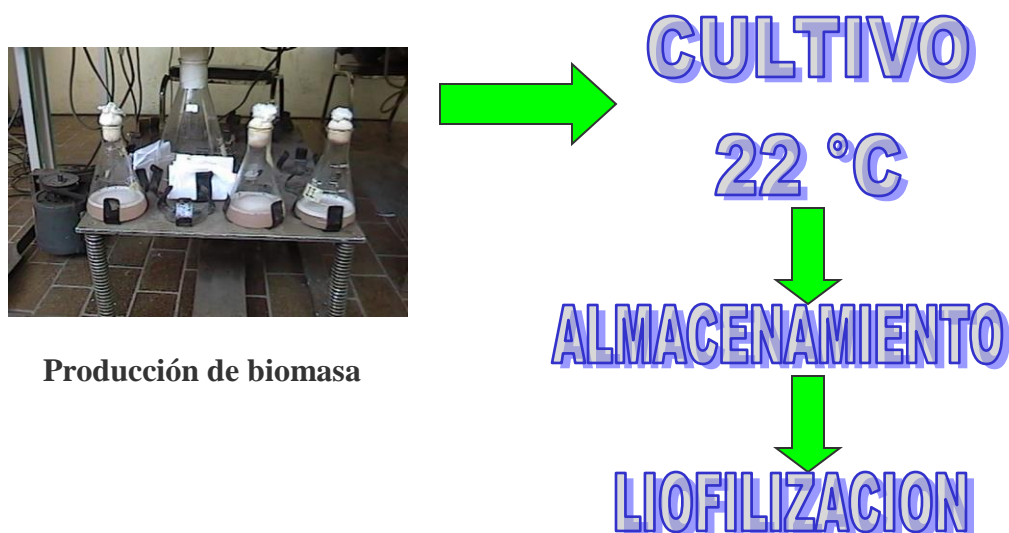


Figura 1. Producción de biomasa pigmentada a partir de un cultivo mixto de *Xanthophyllomyces dendrorhous* y *Saccharomyces exiguus*.

5.2 Realización de bioensayos

Para evaluar el efecto de la biomasa pigmentada en el crecimiento y la respuesta fisiológica a estresores HAPs (diesel) mediante la determinación de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) en hígado de peces (*Oreochromis niloticus*), se realizó un bioensayo (B1) en el cual se prepararon dos dietas experimentales y se distribuyeron en cuatro tratamientos. Posteriormente, se realizó un segundo bioensayo (B2*) en el cual se adicionó una dieta experimental delipidada para eliminar pigmentos de los ingredientes.

5.2.1 Dietas experimentales

Para evaluar los efectos de la inclusión de biomasa pigmentada en alimento para peces, se elaboraron tres dietas experimentales a partir de un alimento comercial.

El alimento comercial seleccionado fue como sigue:

Marca: Wardley.

Nombre: Cichlid TEN total essential nutrition.

Presentación: Pellets flotantes (figura 2).



Figura 2. Alimento comercial para cichlidos marca Wardley en presentación de pellets.

La dieta 1 (D1) consistió en el alimento comercial.

La dieta 2 (D2) se elaboró suplementando el alimento comercial con biomasa

pigmentada al 1 % de concentración. Para lo anterior la biomasa liofilizada se incluyó

mediante un aspersor manual utilizándose aceite de maíz como vehículo y se realizó la

aspersión de forma directa en el alimento (figura 3).

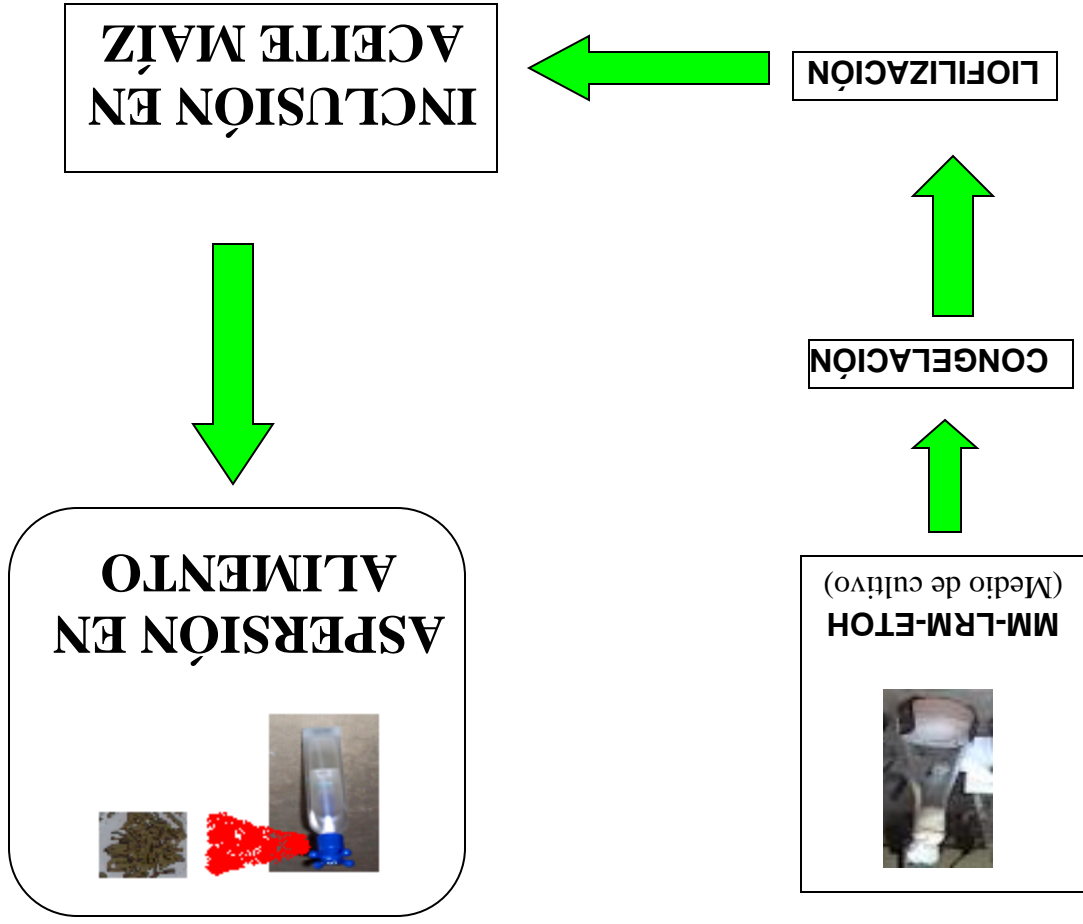


Figura 3. Diagrama de flujo mostrando el proceso de inclusión de biomasa pigmentada en un alimento para peces.

La dieta 3 (D3) se elaboró sometiendo el alimento comercial a un proceso de delipidación para eliminar los pigmentos mediante el método de Bligh and Dyer (1959) como se muestra en la figura 4 (página 24). De esta forma se dispuso de una dieta experimental sin pigmentos.

Una vez elaboradas las 3 dietas, se determinó en cada una de ellas la composición química proximal mediante los métodos propuestos por la A.O.A.C. (1990).

5.2.2 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en un sistema en bloques completamente al azar con dos factores a evaluar, la biomasa pigmentada y los HAPs (diesel). En B1 los factores fueron distribuidos en cuatro tratamientos con tres replicados, cada replicado consistió en un acuario con cuatro peces; en B2* se realizaron los mismos tratamientos más dos adicionales y se realizaron cuatro replicados por tratamiento con siete peces en cada repetición como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución de los tratamientos en un sistema de bloques completamente al azar en los bioensayos B1 y B2.

Factor 1 Dietas	Factor 2 HAPs	Bioensayo	Tratamiento
D1 (sin biomasa pigmentada)	Diesel	B1 y B2	D1D
	Aceite de maíz	B1 y B2	D1A
D2 (con biomasa pigmentada)	Diesel	B1 y B2	D2D
	Aceite de maíz	B1 y B2	D2A
D3* (Delipidada)	Diesel	B2	D3D*
	Aceite de maíz	B2	D3A*

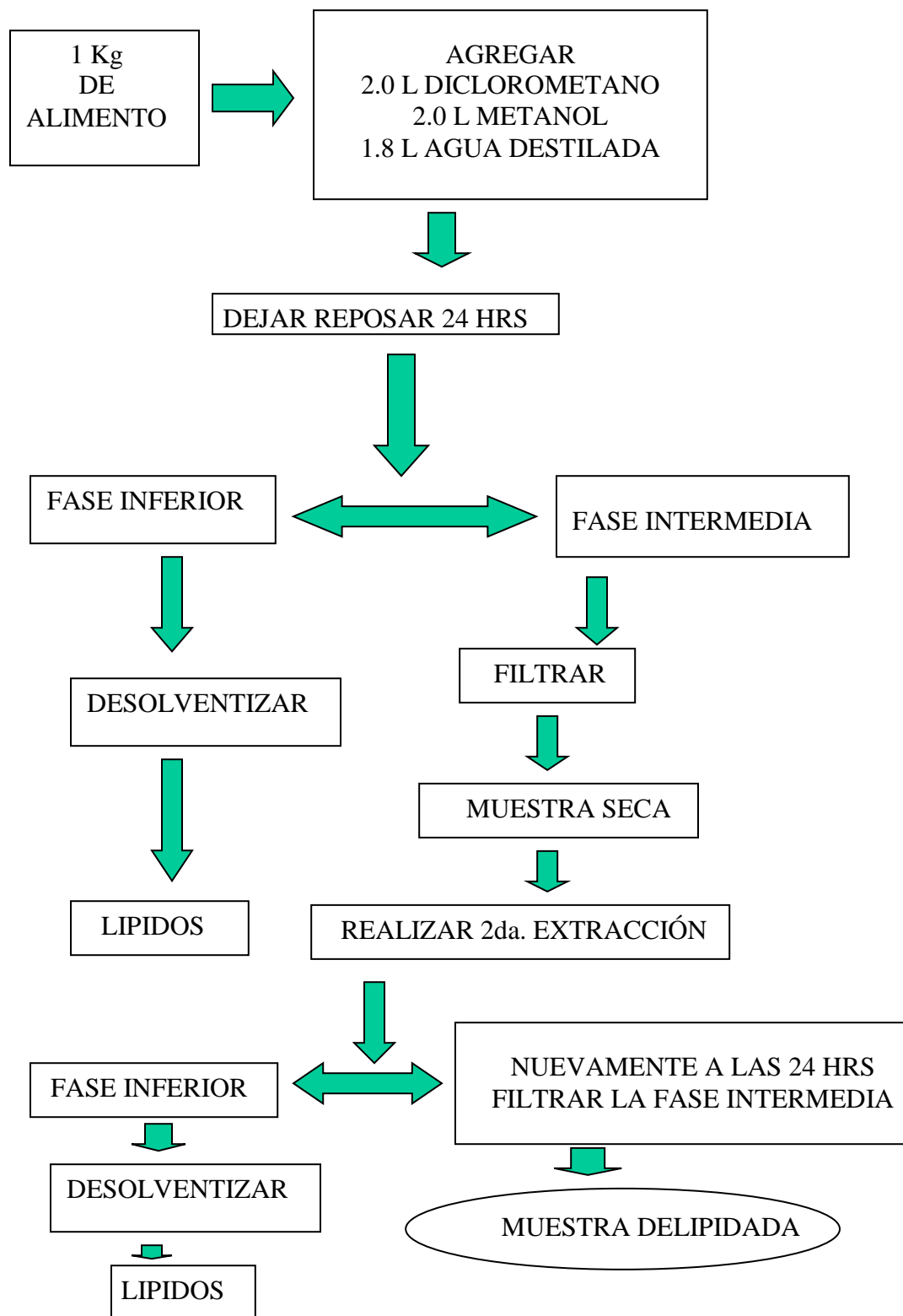


Figura 4. Proceso de delipidación mediante el método Bligh and Dyer (1959).

Los tratamientos y sus replicados se distribuyeron de forma aleatoria en cuatro canaletas de 500 litros divididas en varias secciones (acuarios) con recirculación de agua (figura 5). Los peces fueron pesados en una balanza OHAUS (de 0.001 g de sensibilidad) y se utilizó un vernier para registrar su longitud antes de iniciar los bioensayos (figura 6); posteriormente, se colocaron en cada uno de los acuarios de acuerdo al diseño experimental comprobando que las medias del peso de los peces fueran homogéneas en todos los acuarios mediante un análisis de varianza para partir de una distribución. Los peces de cada acuario fueron alimentados diariamente al 4 % de su biomasa con las dietas experimentales de acuerdo al tratamiento correspondiente.

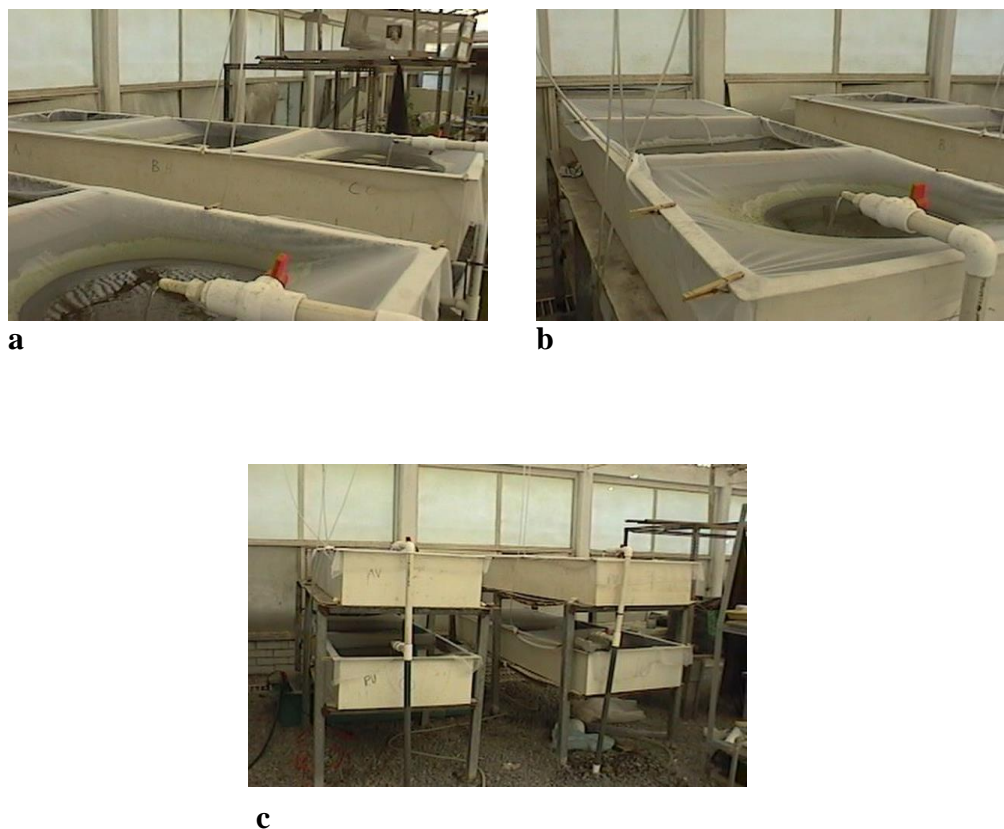


Figura 5. Canaletas de 500 litros con recirculación de agua donde se efectuaron los bioensayos (cuadros a, b y c).

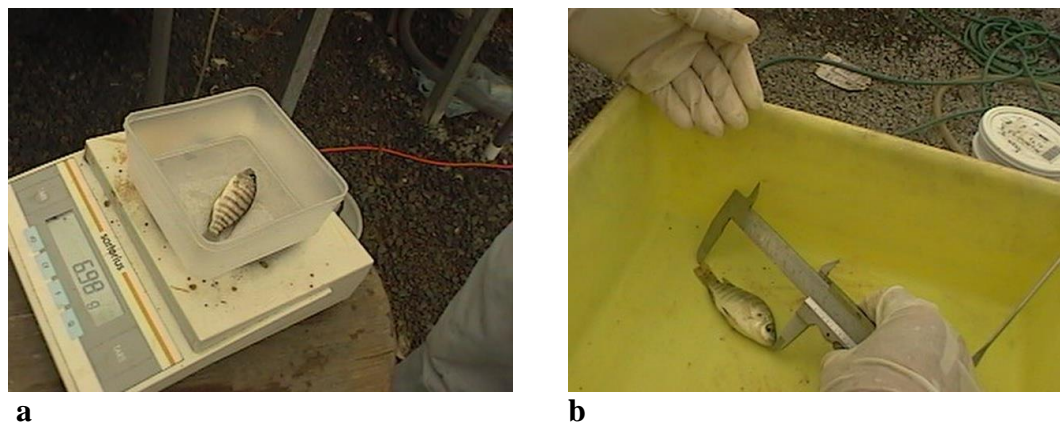


Figura 6. Medición de los parámetros biológicos de peso gr (cuadro a) y longitud cm (cuadro b).

5.2.3 Exposición a estresores HAPs

Se evaluó el efecto de la exposición de los peces a los HAPs (Diesel) y en el segundo tratamiento (grupo control) al aceite de maíz el cual ha mostrado un efecto inocuo en peces. Después de un período de alimentación de 28 días, fueron expuestos a los HAPs o al aceite de maíz mediante una inyección intraperitoneal a una dosis de 20 mg / 1000 gr de peso (figura 7). Se mantuvieron durante un lapso de 24 horas en B1 y 96 horas en B2; una vez finalizado el tiempo de desafío, se procedió a registrar el peso y la longitud de los peces, para luego ser sacrificados y posteriormente obtener el hígado mediante una disección precisa (figura 7); las muestras obtenidas se colocaron en tubos eppendorf etiquetados e inmediatamente se almacenaron en nitrógeno líquido para su análisis posterior.

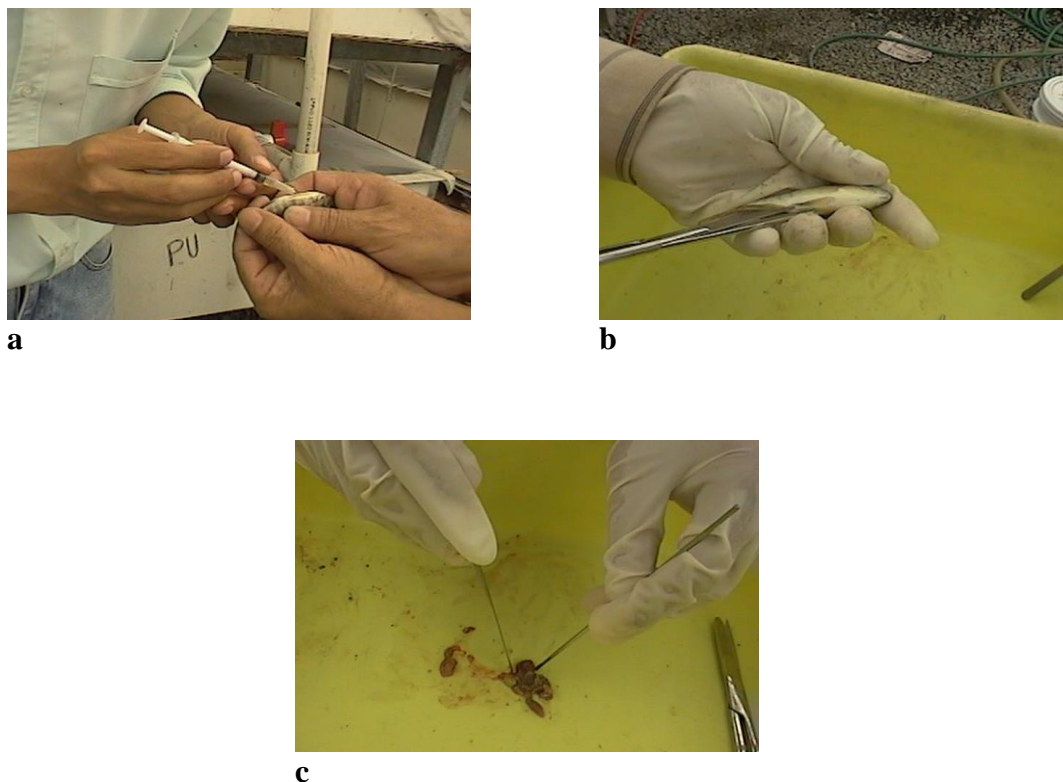


Figura 7. En el cuadro a se observa la técnica de inyección intraperitoneal y en los cuadros b y c se observa el método de disección y la separación del hígado de los peces.

5.3 Evaluación de los parámetros biológicos

Al inicio y al final de ambos bioensayos los peces fueron contabilizados; se pesaron y se registró su longitud antero-posterior. Se determinó la tasa de crecimiento específico (TCE) de la siguiente forma $TCE = ((\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{Número días del experimento}) \times 100$; el índice de longitud específico (ILE) se calculó como $ILE = ((\text{longitud final} - \text{longitud inicial}) / \text{número días del experimento}) \times 100$ y la tasa de sobrevivencia (TS) fue como sigue $TS = (\text{número final de peces} / \text{número inicial de peces}) \times 100$.

5.4 Evaluación de la actividad enzimática

5.4.1 Elaboración de extractos enzimáticos

Para la obtención de los extractos enzimáticos, se utilizaron las muestras individuales de hígado almacenadas en nitrógeno líquido y se pesaron en una balanza digital para determinar el peso de la muestra; posteriormente, los hígados se homogenizaron durante un minuto en buffer *tris*-HCl 50 mM (pH 7.1) en una proporción de 1:10 (peso/volumen); los homogenizados se colocaron en tubos eppendorf y se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C y 10,000 rpm, se separó el sobrenadante para ser utilizado como extracto enzimático (figura 8).

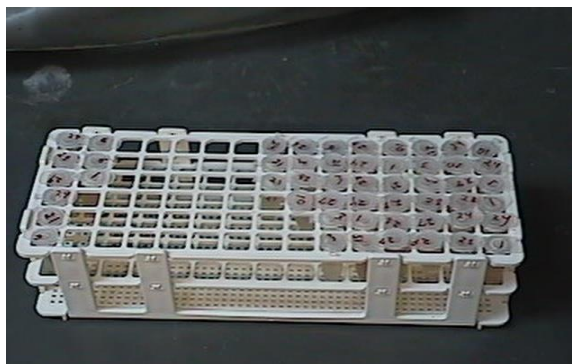


Figura 8. Extractos enzimáticos utilizados para realizar las lecturas de actividad enzimática de acetilcolinesterasa.

5.4.2 Evaluación de la cinética enzimática

La cinética enzimática se determinó calculando la variación de la absorbancia durante el tiempo de reacción de la acetilcolinesterasa mediante una lectura espectrofotométrica en microplacas; para esto se realizó un ensayo en el cual se colocó en cada pozo 10 μL de extracto enzimático, 200 μL de buffer *tris*-HCl 50 mM (pH 7.1) y se agregaron 100 μL de p-nitrofenilacetato 2 mM como sustrato para iniciar la reacción (figura 9); para cada extracto enzimático se realizaron tres replicados, inmediatamente después se realizó la lectura de absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas modelo Sunset.

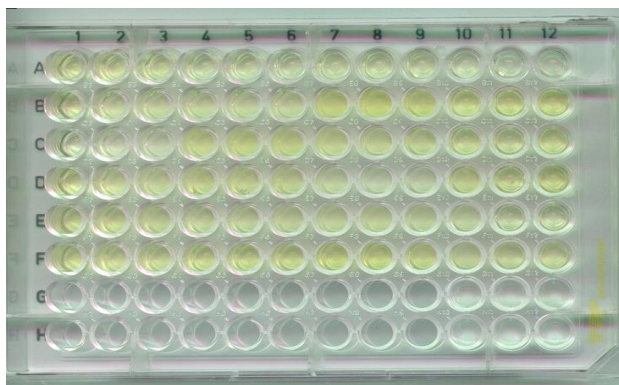


Figura 9. Microplacas donde se realizaron las lecturas espectrofotométricas de los extractos enzimáticos para determinar su cinética enzimática.

5.4.3 Determinación de la concentración de proteína en extractos enzimáticos

Para determinar la concentración de proteína se utilizó una modificación del método de Bradford (1976) adaptado para su uso en microplacas, para lo cual se elaboró un ensayo colocando 10 μL de extracto enzimático y 200 μL de solución de trabajo Bradford en cada pozo con un total de tres repeticiones para cada muestra; posteriormente, se realizó una lectura espectrofotométrica de las microplacas a 620 nm durante 60 segundos en agitación. Se utilizó suero de albúmina bovina como proteína estándar.

5.4.4 Actividad enzimática

La actividad enzimática fue calculada como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína en los extractos.

5.5 Diseño estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA one-way) y la prueba de comparación múltiple de medias de Scheffe entre los tratamientos para evaluar el efecto de las dietas experimentales en la tasa de crecimiento específico y el índice de longitud específico a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Para determinar el efecto de las dietas experimentales y de la exposición a los HAPs (Diesel) en la actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) en el hígado de los peces, se calcularon los niveles de significancia estadística utilizando un análisis de varianza (ANOVA one-way) entre los tratamientos y la prueba de comparación múltiple de medias de Scheffe a un nivel de significancia de $P < 0.05$; los análisis estadísticos correspondientes se realizaron mediante el programa SPSS versión 9.0.

6 RESULTADOS

6.1 Obtención de biomasa pigmentada

La biomasa pigmentada de *Xanthophyllomyces dendrorhous* y *Saccharomyces exiguus* obtenida de los matraces de cultivo osciló de 1.608 a 2.368 gramos de biomasa por litro de medio de cultivo (g/l), la producción promedio registrada fue de 1.968 ± 0.057 g/l.

Se obtuvieron 17.719 gramos de biomasa pigmentada liofilizada en un total de 36 matraces y se utilizaron 17 g para producir un total de 1.7 Kg de dieta experimental con biomasa pigmentada al 1 % (D2).

6.2 Análisis proximal de las dietas experimentales

Las dietas experimentales elaboradas para este experimento presentaron bastante homogeneidad en los resultados del análisis químico proximal en base húmeda, con excepción de la dieta delipidada la cual presentó un porcentaje bajo de lípidos debido al proceso de extracción de pigmentos (tabla 3).

Tabla 3. Análisis proximal de dietas experimentales (% base húmeda).

DIETA	Proteína	Lípidos	Fibra	Ceniza	*ELN	Humedad
D1	40.82	3.75	4.16	5.48	37.75	8.86
D2	42.13	3.92	4.53	5.20	35.72	8.50
D3	43.05	0.31	4.42	5.32	37.72	9.18

*Extracto libre de nitrógeno

6.3 Tasa de crecimiento específico

Para evaluar los efectos de las dietas experimentales en la tasa de crecimiento específico (TCE) de los peces se analizó cada uno de los tratamientos correspondientes a cada dieta experimental. En la tabla 4 se muestran los valores de TCE a los 28 días de experimentación en el bioensayo B1. Las dietas experimentales no causaron efectos significativos en la TCE de los peces de acuerdo al análisis de varianza en B1 ($P = 0.614$), sin embargo, en el bioensayo B2 la dieta sin pigmentos (D3) causó una diferencia significativa ($P = 0.001$) en la TCE de los peces con respecto a la dieta comercial sin biomasa pigmentada (D1), igualmente fue diferente significativamente ($P = 0.000$) con respecto a la dieta incluyendo biomasa pigmentada (D2), los valores promedio de TCE fueron menores en las dietas D1 y D2 como se observa en la tabla 5.

Las tasas de crecimiento específico más altas fueron para los peces alimentados con la dieta comercial D1 en B1 y la dieta sin pigmentos D3 en B2 ($65.36 \pm 33.73\%$ y $19.18 \pm 8.03\%$ respectivamente). Los peces alimentados con la dieta incluyendo biomasa pigmentada D2 presentaron la TCE más baja en B1 ($60.60 \pm 31.11\%$) y en B2 ($12.72 \pm 5.64\%$). En las figuras 10 y 11 se observa la variación de la TCE en las distintas dietas de ambos bioensayos.

Tabla 4. Valores promedio de la tasa de crecimiento específico (TCE) de los peces para la dieta comercial (D1) y la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada (D2) en B1.

B1 n = 48			
Dieta	TCE % ξ	^a S.D.	*P D1-D2
D1	65.36	±33.73	0.614
D2	60.60	±31.11	

*Probabilidad a una significancia estadística de $P < 0.05$

^aDesviación estándar

Tabla 5. Valores promedio de la tasa de crecimiento específico (TCE) de los peces para la dieta comercial (D1), la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada (D2) y la dieta sin pigmentos (D3) en B2.

B2 n = 168					
Dieta	TCE % ξ	^a S.D.	*P D1-D2	*P D1-D3	*P D2-D3
D1	14.52	±6.09	0.363	0.001	0.000
D2	12.72	±5.64			
D3	19.18	±8.03			

*Probabilidad a una significancia estadística de $P < 0.05$

^aDesviación estándar

Figura 11. Tasa de crecimiento específico promedio (TCE) a los 28 días en B2.

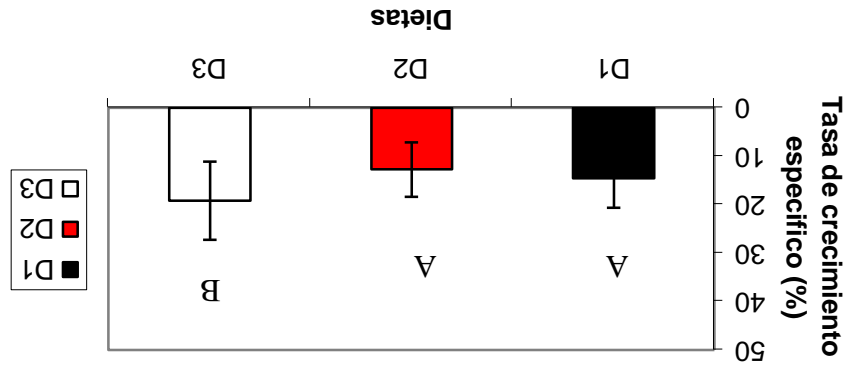
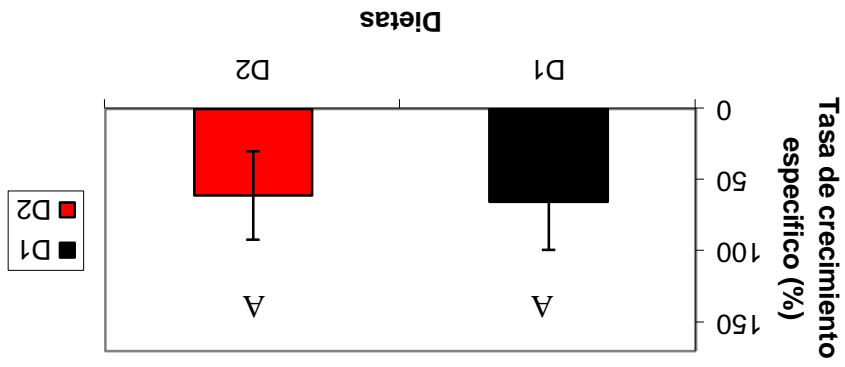


Figura 10. Tasa de crecimiento específico promedio (TCE) a los 28 días en B1.



6.4 Índice de longitud específico

Los valores de índice de longitud específico (ILE) en los distintos tratamientos de B1 y B2 a los 28 días de experimentación se muestran en las tablas 6 y 7.

El índice de longitud específico (ILE) registró efectos similares a la TCE en los peces por las distintas dietas tal y como se observa en las figuras 12 y 13. En el bioensayo B1 el valor promedio de ILE más alto se registró en los peces alimentados con la dieta comercial sin biomasa pigmentada D1 (6.80 ± 2.36 %), este valor fue diferente significativamente al registrado con la dieta incluyendo biomasa pigmentada D2 ($P = 0.052$); en el bioensayo B2 el valor de ILE más alto se observó en los peces alimentados con la dieta sin pigmentos D3 (4.95 ± 2.24 %), la dieta comercial sin biomasa pigmentada D1 registró un valor promedio de ILE significativamente menor a D3 ($P = 0.040$) y la dieta incluyendo biomasa pigmentada D2 registró una diferencia significativa en el valor promedio de ILE con respecto a la dieta D3 ($P = 0.004$).

Tabla 6. Valores promedio de índice de longitud específico (ILE) de los peces para la dieta comercial (D1) y la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada (D2) en B1.

B1 n = 48			
Dieta	ILE % ξ	^a S.D.	*P D1-D2
D1	6.80	±2.36	0.052
D2	5.04	±3.60	

*Probabilidad a una significancia estadística de P<0.05

^aDesviación estándar

Tabla 7. Valores promedio de índice de longitud específico (ILE) de los peces para la dieta comercial (D1), la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada (D2) y la dieta sin pigmentos (D3) en B2.

B2 n = 168					
Dieta	ILE % ξ	^a S.D.	*P D1-D2	*P D1-D3	*P D2-D3
D1	3.99	±1.68	0.733	0.040	0.004
D2	3.70	±1.96			
D3	4.95	±2.24			

*Probabilidad a una significancia estadística de P<0.05

^aDesviación estándar

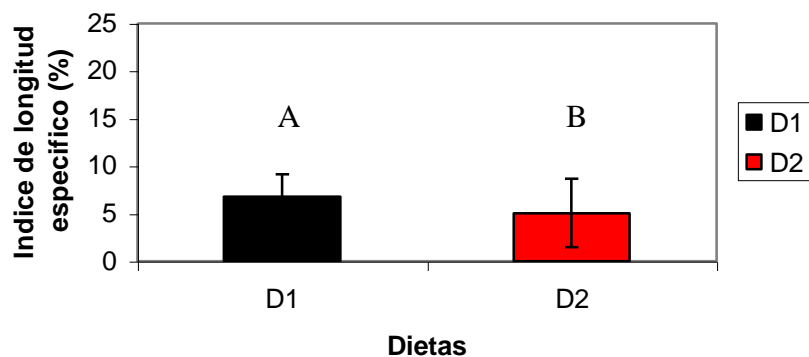


Figura 12. Índice de longitud específico promedio (ILE) a los 28 días en B1.

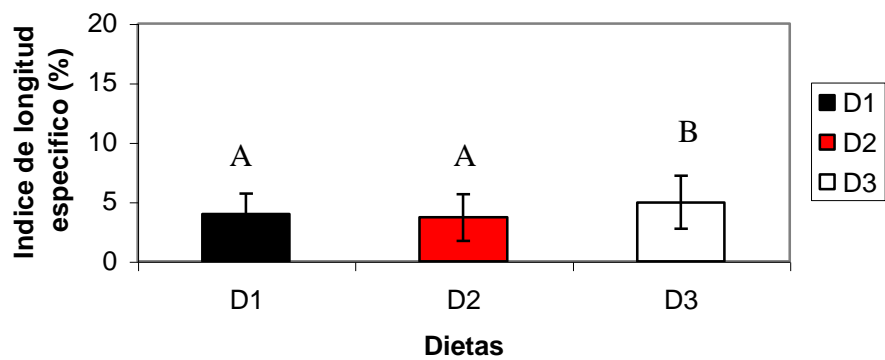


Figura 13. Índice de longitud específico promedio (ILE) a los 28 días en B2.

6.5 Tasa de sobrevivencia

Los resultados de tasa de sobrevivencia (TS) en cada uno de los tratamientos durante todo el experimento se resumen en la tabla 8. A los 28 días de experimentación todos los tratamientos en el bioensayo B1 presentaron una tasa de sobrevivencia del 100 % (figura 14). De igual forma la tasa de sobrevivencia en el bioensayo B2 fue de 100 % en todos los tratamientos (figura 15).

Tabla 8. Valores de tasa de sobrevivencia (TS) en los distintos tratamientos de B1 y B2 a los 28 días de experimentación.

Dieta	B1		B2	
	Tratamiento	TS %	Tratamiento	TS %
D1	D1D	100	D1D	100
	D1A	100	D1A	100
D2	D2D	100	D2D	100
	D2A	100	D2A	100
D3			D3D	100
			D3A	100

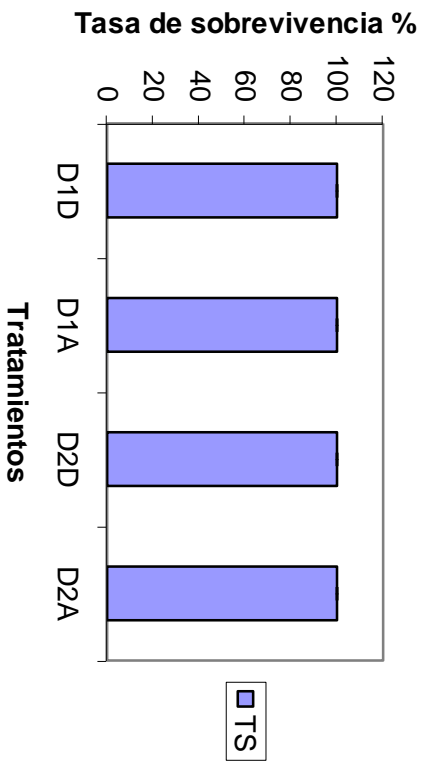


Figura 14. Tasa de supervivencia (TS) en B1.

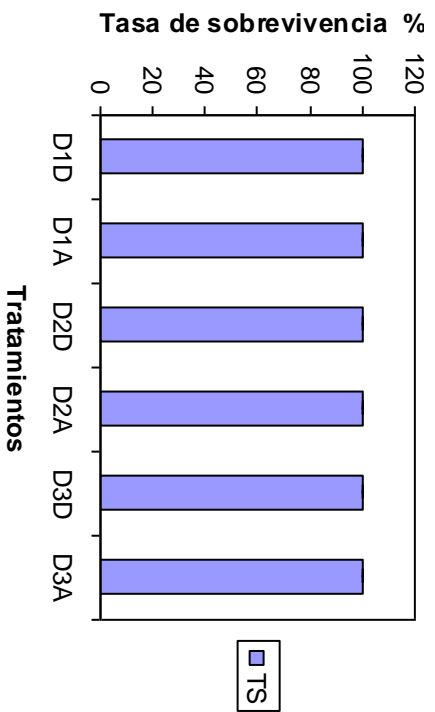


Figura 15. Tasa de supervivencia (TS) en B2.

6.6 Efecto de los HAPs (diesel) en la actividad enzimática de acetilcolinesterasa

Se calcularon los valores de actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) en los hígados de los peces *O. niloticus* en cada uno de los tratamientos en ambos bioensayos, los valores promedio de AE para cada tratamiento se calcularon como el incremento en absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína. Por cada pez se realizaron dos lecturas de AE en todos los tratamientos. Los valores promedio de AE registrados en cada tratamiento de los bioensayos B1 y B2 se muestran en las tablas 9 y 10.

El análisis de varianza (ANOVA) mostró una diferencia significativa en los valores promedio de AE entre los tratamientos de B1 ($P = 0.010$, $n = 48$). En la figura 16 se observa que los peces tratados con diesel en B1 presentaron valores de AE más bajos en comparación con los peces tratados con aceite de maíz, esta variación se presentó de igual forma en los peces alimentados con la dieta incluyendo biomasa pigmentada y en los alimentados con la dieta comercial sin biomasa pigmentada, sin embargo, solo se registró una diferencia significativa ($P = 0.013$, $P < 0.05$) entre el tratamiento con peces alimentados con la dieta sin biomasa pigmentada y expuestos a aceite de maíz por 24 horas D1A (AE $\bar{x} = 54.520 \pm 24.81$) y el tratamiento con peces alimentados con la dieta incluyendo biomasa pigmentada y expuestos a diesel por 24 horas D2D (AE $\bar{x} = 37.498 \pm 17.55$). La dieta incluyendo biomasa pigmentada no causó una diferencia significativa en los valores promedio de AE de los peces expuestos a diesel por 24 horas con respecto a los peces igualmente expuestos a diesel pero alimentados con una dieta comercial sin biomasa pigmentada ($P = 0.622$, $P < 0.05$).

El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas en los valores promedio de AE entre los tratamientos del bioensayo B2 ($P = 0.000$, $n = 168$). Los peces

expuestos a diesel registraron valores de actividad enzimática de acetilcolinesterasa menores a los observados en los peces expuestos a aceite de maíz, sin embargo, esta diferencia solo fue significativa entre los tratamientos D1D y D1A ($P = 0.000$), D2D y D1A ($P = 0.036$) y D3D y D1A ($P = 0.016$). Las dietas experimentales no provocaron diferencias significativas en los valores promedio de AE de los peces expuestos a diesel durante 96 horas en los distintos tratamientos. En la figura 17 se observa la variación en los valores de AE de los distintos tratamientos en B2.

El tratamiento D2D correspondiente a los peces alimentados con la dieta incluyendo biomasa pigmentada y posteriormente expuestos a diesel durante 24 horas, presentó la AE promedio más baja en B1 ($AE \bar{x}=37.49 \pm 17.55$), mientras que el tratamiento D1D correspondiente a los peces alimentados con la dieta comercial sin biomasa pigmentada y expuestos a diesel durante 96 horas registró la AE promedio más baja en B2 ($AE \bar{x}=26.30 \pm 9.93$). Los valores de AE más altos se registraron en los peces alimentados con la dieta comercial sin biomasa pigmentada y expuestos a aceite de maíz D1A en ambos bioensayos ($AE \bar{x}=54.52 \pm 24.81$ B1 y $AE \bar{x}=35.92 \pm 12.09$ B2).

Tabla 9. Valores promedio de actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) expresada como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína en los distintos tratamientos de B1.

B1 n = 48			
Dieta	Tratamiento	AE ξ	^a S.D.
D1	D1D	44.253	± 7.94 AB
	D1A	54.520	± 24.81 B
D2	D2D	37.498	± 17.55 A
	D2A	42.648	± 18.67 AB

*Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes (P<0.05)

^aDesviación estándar

Tabla 10. Valores promedio de actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) expresada como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína en los distintos tratamientos de B2.

B2 n = 168			
Dieta	Tratamiento	AE ξ	^a S.D.
D1	D1D	26.300	± 9.93 A
	D1A	35.923	± 12.09 B
D2	D2D	29.355	± 8.80 A
	D2A	32.234	± 8.06 AB
D3	D3D	28.796	± 11.19 A
	D3A	29.993	± 9.30 AB

*Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes (P<0.05)

^aDesviación estándar

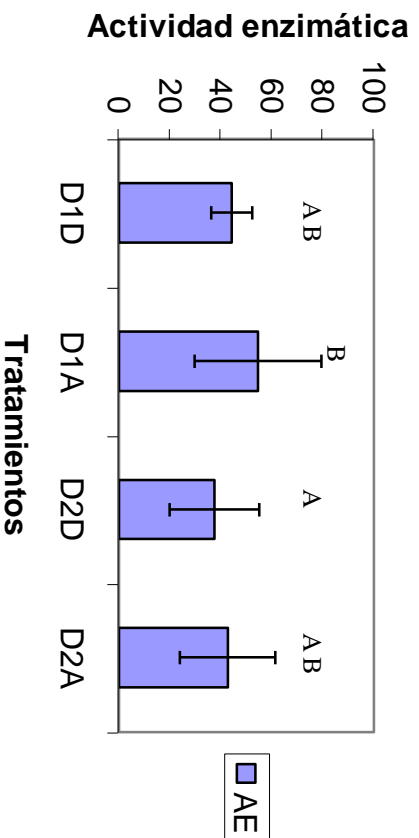


Figura 16. Promedio de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) expresado como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína en B1.

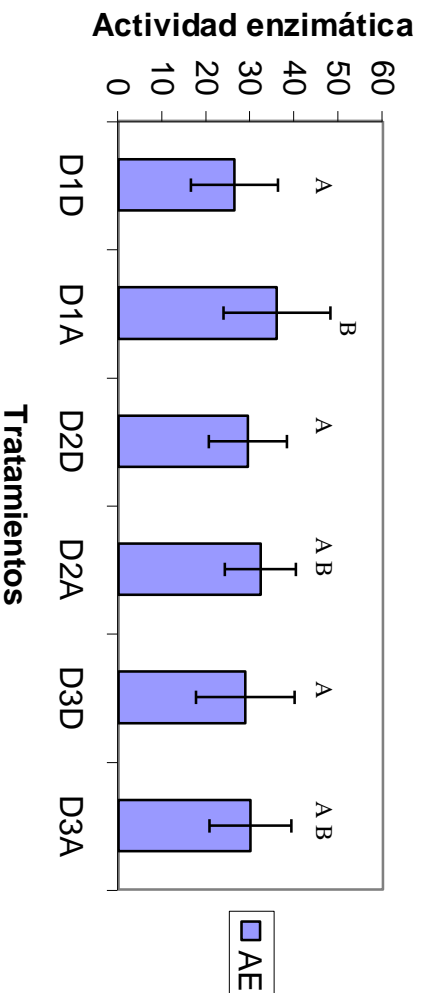


Figura 17. Promedio de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) expresado como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína en B2.

7 DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en la producción de biomasa pigmentada de *X. dendrorhous* y *S. exiguus* en el presente estudio fueron semejantes a los reportados por García (2000) quien reporta un rendimiento de 1 a 3 gramos de biomasa pigmentada por litro de medio de cultivo.

La evaluación de dietas experimentales con levadura roja (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) en trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* mostró que la ruptura de la pared celular de las levaduras optimizó la asimilación de los carotenoides (Storebakken *et al.*, 2004). La biomasa pigmentada de levaduras *X. dendrorhous* y *S. exiguus* evaluada en el presente estudio en mojarra tilapia *O. niloticus* no fue sometida a procesos de ruptura enzimática, sin embargo, al observar al microscopio las levaduras desarrollan hifas y su pared celular se adelgaza permitiendo una mejor asimilación de los pigmentos (García, 2000). Por otra parte el ácido maloico presente en las levaduras *X. dendrorhous* y *S. exiguus* puede actuar como un attractante.

Las dietas experimentales evaluadas no mostraron diferencias significativas en el crecimiento de los peces en el bioensayo B1, sin embargo, en el bioensayo B2 se observó una diferencia significativa en la TCE de los peces alimentados con la dieta sin pigmentos D3 con relación a la dieta comercial D1 y la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada D2. Esta diferencia pudo ser causada por una palatabilidad baja de

los lípidos presentes en las dietas no delipidadas traduciéndose en un consumo menor. Estos resultados coinciden con los reportados por San Martín (1994) donde se observó que la suplementación de dietas experimentales con compuestos antioxidantes como la vitamina E no causaron efectos significativos en la tasa de crecimiento de organismos acuáticos. Los valores de ILE presentaron una variación similar a los de TCE.

La mojarra tilapia ha demostrado ser un excelente modelo para estudios toxicológicos debido a su alta tolerancia a la contaminación y manipulación en condiciones de laboratorio, tal y como se ha observado en los resultados de tasa de sobrevivencia (TS) obtenidos en los bioensayos B1 y B2. En ambos bioensayos la sobrevivencia fue de 100 % en todos sus tratamientos correspondientes, comprobando la alta resistencia de la especie utilizada en el presente estudio.

Los resultados mostraron una disminución en la actividad enzimática de acetilcolinesterasa en hígado de tilapia *O. niloticus* al ser tratadas con diesel tal como se ha reportado en otras especies con diversos contaminantes ambientales (Payne *et al.*, 1987; Labrot *et al.*, 1996, Huang *et al.*, 1997, Chuiko 2000 y Brown 2004), sin embargo, existen otros estudios los cuales han demostrado que algunas enzimas pueden incrementar su actividad con la presencia de un estresor tal como reportan Oruç y Üner (2000).

En el bioensayo B2 las tilapias alimentadas con una dieta experimental suplementada con biomasa pigmentada de levaduras *X. dendrorhous* y *S. exiguus* registraron una disminución menor de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa en hígado al ser expuestas a diesel, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. De acuerdo con García (2000) esta aminoración del estrés puede reflejarse en una mayor

sobrevivencia. En otro estudio una dieta suplementada con vitamina E mostró su capacidad de reducir el nivel de peroxidación de lípidos y modular sistemas de defensa antioxidantes en branquias y hepatopáncreas de *Macrobrachium rosenbergii*, observándose cambios en la actividad de diferentes enzimas (Dandapat *et al.*, 2000).

La variación en los valores promedio de actividad enzimática de acetilcolinesterasa en las tilapias del bioensayo B1 se observó 24 horas después de la exposición de las mismas al diesel y al aceite de maíz, en el bioensayo B2 se registró 96 horas después, por lo cual resulta evidente que estos indicadores bioquímicos tienen una relevancia toxicológica alta debido a la rapidez de reacción de los mismos en presencia de algunos contaminantes, tal como ha sido mencionado por Marshall (1990).

De igual forma otros estudios han mostrado cambios bioquímicos en peces expuestos a diversos contaminantes e incluso los cambios han sido significativos. Resultados similares a los reportados en el presente estudio han sido registrados por Mayer *et al.* (1978), Neff and Haensley (1982), Hodson *et al.* (1984), Thomas and Wofford (1984), Neff (1985), Thomas *et al.* (1987) y Norris *et al.* (2000).

Las lesiones histopatológicas en peces pueden ser importantes bioindicadores tal como lo reportan Hartley *et al.* (1996) y Stentiford *et al.* (2003), sin embargo, los indicadores bioquímicos como la actividad enzimática de acetilcolinesterasa suelen ser más específicos.

8 CONCLUSIONES

El rendimiento promedio de producción de biomasa pigmentada de levaduras (*X. dendrorhous* y *S. exiguus*) en un cultivo en condiciones de laboratorio fue de 1.968 \pm 0.057 gramos de biomasa pigmentada por litro de medio de cultivo.

La producción de biomasa pigmentada de levaduras (*X. dendrorhous* y *S. exiguus*) fue suficiente para elaborar 1.7 Kg de dieta experimental incluyendo biomasa pigmentada al 1 % de concentración. El proceso de delipidación para extraer los pigmentos en una dieta experimental registró una eficiencia de 99.69 %.

La inclusión de biomasa pigmentada a partir de un cultivo mixto de levaduras (*X. dendrorhous* y *S. exiguus*) en un alimento para peces, no generó efectos significativos en la tasa de crecimiento específico de la mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus*) con respecto a la dieta comercial y a la dieta sin pigmentos; el índice de longitud específico no causó variaciones altamente significativas en ninguna de las dietas experimentales.

Durante los experimentos no se presentó mortalidad de peces registrándose una tasa de sobrevivencia del 100 % en cada uno de los tratamientos de ambos bioensayos.

Los valores de actividad enzimática de acetilcolinesterasa en el hígado de los peces expuestos a diesel fueron menores con respecto a los valores registrados en los peces expuestos a aceite de maíz en ambos bioensayos, sin embargo, esta diferencia fue significativa solo en algunos tratamientos.

Los resultados sugieren que la exposición de peces a diesel puede causar una disminución en la actividad enzimática de acetilcolinesterasa en hígado pudiendo llegar a ser significativa como fue el caso de algunos tratamientos, por lo cual, el monitoreo de estos parámetros puede servir como un bioindicador potencial al evaluar la toxicidad de hidrocarburos poliaromáticos en poblaciones de peces reproductores naturales.

La dieta experimental incluyendo biomasa pigmentada de levaduras (*X. dendrorhous* y *S. exiguus*) no causó un efecto significativo en la actividad enzimática de acetilcolinesterasa en el hígado de los peces expuestos a diesel al compararla con la dieta comercial y la dieta sin pigmentos, sin embargo, en el bioensayo B2 se observó una menor disminución de la actividad enzimática en los peces alimentados con la dieta incluyendo biomasa pigmentada y expuestos a diesel en comparación con los peces alimentados con la dieta comercial y la dieta sin pigmentos.

9 LITERATURA CITADA

- Andrewes, A. G., Phaff, H. J. y Starr, M. P. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast, *Phytochemistry*, 15, 1003-1007 pp.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brown, M., Davies, I. M., Moffat, C. F., Redshaw, J. and Craft, J. A. 2004. Characterisation of choline esterases and their tissue and subcellular distribution in mussel (*Mytilus edulis*), *Marine Environmental Research* 57 (2004) 155-169 pp.
- Calo, P., Velázquez, J. B., Sieiro, C., Blanco, P., Longo, E. y Villa, T. G. 1995. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 1396-1399 pp.
- Chuiko, G. M. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 127 (2000) 233-242 pp.

- Coral, H. G., Huberman, W. A., de la Lanza, G. y Monroy, R. J. 1997. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Vol. 47, No. 3, 237-241 pp.
- Cortés, C. R. 1993. Productos La Roche. Aspectos generales de pigmentaciones para peces y crustáceos, nutrición y salud animal, productos Roche, México, D. F.
- Cvancara, V. A. 1974. Liver carabamyl phosphate synthetase in the primitive freshwater bony fishes (Chondrostei, Holostei), Comp. Biochem. Physiol. Vol. 49B, 785-787 pp.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G. P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M. and Dimitriadis, V. K. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring, Marine Environmental Research 56 (2003) 443-470 pp.
- Dandapat, J., Chainy, G. B. N. and Rao, K. J. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, Comparative Biochemistry and Physiology Part C 127 (2000) 101-115 pp.
- Devi, M y M. Fingerman. 1995. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium, and lead. Bull Environ Contam Toxicol 55:746-750.
- Fox, D. L. 1953. Animal biochromes and structural colors, Cambridge Univ. Press, London and New York.
- Fox, D. L. 1966. In "Physiology of Mollusca" (K. M. Wilbur and C. M. Yonge, eds.), Vol. 2, Academic Press, New York, 249-274 pp.

- Fox, D. L. and Hopkins, 1968. In "Physiology of Echinodermata" (R.A. Boolootian, ed.), Wiley (Interscience), New York, 277-300 pp.
- Fox, D. L. 1976. Animal biochromes and structural colors, University of California Press, Berkley.
- Frankel, J. S. 1982. Serum esterase variation and characterization in populations of the longnose garpike, *Lepisosteus osseus*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 73B, No. 2, 347-349 pp.
- García-Díaz, G. 2000. Producción de Biomasa Pigmentada de Color Rojo a partir de un Cultivo Mixto en Medio Sintético, Evaluación en Nutrición de Camarón Blanco *Litopeneus vannamei*, Tesis Doctoral, U.A.N.L., FCB, 14-21 pp.
- Goodwin, T. W. 1951. Nature 167, 559.
- Goodwin, T. W. 1952. Comparative biochemistry of plant pigments (T. W. Goodwin, ed.), Academic Press, London, 127-173 pp.
- Goodwin, T. W. 1960. In "Physiology of crustacea" (T. Waterman, ed.), Academic Press, New York, 101-140 pp.
- Goodwin, T. W. 1968a. Chemical Zoology (M. Florkin and B. T. Sheer, eds.), Vol. 2, Academic Press, New York, 37-39 pp.
- Goodwin, T. W. 1968b. Chemical Zoology (M. Florkin and B. T. Sheer, eds.), Vol. 2, Academic Press, New York, 149-151 pp.
- Goodwin, T. W. 1971. Chemical Zoology (M. Florkin and B. T. Sheer, eds.), Vol. 6, Academic Press, London, 279-306 pp.
- Goodwin, T. W. 1972. In "Mollusca" (M. Florkin and B. T. Sheer, eds.), Chemical Zoology, Vol. 7, Academic Press, New York, 187-199 pp.

- Habig C., Di Giulio R. T. 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: Mineau P (ed) Cholinesterase-inhibiting insecticides, Elsevier, Amsterdam, p 20-33.
- Hartley, W. R., Thiagarajah, A. and Treinies, A. M. 1996. Liver lesions in the gar fish (*Lepisosteidae*) as biomarkers of exposure, Marine Environmental Research Vol. 42, No. 1-4, 217-221 pp.
- Hodson, P. V., B. R. Blunt, and D. M. Whittle. 1984. Monitoring lead exposure of fish. Pages 87-98 in Cairns *et al.*, (1984).
- Huang, T. L., Shiotsuki, T., Uematsu, T., Borhan, B., Li, Q. X., Hammock, B. D. 1996. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of mammalian liver microsomal carboxylesterases. Pharm Res 13: 1493-1498.
- Huang, T. L., P. O. Obih, R. Jaiswal, W. R. Hartley and A. Thiagarajah. 1997. Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi river basin, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58 :688-695.
- Johnson, E. A. y Lewis, M. J. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*, J. Gen. Microbiol., 115, 173-183 pp.
- Johnson, E. A. 1992. New advances in astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. In Profiles on Biotechnology; Villa, T. G., Abalde, J., Eds.; University of Santiago Press: Santiago de Compostela, 289-299 pp.
- Labrot, F. D. Ribera, M. Saint Denis y J. F. Narbonne. 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contaminants: lipid peroxidation,

- acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three nonmammalian species. *Biomarkers* 1:21-28.
- Latscha, T. 1990. Carotenoids in aquatic animal nutrition, Rovithai Limited (Roche), 68-77 pp.
- Latscha, T. 1990b. Carotenoids in animal nutrition their nature and significance in animal feeds. Roche Publication No. 2175, F. Hoffmann- La Roche, animal nutrition and health, Basle, Switzerland, 110 pp.
- Marshall, A. S. 1990. Status and Use of Biological Indicators for Evaluating the Effects of Stress on Fish, *American Fisheries Society Symposium* 8:1-8.
- Mayer, F. L., P. M. Mehrle, and P. L. Crutcher. 1978. Interactions of toxaphene and vitamin C in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 107:326-333.
- Miller, M. W., Yoneyama, M. y Soneda, M. 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int. J. Syst. Bacteriol*, 26, 286-291 pp.
- Muñoz, M. S., Díaz, P. N., Pokniak, R. J. y Pino, P. I. 2000. http://www.uchile.cl/facultades/cs_agronomicas/acuicultura/nutricion/nutricion.htm
- Neff, J. M. 1985. Use of biochemical measurements to detect pollutant-mediated damage to fish. American Society for Testing and Materials, Special Technical Publication 854:155-181.
- Neff, J. M. and Haensley, W. E. 1982. Long-term impact of the *Aamoco Cadiz* crude oil spill on oysters *Crassostrea gigas* and plaice *Pleuronectes platessa* from Aber Benoit and Aber Wrac'h, Brittany, France. Pages 269-328 in *Ecological study of*

- the *Amoco Cadiz* oil spill. National Oceanic and Atmospheric Administration, Washington, D. C.
- Norris, D. O., Camp, J. M., Maldonado, T. A. and Woodling, J. D. 2000. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 127 (2000) 71-78 pp.
- NRC (National Research Council). 1987. Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives* 74:3-9.
- Olson, D. L. and Christensen, G. M. 1980. Effects of water pollutants and other chemicals in fish acetylcholinesterase (*in vitro*). *Environ Res* 21:327-335.
- Oruç, E. Ö. and Üner, N. 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 127 (2000) 291-296.
- Payne, J. F., Rahimtula, A. D. and Porter, E. L. 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp Biochem Physiol* 86C: 233-245.
- Rodríguez, F. G. y Gold, B. G. 2004. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Marine Environmental Research*, 58 (2004) 505-509.
- San Martín-Del Angel, P. 1995. Efecto del grado de oxidación de aceite de pescado y de la suplementación con vitamina "E" y un antioxidante sintético en la nutrición del camarón blanco *Penaeus vannamei*, Tesis de Maestría, U.A.N.L., FCB, 39-41 pp.
- Shaonan, L., Xianchuan, X., Guonian, Z. and Yajun, T. 2004. *Aquatic Toxicology* 68 (2004) 293-299 pp.

- Simpson, K. L., Katayama, T. y Chichester, C. O. 1981. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors (J. C. Bauernfeind, ed.), Academic Press, New York, 463-538 pp.
- Stentiford, G. D., Longshaw, M., Lyons, B. P., Jones, G., Green, M. and Feist, S. W. 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants, *Marine Environmental Research* 55 (2003) 137-159 pp.
- Stepnowski, P., Ólafsson, G., Helgason, H. and Jastorff, B. 2004. Preliminary study on chemical and physical principles of astaxanthin sorption to fish scales towards applicability in fisheries waste management, *Aquaculture* 232 (2004) 293-303 pp.
- Storebakken, T. y Goswami, U. C. 1996. Plasma carotenoid concentration indicates the availability of dietary astaxanthin for Atlantic salmon, *Salmo solar*, *Aquaculture* 146 (1996): 147-153.
- Storebakken, T., Sørensen, M., Bjerkeng, B. and Hiu, S. 2004. Utilization of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of enzymatic cell wall disruption and feed extrusion temperature, *Aquaculture* 236 (2004) 391-403 pp.
- Thomas, P. and Wofford, H. W. 1984. Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid-soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus* L.) to fluorene analogs. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam) 1:329-342.
- Thomas, P., Carr, R. S. and Neff, J. M. 1987. Biochemical responses and alterations of tissue ascorbic acid and glutathione content. Pages 155-180 in C. S. Giam and L. E. Ray, editors. *Pollutant studies in marine animals*. CRC Press. Boca Raton, Florida.

- Vevers, H. G. 1966. In "Physiology of Echinodermata", (R. A. Boolootian, ed.), Wiley (Interscience), New York, 267-275 pp.
- Wedemeyer, G. A. and Mc Leay, D. J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. Pages 247-275 in A. D. Pickering, editor. Stress and fish. Academic Press, New York.
- Wedemeyer, G. A., Mc Leay, D. J. and Goodyear, C. P. 1984. Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: the problems and methods of monitoring. Pages 163-195 in V. W. Cairns, P. V. Hodson, and J. O. Nriagu, editors. Contaminant effects on fisheries. Wiley, New York.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. y Nishio, N. 1997. Applied and environmental microbiology, 4471-4478 pp.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. y Nishio, N. 1997. Biotechnology Letters, Vol. 19, No. 11, Noviembre 1997. 1109-1111 pp.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Análisis estadístico: tasa de crecimiento específico e índice de longitud específico

B1:

ANOVA

TCE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	272.109	1	272.109	.258	.614
Within Groups	48448.772	46	1053.234		
Total	48720.881	47			

B2:

ANOVA

TCE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1248.418	2	624.209	14.011	.000
Within Groups	7350.785	165	44.550		
Total	8599.204	167			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TCE

	(I) DIETA	(J) DIETA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1	2	1.80165816	1.261380	.363	-1.31412	4.917438
		3	-4.667411*	1.261380	.001	-7.78319	-1.55163
	2	1	-1.801658	1.261380	.363	-4.91744	1.314122
		3	-6.469069*	1.261380	.000	-9.58485	-3.35329
	3	1	4.66741071*	1.261380	.001	1.551630	7.783191
		2	6.46906888*	1.261380	.000	3.353289	9.584849

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ANOVA

ILE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37.032	1	37.032	3.983	.052
Within Groups	427.726	46	9.298		
Total	464.758	47			

B2:

ANOVA

ILE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48.252	2	24.126	6.150	.003
Within Groups	647.256	165	3.923		
Total	695.508	167			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ILE

	(I) DIETA	(J) DIETA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1	2	.29506803	.37429752	.733	-.629498	1.219634
		3	-.96024660*	.37429752	.040	-1.88481	-3.6E-02
	2	1	-.29506803	.37429752	.733	-1.21963	.62949791
		3	-1.255315*	.37429752	.004	-2.17988	-.330749
	3	1	.96024660*	.37429752	.040	3.57E-02	1.884813
		2	1.25531463*	.37429752	.004	.33074868	2.179881

* . The mean difference is significant at the .05 level.

APÉNDICE B

Análisis estadístico: actividad enzimática de acetilcolinesterasa

B1:**ANOVA**

AE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3970.219	3	1323.406	3.964	.010
Within Groups	33386.980	100	333.870		
Total	37357.199	103			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: AE

Scheffe

(I) TRATAMIE	(J) TRATAMIE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-10.2665	5.0678	.257	-24.6777	4.1447
	3	6.7550	5.0678	.622	-7.6562	21.1662
	4	1.6054	5.0678	.992	-12.8058	16.0166
2	1	10.2665	5.0678	.257	-4.1447	24.6777
	3	17.0215*	5.0678	.013	2.6103	31.4327
	4	11.8719	5.0678	.147	-2.5393	26.2831
3	1	-6.7550	5.0678	.622	-21.1662	7.6562
	2	-17.0215*	5.0678	.013	-31.4327	-2.6103
	4	-5.1496	5.0678	.793	-19.5608	9.2616
4	1	-1.6054	5.0678	.992	-16.0166	12.8058
	2	-11.8719	5.0678	.147	-26.2831	2.5393
	3	5.1496	5.0678	.793	-9.2616	19.5608

*. The mean difference is significant at the .05 level.

B2:

ANOVA

ACTENZIM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3051.712	5	610.342	6.110	.000
Within Groups	32963.904	330	99.891		
Total	36015.616	335			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ACTENZIM

	(I) TRATAMIE	(J) TRATAMIE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe 1	2	3	-9.62250*	1.88879	.000	-15.94549	-3.29951
		4	-3.05496	1.88879	.759	-9.37796	3.26803
		5	-5.93355	1.88879	.082	-12.25654	.38944
		6	-2.49591	1.88879	.883	-8.81890	3.82703
		6	-3.69216	1.88879	.576	-10.01515	2.63083
2	1	3	9.62250*	1.88879	.000	3.29951	15.94549
		4	6.56754*	1.88879	.036	.24454	12.89053
		5	3.68895	1.88879	.577	-2.63404	10.01194
		6	7.12659*	1.88879	.016	.80360	13.44953
		6	5.93034	1.88879	.082	-.39265	12.25333
3	1	2	3.05496	1.88879	.759	-3.26803	9.37796
		2	-6.56754*	1.88879	.036	-12.89053	-.24454
		4	-2.87859	1.88879	.803	-9.20158	3.44440
		5	.55905	1.88879	1.000	-5.76394	6.88204
		6	-.63720	1.88879	1.000	-6.96019	5.68579
4	1	2	5.93355	1.88879	.082	-.38944	12.25654
		2	-3.68895	1.88879	.577	-10.01194	2.63404
		3	2.87859	1.88879	.803	-3.44440	9.20153
		5	3.43764	1.88879	.652	-2.88535	9.76063
		6	2.24139	1.88879	.923	-4.08160	8.56433
5	1	2	2.49591	1.88879	.883	-3.82708	8.81890
		2	-7.12659*	1.88879	.016	-13.44958	-.80360
		3	-.55905	1.88879	1.000	-6.88204	5.76394
		4	-3.43764	1.88879	.652	-9.76063	2.88535
		6	-1.19625	1.88879	.995	-7.51924	5.12674
6	1	2	3.69216	1.88879	.576	-2.63083	10.01515
		2	-5.93034	1.88879	.082	-12.25333	.39265
		3	.63720	1.88879	1.000	-5.68579	6.96019
		4	-2.24139	1.88879	.923	-8.56438	4.08160
		5	1.19625	1.88879	.995	-5.12674	7.51924

*. The mean difference is significant at the .05 level.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Funciones biológicas de los carotenoides en salmónidos.....	5
Tabla 2.	Distribución de los tratamientos en un sistema de bloques completamente al azar en los bioensayos B1 y B2.....	23
Tabla 3.	Análisis proximal de dietas experimentales (% base húmeda).....	32
Tabla 4.	Valores promedio de la tasa de crecimiento específico (TCE) de los peces para la dieta comercial (D1) y la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada (D2) en B1.....	34
Tabla 5.	Valores promedio de la tasa de crecimiento específico (TCE) de los peces para la dieta comercial (D1), la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada (D2) y la dieta sin pigmentos (D3) en B2.....	34
Tabla 6.	Valores promedio de índice de longitud específico (ILE) de los peces para la dieta comercial (D1) y la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada (D2) en B1.....	37
Tabla 7.	Valores promedio de índice de longitud específico (ILE) de los peces para la dieta comercial (D1), la dieta comercial incluyendo biomasa pigmentada (D2) y la dieta sin pigmentos (D3) en B2.....	37
Tabla 8.	Valores de tasa de sobrevivencia (TS) en los distintos tratamientos de B1 y B2 a los 28 días de experimentación.....	39
Tabla 9.	Valores promedio de actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) expresada como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por	

miligramo de proteína en los distintos tratamientos de B1.....43

Tabla 10. Valores promedio de actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) expresada como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína en los distintos tratamientos de B2.....43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Producción de biomasa pigmentada a partir de un cultivo mixto de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> y <i>Saccharomyces exiguus</i>	20
Figura 2.	Alimento comercial para cichlidos marca Wardley en presentación de pellets.....	21
Figura 3.	Diagrama de flujo mostrando el proceso de inclusión de biomasa pigmentada en un alimento para peces.....	22
Figura 4.	Proceso de delipidación mediante el método Bligh and Dyer (1959).....	24
Figura 5.	Canaletas de 500 litros con recirculación de agua donde se efectuaron los bioensayos (cuadros a, b y c).....	25
Figura 6.	Medición de los parámetros biológicos de peso gr (cuadro a) y longitud cm (cuadro b).....	26
Figura 7.	En el cuadro a se observa la técnica de inyección intraperitoneal y en los cuadros b y c se observa el método de disección y la separación del hígado de los peces.....	27
Figura 8.	Extractos enzimáticos utilizados para realizar las lecturas de actividad enzimática de acetilcolinesterasa.....	28
Figura 9.	Microplacas donde se realizaron las lecturas espectrofotométricas de los extractos enzimáticos para determinar su cinética enzimática.....	29
Figura 10.	Tasa de crecimiento específico promedio (TCE) a los 28 días en B1.....	35

Figura 11.	Tasa de crecimiento específico promedio (TCE) a los 28 días en B2.....	35
Figura 12.	Índice de longitud específico promedio (ILE) a los 28 días en B1.....	38
Figura 13.	Índice de longitud específico promedio (ILE) a los 28 días en B2.....	38
Figura 14.	Tasa de sobrevivencia (TS) en B1.....	40
Figura 15.	Tasa de sobrevivencia (TS) en B2.....	40
Figura 16.	Promedio de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) expresado como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína en B1.....	44
Figura 17.	Promedio de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AE) expresado como el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína en B2.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Actividad enzimática
B1	Bioensayo 1
B2	Bioensayo 2
D1	Dieta 1 Alimento comercial sin biomasa pigmentada
D2	Dieta 2 Alimento comercial con 1 % de biomasa pigmentada
D3	Dieta 3 Alimento comercial delipidado (sin pigmentos)
D1A	Tratamiento con peces expuestos a dieta 1 y aceite de maíz
D1D	Tratamiento con peces expuestos a dieta 1 y diesel
D2A	Tratamiento con peces expuestos a dieta 2 y aceite de maíz
D2D	Tratamiento con peces expuestos a dieta 2 y diesel
D3A	Tratamiento con peces expuestos a dieta 3 y aceite de maíz
D3D	Tratamiento con peces expuestos a dieta 3 y diesel
g/l	Gramos por litro
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
ILE	Índice de longitud específico
TCE	Tasa de crecimiento específico
TS	Tasa de sobrevivencia

RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos comúnmente utilizados como agentes pigmentantes y antioxidantes por diversos organismos acuáticos. Tienen un efecto sobre el sistema inmune, lo cual se refleja en una mayor sobrevivencia de las especies en explotación comercial. En sistemas de cultivo de peces, el medio no provee los pigmentos en cantidades adecuadas. Es evidente la necesidad de realizar evaluaciones de la inclusión de los mismos en dietas para peces de importancia comercial acuícola en México. Con tal motivo se realizó un experimento para evaluar el efecto de una dieta suplementada con biomasa pigmentada de (*Xanthophyllomyces dendrorhous* y *Saccharomyces exiguus*) en el pez tilapia (*Oreochromis niloticus*) y su tolerancia al estrés por hidrocarburos aromáticos policíclicos (Diesel). Se establecieron dos bioensayos (B1 con 48 peces en cuatro tratamientos y B2 con 168 peces en seis tratamientos). Se evaluaron tres dietas experimentales una dieta comercial (D1), una dieta comercial suplementada con biomasa pigmentada (D2) y una dieta sin pigmentos (D3), los peces se alimentaron con sus respectivas dietas durante 28 días; posteriormente, se aplicó a cada pez una inyección intraperitoneal (IP) de Diesel o aceite de maíz (control) a una dosis de 20 mg/1000 g de peso promedio. Después de 24 h en B1 y 96 h en B2 se determinó la actividad enzimática de acetilcolinesterasa en el hígado de los peces para verificar el estrés causado en los distintos tratamientos. El rendimiento de producción de biomasa pigmentada fue de 1.968 ±0.057 g/l. La dieta suplementada con biomasa pigmentada no provocó efectos altamente significativos en la tasa de crecimiento específico con respecto a la dieta comercial aunque si se registró una diferencia con respecto a la dieta sin pigmentos (P = 0.000, P<0.05). Los peces expuestos a diesel registraron valores de actividad enzimática de acetilcolinesterasa en hígado menores a los valores registrados en los peces expuestos a aceite de maíz en ambos bioensayos, sin embargo, en B1 esta diferencia solo fue significativa (P = 0.013, P<0.05) entre los peces alimentados con la dieta comercial sin biomasa pigmentada y expuestos a aceite de maíz y los peces alimentados con la dieta suplementada con biomasa pigmentada y expuestos a diesel; en B2 el análisis de varianza mostró que todos los tratamientos de peces expuestos a diesel registraron valores significativamente diferentes con respecto a los peces alimentados con la dieta comercial sin biomasa pigmentada y expuestos a aceite de maíz. La dieta comercial suplementada con biomasa pigmentada no generó efectos significativos en la actividad enzimática de acetilcolinesterasa de los peces expuestos a diesel con respecto a las otras dietas experimentales.