



CONTRIBUCIONES RECIENTES EN ALIMENTACION Y NUTRICION ACUICOLA

Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez,
Denis Ricque Marie, Mireya Tapia
Salazar, Martha G. Nieto López, David
A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa
Delgado y Carlos Alfonso Alvarez
González.

Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola
2013, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos Alfonso Alvarez González.

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2013

Copias disponibles en:
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Maricultura
Cd. Universitaria A.P. F-67
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66450
Tel.+Fax. 818352 6380

Editores
L. Elizabeth Cruz Suárez
Denis Ricque Marie
Mireya Tapia Salazar
Martha G. Nieto López
David A. Villarreal Cavazos
Julián Gamboa Delgado
Carlos Alfonso Alvarez
González.

E-mail: lucia.cruzs@uanl.edu.mx

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

Autores del escrito. 2013. Nombre del artículo. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazo, Julián Gamboa Delgado y Carlos Alfonso Alvarez Gzz. *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. ISBN: 978-607-27-0391-9. El cuidado de la presente edición así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

AGRADECIMIENTOS

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias
- Y a la imprenta Universitaria de la UANL por el apoyo brindado para la edición de estas memorias.

Requerimientos para acceder al contenido PC o MAC, 128 RAM

Directorio

Dr. Jesús Ancer Rodríguez
Rector

M.C. Rogelio Garza Rivera
Srio General

Dr. Rogelio Villarreal Elizondo
Srio extensión y cultura

Celso José Garza Acuña
Director de publicaciones

cDr. Antonio Guzmán Velasco
Director de la facultad

Editores

L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos Alfonso Alvarez González.

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66450

Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2014. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Denis Ricque Marie, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha G. Nieto López, ©David A. Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado y ©Carlos Alfonso Alvarez González

ISBN: 978-607-27-0391-9. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

Índice

	Páginas
Sesión1. General/Session 1. General	
Global trends in aquaculture and feed ingredient use in compound aquafeeds	
Dr. Albert Tacon	1
<i>Aquatic Farms Ltd., USA</i>	
Nutriendo el sistema inmune de los peces	
Dr. Camilo Pohlenz Castillo	13
<i>Texas A&M University, USA</i>	
Sesión 2. Cultivo de especies acuáticas	
Session 2. Culture of aquatic species	
Cultivo de pargo en jaulas flotantes	
Dra. Crisantema Hernández González	30
<i>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., México</i>	
Sesión 3. Ingredientes en alimentos de peces y crustáceos	
Session 3. Ingredients in diets for fish and shrimp	
Animal co-product hydrolysates: a source of key molecules in aquaculture feeds	
Dr. Sergio Nates	42
<i>National Renderers Association, USA</i>	
Fuentes de proteína alternativas para dietas de trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	
Dr. Luis Héctor Hernández Hernández	49
<i>FES-Iztacala-UNAM, México</i>	
Subproductos de la pesca para dietas de organismos cultivados: Beneficios, problemas y estrategias	
Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer	66
<i>Universidad de Sonora, México</i>	
Selección de alimentos y estrategias de alimentación acordes a las condiciones de cultivo del camarón	
Dr. Luis Rafael Martínez Córdova	84
<i>Universidad de Sonora, México</i>	
Use of corn protein concentrates in practical diets for the Pacific white shrimp	
Dr. D. Allen Davis	105
<i>Auburn University, USA</i>	
Utilización de Algas como Ingrediente Alternativo en la Alimentación de Peces Marinos	
F.J. Alarcon/Dr. Carlos Alfonso Alvarez	127
<i>Universidad de Almería, España</i>	
Avances en el uso de secuestrantes para aflatoxicosis en camarón	
Dr. Oscar D. García Pérez	191
<i>Universidad Autónoma de Nuevo León</i>	

Uso eficiente de los recursos pesqueros: extracción de moléculas bioactivas de los subproductos para su empleo en el sector farmacéutico
Dr. Sergio Rodríguez Morales 224
Facultad de Química de la UMDI-SISAL, México

Sesión 4. Fisiología / Session 4. Physiology

Avances en el estudio de la nutrición larvaria, expresión y actividad de enzimas digestivas en totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert 1890) una especie con potencial de maricultivo en Baja California

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinosa 238
Universidad Autónoma de Baja California, México

Gene expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, and white sturgeon *Acipenser transmontanus* erythrocytes under differing glycaemic conditions
Dr. Madison Powell 261

University of Idaho, USA

Avances en el estudio de la maduración y reproducción de curvina golfina en el estado de Sonora, México
Dr. Martín Pérez Velázquez 271

Universidad de Sonora, México

Uso de la técnica de isótopos estables para el diseño de dietas para peces
Dra. María Teresa Viana Castrillón 294

Universidad Autónoma de Baja California, México

Ontogenia del sistema digestivo del guapote lagunero *Parachromis dovii* durante el periodo larval y selección de fuentes proteicas para su alimentación

M. en C. Silvia Valverde Chavarría 320

Universidad Nacional de Costa Rica, Costa Rica

Modelizando el biorreactor; o cómo conocer mejor el digestivo de tus peces

Dr. Francisco J. Moyano López 356

Universidad de Almería, España

Indicadores del desarrollo morfofuncional durante la ontogenia inicial de peces teleósteos: una revisión

Dr. Dariel Tovar Ramírez 376

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., México

Avances en la fisiología digestiva de la mojarra tahuina *Cichlasoma trimaculatum*

Dr. Arkady Uscanga Martínez 405

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México

Avances en la fisiología digestiva de la mojarra castarrica

Cichlasoma urophthalmus

Dr. Carlos Alberto Cuenca Soria 460

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México

Sesión 5. Requerimientos nutricionales/Session 5. Nutrient requirements

Requirements for some marine fish species with an emphasis on organic ingredients Dr. Gerard Cuzon <i>IFREMER, Brest, Francia</i>	494
Avances en el requerimiento de vitaminas en peces marinos Dra. María Cristina Chávez Sánchez <i>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., México</i>	507
Requerimientos de Proteína y Energía en Juveniles Silvestres del Mero rojo <i>Epinephelus morio</i> Dra. Adriana Ferreira <i>UMDI-Sisal-UNAM, México</i>	521
Evaluation of a beta-propeller phytase for its application in aquaculture Dra. Martha Guerrero Olazarán <i>Universidad Autónoma de Nuevo León</i>	532
Avances en la valoración de macroalgas del Género Ulva como nutracéutico en <i>Litopenaeus vannamei</i> . Dra. L. Elizabeth Cruz Suarez <i>Universidad Autónoma de Nuevo León</i>	553
El Isótopo ¹⁵ N como Indicador de la Asimilación del Nitrógeno de la Dieta en Rotíferos y Copépodos Utilizados como Alimento vivo en la Acuicultura José Cristóbal Román Reyes <i>Universidad Autónoma de Sinaloa</i>	599

Global Trends in Aquaculture and Feed Ingredient Use in Compound Aquafeeds

Albert G.J. Tacon, Ph.D.

¹ Technical Director, Aquatic Farms Ltd, Kaneohe, HI 96744, USA;

² Laboratório de Aquicultura, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: agjtacon@aol.com

Abstract

Aquaculture, the farming of aquatic plants and animals, has been growing at an average annual rate (APR) of 8.2 percent per year since 1984, with total global production increasing over eight fold from 10.2 million tonnes in 1984 to 83.7 in 2011, with global production currently valued at over US \$ 135.7 billion (FAO, 2013). By region, Asia accounted for over 91.2 percent of total global aquaculture production in 2011 (APR 8.46 percent since 1984), followed by the Americas at 3.53 percent (APR 7.59 percent), Europe at 3.20 percent (APR 3.99 percent), Africa at 1.84 percent (APR 14.82 percent), and Oceania at 0.25 percent (APR 9.02 percent).

In terms of the major farmed species groups in 2011, finfish accounted for 41.6 million tonnes or 49.8 percent of total global aquaculture production in 2011 (valued at US \$ 83.6 billion, with over 102 reported fish species, and production growing at an average APR of 8.85 percent since 1984), followed by aquatic plants at 21.0 million tonnes or 25.1% of total global production (valued at US \$ 5.5 billion, with 12 reported aquatic plant species, and production growing at an average APR of 7.16 percent since 1984), molluscs at 14.4 million tonnes or 17.2 percent of total global production (valued at US \$ 15.3 billion, with 27 reported mollusk species, and production growing at an average APR of 7.17 percent since 1984), and crustaceans at 5.9 million tonnes or 7.0 percent of total global production (valued at US \$ 28.4 billion, with 15 reported crustacean species, and production growing at an average APR 13.1 percent since 1984; FAO, 2013).

The total production of the major finfish and crustacean species groups fed industrially compounded or farm-made aquafeeds was reported to be 40.57 million tonnes in 2011 (FAO, 2013), with total global industrial compound aquafeed production estimated at approximately 35.75 million tonnes; the major compound feed fed species groups including:

- Chinese carp at 11.76 million tonnes (excluding silver carp and big head carp) with an estimated total compound aquafeed requirement of 10.19 million tonnes;
- Tilapia at 3.96 million tonnes with an estimated total compound aquafeed requirement of 5.79 million tonnes or 16.2 percent of total global compound aquafeed production;

- Shrimp at 3.93 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 5.54 million tonnes or 15.5 percent of total global compound aquafeed production;
- Catfish at 3.38 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 3.70 million tonnes or 10.3 percent of total global compound aquafeed production;
- Marine fish at 2.01 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 2.82 million tonnes or 7.9 percent of total global compound aquafeed production;
- Other freshwater and diadromous fish at 1.94 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 1.24 million tonnes or 3.5 percent of total global compound aquafeed production;
- Salmon at 1.93 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 2.51 million tonnes or 7.0 percent of total global compound aquafeed production;
- Freshwater crustaceans at 1.67 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 1.71 million tonnes or 4.8 percent of total global compound aquafeed production;
- Milkfish at 891,407 tonnes with an estimated total compound feed requirement of 820,000 tonnes or 2.3 percent of total global compound aquafeed production;
- Trout at 791,959 tonnes with an estimated total compound feed requirement of 1.03 million tonnes or 2.9 percent of total global compound aquafeed production;
- Eel at 255,284 tonnes with an estimated total compound feed requirement of 392,000 tonnes or 1.1 percent of total global compound aquafeed production in 2011.

In terms of feed ingredient usage, the compound aquafeed sector still remains the largest consumer of fishmeal and fish oil, aquaculture consuming 78 percent of total global fish oil production in 2011 (major aquaculture species group consumer being salmonids at 66 percent followed by marine fish at 17 percent) and 68% of total global fishmeal production in 2011 (major aquaculture species group consumer being crustaceans at 30 percent, followed by salmonids at 22 percent, and marine fish at 21 percent; Dr Andrew Jackson, personal communication, The Marine Ingredients Organization, <http://iffo.net>). The paper discusses the nutritional value, availability and use of other major feed ingredients commonly used in compound aquafeeds.

Keywords: global trends, aquaculture, feed ingredients, aquafeed

Trends in global aquaculture production

Aquaculture, the farming of aquatic plants and animals, has been the fastest growing food production sector for over a quarter of a century (FAO, 2013); the aquaculture sector growing at an average annual rate (APR) of 8.2 percent per year since 1984, compared with only 1.3 percent per year for capture fisheries, and 2.6 percent per year for terrestrial meat (Figure 1).

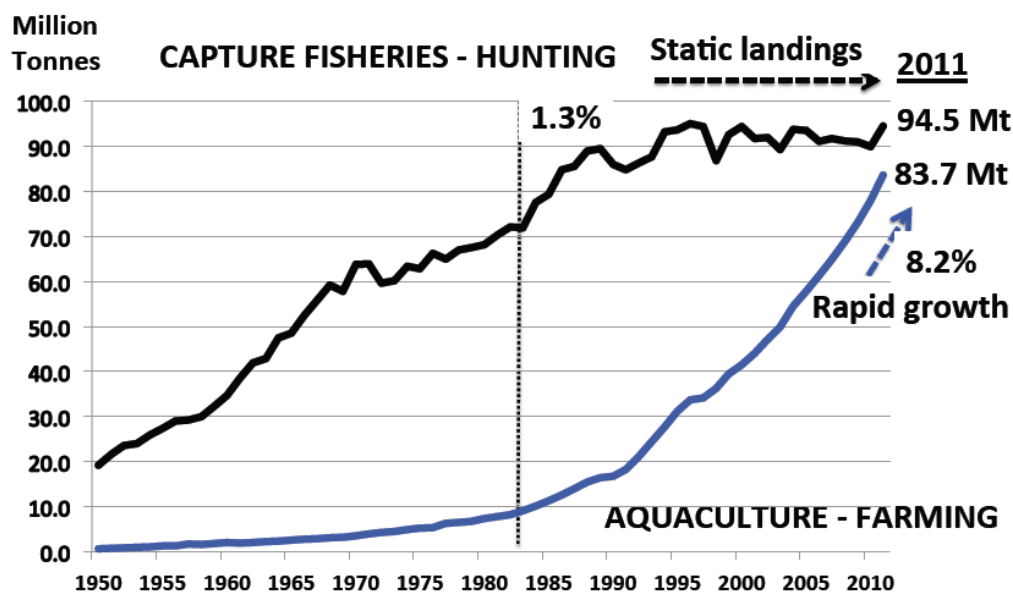


Figure 1. Growth of global aquaculture and capture fisheries production

(Source: FAO, 2013)

Total global aquaculture production reached a new high of 83.7 million tonnes in 2011, with production up over eight fold from 10.2 million tonnes in 1984, and total production currently valued at over US \$ 135.7 billion (Figure 2).

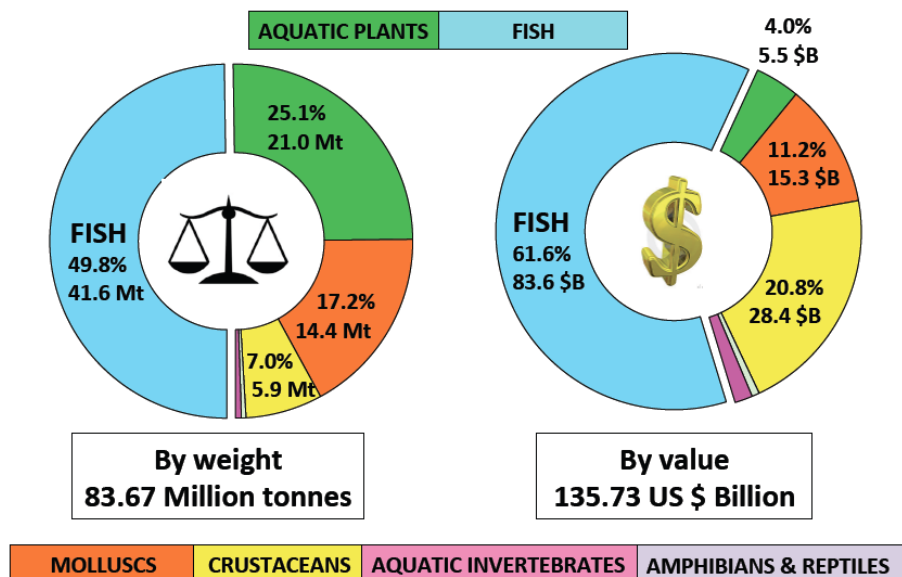


Figure 2. Total global aquaculture production by weight and value in 2011

(Source: FAO, 2013)

In terms of the major farmed species groups, finfish accounted for 41.6 million tonnes or 49.8 percent of total global aquaculture production in 2011 (valued at US \$ 83.6 billion, with over 102 reported fish species), followed by aquatic plants at 21.0 million tonnes or 25.1% of total global production (valued at US \$ 5.5 billion, with 12 reported aquatic plant species), molluscs at 14.4 million tonnes or 17.2 percent of total global production (valued at US \$ 15.3 billion, with 27 reported mollusk species), and crustaceans at 5.9 million tonnes or 7.0 percent of total global production (valued at US \$ 28.4 billion, with 15 reported crustacean species; Figure 3, FAO, 2013).

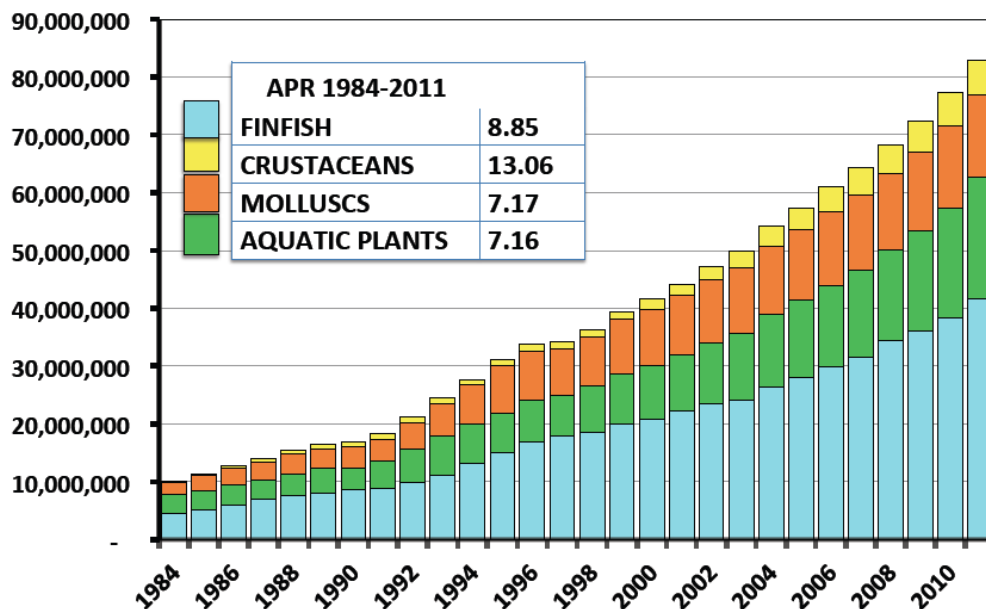


Figure 3. Growth of global aquaculture by major species group (tonnes; FAO, 2013)

By region, Asia accounted for over 91.2 percent of total global aquaculture production in 2011, followed by the Americas at 3.53 percent, Europe at 3.20 percent, Africa at 1.84 percent, and Oceania at 0.25 percent (Figure 4). Of particular note, is the fact that the growth of the aquaculture sector has been highest within the African region over the period 1984 to 2011, and that over 94 percent of global aquaculture production was realized within developing countries; the growth of the aquaculture sector within developing countries being over five times faster than that within economically developed countries (FAO, 2013).

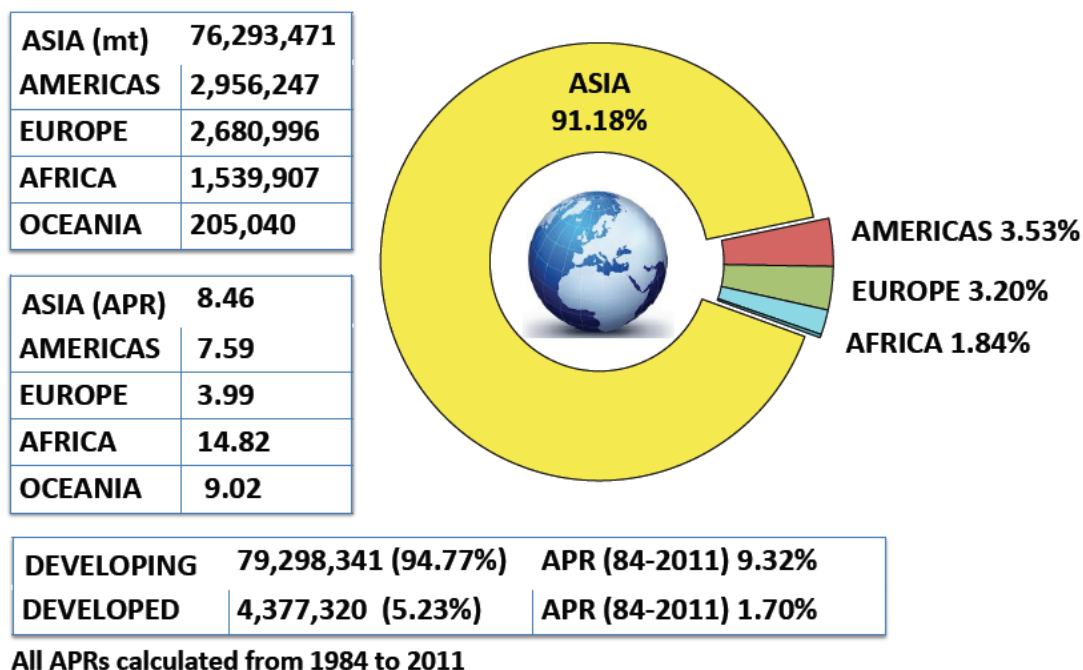


Figure 4. Global aquaculture production by region in 2011 and growth since 1984 (FAO, 2013)

China currently dominates global aquaculture production by producing over 60% of global aquaculture production by weight in 2011 (total aquaculture production reported at 50.17 million tonnes; FAO, 2013), with eight of the top ten aquaculture producing countries coming from the Asian region, including Indonesia, India, Vietnam, Philippines, Bangladesh, Korea Republic, and Thailand (Figure 5).

Of particular note is the diversity of major species groups produced by China, compared with other major producing countries, where production is concentrated on only one or two key species, including India (Finfish: Indian major carps – catla, rohu, mrigal carp), Bangladesh (Finfish: Indian major carps, Chinese carps), Norway (Finfish: salmon), and Egypt (Finfish: tilapia, grey mullet; Figure 6).

Other important aquaculture producers in 2011 included Norway (ranked 8th by weight), followed by Egypt (ranked 10th and producing 64.1% of total aquaculture production within

Tacon, A.G.J. 2013. Global Trends in Aquaculture and Feed Ingredient use in Compound Aquaculture Feeds. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 1-12.

the African region), Chile (ranked 11th and producing 32.8% of total aquaculture production within the American region), Japan (12th), Myanmar (13th) and Brazil (14th at 630,039 tonnes in 2011; Figure 7).

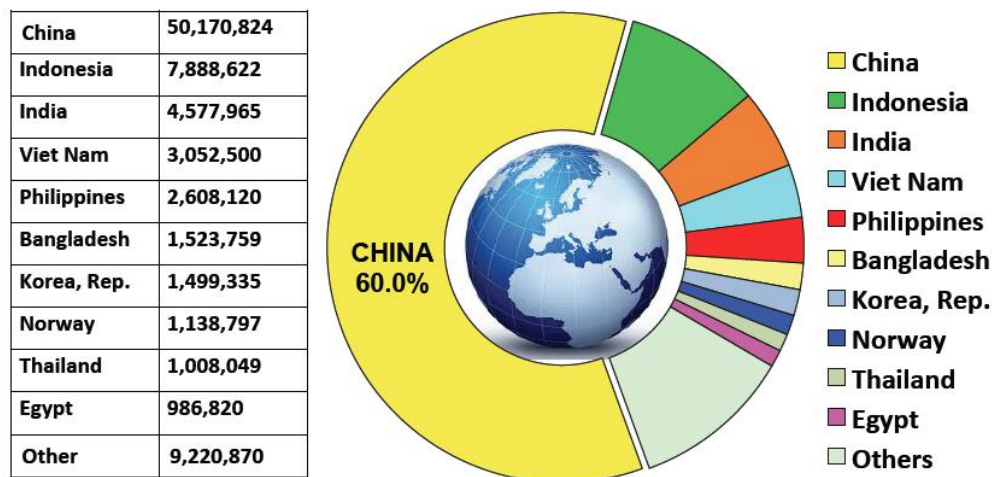


Figure 5. Top ten aquaculture producers by country in 2011 (metric tonnes; FAO, 2013)

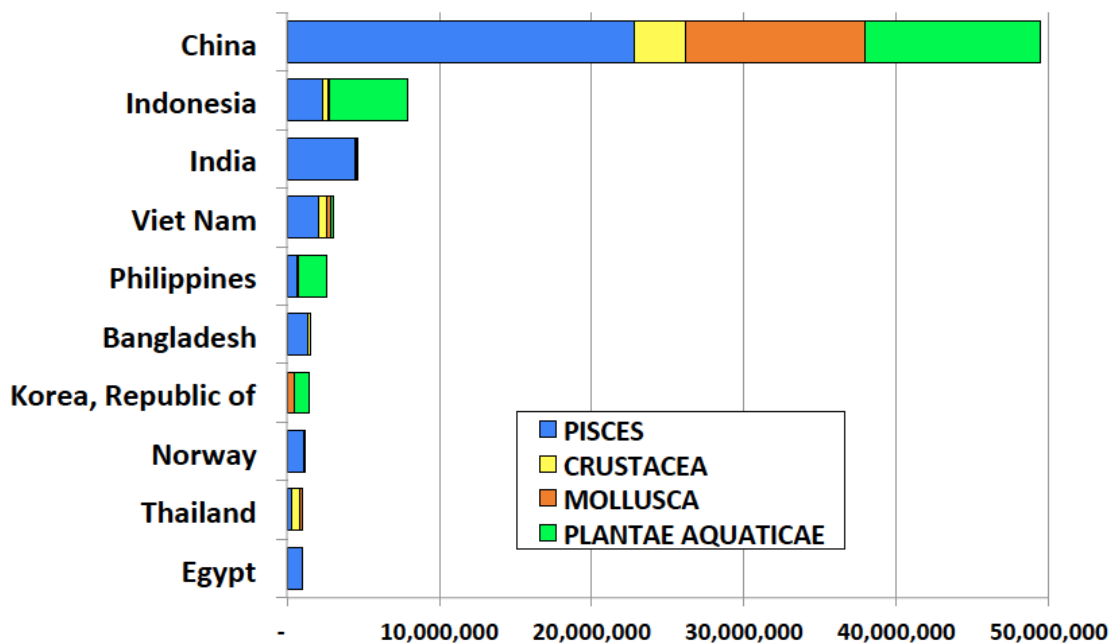


Figure 6. Major cultured species groups by top ten producing countries in 2011 (FAO, 2013)

Top 10 countries – 89.0%		Top 11-20 countries	
1 China	50,170,824 (60.0%)	11 Chile	969,539
2 Indonesia	7,888,622 (9.4%)	12 Japan	906,498
3 India	4,577,965 (5.5%)	13 Myanmar	817,112
4 Viet Nam	3,052,500 (3.6%)	14 Brazil	630,039
5 Philippines	2,608,120 (3.1%)	15 Malaysia	526,526
6 Bangladesh	1,523,759 (1.82%)	16 Korea DPR	508,350
7 Korea, Rep.	1,499,335 (1.79%)	17 USA	396,841
8 Norway	1,138,797 (1.36%)	18 Taiwan	319,245
9 Thailand	1,008,049 (1.20%)	19 Ecuador	308,900
10 Egypt	986,820	20 Spain	271,963

Figure 7. Top twenty country aquaculture producers in 2011 (metric tonnes; FAO, 2013)
 The top ten aquaculture species by major species group is shown in Figure 8, and show the current dominance of freshwater fish species and the Whiteleg shrimp in the case of finfish and crustaceans, and brown/green seaweeds and Cupped oysters in the case of aquatic plants and molluscs.

Top 10 cultured fish & shrimp		Top 10 cultured plants & molluscs	
01. Silver carp	5.35 Mt	01. Japanese kelp	5.26 Mt
02. Grass carp	4.57	02. Eucheuma seaweed	4.62
03. Common carp	3.73	03. Cupped oysters nei	3.77
04. Whiteleg shrimp	2.88	04. Aquatic plants nei	2.89
05. Nile tilapia	2.79	05. Elkhorn sea moss	2.10
06. Bighead carp	2.70	06. Wakame	1.75
07. Catla	2.41	07. Warty gracilaria	1.52
08. Crucian carp	2.30	08. Scallops nei	1.31
09. Atlantic salmon	1.72	09. Marine molluscs nei	1.05
10. Roho labeo	1.44	10. Nori nei	1.03
11. Pangas catfish nei	1.42		

Figure 8. Top ten cultured species by major species group in 2011
 (metric tonnes; FAO, 2013)

Trends in global fish and crustacean aquaculture production fed compound aquafeeds

The total production of the major finfish and crustacean species groups fed industrially compounded or farm-made aquafeeds was reported to be 40.57 million tonnes in 2011 (FAO, 2013), with total global industrial compound aquafeed production estimated at approximately 35.75 million tonnes (figure 9), with fish and crustacean aquaculture and compound aquafeed production growing at an average compound rate of 8.2% and 10.2% per year since 1995, respectively.

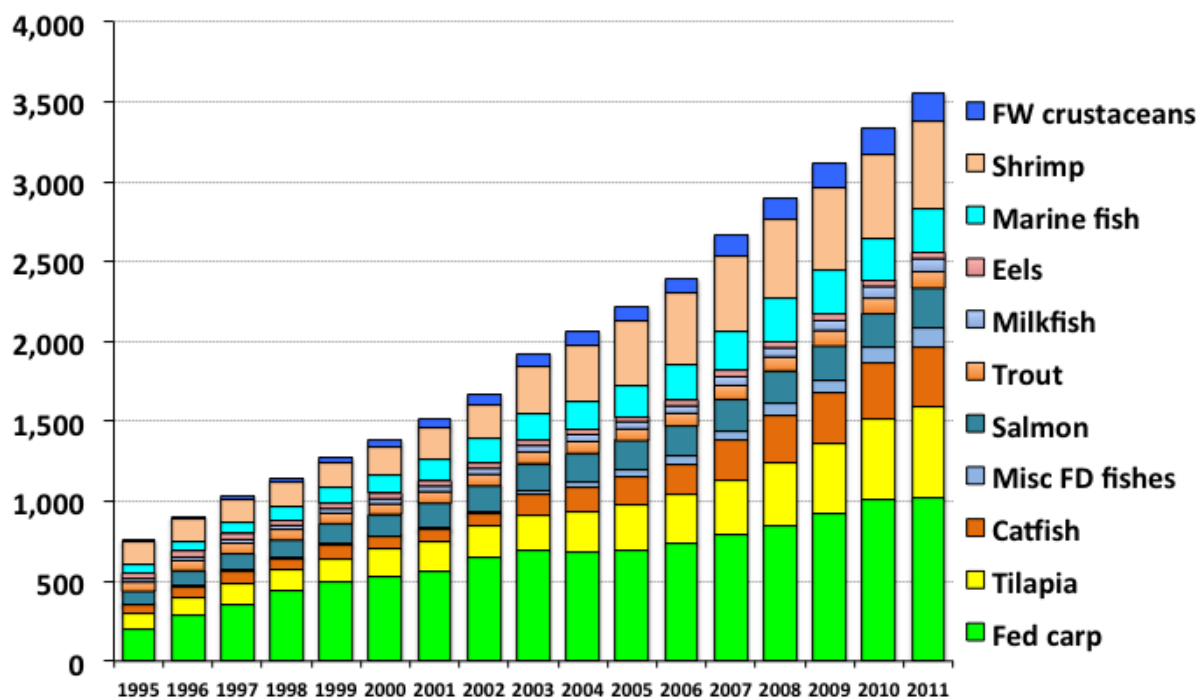


Figure 9. Estimated aquafeed production by major species group
(x 10,000 tonnes; 1995 – 2011)

The major compound feed fed species groups in 2001 included:

- **Chinese carp** at 11.76 million tonnes (excluding silver carp and big head carp) with an estimated total compound aquafeed requirement of 10.19 million tonnes;

- **Tilapia** at 3.96 million tonnes with an estimated total compound aquafeed requirement of 5.79 million tonnes or 16.2 percent of total global compound aquafeed production;
- **Shrimp** at 3.93 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 5.54 million tonnes or 15.5 percent of total global compound aquafeed production;
- **Catfish** at 3.38 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 3.70 million tonnes or 10.3 percent of total global compound aquafeed production;
- **Marine fish** at 2.01 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 2.82 million tonnes or 7.9 percent of total global compound aquafeed production;
- **Other freshwater and diadromous fish** at 1.94 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 1.24 million tonnes or 3.5 percent of total global compound aquafeed production;
- **Salmon** at 1.93 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 2.51 million tonnes or 7.0 percent of total global compound aquafeed production;
- **Freshwater crustaceans** at 1.67 million tonnes with an estimated total compound feed requirement of 1.71 million tonnes or 4.8 percent of total global compound aquafeed production;
- **Milkfish** at 891,407 tonnes with an estimated total compound feed requirement of 820,000 tonnes or 2.3 percent of total global compound aquafeed production;
- **Trout** at 791,959 tonnes with an estimated total compound feed requirement of 1.03 million tonnes or 2.9 percent of total global compound aquafeed production; and
- **Eel** at 255,284 tonnes with an estimated total compound feed requirement of 392,000 tonnes or 1.1 percent of total global compound aquafeed production in 2011.

In terms of feed ingredient usage, the compound aquafeed sector still remains the largest consumer of fishmeal and fish oil, aquaculture consuming 68% of total global fishmeal production in 2011 (major aquaculture species group consumer being crustaceans at 30 percent, followed by salmonids at 22 percent, and marine fish at 21 percent; Figure 10) and 78 percent of total global fish oil production in 2011 (major aquaculture species group consumer being salmonids at 66 percent followed by marine fish at 17 percent; Figure 11,

Dr Andrew Jackson, personal communication, The Marine Ingredients Organisation, <http://iffo.net>).

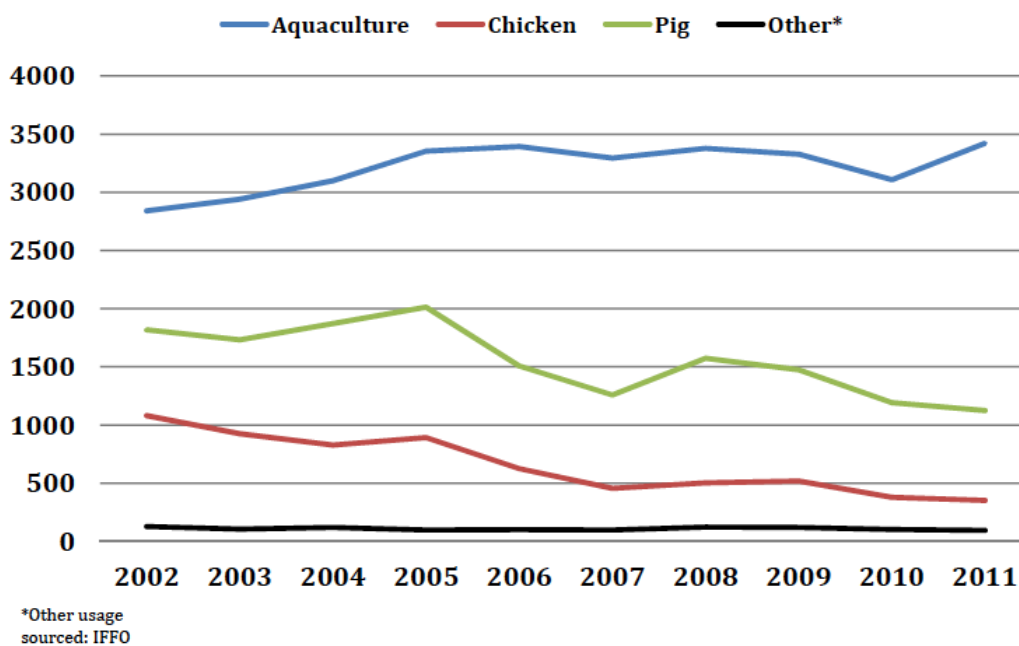


Figure 10. Major trends concerning fishmeal use by major species group (1,000 tonnes)

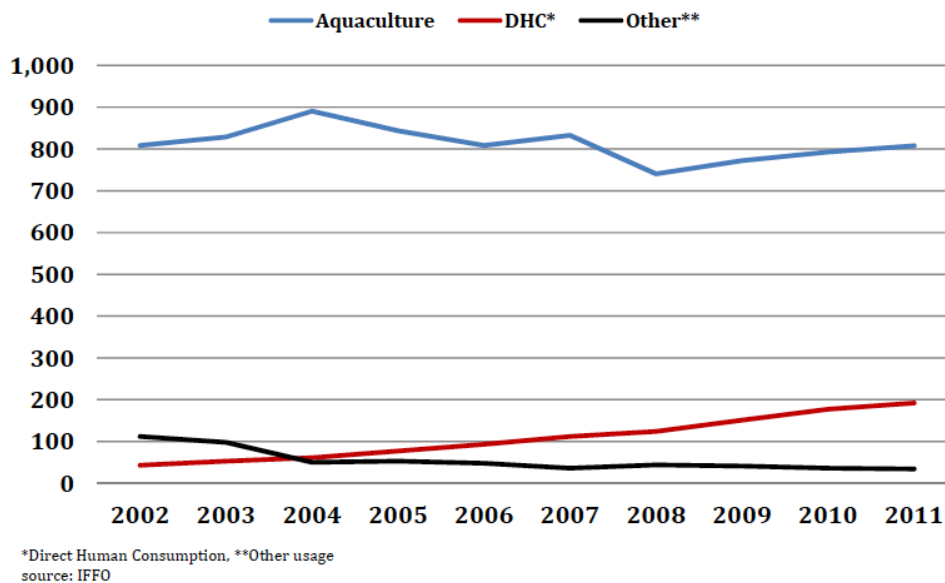


Figure 11. Major trends concerning fish oil use by major species group (1,000 tonnes)

Bibliography

FAO (2003). FAO Fisheries & Aquaculture Department, Policy and Economics Division, Statistics and Information Service, FishstatJ: a tool for fishery statistics analysis, Release 2.0.0. Universal software for fishery statistical time series. Aquaculture production: Quantities 1950–2011; Aquaculture production: Values 1984–2011.

Nutriendo el Sistema Inmune de los Peces

Camilo Pohlenz, Delbert M. Gatlin III

Department of Wildlife and Fisheries Sciences

Texas A&M University

College Station, TX 77843, USA

Teléfono: +1 (979) 847-9330 E-mail: cpohlenz@tamu.edu

Resumen

El estudio del sistema de defensa de los organismos de cultivo es de suma importancia y el entendimiento de cómo nutrir y modular los diferentes componentes del sistema inmunológico es crucial para prevenir, tratar y controlar enfermedades, asegurando así la sustentabilidad y futuro de la acuicultura. La disponibilidad adecuada de nutrientes específicos durante la respuesta inmune juega un papel fundamental en la activación y rendimiento de este sistema ante el combate a un agente invasor. En la presente revisión se proponen resultados positivos del uso de nutrientes específicos y que prometen mayor versatilidad y eficacia en la elaboración de dietas funcionales, haciéndose especial hincapié en cada una de las etapas de la respuesta inmune de los peces.

Palabras clave: Sistema inmune, inmunonutrición, nutrientes funcionales

Introducción

El posicionamiento de la acuicultura como fuente importante de proteína animal para consumo humano en la era actual es un hecho innegable. El cultivo de peces en las últimas décadas ha visto constantemente un crecimiento anual más alto que otras industrias de producción animal (FAO 2012). Aunque las enfermedades son eventos naturales en todos los grupos animales, la intensificación en las técnicas de cultivo ha llevado consigo un aumento importante en la aparición o dispersión de enfermedades infecciosas, convirtiéndose en uno de los principales constrictores del crecimiento de la industria (Klesius, Evans & Shoemaker 2004; Costello 2009). Es por ello que el estudio del sistema de defensa de los organismos de cultivo es de suma importancia y el entendimiento de cómo nutrir y modular los diferentes componentes del sistema inmunológico es crucial para prevenir, tratar y controlar enfermedades, asegurando así la sustentabilidad y futuro de la acuicultura.

Una nutrición adecuada es crítica no sólo para alcanzar niveles óptimos de crecimiento de los peces, sino también para mantener la salud de los mismos (Sealey & Gatlin 2001). Por muchos años, el estudio de la nutrición de peces se enfocó en determinar los requerimientos nutricionales mínimos de diferentes especies de cultivo. Sin embargo, el rol de la nutrición en el manejo de la salud a través de la modulación de la respuesta inmune y resistencia a enfermedades se ha convertido en un área de investigación prioritaria. Dando paso al campo de la inmunonutrición, que puede ser definida como el estudio de mejorar la función inmunológica por medio de nutrientes específicos, que pueden ser a niveles por encima de los requerimientos para un crecimiento normal (Kiron 2012; Oliva-Teles 2012).

Sistema inmune de los peces

El sistema inmune constituye un mecanismo de defensa altamente complejo que utiliza una amplia variedad de componentes individuales (Tort, Balasch & Mackenzie 2003; Bowden 2008). Los peces (teleósteos) poseen un sistema inmune similar al de los vertebrados superiores, aunque evolutivamente menos desarrollado y mucho menos comprendido

(Magnadottir 2006; Uribe, Folch, Enriquez & Moran 2011). Consta de dos grandes ramas que son el sistema inmune innato y el específico (o adaptativo). Las cuales, durante una respuesta de defensa, orquestan una comunicación extremadamente estrecha (Tort *et al.* 2003), fundamental para el éxito de erradicación y protección contra patógenos.

La respuesta inmune es un proceso que envuelve múltiples componentes celulares y humorales de ambas ramas del sistema inmune (Tabla 1), incluyendo citoquinas, proteínas plasmáticas, inmunoglobulinas, mononucleares (macrófagos y linfocitos) así como polimorfonucleares (neutrófilos) (Secombes 2008) y células dendríticas (Bassity & Clark 2012). Sin embargo, una cualidad importante en los peces, es que por el grado de desarrollo evolutivo, la respuesta innata puede llegar a poseer una mayor importancia para la eliminación de un organismo invasor (Magnadottir 2006). Y donde los macrófagos son probablemente las células más importantes en la respuesta inmune de los peces, ya que no solo producen citoquinas, sino que son las principales células comprometidas en la fagocitosis y destrucción de patógenos después del reconocimiento inicial y/o infecciones posteriores (Bayne & Gerwick 2001; Shoemaker, Klesius & Lim 2001). Aunque recientemente se ha descrito la existencia de células dendríticas en peces, la célula presentadora de antígenos por excelencia, aún faltan estudios para una caracterización funcional completa de la misma durante una respuesta inmune (Bassity & Clark 2012).

Tabla 1. Principales componentes de la respuesta inmunitaria de los peces.

Rama	Componentes Celulares	Componentes Humorales	Especificidad
Innato	Barreras físicas (mucosas)	Complemento	Moléculas compartidas por grupos de patógenos
	Macrófagos	Lisozima	
	Neutrófilos	Péptidos antimicrobianos	
	Células dendríticas*	Pentraxinas	
Adaptativo (Específico)	Linfocitos B Linfocitos T	Inhibidores de proteasas	Epítomos de antígenos específicos
		Inmunoglobulinas naturales	
		Inmunoglobulina M	
		Inmunoglobulina D	
		Inmunoglobulina Z/T**	

* Función durante la respuesta innata no está totalmente elucidada en peces. ** No presente en todas las especies.

De igual forma, cabe señalar que la diversidad de especies de peces existentes y/o en cultivo, da cabida a diferencias sustanciales entre algunos componentes importantes del sistema (Uribe *et al.* 2011). Como es el caso de los isotipos de inmunoglobulinas, donde numerosas especies, como la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), salmón del atlántico, *Salmo salar* (L.), o carpa común, *Cyprinus carpio* (L.) (Zhang, Salinas & Oriol Sunyer 2011) cuentan con tres isotipos, IgM, IgD e IgT/Z, mientras que otras, como el bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), solo dos, la IgM e IgD (Bengtén, Clem, Miller, Warr & Wilson 2006). Sin embargo, aun con estas diferencias, la respuesta a un patógeno invasor es generalmente similar en todas las especies.

Respuesta inmune y metabolismo

Existe una relación constante entre patógenos (principales u oportunistas) tratando de invadir y hospederos limitando dicha invasión. Cuando existe un desbalance en los componentes hospedero-patógeno-ambiente, se dan las condiciones adecuadas para una infección (Bowden 2008), disparando así, una respuesta de defensa (Fig. 1). Aunque la complejidad y la especificidad de las respuestas significa que los límites entre participantes están pobremente definidos, para fines de esta revisión, y en una manera general, la respuesta inmune se puede dividir en 3 etapas, 1) Señal de alerta y detección del patógeno, 2) Fagocitosis, destrucción del patógeno y presentación de antígenos, y 3) Expansión y creación de memoria inmunológica.

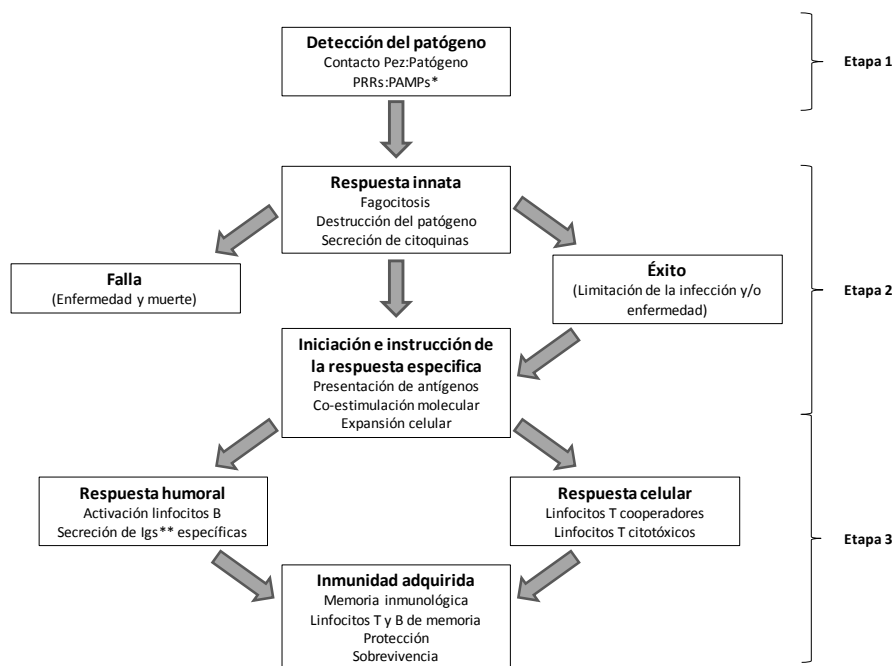


Fig. 1. Esquema general de la respuesta inmune en peces. * PRRs: receptores reconocedores de patrones, PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos. **Igs: inmunoglobulinas, son secretadas por células plasmáticas las cuales se derivan de linfocitos B activados. Modificado de (Shoemaker *et al.* 2001)

La respuesta aguda inicial a una infección (etapa 1 y 2) es probablemente la más importante para la sobrevivencia de un animal, ya que es competencia del sistema inmune innato, principalmente de los fagocitos, el detectar y activar una respuesta generalizada a la invasión de un patógeno (Bayne & Gerwick 2001; Magnadottir 2006).

La ruptura de la homeostasis y el establecimiento de un estado de defensa y/o enfermedad es un proceso metabólicamente costoso para el hospedero, donde una infección promueve un cambio completo en prioridades metabólicas hacia las necesidades asociadas a la inmunidad (Lochmiller & Deerenberg 2000). En células inmunes quiescentes, la utilización de nutrientes se da a niveles solo indispensables para el mantenimiento celular, sin embargo, durante un desafío inmunológico, la utilización de nutrientes clave por este tipo de células incrementa dramáticamente. Por ejemplo, reportes *in vivo*, sugieren que los

niveles plasmáticos de glutamina disminuyen rápidamente en peces enfermos (Walker, Keast & McBride 1996); e incluso, estudios *in vitro* señalan que la utilización del tipo de amino ácidos dependería de si la respuesta celular es fagocítica o linfocítica (Pohlenz, Buentello, Mwangi & Gatlin 2012b), o bien que un macrófago activado consume energía comparable a la que consume una célula muscular cardíaca a máxima capacidad (Newsholme & Newsholme 1989).

El establecimiento de dicho estado, no sólo puede conducir un cuadro de anorexia, sino que además moviliza las reservas de proteína y energía para soportar la fase inicial aguda de una respuesta inmune, la cual se caracteriza por un estado de hipermetabolismo (Lochmiller & Deerenberg 2000; Wang, Wang, Zhang, Ji, Song, Qiu, Zhou, Wang & Wang 2012), y para sostener la respuesta hasta la resolución de la infección (Sealey & Gatlin 2001). Un resultado típico durante este período es un balance de nitrógeno negativo, el cual puede variar dependiendo de la severidad de la infección (Midtlyng & Lillehaug 1998; Lochmiller & Deerenberg 2000; Lönnström, Rahkonen, Lundén, Pasternack, Koskela & Gröndahl 2001). Además, debido a que la mayoría de los mecanismos de defensa para combatir un patógeno requieren síntesis de proteínas, existe una demanda importante de amino ácidos para mantener dicho proceso (Lochmiller & Deerenberg 2000; Uribe *et al.* 2011; Kiron 2012). Los cual cobra vital importancia en peces, debido a que su historia natural requiere altos niveles de proteína en dieta (NRC 2011).

Bajo este planteamiento, la disponibilidad adecuada de nutrientes específicos durante este proceso hipermetabólico juega un papel fundamental en la activación y rendimiento del sistema inmune ante el combate a un agente invasor.

Nutrición del sistema inmune

La nutrición es también un componente complejo y multidimensional en este tópico, ya que el sistema inmune y la nutrición interactúan en múltiples mecanismos directos o indirectos (Sealey & Gatlin 2001; Oliva-Teles 2012). Tomando en cuenta la variabilidad entre especies antes mencionada y la falta de un entendimiento total del sistema inmune de los

teleósteos, podemos decir que existe un enorme desafío en el estudio de estas interacciones y comprensión de la inmunonutrición (Ponton, Wilson, Holmes, Cotter, Raubenheimer & Simpson 2013). De igual manera, cabe señalar que el uso de un mismo nutriente como modulador del sistema inmune puede arrojar diferentes resultados entre especies o incluso dentro de la misma especie (Dalmo & Bogwald 2008).

Las fuentes endógenas de nutrientes deberían suplir los requerimientos básicos para que el sistema inmune realice sus funciones, así como proteger tejidos de daños colaterales. Sin embargo, en situaciones especiales, proveer nutrientes adicionales a los requeridos para el crecimiento y mantenimiento normal del pez, consigue sostener o mejorar una o más funciones del sistema inmune, lo que da como resultado un mayor grado de efectividad y por lo tanto protección (Sealey & Gatlin 2001; Kiron 2012). En este contexto, existen varias herramientas nutricionales que se pueden implementar como suplementos para lograr este objetivo. A continuación se proponen resultados positivos de los compuestos, que a opinión de los autores, prometen mayor versatilidad y eficacia en la elaboración de dietas funcionales; y se hace hincapié en cada una de las etapas de la respuesta inmune de los peces mencionados anteriormente.

1) *Detección y reconocimiento de patógenos*

El sistema inmune innato reconoce y responde a una amplia variedad de microbios invasores; esto, principalmente mediante el reconocimiento de señales de alerta llamadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs), por medio de receptores reconocedores de patrones (PRRs) celulares o humorales (Tort *et al.* 2003; Abbas, Lichtman & Pillai 2012). El encuentro de dichos componentes, desata una cascada de secreción de citoquinas (Roher, Callol, Planas, Goetz & MacKenzie 2011) que tienen como fin último la activación de una respuesta inmune, incluyendo el reclutamiento de fagocitos y linfocitos, por medio de quimiotaxis, así como la activación de mecanismos de defensa antimicrobiales celulares o humorales, como el sistema del complemento (Bayne & Gerwick 2001; Abbas *et al.* 2012; Reyes-Cerpa, Maisey, Reyes-López, Toro-Ascuy, Sandino & Imarai 2012).

El proveer ciertos aditivos no digeribles en la dieta, como componentes estructurales de patógenos o productos vegetales, ya sea extractos mixtos o purificados, que sirvan como estas “señales de alerta” han probado ser eficaz en promover la respuesta inicial del sistema inmune (Dalmo & Bogwald 2008). Estudios *in vitro* han demostrado un incremento en la capacidad migratoria de leucocitos con extractos del parásito *Philasterides dicentrarchi*, en rodaballo, *Psetta máxima* (L.) (Leiro, Paramá, Arranz, Álvarez & Sanmartín 2006), y con extractos de alga marina en lenguado europeo, *Solea senegalensis* (Kaup) (Diaz-Rosales, Burmeister, Aguilera, Korbee, Morinigo, Figueroa, Chabrilion, Arijó, Lindequist & Balebona 2005). Mientras que *in vivo*, con suplementación de peptidoglicanos en lenguado del pacífico, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel) (Galindo-Villegas, Fukada, Masumoto & Hosokawa 2006) y alginato de sodio en carpa común (Fujiki & Yano 1997).

Por otro lado, este tipo de aditivos, como mananoligosacáridos, β -glucanos, polisacáridos sulfatados o nucleótidos, pueden promover la expresión y/o secreción de importantes citoquinas pro-inflamatorias y quimiotácticas en diferentes especies, como la interleucina-1beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), IL-6, IL-8, e interferón-gamma (Leiro *et al.* 2006; Dalmo & Bogwald 2008; Caipang, Lazado, Berg, Brinchmann & Kiron 2011; Roher *et al.* 2011; Lokesh, Fernandes, Korsnes, Bergh, Brinchmann & Kiron 2012; Fierro-Castro, Barrioluengo, López-Fierro, Razquin & Villena 2013; Reyes-Becerril, Guardiola, Rojas, Ascencio-Valle & Esteban 2013). Así como la expresión génica de importantes PRRs como TLR3, TLR5 and TLR9 (Fierro-Castro *et al.* 2013).

2) Incremento fagocitosis, destrucción y presentación de antígenos

La fagocitosis es la internalización de un patógeno con el propósito de destruirlo, y posteriormente, bajo ciertas condiciones, presentar sus antígenos a linfocitos. Este proceso sobreviene inmediatamente después del reconocimiento de un patógeno por parte de un macrófago o neutrófilo (incluso célula dendrítica) (Shoemaker *et al.* 2001). Los fagocitos cuentan con un set de herramientas de destrucción, dependientes o no dependientes de oxígeno, como son anión, superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, lisozima, entre otras proteasas (Secombes & Fletcher 1992; Tort *et al.* 2003; Uribe *et al.* 2011). Cabe

señalar que aunque se promueva la actividad fagocítica de una célula, no necesariamente se promueve la actividad microbicida de la misma al mismo tiempo, es por ello que es importante la evaluación de ambos parámetros para obtener un panorama completo del efecto modulador de un nutriente dado (Pohlenz *et al.* 2012b).

Ciertos amino ácidos, juegan un papel crucial en este proceso inmunológico. En bagre de canal, la suplementación *in vitro* e *in vivo* de arginina, incrementa la actividad fagocítica e índice fagocítico de macrófagos, así como la capacidad bactericida de los mismos (Buentello, Reyes-Becerril, Romero-Geraldo & Ascencio-Valle 2007; Pohlenz *et al.* 2012b). Lo anterior, posiblemente se debe a que la suplementación de arginina eleva los niveles de producción de óxido nítrico, su precursor único, en macrófagos activados (Buentello & Gatlin 1999), un potente compuesto bactericida en este tipo de células y potente modulador del citoesqueleto (Moffat, Han, Li, Peck, Jy, Ahn, Chu & Bourguignon 1996). De la misma forma, la suplementación de arginina y/o glutamina en dietas de corvina roja, *Sciaenops ocellatus* (L.) (Cheng, Buentello & Gatlin 2011), lobina rayada híbrida, *Morone chrysops* x *M. saxatilis* (Kerby) (Cheng, Gatlin & Buentello 2012), lenguado del pacífico (Galindo-Villegas *et al.* 2006) y lenguado europeo (Costas, Conceição, Dias, Novoa, Figueras & Afonso 2011), incrementa la explosión respiratoria de neutrófilos y/o macrófagos. Aún más, la suplementación de ciertos metabolitos de amino ácidos como β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB, derivado de leucina) aumentan la explosión respiratoria de neutrófilos, así como el potencial bactericida de macrófagos de trucha arcoíris (Siwicki, Morand, Fuller, Nissen, Goryczko, Ostaszewski, Kazun & Głombki 2003), mientras que poliaminas (derivadas de arginina-ornitina), por lo menos *in vitro*, aumentan la actividad fagocítica y la expresión génica de moléculas importantes para la presentación de antígenos como el complejo mayor de histocompatibilidad-I (MHC-I) y el clúster de diferenciación-8 (CD8) en leucocitos de dorada, *Sparus aurata* (L.) (Reyes-Becerril, Ascencio-Valle, Tovar-Ramirez, Meseguer & Esteban 2011).

Otra alternativa de mejorar la fagocitosis es mediante la modificación de la naturaleza física de la membrana plasmática haciéndola más “fluida” (Calder 1998), y también la alteración en la expresión de receptores envueltos en este proceso celular (Calder, Bond, Harvey,

Gordon & Newsholme 1990; Balfry & Higgs 2001), lo que también puede favorecer a la producción de compuestos antimicrobianos como anión superóxido mediante la modulación de la proteína quinasa C (Balfry & Higgs 2001). Lo anterior se ha demostrado en peces, al proveer ácidos grasos poliinsaturados, n-3 o n-6, o bien vitaminas C y E. Por mencionar algunos, en rodaballo (Roberts, Davies & Pulsford 1995), trucha arcoíris (Kiron, Fukuda, Takeuchi & Watanabe 1995), salmón del atlántico (Verlhac & Gabaudan 1994; Li, Ai, Mai, Xu & Zheng 2013), lenguado del pacífico (Galindo-Villegas *et al.* 2006), roncadador amarillo, *Larmichthys crocea* (Richardson) (Li, Ai, Mai, Xu & Zheng 2012) y dorada (Ortuño, Cuesta, Angeles Esteban & Meseguer 2001).

3) *Expansión y creación de memoria*

La destrucción y procesamiento exitoso de un patógeno invasor, ya sea infección natural o inoculada, lleva consigo la inducción de una respuesta fuerte y duradera de linfocitos de memoria. La manera en la cual la expansión clonal de linfocitos T es inducida y la dimensión de la población celular efectora generada es clave para este proceso (Secombes 2008). La capacidad de crear memoria inmunológica, recae en la activación inicial y en la expansión de linfocitos vírgenes después de presentárseles con el antígeno apropiado, estimulación por citoquinas y co-estimulación molecular a nivel membrana (Secombes 2008; Uribe *et al.* 2011). Así mismo, no obstante la producción de inmunoglobulinas específicas es un componente importante del sistema adaptativo, en peces, la correlación de protección es mínima a menos de que existan títulos circulantes altos (Thune, Hawke, Fernandez, Lawrence & Moore 1997), por lo que una buena activación de linfocitos B para su transformación en células plasmáticas efectoras o bien de memoria es necesaria.

Durante este proceso, la suplementación de nutrientes que funcionen como fuente de energía o precursores de compuestos importantes para la proliferación celular han demostrado ser una opción viable. Resultados *in vitro* demuestran que la suplementación de arginina o glutamina promueve la proliferación de linfocitos T y B de bagre de canal estimulados inespecíficamente (Pohlenz *et al.* 2012b). Igualmente, estudios *in vivo* señalan que alimentos suplementados de arginina (hasta cuatro veces el requerimientos nutricional)

o glutamina, no sólo confieren un aumento en la población de linfocitos B residentes en tejidos en peces vacunados, si no que elevan los títulos de anticuerpos específicos en peces tan pronto como los 7 d post-vacunación. Además de incrementar de manera significativa la proliferación de linfocitos de memoria (Pohlenz, Buentello, Criscitiello, Mwangi, Smith & Gatlin 2012a). Similarmente, la suplementación de HMB en trucha arcoíris promueve el índice de proliferación de ambas poblaciones de linfocitos estimulados inespecíficamente y los niveles totales de inmunoglobulinas en plasma (Siwicky *et al.* 2003). Por otra parte, la suplementación alimenticia de nucleótidos también incrementa títulos de anticuerpos vacunales o naturales y/o la respuesta mitogénica de linfocitos en tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) (Ramadan, Afifi, Moustafa & Samy 1994), salmón del atlántico (Burrells, Williams, Southgate & Wadsworth 2001), lobina rayada híbrida (Li, Lewis & Gatlin 2004) y bagre de canal (Welker, Lim, Yildirim-Aksoy & Klesius 2011).

Por último, de una forma menos entendida, la suplementación de vitaminas puede tener un efecto en la expansión linfocítica y la creación de memoria. Por ejemplo, la suplementación de vitamina C y/o E influencia la proliferación de linfocitos T y B en trucha arcoíris (Verlhac & Gabaudan 1994) o la producción de anticuerpos específicos en salmón del atlántico (Erdal, Evensen, Kaurstad, Lillehaug, Solbakken & Thorud 1991) o chano, *Chanos chanos* (Forsskal) (Azad, Dayal, Poornima & Ali 2007), mientras que en pez perico japonés, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) y perico manchado, *O. punctatus*, (Temminck & Schlegel) la suplementación con carotenoides mejoró la proliferación de linfocitos T (Tachibana, Yagi, Hara, Mishima & Tsuchimoto 1997).

Conclusión

En el presente artículo se ha tratado de plasmar y promover el uso de nutrientes específicos para modular o nutrir el sistema inmune con fin último de mejorar la sanidad y producción en peces de cultivo. El uso de dichos nutrientes se afianza como una herramienta en la elaboración de alimentos funcionales para el uso de la acuicultura y cobra vital importancia en el campo de estudio de reemplazo de harina o aceites de pescado. La gran variedad de peces de cultivo así como la falta de un conocimiento total del sistema inmune de los

mismos arroja un gran desafío en el entendimiento total de la inmunonutrición, por lo que existe un gran campo de investigación por delante en esta área, sobre todo falta definir o ajustar dosificaciones, regímenes alimenticios, tiempos de suplementación, etc. para así poder utilizar estos nutrientes de manera eficaz para beneficio de la industria.

Literatura citada

- Abbas A.K., Lichtman A.H. & Pillai S. (2012) Cellular and molecular immunology, Elsevier Saunders, Philadelphia, USA.
- Azad I.S., Dayal J.S., Poornima M. & Ali S.A. (2007) Supra dietary levels of vitamins C and E enhance antibody production and immune memory in juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal) to formalin-killed *Vibrio vulnificus*. *Fish and Shellfish Immunology* **23**, 154-163.
- Balfry S.K. & Higgs D.A. (2001) Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: *Nutrition and Fish Health* (ed. by Lim C., Webster C.D.). pp. 213-234, Food Products Press, Binghamton, N.Y.
- Bassity E. & Clark T.G. (2012) Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS ONE* **7**, e33196.
- Bayne C.J. & Gerwick L. (2001) The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 725-743.
- Bengtén E., Clem L.W., Miller N.W., Warr G.W. & Wilson M. (2006) Channel catfish immunoglobulins: Repertoire and expression. *Developmental & Comparative Immunology* **30**, 77-92.
- Bowden T.J. (2008) Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish and Shellfish Immunology* **25**, 373-383.
- Buentello J.A. & Gatlin D.M. (1999) Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. *Aquaculture* **179**, 513-521.
- Buentello J.A., Reyes-Becerril M., Romero-Geraldo M.J. & Ascencio-Valle F.J. (2007) Effects of dietary arginine on hematological parameters and innate immune function of channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* **19**, 195-203.
- Burrells C., Williams P.D., Southgate P.J. & Wadsworth S.L. (2001) Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **199**, 171-184.
- Caipang C.M.A., Lazado C.C., Berg I., Brinchmann M.F. & Kiron V. (2011) Influence of alginic acid and fucoidan on the immune responses of head kidney leukocytes in cod. *Fish Physiology and Biochemistry* **37**, 603-612.
- Calder P. (1998) n-3 Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. In: *Medicinal Fatty Acids in Inflammation* (ed by Kremer J.). pp. 1-27, Birkhäuser Basel.
- Calder P.C., Bond J.A., Harvey D.J., Gordon S. & Newsholme E.A. (1990) Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochemical Journal* **269**, 807-814.
- Cheng Z., Buentello A. & Gatlin D.M. (2011) Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* **319**, 247-252.

- Cheng Z., Gatlin D.M. & Buentello A. (2012) Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Aquaculture* **362–363**, 39-43.
- Costas B., Conceição L.E.C., Dias J., Novoa B., Figueras A. & Afonso A. (2011) Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish and Shellfish Immunology* **31**, 838-847.
- Costello M.J. (2009) The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases* **32**, 115-118.
- Dalmo R.A. & Bogwald J. (2008) Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish and Shellfish Immunology* **25**, 384-396.
- Diaz-Rosales P., Burmeister A., Aguilera J., Korbee N., Morinigo M.A., Figueroa F.L., Chabrillon M., Arijo S., Lindequist U. & Balebona M.C. (2005) Screening of algal extracts as potential stimulants of chemotaxis and respiratory burst activity of phagocytes from sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **25**, 9-19.
- Erdal J.I., Evensen Ø., Kaurstad O.K., Lillehaug A., Solbakken R. & Thorud K. (1991) Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture* **98**, 363-379.
- FAO (2012) *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Fierro-Castro C., Barrioluengo L., López-Fierro P., Razquin B.E. & Villena A.J. (2013) Fish cell cultures as in vitro models of inflammatory responses elicited by immunostimulants. Expression of regulatory genes of the innate immune response. *Fish and Shellfish Immunology* **35**, 979-987.
- Fujiki K. & Yano T. (1997) Effects of sodium alginate on the non-specific defence system of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology* **7**, 417-427.
- Galindo-Villegas J., Fukada H., Masumoto T. & Hosokawa H. (2006) Effect of dietary immunostimulants on some innate immune responses and disease resistance against *Edwardsiella tarda* infection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Science* **54**, 153-162.
- Kiron V. (2012) Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* **173**, 111-133.
- Kiron V., Fukuda H., Takeuchi T. & Watanabe T. (1995) Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **111**, 361-367.
- Klesius P.H., Evans J.J. & Shoemaker C.A. (2004) Warmwater fish vaccinology in catfish production. *Animmal Health Research Reviews* **5**, 305-311.
- Leiro J., Paramá A., Arranz J.A., Álvarez M.F. & Sanmartín M.L. (2006) Modulation by extracts of the scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* of turbot leucocyte functions and inflammatory cytokine gene expression. *Revista Ibérica de Parasitología* **66**, 55-67.

- Li P., Lewis D.H. & Gatlin D.M., 3rd (2004) Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops x Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish and Shellfish Immunology* **16**, 561-569.
- Li Q., Ai Q., Mai K., Xu W. & Zheng Y. (2012) In vitro effects of arachidonic acid on immune functions of head kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture* **330-333**, 47-53.
- Li Q., Ai Q., Mai K., Xu W. & Zheng Y. (2013) A comparative study: *In vitro* effects of EPA and DHA on immune functions of head-kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish and Shellfish Immunology* **35**, 933-940.
- Lochmiller R.L. & Deerenberg C. (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**, 87-98.
- Lokesh J., Fernandes J.M.O., Korsnes K., Bergh Ø., Brinchmann M.F. & Kiron V. (2012) Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -Glucan and challenged with *Vibrio anguillarum* *Fish and Shellfish Immunology* **33**, 626-631.
- Lönnström L.G., Rahkonen R., Lundén T., Pasternack M., Koskela J. & Gröndahl A. (2001) Protection, immune response and side-effects in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) vaccinated against vibriosis and furunculosis. *Aquaculture* **200**, 271-284.
- Magnadottir B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 137-151.
- Midtlyng P.J. & Lillehaug A. (1998) Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Diseases of Aquatic Organisms* **32**, 91-97.
- Moffat F.L., Jr., Han T., Li Z.M., Peck M.D., Jy W., Ahn Y.S., Chu A.J. & Bourguignon L.Y. (1996) Supplemental L-arginine HCl augments bacterial phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Cell Physiology* **168**, 26-33.
- Newsholme P. & Newsholme E.A. (1989) Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture. *Biochemical Journal* **261**, 211-218.
- NRC (2011) Nutrient requirements of fish and shrimp, The National Academies Press, Washington, D.C.
- Oliva-Teles A. (2012) Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases* **35**, 83-108.
- Ortuño J., Cuesta A., Angeles Esteban M. & Meseguer J. (2001) Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **79**, 167-180.
- Pohlenz C., Buentello A., Criscitiello M.F., Mwangi W., Smith R. & Gatlin D.M., 3rd (2012a) Synergies between vaccination and dietary arginine and glutamine supplementation improve the immune response of channel catfish against *Edwardsiella ictaluri*. *Fish and Shellfish Immunology* **33**, 543-551.
- Pohlenz C., Buentello A., Mwangi W. & Gatlin D.M., 3rd (2012b) Arginine and glutamine supplementation to culture media improves the performance of various channel catfish immune cells. *Fish and Shellfish Immunology* **32**, 762-768.

- Ponton F., Wilson K., Holmes A.J., Cotter S.C., Raubenheimer D. & Simpson S.J. (2013) Integrating nutrition and immunology: A new frontier. *Journal of Insect Physiology* **59**, 130-137.
- Ramadan A., Afifi N.A., Moustafa M.M. & Samy A.M. (1994) The effect of ascogen on the immune response of tilapia fish to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *Fish and Shellfish Immunology* **4**, 159-165.
- Reyes-Becerril M., Ascencio-Valle F., Tovar-Ramirez D., Meseguer J. & Esteban M.A. (2011) Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* **30**, 248-254.
- Reyes-Becerril M., Guardiola F., Rojas M., Ascencio-Valle F. & Esteban M.Á. (2013) Dietary administration of microalgae *Navicula* sp. affects immune status and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology* **35**, 883-889.
- Reyes-Cerpa S., Maisey K., Reyes-López F., Toro-Ascuy D., Sandino A.M. & Imarai M. (2012) Fish Cytokines and Immune Response. In: *New Advances and Contributions to Fish Biology* (ed Turker H.). InTech, DOI:10.5772/53504.
- Roberts M.L., Davies S.J. & Pulsford A.L. (1995) The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology* **5**, 27-38.
- Roher N., Callol A., Planas J.V., Goetz F.W. & MacKenzie S.A. (2011) Endotoxin recognition in fish results in inflammatory cytokine secretion not gene expression. *Innate Immunity* **17**, 16-28.
- Sealey W.M. & Gatlin D.M. (2001) Overview of nutritional strategies affecting the health of marine fish. In: *Nutrition and Fish Health* (ed. by Lim C., Webster C.D.). pp. 103-118, Food Products Press, Binghamton, N.Y.
- Secombes C. (2008) Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish and Shellfish Immunology* **25**, 409-416.
- Secombes C.J. & Fletcher T.C. (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* **2**, 53-71.
- Shoemaker C.A., Klesius P.H. & Lim C. (2001) Immunity and disease resistance in fish. In: *Nutrition and Fish Health* (ed. by Lim C., Webster C.D.). pp. 149-162, Food Products Press, Binghamton, N.Y.
- Siwicki A.K., Morand M., Fuller J., Nissen S., Goryczko K., Ostaszewski P., Kazun K. & Głombski E. (2003) Influence of feeding the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on the non-specific cellular and humoral defence mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology* **19**, 44-48.
- Tachibana K., Yagi M., Hara K., Mishima T. & Tsuchimoto M. (1997) Effects of feeding of β -carotene-supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae (Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*) and Spotted parrotfish (*Oplegnathus punctatus*)): preliminary trials. *Hydrobiologia* **358**, 313-316.
- Thune R.L., Hawke J.P., Fernandez D.H., Lawrence M.L. & Moore M.M. (1997) Immunization with bacterial antigens: edwardsiellosis. *Development of Biologics Standards* **90**, 125-134.
- Tort L., Balasch J. & Mackenzie S. (2003) Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* **22**, 277-286.

- Uribe C., Folch H., Enriquez R. & Moran G. (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinaria Medica* **56**, 486-503.
- Verlhac V. & Gabaudan J. (1994) Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquaculture Research* **25**, 21-36.
- Walker S.P., Keast D. & McBride S. (1996) Distribution of glutamine synthetase in the snapper (*Pagrus auratus*) and implications for the immune system. *Fish Physiology and Biochemistry* **15**, 187-194.
- Wang X., Wang L., Zhang H., Ji Q., Song L., Qiu L., Zhou Z., Wang M. & Wang L. (2012) Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure. *Fish and Shellfish Immunology* **33**, 1016-1026.
- Welker T.L., Lim C., Yildirim-Aksoy M. & Klesius P.H. (2011) Effects of dietary supplementation of a purified nucleotide mixture on immune function and disease and stress resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture Research* **42**, 1878-1889.
- Zhang Y.A., Salinas I. & Oriol Sunyer J. (2011) Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish and Shellfish Immunology* **31**, 627-634.

Resultados Preliminares del Cultivo Piloto Comercial de Pargo *Lutjanus guttatus* Criado en Laboratorio y Engordado en Jaulas Flotantes en el Noroeste Mexicano

Crisantema Hernández ^{1*} & Carlos Humberto Hernández López ²

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán.

Mazatlán, Sinaloa, México.*E-mail chernandez@ciad.mx

²Postgrado en Ciencias en Recursos Acuáticos, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa.

Resumen

Los pargos son un recurso pesquero de importancia en las zonas tropicales y subtropicales, y su pesquería está siendo explotada por encima del máximo rendimiento sostenible (Stickney, 2000). El pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*, se encuentra a lo largo de la costa del Pacífico, desde el Golfo de California hasta Perú, incluyendo las Islas Galápagos (Allen, 1985). Es una especie de gran importancia económica para la pesca artesanal a lo largo de la costa del noroeste mexicano. Debido a sus características biológicas y las características de mercado, el pargo lunarejo presenta un buen potencial para la acuicultura. Los procesos tecnológicos de su cultivo, desove, cría de larvas, producción de alevines, engorda en jaulas flotantes y su alimentación usando una dieta específica, han sido desarrollados por los esfuerzos colectivos de los investigadores del CIAD Unidad Mazatlán, mediante el apoyo de Instituciones Gubernamentales de México. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes densidades de siembra en el crecimiento y la supervivencia del pargo cultivado en jaulas flotantes en la Isla de la Piedra, Mazatlán, Sinaloa, México. Se realizó un ensayo de crecimiento de 240 días de cultivo (Febrero a Octubre de 2012), utilizando tres jaulas flotantes redondas: dos de 222 m³ (9 m de diámetro y 3.5 m de profundidad) y una de 286 m³ (9 m de diámetro y 4.5 m de profundidad), fabricadas con tubo de polietileno de alta densidad y conexiones de acero inoxidable. 39,120 juveniles de pargo producidos en la Planta piloto de peces marinos del CIAD, con un peso promedio de 14.15 ± 4.97 g fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de 9,300, 12,340 y 17,480 peces en cada jaula de cultivo con el fin de alcanzar un rendimiento de biomasa final de 15 kg/m³, 20 kg/m³ y 22 kg/m³, respectivamente. Los peces fueron alimentados dos veces al día (al amanecer y al atardecer) con una dieta específica para la especie. Los resultados mostraron que a la densidad de 20 kg/m³ se obtuvo un mayor peso final (314.69 ± 43.41 g), una tasa absoluta de crecimiento (1.3 g/día) y un factor de conversión alimenticia de 1.4; sin embargo, no mostraron diferencia significativa con la densidad de 15 kg/m³. Los peces sembrados a densidad más alta 22 kg/m³ registraron el menor peso final (244.02 ± 35.77 g). Todas las densidades

evaluadas mostraron una alta supervivencia (95 %) sin importar cambios de temperaturas (en ocasiones con descensos hasta 16°C). Estos resultados indican la viabilidad técnica del cultivo de pargo *Lutjanus guttatus* en jaulas flotantes.

Palabras claves: pargo, cultivo, jaulas flotantes, crecimiento, densidad

Abstract

The snapper family is an important fisheries resource in tropical and subtropical areas, and most snapper fisheries are being harvested at or beyond their maximum sustainable yield (Stickney 2000). The spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, is found along the Pacific coast from the Gulf of California to Peru, including the Galapagos Islands (Allen 1985). It is an economically important artisanal fishery along the northwest coast of Mexico. Due to their biological and market characteristics, spotted rose snappers exhibit good potential for aquaculture. Technology for spotted rose snapper spawning, larval rearing, fingerling production and grow cultivation in floating cages, using a specific balanced feed, have been developed by collective efforts of researchers in CIAD-Mazatlán and Mexican Government institutions. The aim of the present study was to evaluate the effect of different stocking densities on grow and survival of spotted rose snapper cultured in floating cages at Isla de la Piedra, Mazatlán, Sinaloa, México. A 240-day grow trial (February to October 2012), using three round cages: two 222 m³ (9-m diameter and 3.5 m depth) cages, and one 286 m³ (9-m diameter and 4.5 m depth) cage manufactured with high density polystyrene, galvanized steel connection, and 1" mesh polyester nets. Juveniles (39,120) from CIAD's hatchery, weighing 14.15 ± 4.97 g were randomly distributed into groups of 9,300, 12,340 and 17,480 fish into each cage in order to reach a final biomass yield of 15 kg/m³, 20 kg/m³ and 22 kg/m³, respectively. Specific grow feed, manufactured at CIAD was offered twice a day (at sunrise and sunset) at 3% of the estimated fish biomass. Results showed that 20 kg/m³ density had a final higher weight (314.69 ± 43.41 g), best absolute growth rate (1.3 g/day) and feed conversion ratio (1.4); however, there was no significant difference with the low density 15 kg/m³. Fish stocked at highest density (22 kg/m³) showed the lowest final weigh (244.02 ± 35.77 g). All tested densities showed a high survival (95%) no mattering temperatures changes (sometimes dropped by 16°C). These findings indicate the technical viability of rearing spotted rose snapper in floating cages.

Keywords: pargus, culture,, floating caches, growth, density

Introducción

El cultivo de peces marinos en jaulas flotantes ha crecido rápidamente en las últimas décadas en Asia, Europa, Australia y América Latina. En términos de producción, el cultivo de peces en jaulas marinas es cada vez más importante en el sector pesquero y acuícola mundial, teniendo para el 2008 un nivel de producción superior a las tres mil toneladas (Masser y Bridger, 2008).

A principios de 1993, en México se inician las primeras experiencias de cultivo de pargo *Lutjanus* sp en jaulas flotantes. Mediante el esfuerzo conjunto del gobierno de Sonora y la Secretaría de pesca se impulsó la creación de tecnologías para realizar el cultivo. En el 2005, se instalaron las primeras jaulas flotantes móviles, las cuales fueron diseñadas y construidas en México para el cultivo de pargo en el estado de Michoacán, sin embargo, los organismos confinados en ellas fueron capturados del medio natural.

Debido a sus características biológicas y de mercado el pargo o “snapper” en inglés, exhibe buen potencial para su cultivo. El pez se adapta fácilmente al cautiverio y la tecnología para cerrar su ciclo de vida ha sido exitosamente desarrollada en el CIAD Mazatlán como resultado del esfuerzo colectivo de un grupo de investigadores (Ibarra-Castro & Alvarez-Lajonchere, 2011).

Recientemente con la producción de juveniles de pargo en CIAD se ha suministrado para su cultivo en jaulas instaladas en los estados de Sonora, Baja California, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, considerando que los estados del Sur presentan características de cultivo idóneas para el buen crecimiento del pargo. Los resultados que se obtengan serán fundamentales para definir estrategias específicas de cultivo para las condiciones ambientales que prevalecen en cada estado.

Las condiciones ambientales que presenta Sinaloa para la producción de pargo cultivado, impulsó la instalación de la primera unidad demostrativa de jaulas flotantes múltiples. Mediante los proyectos: SAGARPA-CONACYT Clave 109673 y fondos concurrentes de la

Hernández, C. y C. Hernández. 2013. Resultados Preliminares del Cultivo Piloto Comercial de Pargo *Lutjanus guttatus* Criado en Laboratorio y Engordado en Jaulas Flotantes en el Noroeste Mexicano.. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 30-41.

CONAPESCA se iniciaron las capacitaciones de diferentes grupos de pescadores ribereños: “La Unión de Pescadores de la Isla de la Piedra” y La Sociedad Cooperativa Pescadores de Medina de Barras de Piaxtla, así como interesados del sector empresarial y la comunidad académica.

Así mismo, con la Unidad demostrativa se ha realizado la validación de alimentos para las fases de pre-engorda y engorda del pargo el cual se encuentra registrado bajo una patente de CIAD. En los últimos dos años se han hecho evaluaciones de engorda que ha permitido generar información sobre el último eslabón de la cadena productiva del pargo, procesamiento de calidad bioquímica post-mortem, vida de anaquel, y finalmente la comercialización que en su conjunto validan la factibilidad técnica del cultivo del pargo. El presente estudio, muestra resultados de la engorda de juveniles de pargo producidos en laboratorio y alimentados con un alimento específico para la especie.

Métodos generales

El estudio se realizó en La Isla de la Piedra, Mazatlán, Sinaloa, durante un periodo de ocho meses (Febrero a Octubre del 2012). En tres jaulas se distribuyeron 39,120 juveniles de pargo con un peso y longitud promedio de 14.15 ± 4.97 g y 10.8 ± 1.3 cm respectivamente. Se evaluaron tres densidades de siembra: dos jaulas con un volumen de 222 m^3 fueron sembradas con densidades a cosecha de 15 y 20 kg/m^3 y en la tercera jaula con un volumen de 286 m^3 se evaluó la densidad de 22 kg/m^3 .

Mensualmente se realizaron muestreos de longitud total (LT) y peso (g), para fines de la evaluación biológica. Los peces fueron capturados al azar por buzos con el uso de chinchorros formando una red de cerco. Para evitar que los peces se golpearan durante la operación de pesaje, los peces fueron sedados con una dosis de 0.3 ml L^{-1} de esencia de clavo. La mortalidad fue determinada mediante la recolección y conteo individual de los peces muertos tanto en superficie como de fondo.

Los pargos fueron alimentados dos veces al día (mañana y tarde) con una fórmula diseñada por el Laboratorio de nutrición de peces y crustáceos en CIAD, que contenía 50% de proteína y 15% de grasa y 45% de proteína y 12% de grasa para la etapa de pre engorda y engorda respectivamente. El alimento se proporcionó a una tasa inicial del 3% de su biomasa hasta reducirla al 1%, el ajuste se realizó de acuerdo a los muestreos mensuales. El tamaño de la partícula inicial fue de 3 mm de hundimiento lento y aumentó a 9 mm conforme al crecimiento del pez.

A la par del seguimiento biológico del cultivo, fue necesario diseñar un plan de trabajo para el seguimiento tecnológico del sistema de jaula (Tabla 1), el cual consistió en la creación de un programa de limpieza, ajustes, mantenimiento, reparación y reemplazos de piezas dañadas. Es importante señalar que la frecuencia para llevar a cabo las tareas de mantenimiento dependió del tipo de paño que se utilizó y de las características biológicas y meteorológicas del sitio de cultivo. Este plan fue ejecutado por los pescadores y contempló en términos generales la siguiente información:

Tabla 1. Plan de trabajo propuesto para el seguimiento tecnológico del cultivo de pargo lunarejo en jaulas flotantes

Componente de la jaula	Actividades a realizar	Periodicidad*
Sistema de servicios	Revisar estado físico de los soporte, herrajes y plataforma de servicios	Diario
Sistema de flotación	Revisar tubos de flotación	Diario
	Limpiar tubos de flotación	Dos veces al mes
Bolso contenedor	Revisar estado físico del bolso	Diario
	Revisar estado físico del lastre y aparejos	2 veces por semana
	Limpieza del bolso	Cuando se requiera
Sistema de amarres	Revisar estado físico de cabos de lastre	2 veces por semana
	Revisar estado físico de los tirantes	2 veces por semana
	Revisar estado físico de la línea de fondeo	2 veces por semana
	Revisar estado físico del distribuidor de carga	Diario
Sistema de anclaje	Revisar estado físico de cabos, cadenas, grilletes de líneas de anclaje y destorcedor	Dos veces por semana
		2 vez al mes
	Revisar estado físico del sistema de muertos	

Resultados y Discusión

El análisis del oxígeno mostró una fase de considerable oscilación. Las concentraciones de oxígeno menores o iguales a 3 mg L^{-1} son consideradas peligrosas para los peces, teniendo para este experimento una fluctuación entre 4.3 a 7.8 mg L^{-1} resultando un promedio de 5.9 mg L^{-1} .

La temperatura del agua es uno de los parámetros que influye directamente en el crecimiento de los organismos en donde su tolerancia depende de su comportamiento y hábitos en el medio natural. Los registros de temperatura del agua de este trabajo se encuentran dentro de los rangos óptimos para el cultivo de la especie, oscilando entre 18.8 y 31.0°C , Figura 1. Las temperaturas mínimas se registraron en los meses de febrero a marzo, las máximas se registraron en los meses de agosto y septiembre.

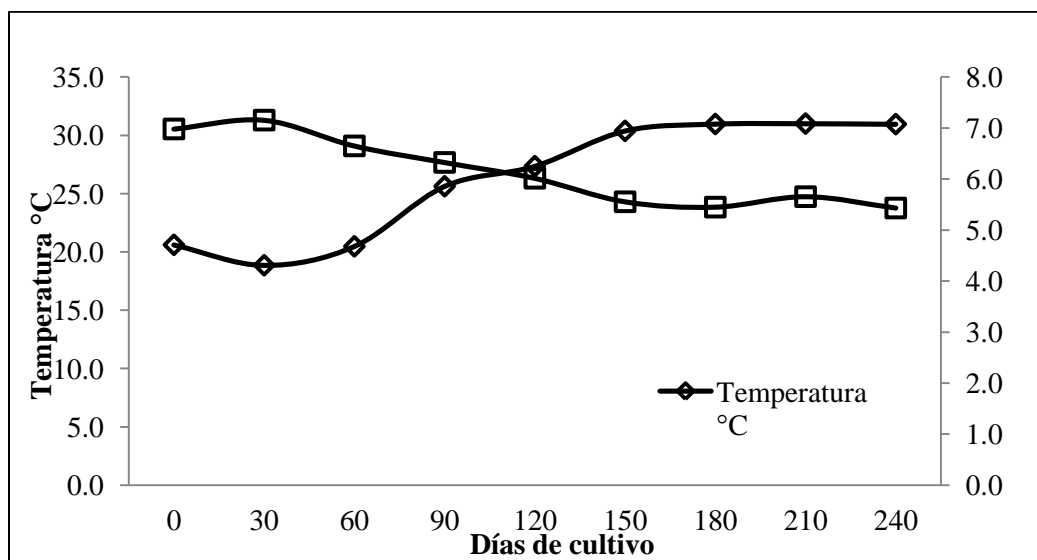


Figura 1. Fluctuación de la temperatura y oxígeno durante el periodo de cultivo

Es importante mencionar que la temperatura después del día 61 se mantuvo dentro del rango óptimo para el buen desarrollo de los peces en cultivo. No obstante, cuando se presentaron temperaturas promedio de 19.8°C durante la fase de pre-engorda, la ganancia en peso de los organismos fue considerablemente baja (Figura 2).

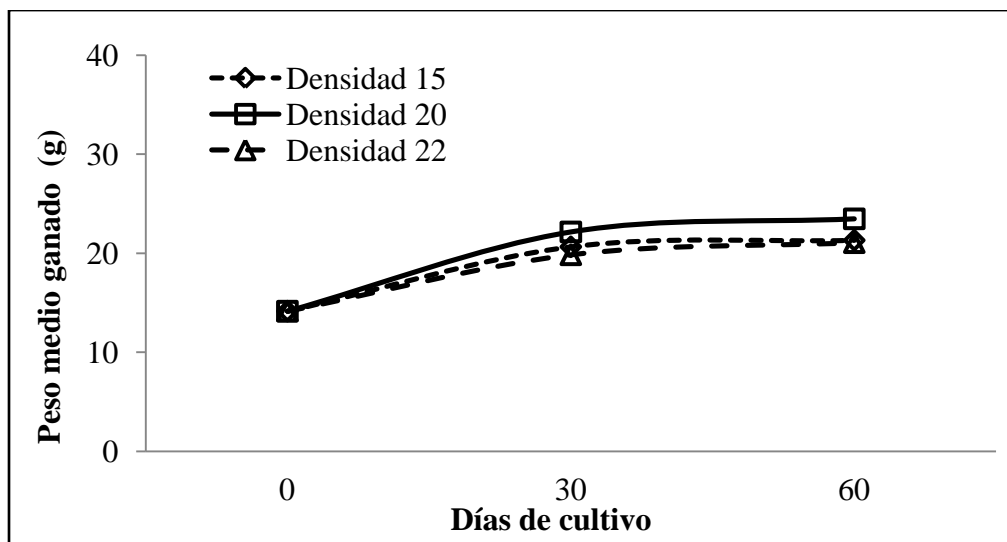


Figura 2. Peso ganado de juveniles de pargo cultivado en jaulas a temperaturas medias de 19.8 °C.

Diversos autores reportan que la temperatura promedio óptima de cultivo para el pargo es de 24-30°C (Avilés-Quevedo, 2005; Castillo-Vargasmachuca, 2007 y Ángel-Pérez, 2011). Por lo cual podemos decir que áreas donde la temperatura es superior a 25°C, pueden ser considerados como sitios potenciales para establecer el cultivo de pargo en jaulas.

Crecimiento y supervivencia de los peces

Los peces sembrados con densidad baja de 15 kg/m³ mostraron un incremento en peso de 299.3 g en un periodo de 240 días. Se registró una tasa de crecimiento específico (TCE) de 1.3% d⁻¹ y un factor de conversión alimenticia (FCA) de 1.4. Para la densidad media de 20 kg/m³ los peces crecieron 300.5 g, alcanzando un peso final de 314.7 g. Se logró una TCE de 1.3% d⁻¹ y un FCA de 1.5. Para la densidad alta de 22 kg/m³ los peces tuvieron una ganancia en peso de 229.9 g, alcanzaron un peso promedio 244.02 g, una TCE de 1.2% d⁻¹ y un FCA de 1.1. Todos los tratamientos mostraron una supervivencia del 95%.

Después de 240 días de cultivo, al comparar el crecimiento respecto a las tres densidades de siembra, se observó que el incremento porcentual en peso promedio fue mayor para la baja 15 kg/m³ y media densidad de 20 kg/m³. El crecimiento de la mayor densidad de 22 kg/m³

evaluada mostró el más bajo desempeño. Sin embargo, al inicio del cultivo (hasta el día 60) los tres lotes presentaron un crecimiento bajo, observándose un crecimiento compensatorio con el incremento de la temperatura y un patrón ascendente hasta el final del periodo aquí reportado. Por lo tanto, al final del cultivo no se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) para las densidades de 15 y 20 kg/m^3 (Figura 3), sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las densidades 15 y 20 kg/m^3 con respecto a la densidad de 22 kg/m^3 .

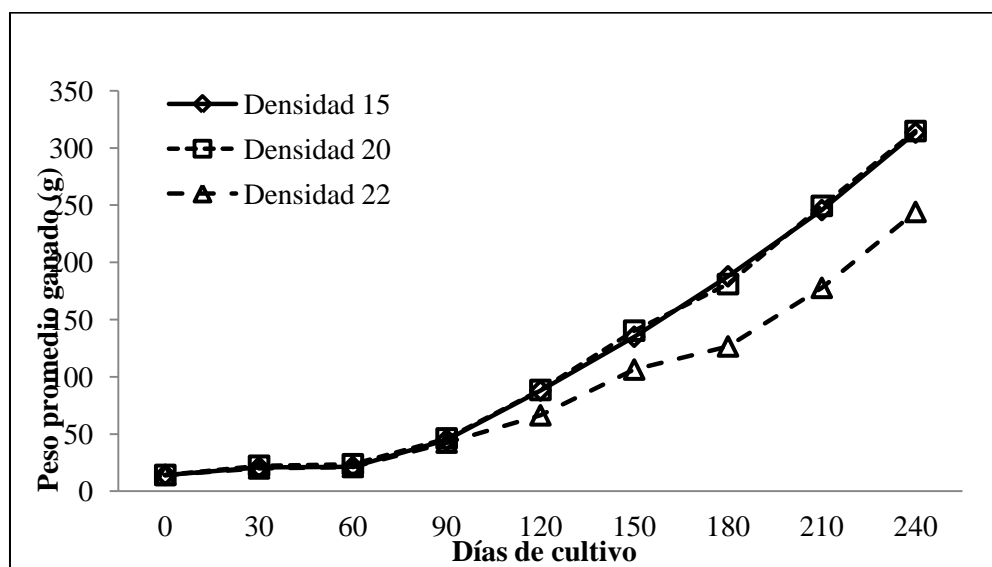


Figura 3. Tasa de crecimiento del pargo *Lutjanus guttatus* cultivado a diferentes densidades en jaulas flotantes por un periodo de 240 días.

La Tabla 2 presenta los parámetros de producción tales como: biomasa, tasa de crecimiento, factor de conversión de alimento y supervivencia. Los organismos de la jaula con mayor densidad tuvieron un menor crecimiento en longitud al final del experimento que los organismos de las jaulas con menores densidades.

Al término de los 240 días de cultivo los organismos de la jaula con mayor densidad (22 kg/m^3) tuvieron un peso significativamente menor que los de las densidades de 15 y 20 kg/m^3 . Los organismos de las jaulas de alta densidad crecieron 22% menos que los otros

tratamientos. La velocidad de crecimiento en peso más rápida de la especie se registró de 180 a 250 g en un periodo de 210 días de cultivo.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de juveniles de laboratorio de pargo lunarejo cultivado en jaulas flotantes.

Parámetros de medición	Densidades de cultivo		
	15 kg/m ³	20kg/m ³	22kg/m ³
Peso inicial (g)	14.1 ± 4.9	14.1 ± 4.9	14.1 ± 4.9
Peso final (g)	313.4 ± 41.0 ^a	314.6 ± 43.4 ^a	244.0 ± 35.7 ^b
Longitud inicial (cm)	10.8 ± 1.2	10.8 ± 1.2	10.8 ± 1.2
Longitud final (cm)	25.1 ± 1.3	25.4 ± 1.3	23.2 ± 1.4
Ganancia en peso (g)	299.33	300.54	229.87
Biomasa inicial (kg)	131.6	174.6	247.3
Biomasa final (kg)	2,768.7	3,689.1	4,052.2
Supervivencia (%)	95	95	95
FCA	1.4	1.4	1.1
TCE (% día ⁻¹)	1.3	1.3	1.2

La tasa de crecimiento específica (TCE) fue menor en la jaula con alta densidad (22 kg/m²). El factor de conversión alimenticia fue similar en las tres densidades. Con respecto a la supervivencia no se encontraron diferencias entre las tres densidades de cultivo evaluadas. Resultados similares fueron obtenidos por Castillo-Vargasmachuca (2007) para la engorda de pargo de origen silvestre en jaulas a densidades de 5,10 y 15 kg/m³.

Conclusiones

Las mortalidades registradas (5%) fueron consideradas como mínimas y aceptables debido a que se encuentran dentro de los rangos reportados para la especie en México (5%-25% y 2% por Avilés-Quevedo (2005), Castillo-Vargasmachuca (2007) y Ángel-Pérez (2011) respectivamente, en Colombia han reportados similares valores (Botero *et al.*, 2002; Benetti *et al.*, 2002). Los resultados de crecimiento registrados en este trabajo utilizando juveniles producidos en laboratorio y densidades a escala piloto-comercial no evaluadas anteriormente, son aceptables en comparación con lo reportado para el cultivo de pargo

Hernández, C. y C. Hernández. 2013. Resultados Preliminares del Cultivo Piloto Comercial de Pargo *Lutjanus guttatus* Criado en Laboratorio y Engordado en Jaulas Flotantes en el Noroeste Mexicano.. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds). Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 30-41.

capturados del medio silvestre y confinado en jaulas. Lo que demuestra la factibilidad técnica al intensificar el cultivo de la especie en jaulas flotantes.

Tomando en cuenta los avances del dominio tecnológico de la producción de semilla, rápido crecimiento, adaptación al cautiverio, aceptación de alimento formulado (actualmente patentado por CIAD) y un precio alto en los mercados nacionales y locales, se concluye que el pargo lunarejo presenta importantes ventajas como especie potencialmente candidata para su cultivo comercial en jaulas manejando densidades de cosecha de 15 y 20 kg/m³.

Finalmente es importante destacar que este tipo de cultivos, han despertado gran interés del sector pesquero, por lo tanto, es necesario conjuntar acciones y formalizar acuerdos entre los sectores pesquero, gobierno y academia para impulsar el desarrollo de la actividad en México, con el fin de favorecer el desarrollo económico y la diversificación del sector pesquero y acuícola del país.

Agradecimientos

Los resultados preliminares sobre el cultivo piloto comercial del pargo con el uso de jaulas flotantes en la costa de Sinaloa presentados en este escrito fueron posibles gracias al financiamiento de proyectos SAGARPA-CONACYT Proyecto clave 109673, FORDECYT clave: 147325 y fondos concurrentes por parte de la CONAPESCA. Un reconocimiento al Biólogo Alan de Jesús González, Biol. Blanca González y Biol. Patricia Domínguez por el apoyo técnico brindado en el presente trabajo.

Así mismo, al grupo de pescadores de la Unión de Pescadores de la Isla de la Piedra por su colaboración en esta Investigación.

Referencias

- Allen, G.R. (1985) FAO species catalogue. Vol. 6. Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue of lutjanidae species known to date. FAO Fish Synop, 125, 208.
- Ángel, P.C. (2011). Crecimiento y supervivencia de *Lutjanus colorado* (Jordan y Gilbert, 1882) en jaulas flotantes a dos densidades de siembra. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 89 pp.
- Avilés-Quevedo. (2005). Engorda de pargo en jaulas flotantes. Memorias de la Segunda Reunión Nacional de la Red de Cultivo de Peces Marinos. 2do. Foro Internacional de Acuicultura. Un encuentro con la Biotecnología. 73-79 pp.
- Benetti, D., Matera, J.A., Stevens, O.M., Alarcón, J.F., Feeley, M.W., Rotman, F.J. Minemoto, Y., Banner, S.G., Fanke, J., Scott, Z. and Eldridge, L. (2002). Growth, Survival, and Feed Conversion Rates of Hatchery-Reared Mutton Snapper *Lutjanus analis* Cultured in Floating Net Cages. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33(3):349-357.
- Botero, J., y Ospina, J.F. (2002). Crecimiento de juveniles de pargo palmero *Lutjanus analis* (Civier) en jaulas flotantes en Islas del Rosario, Caribe Colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras, 31: 205-217 pp.
- Castillo-Vargasmachuca, S. G. (2007). Investigación y desarrollo de tecnologías para el maricultivo en jaulas flotantes de Lutjanidos en San Blas, Nayarit. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias. Universidad Autónoma de Nayarit. 181 pp.
- Ibarra-Castro, L. & Alvarez-Lajonchere, L. (2011) GnRHα induced multiple spawns and voluntary spawning of captive spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) at Mazatlan, Mexico. *J. World Aquacult. Soc.*, 42, 564–574.
- Masser – M.P. y Bridger – C.J. (2008). Estudio de la acuicultura en jaulas: América del Norte. En: M. Halwart, D. Soto y J.R. Arthur (Eds). Acuicultura en jaulas – Estudios regionales y panorama mundial. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 498. Roma, FAO. 2008. Pp. 107 – 131.
- Stickney, R.R. (2000) Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.

Animal Co-product Hydrolysates: a Source of Key Molecules in Aquaculture Feeds

Sergio F. Nates, Victor Suresh and Kent Swisher
ALAPRE¹, Costa Rica, United Research Pte. Ltd.², Singapore,
National Renderers Association³, U.S.A.
E-mail: sergionates@alapre.org

Abstract

Changes in production technology and marketing and changes in feed ingredients are key structural transformations necessary for the aquaculture sector to grow. Today, with improved genetic techniques novel genetic lines are being bred for maximum efficiency over a shorter production period with lower feed conversions. Thus, the correct amount of micro-nutrients present in their diet is crucial. Fishmeal has always been the main source and the preferred choice of nutritionists for quality protein, above all in the formulation and especially in feeds for the youngest ages. Though, with the market volatility of fishmeal, the aquaculture feed industry is looking for cheaper sources of protein to substitute the fishmeal and this has become a priority. Additional renewable and sustainable protein alternatives are needed. Animal byproducts are well accepted as aqua feed ingredients these days due to short supplies and escalating cost of fishmeal. Protein content in animal byproducts is higher and their complement of indispensable amino acids is superior to those of plant origin. In addition, animal Co-Product Hydrolysates (ACPH) can meet the many nutritional needs of aquaculture worldwide as a protein alternative in aqua feeds. ACPH's can help reduce pressure on natural fisheries stocks and provide sustainability to the growing demand for aquatic products.

Keywords: *co-products, feeds, ingredients*

Introduction

Changes in production technology and marketing and changes in feed ingredients are key structural transformations necessary for the aquaculture sector to grow. Today, with improved genetic techniques novel genetic lines are being bred for maximum efficiency over a shorter production period with lower feed conversions. Thus, the correct amount of micro-nutrients present in their diet is crucial. On the other hand, the rapid growth of aquaculture worldwide has become increasingly dependent upon the use of external feed inputs, and in particular upon the use of compound aquafeeds. Pressures to reduce fishmeal consumption for sustainability reasons, combined with economic reasons, require intensive research efforts to find candidates for fish meal replacement. However, formulating low fish meal aquaculture feeds requires the use of combinations of several ingredients since most feedstuffs have been shown to have significant nutrient and functional limitations and cannot be used individually at very high levels in the diets of most aquaculture species. Fishmeal has always been the main source and the preferred choice of nutritionists for quality protein, above all in the formulation and especially in feeds for the youngest ages. Though, with the market volatility of fishmeal, the aquaculture feed industry is looking for cheaper sources of protein to substitute the fishmeal and this has become a priority. Additional renewable and sustainable protein alternatives are needed. Animal byproducts are well accepted as aqua feed ingredients these days due to short supplies and escalating cost of fishmeal. Protein content in animal byproducts is higher and their complement of indispensable amino acids is superior to those of plant origin. In addition, animal Co-Product Hydrolysates (ACPH) can meet the many nutritional needs of aquaculture worldwide as a protein alternative in aquafeeds. ACPH's can help reduce pressure on natural fisheries stocks and provide sustainability to the growing demand for aquatic products.

Methods

Animal Co-Product Hydrolysates result from controlled enzymatic digestion of byproducts from the meat processing industry. Technically, it is feasible to generate ACPH from most

kinds of slaughterhouse waste such as scrape meat, offal, feathers, and blood as well as from rendered animal byproducts such as meat and bone meal, poultry meal, feather, and blood meal. Protein materials are partially defatted by hexane extraction prior to hydrolysis. Hydrolysis is conducted in a thermostat reaction vessel with constant stirring adequate to prevent the settling of the substrate in the vessel. Alkaline hydrolysates are produced with 0.1 g CaOH/g substrate, at 85 °C. During enzymatic hydrolysis, pH is monitored continuously and maintained through the addition of 8M NaOH. Alkaline hydrolysis reactions are terminated by sparging with CO₂ until the pH drops to 9, followed by neutralization with sulfuric acid. Enzymatic reactions can also be terminated by raising the reaction temperature to 90 °C for 10 minutes. Residual solid material is removed by centrifugation followed by filtration. To test the antioxidant activities of ACPH's, two hydrolysis methods have been adopted (Kalambura *et al.*, 2008), including the alkaline hydrolysis by a strong base and an enzymatic hydrolysis by a commercial enzyme protease at a specific pH condition. Most results have showed that alkaline hydrolysis produced better antioxidant hydrolysates than the enzymatic hydrolysis (Bo Li, F. *et al.* 2007 y Jingbo, L. *et al.*, 2010).

Results and Discussion

Hydrolysis improves the nutritive value of feed ingredients that are produced from slaughterhouse waste (Table 1). Enzymatic digestion of the raw material breaks the protein chains into peptides that are better absorbed in the gut. Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases shows the feasibility of hydrolyzing poultry by-products so significant amounts of short-chain peptides and free amino acids can be produced. High levels of digestible protein characterize poultry protein hydrolysates with a digestibility index above 95%. Feather hydrolysates produced by bacterial keratinases have been tested as additives in aquaculture feeds and several species of bacteria with high keratinolytic activity has been isolated from feather meal broth. In recent studies, it has been established that pepsin digestibility and amino acid content of fermented feather meal (FFM) can be far better than those of commercial feather meal. The microbial cells could also potentially supply carotenoid pigments to FFM, whereby the ingredient may be useful

in animal feeding not just as a source of protein but also that of pigments. The short-chain peptides and free amino acids produced as a result of hydrolysis along with nucleotides that are rich in meats confer excellent attractability and palatability properties to ACPH. Poultry liver hydrolysates have been added to animal feeds at levels as high as 6% and have been found to enhance palatability. Spray-dried hydrolysates produced from poultry byproduct meal can contain up to 70% protein with compounds that have molecular weights ranging from 5,800 to 12,000 Da. We have found that inosine is the dominant nucleoside in poultry meal, a molecule that is believed to enhance diet attractability in several fish species, including largemouth bass, turbot and mackerel. Among monophosphate forms, adenosine monophosphate (AMP) dominated and similar trends have been seen in fishmeal hydrolysates. It is known that alkali-hydrolysates and enzyme-hydrolysates from meat and bone meal, blood meal and feather meal have similar ash and protein content as the parent materials, but with concomitant liberation of bioactive peptides that are encoded within the protein. It has been demonstrated that ACPH prepared under alkaline hydrolysis can be a source of antioxidants with activities comparable to BHT. Results from previous studies have also shown the presence of antioxidant, carnosine, a histidine containing dipeptide, in poultry byproducts (Manhiani, P. 2011 y Manhiani, P. *et al.*, 2013). Carnosine levels in poultry products ranged from 0.95-102.3 mg/g (wet basis) (Table 2). Carnosine levels in Meat and Bone meal ranged from 500 to 1,800 ppm, while in fishmeal they can be as low as 5 ppm. Soy and other plant proteins don't contain carnosine. The results of adding carnosine on growth performance of Nile tilapia showed that the body weight and body length of tilapia in the group supplemented with carnosine were higher than that in the control group, and diets supplemented with carnosine could increase the levels of GH, IGF-1 and T₃ in their serum indicating that diets supplemented with carnosine could improve antioxidation in muscle. Anti-microbial peptides have also been identified in PBM and FeM hydrolysates. These include cysteine rich antimicrobial peptides. Other potential molecules that can be found in cattle, chickens and turkeys include "Galanin", which has previously been reported to elicit feeding in satiated animals, and "Defensins" that show antimicrobial activity against bacteria and fungi, but at this point we don't know if these molecules are being present in animal by-products. Compared with fishmeal, dried porcine blood co-products and bone protein hydrolysates are poor in methionine and lysine (Sun, Q.

and H. Shen, 2011). However, blood by-products are rich in microelements, which can improve Ca and Cu retention in aquaculture species, especially shrimp in which it has been reported that inadequate supplementary dietary copper level can result in significant growth depression. Porcine plasma hydrolysates are also effective inhibitors of lipid oxidation as well as metal chelating and reducing agents.

Table 1. Effect of hydrolysis on animal byproducts

Effect of hydrolysis	Resulting benefit
Digestion of protein	Improved digestibility, absorption and assimilation of peptides
Increase in the proportion of low molecular compounds like short-chain peptides, free amino acids and nucleotides	Enhanced attractability and palatability
Production of bioactive peptides	Antioxidant and anti-microbial activities

Table 2. Carnosine levels in different tissues of stress and non-stress broilers
(from Manhiani, 2011)

Organ	Treatment	Calcium content ppm	p-value	Carnosine Content (wb) ^{2,3}	p-value	Carnosine Content (db)	p-value
Breast	Non-stress	6.74±0.07 ^a	P=0.001	1.85±0.24 ^{1, a}	P=0.005	7.52±0.97 ^a	P=0.0005
	Stress	11.03±0.13 ^b		17.39±1.33 ^b		70.89±5.39 ^b	
Thigh	Non-stress	10.50±0.37 ^a	P=0.006	11.10±1.02 ^a	P=0.001	44.47±4.08 ^a	P=0.002
	Stress	13.99±0.19 ^b		21.25±1.25 ^b		85.12±5.01 ^b	
Brain	Non-stress	8.48±0.38 ^a	P=0.002	10.16±1.53 ^a	P=0.82	45.44±12.37 ^a	P=0.54
	Stress	13.78±0.24 ^b		10.27±2.77 ^a		55.12±14.88 ^a	

1. All values are in Mean± S.E.M (N=5)

2. wb= wet basis; db= dry basis

3. Carnosine content is expressed in mg/gm of the original sample.

4. Fisher's Least Significant Difference Test was used to compare mean values; ^{a-b} similar letters indicate that the means values are not significantly different ($p \geq 0.05$); while different letters indicate that the mean values are significantly different ($p \leq 0.05$).

Conclusions

While we need to keep in mind the ability of bioactive peptides and nutraceuticals to exert a physiological effect *in vivo*, these examples of key molecules found in animal by-product hydrolysates show the potential for use as functional ingredients in aquaculture feeds.

References

1. Kalambara S., Krička T., Jurišić V. and Z. Janječić (2008) Alkaline hydrolysis of animal waste as pretreatment in production of fermented fertilizers. *Journal Cereal Research Communications* 36(5):179-182.
2. Bo Li, F. Chen, X. Wang, B. Ji, and Yonnie W. (2007) Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 102:1135-1143.
3. Jingbo L., Zhipeng Y., W Zhao, S. Lin, E. Wang, Y. Zhang, H. Hao, Z. Wang, and Feng C. (2010) Isolation and identification of angiotension-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 122:1159-1163.
4. Manhiani P. S. (2011) Carnosine content and antioxidant activity from poultry co-products, proetin meal and stressed poultry tissues. P.h.D. Dissertation, Clemson University. 179 pp.
5. Manhiani P.S., Northcult J.K., Bridges W.C. and Dawson Pl.L. (2013) Antioxidant activity of carnosine extracted from various poultry tissues. *Poultry Science* 92(2): 444-453.
6. Sun, Q. and H. Shen (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology* 48(1): 53-60.

Fuentes de Proteína Alternativas para Dietas de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

Luis Héctor Hernández Hernández y Mario Alfredo Fernández Araiza

Laboratorio de Producción Acuícola (Acuario), Facultad de Estudios Superiores Iztacala
UNAM, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, C.P.
54090. Tel. y fax (55) 5623 1197, E-mail: luish3@yahoo.com

Resumen

El crecimiento y la intensificación de la acuicultura en los últimos años ha impulsado la investigación en el uso de ingredientes alternativos a la harina y aceite de pescado en dietas balanceadas. El cultivo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) no es ajeno a esta tendencia y el presente trabajo presenta una revisión de los resultados obtenidos durante los últimos años en el Laboratorio de Producción Acuícola de la UNAM FES Iztacala en el desarrollo de dietas con fuentes de proteína de origen vegetal para esta especie y sus efectos en el crecimiento y excreción de P.

Palabras clave: *proteínas alternativas, trucha, dietas*

Introducción

La Acuicultura es la actividad productora de alimento que más ha crecido en los últimos años, con una tasa de crecimiento promedio anual de 6.3%, pasando de 34.6 millones de toneladas producidas en 2001 a 59.9 millones para el 2010 y representa el 40% del total de productos pesqueros (FAO 2012). En México la producción acuícola presenta una tendencia similar, ya que el crecimiento de la producción pesquera nacional se ha asociado a una mayor producción por cultivo en los últimos años y que en 2011, representó el 15.83% del total (CONAPESCA-SAGARPA 2011).

Gran parte de este crecimiento de la producción se debe a la implementación de prácticas intensivas de cultivo, lo que ha sido acompañado por un aumento en la demanda de alimentos balanceados (Gatlin *et al.* 2007). La mayor parte de estas dietas comerciales tienen como ingredientes principales a la harina y el aceite de pescado (fuentes de proteína y lípidos, respectivamente), los cuales han alcanzado un límite máximo de explotación y producción. Así mismo, la FAO (2007) ha asociado diversos efectos ambientales al uso intensivo de las dietas balanceadas:

- Enriquecimiento de productos orgánicos de las aguas de los estanques de cultivo, creando sedimentos anóxicos.
- Cambios en las comunidades del bentos.
- Eutrofización de lagos y zonas costeras cercanas de donde se encuentran las granjas.

Bajo esta perspectiva, la acuicultura no podrá ser una actividad productiva sustentable si depende exclusivamente de materias primas de origen marino (Hardy 2010) y enfrenta el reto de identificar nuevos ingredientes para sustituir la harina y el aceite de pescado en las dietas balanceadas comerciales. Particularmente en el caso de la harina de pescado, se considera que los sustitutos deben de ser abundantes, baratos y que su demanda no compita con el consumo directo por el ser humano. Así mismo, y desde el punto de vista ambiental,

los ingredientes deben de tener una alta tasa de digestibilidad, una cantidad limitada de P y que este tenga una alta bio-disponibilidad.

Las dietas para organismos acuáticos con harinas de origen vegetal han demostrado que pueden soportar el crecimiento como las dietas normales con harina de pescado. Por ejemplo, McCallum *et al.* (2000) reportan que la harina de arvejón puede utilizarse como fuente de proteína para dietas de trucha *Oncorhynchus mykiss*. Lee *et al.* (2006) reportaron truchas alimentadas por 3 años con una dieta con sustitución de harina de pescado por harina de semilla de algodón en 100% en la dieta no afectó el crecimiento de machos y hembras, el potencial reproductivo de machos y que puede ser consumida de forma segura. Thiessen *et al.* (2004) reportaron que la sustitución de harinas de pescado por harina de grano de canola sin ácido fítico no afectó el crecimiento y que esta harina de canola puede ser utilizada en dietas comerciales. Sajjadi y Carter (2004) encontraron que la adición de fitasa a dietas de salmón del Atlántico *Salmo salar*, mejoró la digestibilidad de proteína cuando se adicionó ácido fítico, un compuesto anti nutricional, a las dietas. Drew *et al.* (2005) reportan que la adición de proteasa comercial mejoró la digestión de proteína de harinas de canola y arvejón, así como de la eficiencia del alimento. Hemre *et al.* (2005) reportaron que el uso de harina de soya normal y genéticamente modificada en dietas de salmón del Atlántico no afectó el crecimiento, composición proximal del cuerpo y química de la sangre, comparando con una dieta con harina de pescado.

Así mismo, se ha demostrado que el uso de las harinas de origen vegetal influye positivamente en la utilización del P y que por tanto, haya una menor cantidad de este elemento en los productos de desecho de los organismos. Por ejemplo, Bergheim y Sveier (1995) reportaron la reducción de la excreción de P en las dietas para salmónidos. Storebakken *et al.* (2000) demostraron que la sustitución de aproximadamente el 75% de harina de pescado por concentrado de proteína de soya no tuvo efecto en el crecimiento y disminuyó la cantidad de P. Glencross y Hawkins (2004) reportaron que el fósforo contenido en las harinas de grano de lupino (30% de sustitución por harina de pescado) fue utilizado en 100%.

El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en México ha crecido en los últimos años y alcanzó en 2008 el 3.21 y 3.05 % del volumen y del valor total de la producción acuícola nacional, respectivamente. El Estado de México es el estado del país donde más se produce trucha y concentra aproximadamente el 80% del total (CONAPESCA-SAGARPA 2011). A partir del 2007 y como una oportunidad para mejorar la producción acuícola de trucha arco iris, impactando directamente en la conservación del recurso agua y la reducción en los costos de los alimentos, el Laboratorio de Producción Acuícola inició el desarrollo de dietas con diferentes harinas de origen vegetal como fuentes de proteína y a continuación se presenta una revisión de los resultados obtenidos hasta el momento. La primera parte considera el uso de materias primas (harina de soya, harina de linaza y polvo de Spirulina) como sustitutos de harina de pescado en las dietas. La segunda incluye el uso de aditivos (probióticos principalmente) en las dietas para mejorar la digestibilidad de los ingredientes, así como el uso de ingredientes como concentrados y aislados de proteína de soya. Finalmente, se presentan algunos resultados obtenidos a nivel de granja.

Inicios

Las primeras dietas formuladas en el Laboratorio fueron sustituciones sencillas de la harina de pescado por harina de soya y polvo de Spirulina. Las dietas para las pruebas de alimentación se formularon con una base de contenido de proteína del 40% y las formulaciones pueden verse en las Tablas 1 y 2. Las pruebas de alimentación se realizaron en un sistema de recirculación con tanques de 100 L y con organismos juveniles de trucha con un peso inicial de 4.1 ± 0.7 g (grupos por triplicado 15 juveniles por dieta) para la prueba con sustituciones de harina de soya; de 1.42 ± 0.1 g (grupos por triplicado de 20 juveniles por dieta) y 11.55 ± 0.4 g (grupos por triplicado de 10 individuos por triplicado por dieta) para las pruebas de alimentación con las dietas con polvo de Spirulina. Al término de cada prueba, se determinó el crecimiento, contenido de P y N en excreciones metabólicas de P. Los resultados obtenidos muestran que después de alimentar a los organismos por 50 días, se puede sustituir hasta un 75% de la harina de pescado con la harina de soya con 0.8 g/kg de fitasa sin afectar el crecimiento significativamente (Tabla 3).

Con este nivel de sustitución se reduce la excreción metabólica de P (expresado como PO_4^- ³) en casi la mitad (Figura 1). El uso de polvo de Spirulina como único sustituto de la harina de pescado tiene un efecto diferencial, ya que a etapas tempranas (peso inicial de 1.4 g) los organismos no muestran un crecimiento adecuado, aun en niveles bajos de sustitución y la excreción de P es más alta que en aquellos alimentados con la dieta control (Figura 2). Sin embargo, organismos juveniles (peso inicial de 11.55 g) presentaron mejor crecimiento hasta una sustitución de 75% y los niveles de excreción disminuyeron (Figura 3).

Tabla 1. Formulación de dietas con harina de soya para trucha arco iris

Ingredientes (g/kg)	Dietas				
	Soy 1	Soy 2	Soy 3	Soy 4	Control
Harina de pescado	300	200	0	0	600
Harina de soya	300	400	600	600	-
Otros ingredientes	399.6	399.6	399.6	400	400
Fitasa ¹	0.8	0.8	0.8	0	0

¹DSM Nutritional Products de Mexico S.A de C.V.

Tabla 2. Formulación de dietas con polvo de Spirulina para trucha arco iris

Ingredientes (g/kg)	Dietas				
	Spi1	Spi2	Spi3	Spi4	Control
Harina de pescado	400	300	200	0	600
Polvo de Spirulina	200	300	400	600	400
Otros ingredientes	400	400	400	400	400

Tabla 3. Crecimiento registrado en juveniles alimentados con dietas con sustituciones de la harina de pescado con harina de soya. Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Datos publicados (Cruz *et al.* 2011).

Tratamientos	Soy1	Soy2	Soy3	Soy4	Control
Peso final (g)	10.6 ± 0.9ab	12.5 ± 1.3a	9.4 ± 0.8b	8.9 ± 1.5b	13.9 ± 1.8a
Ganancia en peso ¹ (%)	157 ± 21ab	203 ± 24a	131 ± 8b	116 ± 35b	236 ± 49a
Tasa de crecimiento específico ² (%/día)	1.7 ± 0.2a	2.2 ± 0.3b	1.7 ± 0.1a	1.5 ± 0.2a	2.4 ± 0.2b

¹GP = ((Peso final – peso inicial) / peso inicial) x 100

²TCE = ((ln peso final – ln peso inicial) / 50) x 100

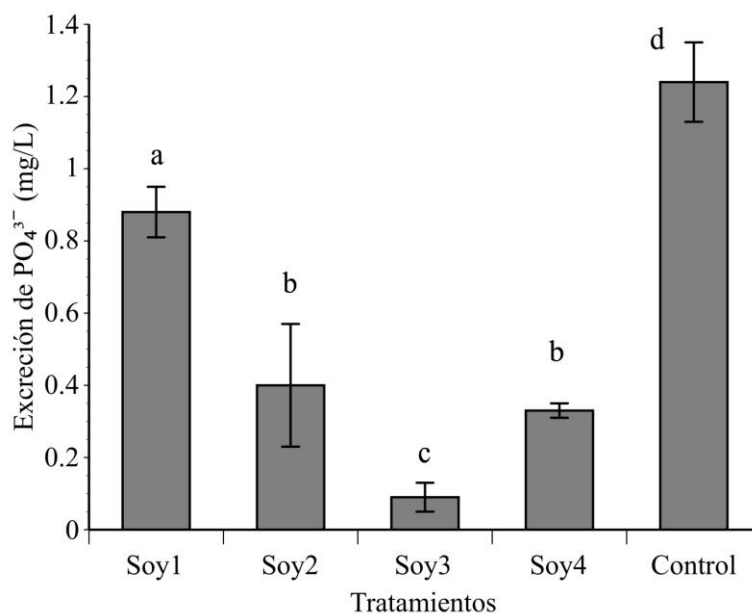


Figura 1. Excreción metabólica de P (expresado como PO_4^{3-}) de juveniles trucha arco iris alimentados con dietas con sustituciones de la harina de pescado con harina de soya. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Datos publicados (Cruz *et al.* 2011).

(a)

(b)

Hernández, L. y M. Fernández. 2013. Fuentes de Proteína Alternativas para Dietas de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds). Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 49-65.

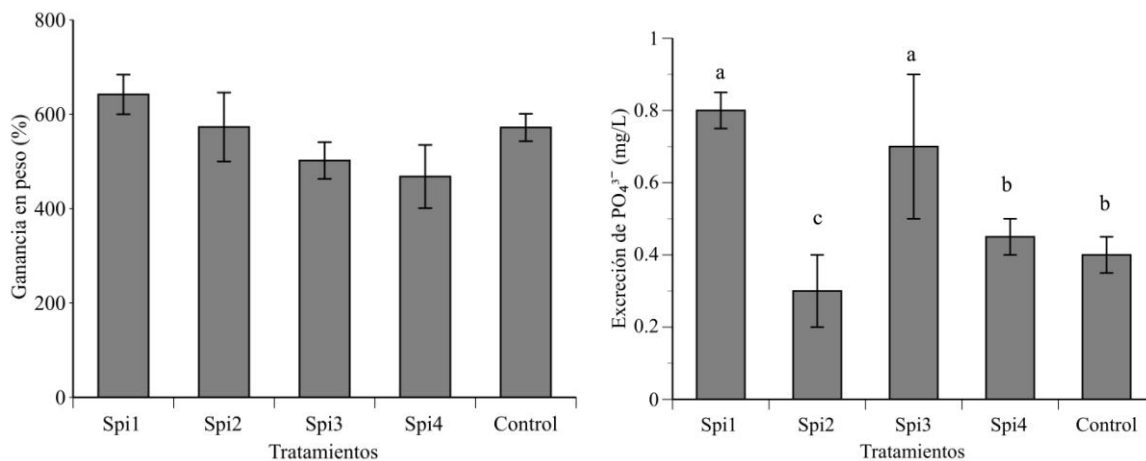


Figura 2. Crecimiento expresado como ganancia en peso (a) y excreción metabólica de P (b) de juveniles de trucha arco iris (peso inicial = 1.4 g), alimentados con dietas con polvo de *Spirulina* como sustituto de harina de pescado.

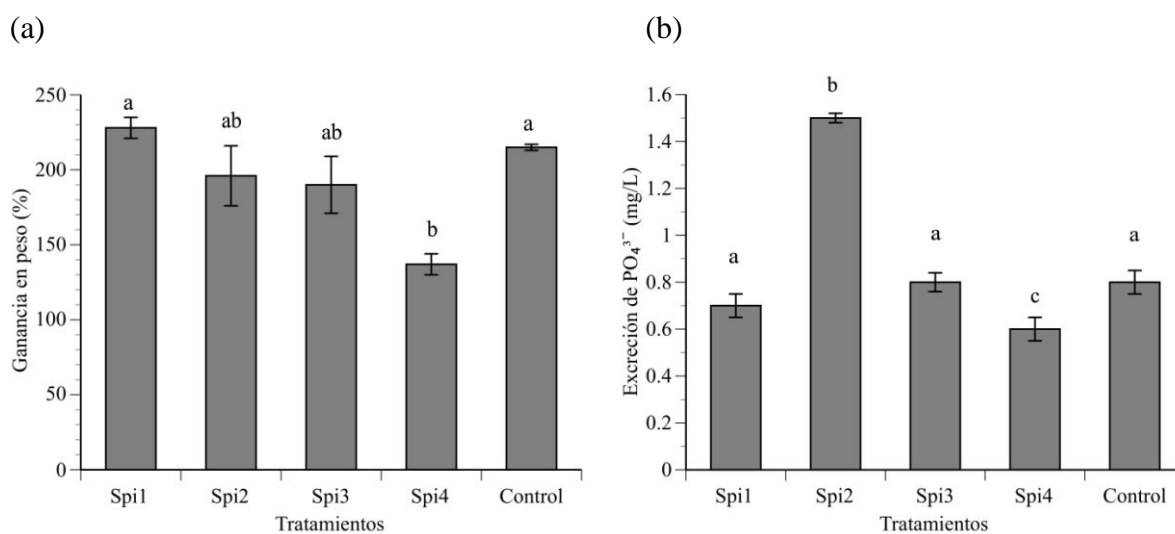


Figura 5. Crecimiento expresado en ganancia en peso (a) y excreción metabólica de P (b) de juveniles de trucha arco iris (peso inicial = 11.5 g) alimentados con dietas con polvo de *Spirulina* como sustituto de harina de pescado.

Mezcla de harinas vegetales y uso de aditivos

Considerando los resultados anteriores, se decidió utilizar harina de soya con una sustitución del 75% de la harina de pescado y además de fitasa, se adicionaron con levadura de acuerdo a la Tabla 4. Cada dieta se dio a grupos por triplicado de 15 peces con peso inicial de 1.2 ± 0.06 g por un periodo de 70 días. Así mismo, se utilizaron dietas con 100% de harina de origen vegetal, usando soya y polvo de *Spirulina* en combinaciones (Tabla 5) con grupos por triplicado de juveniles con un peso inicial de 6.8 ± 0.4 g por 50 días. Finalmente dietas con 100% de sustitución de la harina de pescado con concentrado de proteína de soya y aislado de proteína de soya (Tabla 6), se utilizaron para alimentar a grupos por triplicado de 15 organismos con peso inicial de 1.95 ± 0.3 g por un periodo de 60 días.

La adición de levadura a las dietas con 75% de harina de soya mejoró el crecimiento de los juveniles de trucha y disminuyó la excreción de P (Figura 4). Sin embargo, cuando la dieta se adicionó con la levadura y fitasa, la excreción de P aumentó significativamente. La dieta con sustitución completa de la harina de pescado con una mezcla de 75% harina de soya y 25% polvo de *Spirulina* no mostró diferencias significativas en crecimiento cuando se comparó con la dieta con 100% de harina de pescado (Tabla 7), además de reducir significativamente la excreción de P en las heces y en la orina (Figura 5). El uso de concentrado de proteína de soya con la adición proteasa resultó en un mejor crecimiento, misma tendencia observada en los organismos alimentados con el aislado de proteína cuando se le agregó la proteasa (Figura 6). Respecto a la excreción de P, se observó que las dietas con concentrado de soya redujeron la excreción. Los organismos alimentados con el aislado de proteína de soya tuvieron una excreción de P similar a la observada en el grupo control (Figura 6).

Tabla 4. Formulación de las dietas con harina de soya, levadura y/o fitasa para trucha arco iris

Ingredientes (g/kg)	Dietas			
	Lev+fit	Lev	Fit	Control
Harina de pescado	200	200	200	600
Harina de soya	400	400	400	-
Fitasa	0.4	-	0.4	-
Levadura	15	15	-	-
Otros	384.6	385	399.6	400

Tabla 5. Formulaciones de las dietas con harina de soya y polvo de *Spirulina* para trucha arco iris.

Ingredientes (g)	Dietas			
	75Spi-25HS	50Spi-25HS	25Spi-75HS	Control
Harina de pescado	0	0	0	600
Harina de soya	150	300	450	0
Polvo de <i>Spirulina</i>	450	300	150	0
Fitasa	0.4	0.4	0.4	0
Otros ingredientes	399.6	399.6	399.6	400

Tabla 6. Formulaciones de las dietas con concentrado y aislado de proteína de soya para trucha arco iris.

Ingredientes (g/kg)	Dietas				
	CdS	CdS-P	AdS	AdS-P	Control
Harina de pescado	0	0	0	0	700
Concentrado de proteína de soya	645.1	645.1	0	0	0
Aislado de proteína de soya	0	0	340	340	0
Harina de soya	0	0	50	50	0
Proteasa	0	0.8	0	0.8	0
Otros ingredientes	354.9	354.1	610	609.2	300

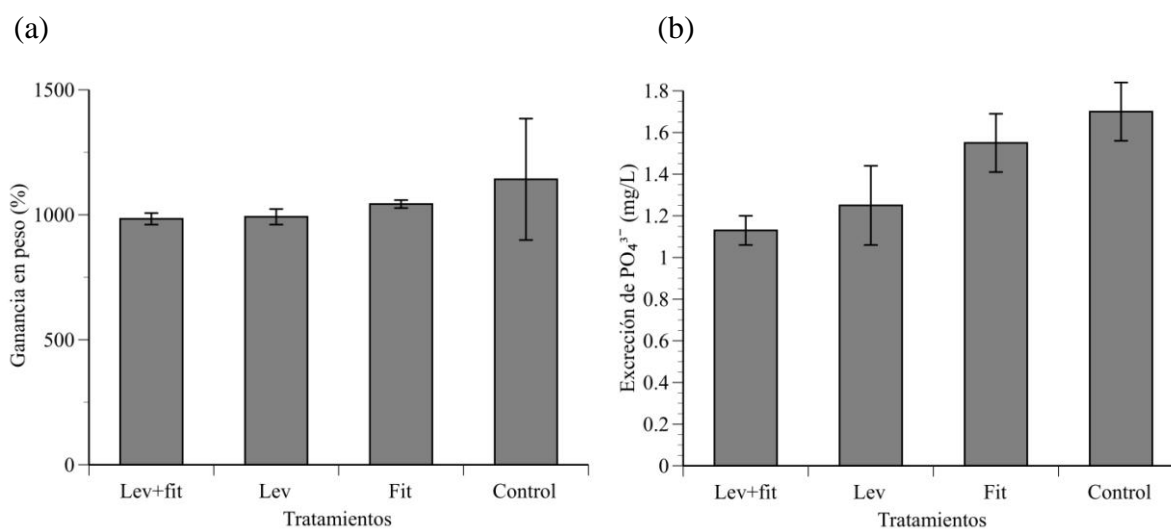


Figura 4. Crecimiento expresado en ganancia en peso (a) y excreción metabólica de P (b) de juveniles de trucha arco iris alimentados con dietas con harina de soya más la adición de levadura y/o fitasa.

Tabla 7. Crecimiento registrado en juveniles alimentados con dietas con sustituciones totales de la harina de pescado con mezclas harina de soya y polvo de *Spirulina*. Datos tomados de Hernández *et al.* (2012).

Tratamiento	Ganancia en peso (%) ¹	Tasa de crecimiento específico (%/día) ²
75Spi-25HS	557 ± 86	3.7 ± 0.2
50Spi-50HS	479 ± 43	3.4 ± 0.1
25Spi-25HS	445 ± 6	3.4 ± 0.1
Control	649 ± 31	4.0 ± 0.1

¹GP = ((Peso final – peso inicial) / peso inicial) x 100

²TCE = ((ln peso final – ln peso inicial) / 50) x 100

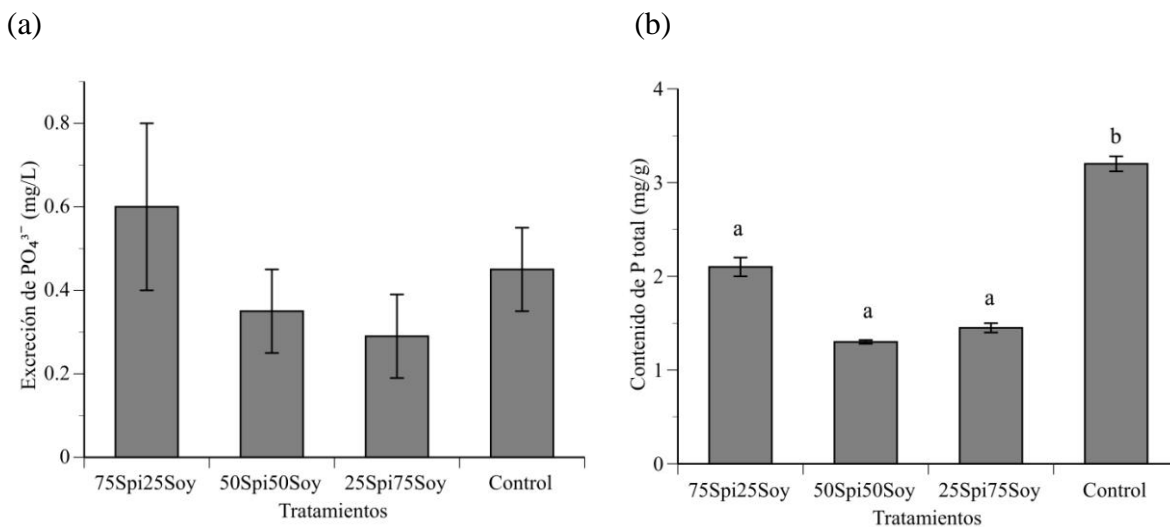


Figura 5. Excreción de P en orina (a) y contenido de P en heces (b) de juveniles de trucha arco iris alimentados con sustituciones totales de la harina de pescado con harina de soya y polvo de *Spirulina*. Letras distintas entre las columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Datos tomados de Hernandez *et al.* (2012).

(a)

(b)

Hernández, L. y M. Fernández. 2013. Fuentes de Proteína Alternativas para Dietas de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds). Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 49-65.

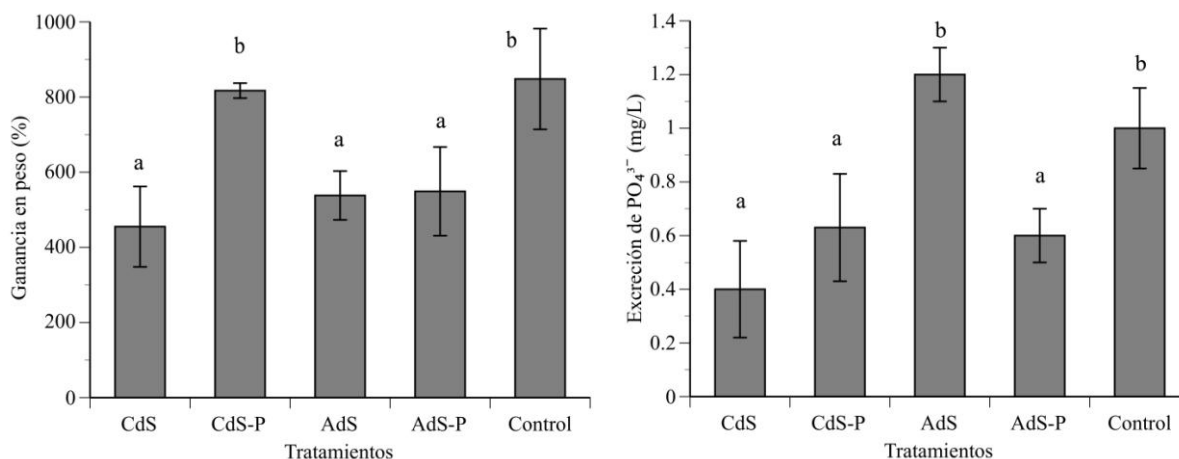


Figura 6. Crecimiento expresado en ganancia en peso (a) y excreción metabólica de P (b) de juveniles de trucha arco iris (peso inicial = 11.5 g) alimentados con dietas con aislado o concentrado de proteína de soja. Letras diferentes entre las columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Pruebas piloto en granjas

Hasta el momento se han realizado dos pruebas piloto en una granja del Municipio de Amanalco de Becerra, Estado de México con diferentes formulaciones. La primera prueba se realizó con las dietas descritas en la Tabla 4, con organismos de peso inicial de 2.8 ± 0.1 g y cada dieta de dio a grupos por triplicado de 65 peces por un periodo inicial de 75 días. Al termino de tiempo, se observó una tendencia de valores más altos en los organismos alimentados con la dietas con la proteína de origen vegetal (Figura 7 a). El contenido de P total es más bajo en las heces de las truchas alimentadas con las dietas con harina de soja (Figura 7 b).

(a)

(b)

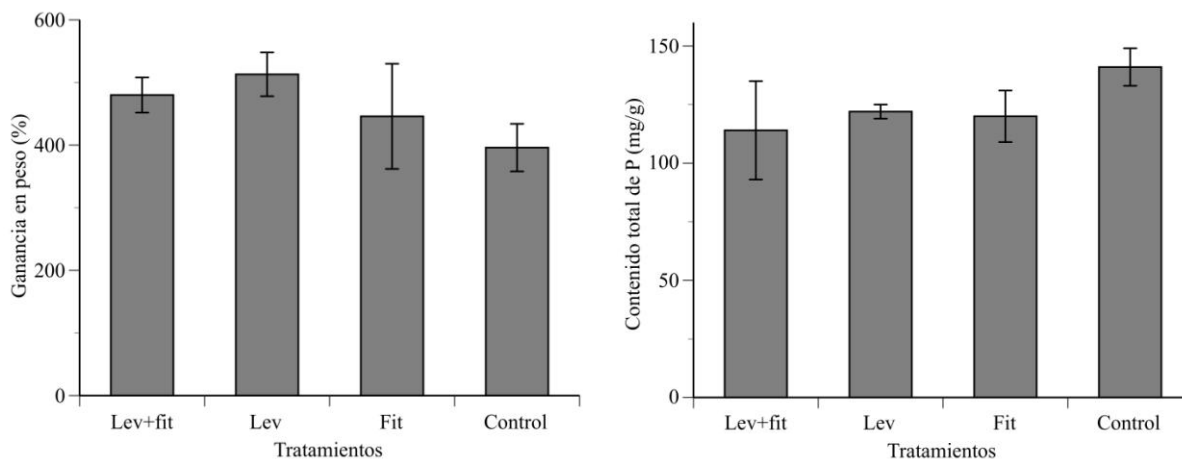


Figura 7. Crecimiento expresado en ganancia en peso (a) y excreción metabólica de P (b) de juveniles de trucha arcoiris alimentados con dietas con harina de soya más la adición de levadura y/o fitasa bajo condiciones prácticas de cultivo.

En la segunda prueba se utilizaron dos dietas con concentrado de proteína de soya como fuente principal de proteína (Tabla 8). Grupos por triplicado de 350 organismos con un peso inicial de 3.5 ± 0.1 g se alimentaron con las dietas por un periodo de 130 días. Los resultados de crecimiento muestran (Tabla 9) que los organismos alimentados con las dietas sin harina de pescado mostraron valores significativamente más bajos que los observados en los organismos alimentados con una dieta comercial. A pesar de ello, el uso del concentrado de soya puede ser un ingrediente útil para las dietas prácticas, ya que los valores del factor de condición (Tabla 9) indican un desarrollo normal.

Tabla 8. Formulaciones de las dietas con concentrado de proteína de soya para trucha arco iris en condiciones prácticas de cultivo en granja.

Ingredientes (g/kg)	Dieta 1	Dieta 2
Concentrado de proteína de soya	645.1	483.8
Harina de soya	0	170
Proteasa	0.8	0.8
Fitasa	0.0	0.8
DL-Metionina	0.07	0.07
Otros	295	290
α -celulosa	59.03	54.53

Tabla 9. Crecimiento registrado y factores de condición (K) en juveniles alimentados con dietas con sustituciones totales de la harina de pescado con concentrado de proteína de soya en condiciones prácticas de cultivo durante 130 días. Letras diferentes entre las columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tratamiento	Ganancia en peso (%) ¹	Tasa de crecimiento específico (%/day) ²	K ³
Dieta 1	1,843a	1.13ab	1.05a
Dieta 2	1,670a	1.08a	0.90b
Comercial	2,493b	1.22b	0.94ab

¹GP = ((Peso final – peso inicial) / peso inicial) x 100

²TCE = ((ln peso final – ln peso inicial) / 50) x 100

³K = ((peso/longitud total³) x 100)

Conclusiones

Estos resultados han permitido establecer que la utilización de fuentes alternativas de proteína es posible, incluso en altos niveles de sustitución en las dietas para trucha arco iris. El crecimiento es, en la mayoría de los casos, similar al observado para los organismos alimentados con las dietas con 100% de harina de pescado o comerciales. De igual forma, la excreción de P metabólico se reduce y algunos resultados de las pruebas, indican que el

contenido de P en las heces también es mas bajo que el observado en las heces de los peces alimentado con dietas al 100% de harina de pescado o comerciales.

El Laboratorio continua con la investigación sobre el desarrollo de formulaciones y actualmente se prueban dietas con una base de proteínas de origen vegetal (hasta 75% de sustitución de la harina de pescado) y la sustitución parcial y total del aceite de pescado con una mezcla 1:1 de aceite de soya y linaza, así como la incorporación de metionina y taurina a las dietas. Así mismo, se empiezan a realizar más pruebas de alimentación en otras granjas con nueva formulaciones con el fin de mejorar el crecimiento y el bienestar de los organismos.

Agradecimientos

El presente proyecto se realizó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM, proyecto RR290112 (2013). Se agradece también a DSM Nutritional Products de México S.A de C.V y a Evonik México S.A. de C.V. por su apoyo con ingredientes para la elaboración de las dietas.

Referencias

- Bergheim, A., Sveier, H. (1995) Replacement of fish meal in salmonid diets by soy meal reduces phosphorus excretion. *Aquaculture International*, 3: 265-268.
- Cruz, C.A.C., Hernández, H.L.H., Fernández, A.M.A., Ramírez, P.T., Angeles, L.O. (2011) Effects of diets with soybean meal on the growth, digestibility, phosphorus and nitrogen excretion of juveniles rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Hidrobiológica*, 21: 118-125
- CONAPESCA-SAGARPA. (2011) Anuario estadístico de pesca 2008. CONAPESCA. México. 265 pp.
- Drew, M.D., Racz, V.J., Gauthier, R., Thiessen, D.L. (2005) Effect of adding protease to coextruded flax:pea or canola:pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 119, 117-128.
- FAO. 2012 The state of world fisheries and aquaculture 2006. FAO. Rome, Italy. 180 pp.
- FAO. 2007. Food Outlook, global market analysis. FAO. Rome Italy. 91 pp. (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah876e/ah876e00.pdf>)
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krodahi, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38, 551-579.
- Glencross, B., Hawkins, W. (2004) A comparison of the digestibility of lupin (*Lupinus sp.*) kernel meals as dietary protein resources when fed to either, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* or red seabream, *Pagrus auratus*. *Aquaculture Nutrition*, 10, 65-73.
- Hemre, G.-I., Sanden, M., Bekke-Mikkelsen, A.M., Sagstad, A. y Krogdahl, Å. (2005) Growth, feed utilization and health of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed genetically modified compared to non-modified commercial hybrid soybeans. *Aquaculture Nutrition*, 11, 157-167.
- Hernández, F.G., Hernández H.L.H., Fernández, A.M.A., Angeles, L.O. (2012) Effects of total replacement of fishmeal with mixtures of *Spirulina* powder and soybean meal as protein sources on the juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) diets. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, IJA_64.2012.790, 8 pages.
- McCallum, I., Newell, W., Cruz-Suarez, L.E., RicqueMarie, D., Tapia-Salazar, M., Davis, A., Thiessen, D., Campbell, L., Willerer, A. O. M., Phillips, C. y Hickling, D. (2000) Uso de arvejón (feed pea, chicharo) *Pisum sativum* en alimentos para camarones (*Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*). En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

- Sajjadi, M., Carter, C.G. (2004) Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Aquaculture Nutrition* 10, 135- 142
- Storebakken, T., Shearer, K.D., Roem, A.J. (2000) Growth, uptake and retention of nitrogen and phosphorus and adsorption of other minerals in Atlantic salmon *Salmo salar* fed diets with fish meal and soy-protein concentrate as the main sources of protein. *Aquaculture Nutrition* 6, 103-108.
- Thiessen, D.L., Maenz, D.D., Newkirk, R.W., Classen, H.L., Drew, M.D. 2004. Replacement of fishmeal by canola protein concentrate in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 10, 379-388.

Subproductos de la Pesca para Dietas de Organismos Cultivados: Beneficios, Problemas y Estrategias

Josafat Marina Ezquerra-Brauer

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd.
Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, 83000. Apdo. Postal 1658. Hermosillo,
Sonora. México. E-mail: ezquerra@guayacan.uson.mx

Resumen

En los últimos años, los aspectos medioambientales de las actividades de cultivo son uno de los temas más debatidos y estudiados, especialmente al tratar con los residuos y sub-productos. Estos sub-productos son ricos en compuestos químicos y biológicos, como minerales, lípidos, amino ácidos, polisacáridos y proteínas, que pueden ser aprovechados en diferentes industrias, siendo una de ellas la acuicultura. Al recuperarse y aprovecharse eficientemente estos compuestos se reduce el impacto ambiental que generan y se contribuye a mejorar el manejo de los residuos en las empresas de la acuicultura. En este trabajo se hace una revisión de lo que se ha publicado sobre estos aspectos, discutidos y analizados en función de los triunfos y fracasos, las estrategias establecidas para mejorar los resultados obtenidos, para finalizar con estrategias futuras. La literatura revisada establece que es prioritario buscar nuevos sustitutos de la harina de pescado, sobre todo cuando en la actualidad se cuenta con información de la digestibilidad y eficiencia proteica de algunas especies de interés comercial, y la gama de nuevos productos que permiten mejorar el papel de las enzimas digestivas de los organismos. Dentro de las alternativas planteadas como fuente de proteína alternas son los subproductos de la pesca.

Palabras clave: *subproductos, dietas, enzimas*

Abstract

In the last few years, environmental aspects of the farming activities are one of the more debated and studied topic, especially when treating with residues and by-products. By-products are source of several chemical and biological compounds, like minerals, lipids, amino acids, polysaccharides and proteins from marine sources have unique features, which can be employed in many applications, suitable for aquaculture applications. Recovering these substances contributing to reduce negative effects on environmental and to improve the management of the residues in the aquaculture enterprises. This review updates information and conveys analysis of success and failure with a focus on this issue, how to face the problems, and the future trends. The literatures reviewed establish that it is important to replace the fishmeal component of fish feeds mainly due to nowadays it is known the digestibility and protein requirements and the relevance of digestive enzymes of several commercial species. Seafood by-products produced during the production phase are a relevant product opportunity for utilization this product as source of protein.

Keywords: *byproducts, diets, enzymes*

Introducción

La gran mayoría de las operaciones pesqueras destinadas a la producción de mariscos y pescados para consumo humano generan residuos, denominados subproductos (Shahidi, 2006). Los subproductos del procesamiento de la industria pesquera son fuentes valiosas de componentes (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008), por lo que estos residuos pueden recuperarse y aprovecharse eficientemente no sólo para reducir el impacto ambiental que generan, sino que también tienen o pueden tener un uso potencial en acuicultura (Shahidi, 2006).

Los resultados de varias investigaciones que hay sobre el valor nutritivo de los subproductos de la pesca para acuicultura, indican que las proteínas de estos subproductos son ingredientes con un excelente valor nutritivo para el cultivo de organismos (Shahidi 2006; Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008; Cruz-Suárez, Rique-Marie, Martínez-Vega, & Wesche-Ebeling, 1993; Hernández, Olvera-Novoa, Smith, Hardy & González-Rodríguez, 2011; Lian, Lee, & Park, 2005).

Hay varios puntos a considerar antes de la utilización de los subproductos entre ellos, el manejo y procesamiento que se les dé, para asegurar la calidad nutricia de los mismos. La idea central de este trabajo es revisar los problemas que se han tenido para la obtención de los subproductos de la pesca y evaluar su aplicación en la acuicultura, así como el de las estrategias que se han seguido para solventar dichos problemas.

El sector de la acuicultura a nivel mundial desde hace ya varios años presenta una fuerte expansión, lo que implica un constante aumento en la generación de residuos y subproductos (bajas, cabezas y vísceras, heces, conchas, caparazones, envases y embalajes, etc.). Sin embargo hay que hacer notar que hay una escasa disponibilidad de infraestructuras necesarias y dificultades técnicas para una correcta gestión de dichos residuos lo que supone un problema ambiental, económico y de cumplimiento de la legislación por parte de las empresas acuícolas. Esto último es importante mencionar ya que, la normativa actual en varios países, sobre los subproductos de la pesca a raíz de las

crisis alimentarias, presenta exigencias muy estrictas sobre la adecuada gestión y control de éstos (Gallé, Macías, Rodríguez, Zufía & Revuleta, 2007).

En cuanto a la gestión de residuos y subproductos por parte de las empresas va a depender principalmente del tipo de residuo, pero en general es un aspecto que no constituye para las empresas una prioridad absoluta sino relativa en función de lo problemático que sea el residuo principal de cada granja. En este sentido, considerando que de los subproductos animales no destinados al consumo humano más destacables son caparzones y conchas, uno de los principales campos de acción pasa por aplicar técnicas de minimización y buscar posibilidades reales de valorización de los residuos en aras a reducir los costes asociados a la gestión (Gallé, Macías, Rodríguez, Zufía & Revuleta, 2007).

Por otro lado, la tendencia a sustituir ingredientes de origen marino de alta demanda y costo como la harina de pescado, nuevos sustitutos de la harina de pescado se ha hecho prioritario en los últimos años, sobre todo cuando en la actualidad se cuenta con información de la digestibilidad y eficiencia proteica de algunas especies de interés comercial, y la gama de nuevos productos que permiten mejorar el papel de las enzimas digestivas de los organismos (Reynier Valdez, 2005).

Lo antes mencionado ha implicado que se requiera determinar qué recursos deben ser explotados para ese fin, con el fin de minimizar el impacto negativo en grandes zonas de pesca y del hábitat que en conjunto con la biota permitan que exista un equilibrio. Por ello, actualmente se lleva a cabo la evaluación de los subproductos y desechos originados por la agroindustria para obtener sustitutos de las fuentes convencionales de proteína (soya y harina de pescado, entre otras). El uso de tales residuos permitiría a escala mundial disminuir su acumulación, así como los problemas de manejo y disposición en beneficio de la calidad del ambiente (Hernández Vergara, Olvera Novoa, Pérez Rostro, Clemente del Río & Ochoa Urquijo, 2009).

Así mismo se debe proponer sustitutos parciales o totales para la harina de pescado, que permitan generar dietas digeribles y sobre todo asimilables, como ha sido el caso de los

ensilados de subproductos pesqueros, los cuales se ha reportado que presentan una calidad nutrimental adecuada, son de fácil preparación y su materia prima es además de bajo costo, abundante (Balsinde Ruano, Fraga Castro & Galindo López, 2004; Hernández Vergara *et al.*, 2009).

En este trabajo se hace una revisión de lo que se ha publicado sobre la gestión de los subproductos de la pesca, abordando principalmente dos aspectos:

- (1) La caracterización de las sustancias generadas durante la fase de la producción.
- (2) La gestión de los residuos en acuicultura.

Los trabajos serán discutidos y analizados en función de los triunfos y fracasos, así como de las estrategias establecidas para mejorar los resultados obtenidos. Para finalizar con estrategias futuras.

Industria acuícola y generación de sub-productos

En los últimos años, los aspectos medioambientales de las actividades de cultivo son uno de los temas más debatidos y estudiados, especialmente al tratar con los residuos y sub-productos de la actividad.

La definición de desecho o subproducto en la industria pesquera varía según la especie así como por los métodos de manejo postcosecha y de procesamiento; sin embargo generalmente son considerados como desechos la cabeza, huesos, piel y vísceras (Kristbergsson & Arason, 2007).

Se ha establecido que de la gran mayoría de las operaciones pesqueras, destinadas a la producción de mariscos y pescados para consumo humano, un 60% de lo capturado es manejado como residuos (Shahidi, 2006). Estos desechos, dependiendo de sus características y de los hábitos alimentarios de cada país, se arrojan al medio ambiente y aumentan la contaminación.

Sin embargo, los subproductos del procesamiento de la industria pesquera son fuentes valiosas de componentes tales como proteínas, pigmentos, vitaminas, minerales y enzimas (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008), por lo que estos residuos pueden recuperarse y aprovecharse en forma eficiente no sólo para reducir el impacto ambiental que generan, sino que también tienen o pueden tener un uso potencial en alimentos, fármacos y otras

aplicaciones en la acuicultura, agricultura e industria en general, convirtiéndose en coproductos y llegan a representar, en algunos casos, un excelente campo de oportunidades de negocio (Shahidi, 2006). Entre ellas, la utilización de los sub-productos para la alimentación animal, ya que representan una fuente importante de proteína de alta calidad así como de energía (Kassaveti & Arvanitoyannis, 2008).

Recuperación de proteínas de los sub-productos

La recuperación de proteínas a partir de los desechos de la pesca puede hacerse mediante la aplicación de diversos métodos, los cuáles pueden ser mediante procesos mecánicos, de extracción, o bien por la aplicación de procesos de hidrólisis (Taylor & Himonides, 2007) buscándose aplicar tecnologías simples y de bajo costo. El primer uso que se les da a los sub-productos de la pesca es para la obtención de harinas y aceites, los cuales se destinan a la elaboración de alimentos en acuicultura (Bechtel, 2006). Sin embargo, por diversas razones, en ocasiones no es conveniente transformar los sub-productos en harina. Por ejemplo, cuando la materia prima no está cerca de las plantas procesadoras y por cuestiones económicas no conviene transportarla, otro caso es cuando la planta está en su máxima capacidad y no admite más material, o por restricciones de calidad establecidas por la compañía (Windsor & Barlow, 1981). En cualquier de estas condiciones u otras, es conveniente considerar otro tipo de tecnologías para la transformación de los dichos sub-productos pesqueros. Dentro de las alternativas más reportadas son la obtención de ensilados e hidrolizados, de los cuáles se hablará con más detalle a continuación.

Ensilados

El uso de ensilados en la alimentación durante el cultivo de organismos ha sido ampliamente estudiado, esto se atribuye a la similitud que hay entre esta proteína con la del organismo, así mismo por los bajos costos de producción, sobre todo cuando se compara con los de la harina de pescado (Shira, 2006).

El ensilado es un alimento proteico, de alta humedad y de fácil preservación puede definirse como un producto líquido pastoso obtenido a partir de la acción de las enzimas sobre el pescado entero, partes o residuos y es comúnmente usado como componente de raciones alimenticias para animales.

Los ensilados biológicos se basan en la fermentación ácido-láctica y se ha elaborado con especies de pescado de bajo valor comercial, desechos de peces marinos y del pescado de las industrias (Vidotti, 2003). En su elaboración se han empleado, como inóculo, distintas cepas de bacterias ácido-lácticas y melaza como fuente de carbohidratos (Cira, Huerta, Hall & Shirai, 2002; Plascencia-Jatomea Olvera-Novoa, Arredondo-Figueroa, Hall & Shirai, 2002; González & Marin, 2005; Ramírez-Ramírez, Huerta, Arias, Prado & Shirai, 2008).

Los ensilados pueden presentar diversas especificaciones, en términos del contenido de aminoácidos, digestibilidad, palatabilidad, dependiendo de la materia prima, del proceso de producción empleado y del nivel de inclusión en la dieta (Balsinde Ruano *et al.*, 2003). Los ensilados se han obtenido principalmente a partir de la cabeza, vísceras y otros desechos que se generan de la industria pesquera, en forma seca o húmeda (Balsinde Ruano *et al.*, 2003, Llanes Iglesias, Toledo Pérez & Lazo de la Vega, 2006; Hernandez Vergara *et al.* 2009). El proceso de obtención de ensilados en general se considera bastante sencillo (Figura 1) e incluso al igual que durante la obtención de la harina de pescado, se puede obtener también aceite, el cual por sus propiedades podría ser aprovechado dentro de la industria de acuicultura.

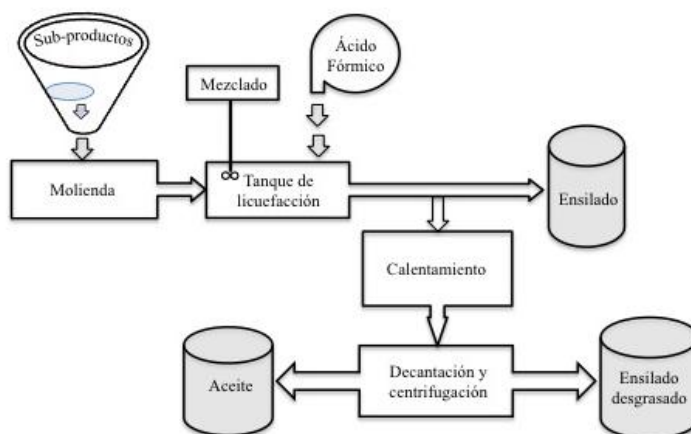


Figura 1. Diagrama general que muestra el proceso de obtención de ensilados

Adaptado de: Windsor & Barlow, 1981.

Las investigaciones sobre los atributos de los ensilados de los sub-productos de la pesca en el desarrollo de organismos cultivados han sido un tópico que comenzó a manejarse desde ya algunos años. Son numerosos los estudios realizados en los cuáles se ha establecido que los ensilados de los sub-productos de la pesca pueden ser utilizados con éxito en el cultivo de diferentes organismos, en la tabla 1 se muestran algunos casos de éxito. En general se reporta que hay una mejora en los diversos parámetros utilizados como indicadores, al compararse dietas tradicionales contra aquellas que contienen ensilados. Los efectos benéficos dependieron principalmente del proceso y del nivel de inclusión.

Tabla 1. Inclusión de ensilados en el desarrollo de organismos cultivados

Organismo	Indicador	Tratamiento		
		Control	Ensilado Químico	Ensilado Biológico
Tilapia ¹	Peso final (g)	30 ^a	29.9 ^a	29.6 ^a
	Supervivencia (%)	96 ^a	95 ^a	97 ^a
Camarón ²	Peso final (g)	2.45 ^b	3.24 ^a	-
	Supervivencia (%)	97 ^a	100 ^a	-
Microalgas ³	Rendimiento (g/L)	1.6 ^b	-	2.85 ^a
	Productividad volumétrica (g/L)	0.97 ^b	-	1.69 ^a
¹ Llanes, Toledo, Savon & Gutiérrez (2012)				
² Fraga-Castro & Jaime-Ceballos (2011)				
³ Sánchez-Torres, Juscamiat-Morales, Vargas-Cardenas & Oliveros-Ramos (2008)				

Los ensilados como cualquier proceso e insumo presentan ventajas y desventajas cuando son comparados con las harinas (Tabla 2) una de las más críticas es su vida de anaquel. El tiempo de almacenamiento afecta negativamente la preservación de los ensilados, durante el almacenamiento se ha visto que presentan procesos deteriorativos relacionados con la oxidación de lípidos, sobre todo si se utilizaron desechos de organismos ricos en grasa, esta oxidación a su vez induce que las proteínas formen complejos, indisponiendo así algunos aminoácidos (Ferrz de Arrada, 2007) de ahí que se recomienda su uso casi inmediato.

Tabla 2. Algunas ventajas y desventajas de harinas, ensilados e hidrolizados de los sub-productos de la pesca

Producto	Ventajas	Desventajas
Harina	<ul style="list-style-type: none"> • Balance adecuado de aminoácidos y ácidos grasos. • Vida de anaquel prolongada • Tiempo de obtención cortos • Fácil distribución • Mercado ampliamente establecido 	<ul style="list-style-type: none"> • Altos costos de inversión • Equipo especializado • Olores desagradables durante la producción.
Ensilados	<ul style="list-style-type: none"> • Balance adecuado de aminoácidos y ácidos grasos. Contenidos más elevados de lisina y menor contenido de azufrados. • Bajos costos de inversión • Producción flexible • Opción muy viable donde la disponibilidad de pescado es baja. • No se han reportado efectos adversos aún. 	<ul style="list-style-type: none"> • Equipo especializado • Tiempo de obtención de la menos 5 días • Alta susceptibilidad a la oxidación • Olores desagradables durante la producción. • Altos costos para su distribución • Comercialización limitada • Producción local
Hidrolizados	<ul style="list-style-type: none"> • Balance adecuado de aminoácidos. • Alta actividad protectora • Atractantes • Vida de anaquel prolongada • No se detectan olores muy intensos durante la producción • Fácil distribución • Amplio mercado 	<ul style="list-style-type: none"> • Costos de inversión y producción pueden ser elevados. • Tecnología más especializada • Tiempo de obtención de al menos 2 días. • Requiere tratamientos posteriores. • Pueden presentar efectos adversos en los organismos dependiendo del grado de hidrólisis, materia prima y porcentaje de inclusión

Hidrolizados

La hidrólisis proteica consiste en la rotura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres si no hay control adecuado de la hidrólisis (Vioque, Clemente, Pedroche, Yust & Millan, 2001). Son varias las actividades biológicas que han sido descritas en diferentes hidrolizados proteicos, algunas de ellas se muestran en la tabla 3. Además presentan propiedades funcionales, como la de formar soluciones de baja viscosidad, buena solubilidad, no imparten sabor aún a altas concentraciones, poseen alta capacidad emulsificantes y espumante, por lo que poseen diferentes aplicaciones en la industria alimentaria (Van der Ven, Muresan, Gruppen, De Bont, Merck & Voragen, 2002).

Tabla 3. Actividad biológica y funcional de hidrolizados de origen marino

Especie	Enzima	Propiedad	Referencia
Pescado de bajo valor económico	Papaína y Flavorasa	Antioxidante y Antibacteriana	1
Lenguado	Alcalasa	Antioxindante Espumante Emulsificante	2
Cazon (<i>Mustelus mustelus</i>)	Tripsina, Pepsina	Antioxidante	3
Salmon atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Pepsina, Pancreatina, Termolisina	Antihipertensivo Antioxidante	4
Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	Alcalasa	Antihipertensivo	5
¹ Deng, Huo, & Xie (2008) ² Gimenez, Aleman, Montero, & Gomez-Guillen (2009) ³ Bougatef, Hajji, Balti, Lassoued, Triki-Ellouz, & Nasri (2009) ⁴ Nakajima, Yoshie-Stark & Ogushi (2009) ⁵ Alemán, Giménez, Pérez-Santin, Gómez-Guillen, & Montero (2011)			

Por los efectos benéficos que han sido detectados en diversos organismos por el uso de los hidrolizados obtenidos a partir de productos marinos es como insumo durante el desarrollo y crecimiento de diversos animales acuícolas. En diversos estudios realizados principalmente peces y camarones, se ha visto que la adición de hidrolizados puede generar altos niveles de de compuestos nitrogenados activos de bajo peso molecular, específicamente (péptidos, nucleótidos, derivados de aminoácidos), los cuáles favorecen el desarrollo de los organismos. Algunos estudios se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Inclusión de hidrolizados en el desarrollo de organismos cultivados

Organismo	Indicador	Tratamiento	
		Control	Hidrolizado
Larvas de Lenguado ¹	Peso final (g)	29.8 ^a	26.2 ^a
	Supervivencia (%)	81 ^b	92 ^a
Camarón ²	Peso final (g)	4.9 ^b	4.8 ^a
	Supervivencia (%)	76 ^a	68 ^a
	Sabor	80 ^b	90 ^a
¹ Lian, Lee & Bengtson (2008)			
² Sánchez-Sánchez (2010)			

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas y por tanto los usos de los hidrolizados, dependen de la enzima que se utilice, el grado de hidrólisis y las condiciones en las que se desarrolle la reacción (pH, temperatura, tiempo de reacción) (Dzwolak & Ziajka, 1999). Los métodos de hidrólisis proteica más frecuentemente usados son la hidrólisis enzimática, la hidrólisis ácida y una combinación de ambas, sin embargo estos aunque dan procesos con mayor control, también pueden implicar mayores gastos o producción de residuos, por lo que una alternativa es mediante el uso de las enzimas propias del organismo, la autohidrólisis, ya que distintos estudios han encontrado la presencia de alta actividad enzimática, específicamente proteasas, en músculo y vísceras de calamar (Leblanc & Gill, 1982; Rodger, Weddle, Carig, & Hastings, 1984; Sugiyama, Kousu., Hanabe, & Okuda, 1989). En estudios llevados a cabo en *Loligopalei* se estableció que los subproductos de esta especie de calamar (músculos y vísceras) al ser perfectamente molidos se hidrolizaron completamente los tejidos por acción de las enzimas endógenas presentes (Lian., Lee, C. & Park, 2005). El esquema general de la obtención de hidrolizados se muestra en la figura 2.

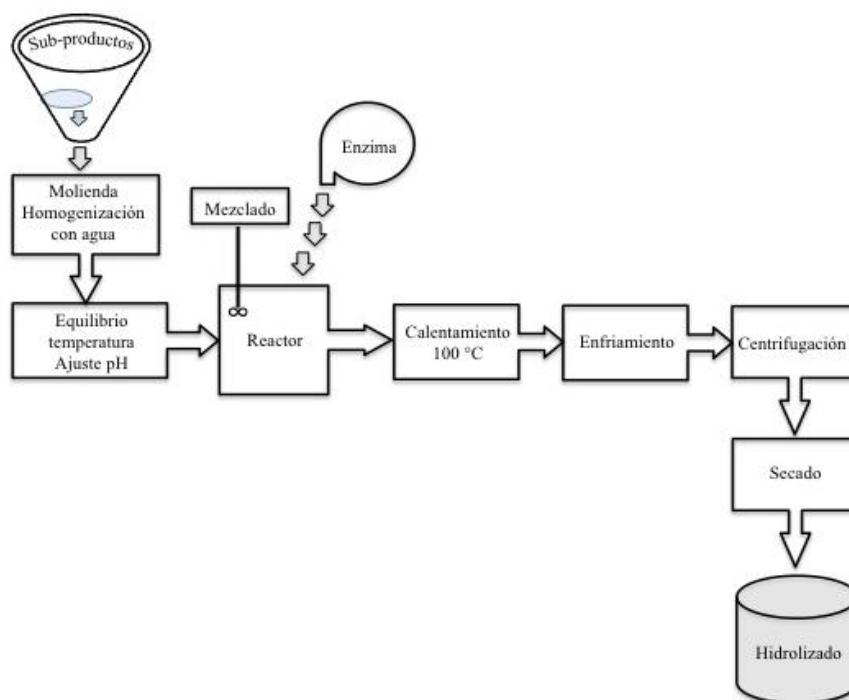


Figura 2. Diagrama general que muestra el proceso de obtención de hidrolizados. Adaptado de: Ezquerra-Brauer, Cuevas-Acuña, Márquez-Ríos, Robles-Sánchez & Torres-Arreola (2013).

Los efectos benéficos atribuidos a los hidrolizados en el desarrollo de los organismos cuando sus dietas son suplementadas con hidrolizados de pescado no se discuten, sin embargo, hay que hacer mención que también se han observado algunas desventajas de los mismos (Tabla 2), como los efectos adversos en el organismo al momento de incluirlos en una dieta. Los efectos adversos detectados son debido a la gran cantidad de péptidos de bajo peso molecular y/o a la elevada presencia de compuestos como la histamina y nitrógeno volátil total, lo cual puede inducir un desbalance en el aprovechamiento de los aminoácidos y afectar el desarrollo de los organismos (Córdova-Murueta & García-Carreño, 2002; Lian, 2008). Finalmente, durante la obtención de los hidrolizados es importante considerar el grado de hidrólisis de los mismos, ya que esto puede modificar el perfil de aminoácidos y ácidos grasos.

Conclusiones

Los subproductos debido a sus propiedades pueden ser aprovechados en acuicultura. El progreso en el desarrollo de los productos a partir de los subproductos de la pesca debe venir integrado, considerando varios aspectos, tanto tecnológicos, cómo ambientales. El futuro de la utilización de los subproductos de la pesca es promisorio, que con una correcta orientación y aplicación de la tecnología adecuada puede propiciar grandes avances en términos de una correcta utilización de los recursos marinos y manteniendo un crecimiento sustentable.

Tendencias Futuras

El campo de los sub-productos de la pesca existe una gama muy amplia de opciones de estudio que deben ser exploradas con el fin de potencializar aún más su uso como ingredientes en el cultivo de organismos, entre ellas se podrían mencionar:

1. Continuar evaluando diferentes sub-productos como insumos en la elaboración de dietas con el fin de reducir costos. Aunque la harina de pescado y el aceite son los ingredientes ideales para utilizarse como ingredientes, se puede ganar más utilizando otras fuentes de proteínas y de obtención de los aceites, como el caso de los ensilados.
2. Desarrollar nuevo productos a partir de los sub-productos de la pesca y separar sus componentes, como se ha hecho ya con la cabeza de camarón, de la cual además de harina, se han obtenido los carotenoides.
3. La extracción de diferentes bio moléculas a partir del procesamiento de los sub-productos, como el caso de la obtención de péptidos con actividad bilógica detectada en los hidrolizados y que pueden llegar a potenciar el sistema inmune de los organismos cultivados.
4. Desarrollar procesos más económicos y viables que pueden ser aplicados al aprovechamiento de los sub-productos en localidades que no puedan soportar altas tecnologías por el consumo energético que esto implica.

Referencias

- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillen, M.C. & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, **128**, 334-341.
- Arvanitoyannis, I. S. & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology* **43**, 726-745.
- Balsinde Ruano, M.P., Fraga Castro, I., Galindo López, J. (2003). Inclusión de ensilado de pescado como alternativa en la elaboración de alimento extruido para camarón de cultivo (*Litopenaeus schmitti*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 2003. <http://www.civa2003.org>, 303-309.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, **114**, 1198-1205.
- Cira, L. A., Huerta S., Hall, G. M. & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* **37**, 1359-1366.
- Córdova-Murueta, J.H. & García-Carreño, F.L. (2002). Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*, **210**, 371-384.
- Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Martínez-Vega, J.A. & Wesche-Ebeling, P. (1993). Evaluation of two shrimp-by product meals as protein sources in diet for *Peanues vannamei*. *Aquaculture* **115**, 53-62.
- Deng, S. G., J. C. Huo, & C. Xie. (2008). Preparation by enzymolysis and bioactivity of iron complex of fish protein hydrolysate (Fe-FPH) from low value fish. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **26**, 300-306.
- Ezquerria-Brauer J.M., Cuevas-Acuña D.A., Márquez-Ríos E., Robles-Sánchez M. & Torres-Arreola W. (2013). Actividad biológica de hidrolizados enzimáticos de especies marinas En: *Avances de Ciencia y Tecnología Alimentaria en México*. J.A. Ramirez de Leon, R., Uresti Marin, M.L., Aldana Madrid, Mg. G. Loarca Piña (Editores) pp 143-160. Editorial Plaza y Valdés. Madrid, España.
- Fraga-Castro, I. & Jaime-Ceballos, B. (2011) Efecto de ensilados de pescado e hígado de tiburón en el crecimiento de *Litopenaeus schmitti*, en sustitución de la harina y aceite de pescado. *Revista Electrónica de Veterinaria*, **12**, 1-15.
- Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P., & Gomez-Guillen, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, **114**, 976-983.
- González, D., Marín, M. (2005). Obtención de ensilados biológicos a partir de los desechos del procesamiento de sardinas. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ* **15**, 560-567.
- Hernández Vergara M.P., Olvera Novoa M.A., Pérez Rostro C.I., Clemente del Río I.S., Ochoa Urquijo I.J. (2009). Uso de ensilados de subproductos pesqueros en dietas para organismos acuícolas. *Avances en la Investigación Agrícola Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano 2009*. 21-28.

- Hernández, C.; Olvera-Novoa, M.A.; Smith, D.M.; Hardy, R.W. y González-Rodríguez, B. (2011). Enhancement of shrimp *Litopenaeus vannamei* diets based on terrestrial protein sources via the inclusion of tuna by-product protein hydrolysates. *Aquaculture*, **317**,117-123.
- Leblanc, E. L. & Gill, T.A. (1982). Comparative study of proteolysis in short-finned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (Loligopealeileseur) squid. *Compound Biochemistry and Physiology B: Biochem. Molecular Biology* **73**, 201-210.
- Lian, P, Chong, M.L., Bengston, D. (2008). Development of squid-hydrolysate based larval diet and its feeding performance on summer flounder, *Paralichthys dentatus*, larvae. *Journal of World Aquaculture Society* **39**, 196-204.
- Lian, P.Z., Lee, C.M. & Park, E. (2005). Characterization of squid processing byproduct hydrolysate and its potencial as aquaculture feed ingredient. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 5587-5592.
- Llanes, J., Toledo, J., Savon, L. & Guitérrez, O. (2012). Utilización de silos pesqueros en la formulación de dietas semi-húmedas para tilapias rojas (*Orcochromis niloticus x O. mossambicus*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* **1**, 67-72.
- Nakajima, K., Yoshie-Stark ,Y., & Ogushi, M.. (2009). Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. *Food Chemistry*, **114**, 844-851.
- Plascencia-Jatomea, M., Olvera-Novoa, M. A., Arredondo-Figueroa, J. L., Hall, G. M. and Shirai, K. (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 753-759.
- Ramírez-Ramírez, J.C., Huerta, S., Arias, L. Prado, A. y Shirai, K. (2008). Utilization of fisheries by-catch and processing wastes for lactic acid fermented silage and evaluation of degree of protein hydrolysis and in vitro digestibility. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **7**, 1-10.
- Rodger, G., Weddle, R.B., Carig, P. & Hastings,R. (1984). Effect of alkaline protease activity on some properties of comminuted squid. *Journal of Food Science*, **49**, 117-119.
- Sánchez.Torres, H., Juscamaita-Morales, J., Vargas-Cardenas, J. & Oliveros-Ramos, R. (2008). Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecología Aplicada*, **1**, 149-158.
- Sánchez Sánchez, A. (2011). *Obtención de un Hidrolizado de Calamar Gigante y su uso Potencial como Ingrediente en Alimento para Acuicultura*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.
- Shahidi, F. (2006). *Maximising the Value of Marine by-Products*, Shahidi, F. (Editor), CRC Press, St. Johns, Canada
- Shirai, K. 2006. Situación actual y perspectivas del uso de ensilado de subproductos pesqueros en la alimentación de organismos acuáticos cultivados. p. 420-433. En: *Avances en nutrición acuícola. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* Cruz Suárez, L. E., M. Denis Ricque, M. Tapia Salazar, M. G. Nieto López, D. A. Villarreal Cavazos, A. C. Puello Cruz y A. García O. (Editores).. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., México.

- Sugiyama, M., Kousu, S., Hanabe, M. & Okuda, Y. (1989). *Chemical properties in utilization of squid*. Oxonian Press: New Delhi-India.
- Van der Ven, C., Muresan S., Gruppen, H., De Bont, D.B.A., Merck K.B. & Voragen, A.G.J. (2002). EFTIR Spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 6943-6950.
- Vidotti, R. M., Carneiro, D., Macedo-Viegas, E. & Carneiro, D. J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology* **105**, 199-204.
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. D. M., & Millan, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites*, **52**, 132-136.
- Windsor, M. & Barlow, S. (1981). *Introduction to fishery by-products*. Fishing News Books Ltd. England. pp. 183

Selección de Alimentos y Estrategias de Alimentación acordes a las Condiciones de Cultivo del Camarón

Luis Rafael Martínez Córdova¹, Marcel Martínez Porchas², Anselmo Miranda Baeza³ y José Antonio López Elías¹

¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora. Blvd Colosio, entre Reforma y Sahuaripa, Edificio 7G. Hermosillo, Sonora, 83000, México.

E-mail: lmtz@guaymas.uson.mx

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Carretera a La Victoria, Km 1.5, Hermosillo, Sonora, México

³Universidad Estatal de Sonora, Carretera a Huatabampo Km 5, Navojoa, Sonora 85800, México

Resumen

El presente documento es el producto de una exhaustiva revisión bibliográfica, enriquecido con experiencias de los autores e instituciones participantes, sobre los alimentos y estrategias de alimentación que mejores resultados han dado para el cultivo del camarón bajo diferentes condiciones. El documento se divide en dos secciones, una relativa a los alimentos en sí, en donde se contemplan aspectos de composición química proximal y características físicas, especialmente hidroestabilidad; la otra sección se refiere a las estrategias de alimentación abarcando cuestiones de ajuste de la ración, formas de distribución y frecuencias de alimentación. En cada uno de los casos se dan referencias sobre el desempeño, ya sea de los alimentos o de las estrategias de alimentación, bajo diferentes condiciones, principalmente formas y sistemas de cultivo, talla o edad de los organismos, variables ambientales, participación de la productividad natural, entre otros. Como conclusión de la revisión se elaboró una tabla que se sugiere como una guía básica para la selección de los alimentos y las estrategias de alimentación más adecuados para diferentes niveles de intensificación, talla de los organismos y participación de la productividad natural.

Palabras clave: *alimentación, camarón, estrategias*

Introducción

Siendo el alimento y la alimentación dos de los principales costos operativos en la actividad camaronícola, y al mismo tiempo dos de los aspectos que mayormente influyen en la respuesta productiva de los organismos en cultivo, es de la mayor importancia un manejo adecuado de ambos en aras de una camaronicultura sustentable (Martínez Córdova, 2009).

Actualmente el cultivo de camarones peneidos se lleva a cabo principalmente en sistemas semi-intensivos y en menor medida en intensivos e hiperintensivos. Sin embargo aún dentro de estos sistemas, sobre todo dentro del semi-intensivo, existen variaciones muy amplias en las condiciones de cultivo en diversos aspectos tales como:

- a. Tipo de estructuras utilizadas
- b. Densidad de siembra, la cual puede ir desde 8 hasta más de 50 Pl's/m²
- c. Recambio diario de agua, que fluctúa entre 0 y más de 20 %
- d. Salinidad la cual puede variar desde <2 hasta >60 UPS
- e. Temperatura, que fluctúa en un rango de 18 hasta 35 °C.
- f. Sólidos suspendidos totales y orgánicos (turbidez) que puede variar entre casi cero y hasta más de 500 mg/L. (>60 y <20 cm en el disco de Secchi)
- g. Alcalinidad y pH, cuyos valores fluctúan entre < 20 y > de 400 mg eq de CaCO₃/L, y entre 5 y 11, respectivamente.
- h. Disponibilidad de alimento natural (bacterias, fitoplancton, zooplancton, bentos, etc.), que puede ir desde insignificante hasta muy abundante.

Aún dentro de una misma granja en la que se pretende manejar todos los estanques de manera homogénea, suele haber a través del tiempo, o incluso entre unas unidades y otras, variaciones muy significativas en algunos de los parámetros antes mencionados.

Todas estas variaciones tienen en mayor o menor medida un efecto en el consumo, asimilación y aprovechamiento de alimento y consecuentemente en la respuesta productiva del camarón. Adicionalmente, aspectos intrínsecos al camarón mismo como especie, talla o

estadio de desarrollo, condición nutricional e inmune, estadio de muda, entre otros, tienen también una marcada influencia en estos aspectos de la alimentación.

El presente documento es una revisión, que incluye experiencias de los propios autores, sobre la selección y desempeño de los alimentos y las estrategias de alimentación bajo las diversas condiciones de cultivo de camarón en sistemas semi-intensivos y en menor medida, intensiva e hiperintensiva.

La primera sección se refiere a la calidad de los alimentos en aspectos de composición bioquímica e ingredientes, valor nutricional, frescura e hidroestabilidad.

La segunda parte está enfocada a las estrategias de alimentación, considerando: formas de suministro, ajuste de la ración y frecuencias.

I. Selección y Desempeño de Alimentos.

1.1 Formulación y Composición Química Proximal (FCQP)

Partiendo del hecho de que en cultivos semi-intensivos de camarón, el alimento artificial que se suministra es, o debiera ser un complemento de lo que el organismo puede obtener como alimento natural dentro del sistema, es muy importante que estos alimentos tengan una composición química proximal, realmente complementaria al alimento natural. Es muy usual que se utilicen alimentos completos o sobre-formulados aún en cultivos en los que la abundancia del alimento natural es alta; es común sobre todo, la inclusión de altos niveles de proteína de origen animal. Esto impacta no solamente la rentabilidad de la granja, sino además aumenta el potencial impacto ambiental tanto dentro del sistema como en los ecosistemas receptores de los efluentes (Martínez-Porchas y Martínez-Córdova, 2012).

1.1.1. Desempeño de la FCQP en relación a la talla

La edad o talla de los organismos es un aspecto muy importante a tomar en cuenta para la selección del alimento más adecuado. Los requerimientos del camarón varían significativamente durante su desarrollo y los alimentos experimentales o comerciales tienen un desempeño diferente según la edad y talla. Se ha documentado desde hace mucho tiempo que para postlarvas y juveniles tempranos, los niveles proteicos deben ser altos (alrededor de 40 %), sin embargo niveles de proteína superiores a 40 % no son necesarios e inclusive son menos eficientes que dietas con niveles proteicos menores (Venkataramiah *et al.* 1975). Kureshy y Davis (2002) evaluaron los requerimientos de proteína para mantenimiento y máximo crecimiento de juveniles y sub-adultos de *L. vannamei* y encontraron que los requerimientos son mayores para los juveniles y además que la eficiencia del alimento aumenta al aumentar el nivel proteico del alimento y disminuye al aumentar la frecuencia de alimentación. Traducido a términos prácticos esto significa que para camarones más pequeños, se requieren o mayores niveles de proteína o mayores cantidades de alimento por biomasa, o una combinación de ambos, pero es necesario también tomar en cuenta que la frecuencia de alimentación sea moderada. En muchas granjas semi-intensivas de camarón en México y de otros países del mundo esto no se toma en cuenta y se ofrece el mismo alimento desde el principio hasta el final del cultivo.

1.1.2. Desempeño de la FCQP en relación a condiciones ambientales

Los parámetros ambientales como temperatura y salinidad afectan el desempeño de los alimentos para el camarón. Trabajos tan anteriores como el de Robertson *et al.* (1993) documentaron que la salinidad interactuó con el nivel proteico de la dieta para el crecimiento del camarón blanco. A salinidades de 46 ‰ los camarones crecieron mejor con una dieta de 45 % de proteína cruda (PC) que con una de 25 o de 35 %; mientras que a una salinidad de 12 ‰ el crecimiento fue mejor con la dieta de 35 %, de PC que con la de 45 y 25 %. Teichert-Coddington y Rodríguez (2007) reportaron una producción de camarón blanco en Honduras 240 % mayor en la estación de lluvias (baja salinidad) que en la

estación seca (alta salinidad), lo cual confirma que a salinidades moderadamente bajas el desempeño de los alimentos es mejor.

La respuesta de los camarones a los alimentos suministrados difiere mucho cuando la evaluación se lleva a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio o condiciones naturales de granja. Hari *et al.* (2004) evaluaron el desempeño de *P. monodon*, en ambas condiciones; para el laboratorio utilizaron dietas de 40 % y de 25 % de PC, ambas con o sin la adición de carbohidratos en el agua (para la promoción de bacterias heterótrofas), mientras que para condiciones de granja, se evaluaron dietas de 25 % + carbohidratos y de 40 % sin ellos. En laboratorio la menor tasa de crecimiento específico y las mayores tasas de conversión alimenticia (TCA), se obtuvieron con la dieta de 25 % sin carbohidratos y no hubo diferencias en los demás tratamientos; mientras que la mejor producción fue obtenida en el tratamiento de 25 % de proteína más carbohidratos. Para condiciones de granja, la mayor producción, la menor TCA, y la mayor eficiencia de asimilación proteica, se obtuvieron en el tratamiento con 25 % de proteína más la adición de carbohidratos en el agua. Igualmente se encontró que la mejor relación costo-beneficio se obtuvo en ese tratamiento, influida sobre todo por la reducción de un 35 % en el costo del alimento.

1.1.3. Desempeño de la FCQP en relación a la intensificación y recambio

La respuesta productiva de los camarones en términos de sobrevivencia y crecimiento, es por lo general inversamente proporcional a la densidad de organismos (Arnold *et al.* 2005), lo cual está relacionado en parte con el estrés por hacinamiento, pero principalmente con la disponibilidad de alimento natural, que disminuye en la medida que la densidad aumenta, a menos que se diseñen estrategias para revertir esta tendencia, como lo sería el uso de substratos artificiales o la promoción directa de las comunidades bióticas (Martínez *et al.* 2006; Audelo-Naranjo *et al.* 2011). Teichert-Coddington y Rodríguez (1995), sugieren que para densidades de 5 a 11 org/m², los alimentos suplementarios no deben contener más de 20 % de proteína, mientras que a mayor intensificación, es necesario aumentar estos niveles. Esto implica que en cultivos más intensificados y en los que no se promueva de alguna manera el alimento natural, se tendría que utilizar necesariamente una mayor

proporción de alimento suplementario y/o formulaciones más completas sobre todo en cuanto a proteína animal (harina de pescado). Sin embargo es posible que también a altas densidades se utilicen alimentos con niveles bajos de proteína animal, siempre y cuando sean enriquecidas con determinados componentes. Por ejemplo Browdy *et al.* (2012) alimentaron juveniles de *L. vannamei* con una dieta basal conteniendo 15 % de harina de pescado y dos dietas experimentales en que el 50 y 100 % de la harina de pescado se sustituyó con harina de soya; las dietas experimentales fueron suplementadas o no con 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMTBa). La respuesta productiva fue similar entre la dieta basal y las experimentales suplementadas con HMTBa, pero inferior en aquella que no se suplementaron. Con relación al recambio diario de agua de los estanques, se ha sugerido que en sistemas con bajo o cero recambio, los nutrientes son más eficientemente aprovechados, debido a la recuperación a través de la cadena trófica que se desarrolla en los estanques, especialmente el material floculado compuesto principalmente por bacterias, cianobacterias y microalgas (Burford *et al.* 2004). La disminución en las tasas de recambio aumentan el tiempo de retención del agua y permiten una mejor utilización de los nutrientes, esto puede disminuir los factores de conversión alimenticia Miranda-Baeza *et al.* (2007). En base a esto es factible utilizar menos cantidad de alimento suplementario y/o formulaciones menos completas (por ejemplo con menores niveles de proteína). Burford *et al.* (2003) en un cultivo hiper-intensivo (120 Pl/m²) de camarón blanco con cero recambio, utilizaron dietas con 24 y 31 % de proteína, con resultados en cuanto a recuperación de nitrógeno y fosforo, superiores a los obtenidos en sistemas abiertos.

1.1.4. Desempeño de la FCQP en relación a la productividad natural

Un aspecto de gran relevancia en la alimentación de camarones en cultivo, es la contribución nutricional de la productividad natural considerando diversos grupos de organismos desde bacterias, microalgas, zooplankton y organismos bentónicos. Eppet *et al.* (2002) estimaron que hasta el 31% de los requerimientos de nitrógeno de *L. vannamei* fueron obtenidos de la productividad natural de los estanques. Se ha documentado a través de varios estudios, que en sistemas en donde la contribución de la productividad natural es alta, es factible utilizar alimentos con menores niveles de proteína sin que se afecte la

respuesta productiva de los organismos cultivados. Martínez-Córdova *et al.* (2002, 2003), evaluaron alimentos con 25, 35 y 40 % de proteína para el cultivo semi-intensivo alto (25 pL/m²) de camarón blanco (*L. vannamei*) y camarón azul (*L. stylirostris*), en estanques en que la productividad natural se había incentivado; se encontró que para el camarón blanco, alimentos con 25 % de proteína fueron tan eficientes o más que aquéllos con 35 y 40 %; sin embargo para camarón azul, los mejores resultados se encontraron con alimentos de 35 y 40 % de proteína, pero sin diferencias significativas entre ellos. Xia *et al.* (2010) evaluaron dietas con diferentes niveles de proteína cruda para *L. vannamei* pero en cultivos hiperintensivos y ausencia de productividad natural. Encontraron que para estas condiciones se requieren alimentos con un 43 % de PC, para obtener un buen crecimiento, sobrevivencia y tolerancia al estrés.

El uso de alimento natural exógeno puede ser otra alternativa para disminuir la utilización de alimento formulado en el cultivo del camarón. Martínez *et al.* (2013) utilizaron insectos (*Tricocorixa sp*) para sustituir el alimento formulado en un 25, 50, 75 y 100 % en la pre-engorda intensiva de *L. vannamei*. La sustitución de 25 y 50 % resultó exitosa en términos de la respuesta productiva del camarón y la calidad del agua del sistema. En un estudio similar, Campaña-Torres *et al.* (2010) utilizaron *Artemia* adulta para incorporarla en la pre-engorda intensiva del camarón blanco en condiciones de laboratorio, encontrando que la incorporación a niveles de 2 a 4 organismos por litro, tuvo un efecto significativo en la mejora del crecimiento y producción, y en la disminución de la TCA. Anand *et al.* (2013) evaluaron 3 niveles (3, 6 y 9 %) de suplementación de perifiton promovido al exterior en bambú, en el cultivo intensivo al interior de *P. monodon*. Encontraron que el tratamiento con una suplementación de 6 %, mostró una mejor respuesta productiva del camarón, en términos de crecimiento, TCA y eficiencia de asimilación proteica.

Otro aspecto relevante en este sentido, es la contribución del material floculado, constituido principalmente por bacterias y fitoplancton. Burford *et al.* (2004) evaluaron la respuesta productiva de *L. vannamei* en sistemas hiperintensivos con cero recambio de agua, utilizando diferentes concentraciones de material floculado y alimento formulado con solo 31 % de proteína. Encontraron que la contribución del material floculado fue de entre 18 y

29 % para camarones de 1 y 9 g, respectivamente y que los organismos respondieron bien a las dietas de baja proteína y mejor cuando la concentración de material floculado fue 20 % más alta. Coyle *et al.* (2008), probaron diferentes intensidades y fuentes de luz en un cultivo de *L. vannamei* basado en bioflocs y alimento suplementario con 35 % de proteína; encontraron que en condiciones de luz natural, luz halógena y luz fluorescente de baja intensidad, la respuesta productiva del camarón fue muy buena. Ballester *et al.* 2010, evaluaron alimentos con 25, 30, 35, 40 y 45 % de proteína cruda para *Farfantepenaeus paulensis* en sistemas basados en bioflóculos, No encontraron diferencias en sobrevivencia, mientras que el crecimiento con dietas de 35 % de proteína o mayores, fue mejor que con dietas de 25 y 30 %. Concluyen que en estos sistemas se deben mantener niveles proteicos de 35 %, no siendo necesarias inclusiones mayores. Zhao *et al.* (2012) cultivaron intensivamente *Marsupenaeus japonicus* en un sistema de cero recambio con y sin bioflóculos y encontraron que con el uso de bioflóculos se obtuvo una producción 41.3 % mayor y una TCA 7.7 % menor. Lopez-Tarin (2011) realizó un cultivo de camarón blanco *L. vannamei* en biofloc con distintos porcentajes de restricción en la ración alimenticia (0, 85, 70 y 55%) a nivel hiperintensivo (750 PL 14) /m² y durante 45 días se evaluó el efecto del biofloc como complemento de un alimento comercial en el crecimiento, sobrevivencia y factor de conversión alimenticia; el contenido de PC del biofloc varió de 28.19 a 30.60 %, el de carbohidratos de 14.54 a 15.93 % y de cenizas 44.06 a 51.06 %; y concluyó que el biofloc permite complementar la dieta cuando se reduce hasta un 30% del alimento peletizado, sin que se afecten significativamente el crecimiento y la sobrevivencia. Viau *et al.* (2013) evaluaron dos sistemas de cultivo hiperintensivo al interior para *F. paulensis*, uno con alimento formulado + bioflóculos y otro con solo alimento formulado. Encontraron que la supervivencia fue significativamente superior para el tratamiento con bioflóculos, peor no encontraron diferencias en el crecimiento.

Todos los anteriores resultados claramente indican que en sistemas en donde la comunidad microbiana es manejada de manera adecuada (bioflóculos o biopelículas), es factible utilizar menor cantidad de alimento formulado o bien formulaciones menos completas, o una combinación de ambos.

1.1.5. Desempeño de la FCQP en condiciones de co-cultivo o policultivo.

Existe información confiable que indica que las dietas pueden tener un desempeño diferente cuando el camarón es cultivado con otra u otras especies. Cruz-Suárez *et al.* (2010) documentan que el camarón en co-cultivo con macroalgas tiene una respuesta productiva muy adecuada y que en estas condiciones, se puede reducir el uso de alimento suplementario. Ellos encontraron que el consumo de *Ulva clathrata* por parte del camarón fue tal que aun reduciéndoles la ración de alimento suplementario de 10 a 45 %, su crecimiento se incrementó en un 60 %, y además hubo un aumento en los lípidos y carotenoides corporales de los organismos en co-cultivo. Lombardi *et al.* (2006) cultivaron *L. vannamei* en jaulas flotantes a densidades de 100 juveniles/m² con y sin la macroalga *Kappaphycus alvarezii*. El camarón presentó una muy alta tasa de crecimiento y producciones de más de 3 kg/m² (más de 30 ton/ha), mientras que la macroalga tuvo producciones de más de 23 kg/m². No se observaron diferencias en el crecimiento de los camarones en los tratamientos. Anaya-Rosas *et al.* (2012) cultivaron *L. vannamei* en un sistema intensivo de recirculación con cortinas plásticas colonizadas con las macroalgas *Ulva sp.*, *Lyngbya sp.*, *Cladophora sp.* y *Ulva flexuosa*, y obtuvieron un FCA de 0.9:1 y un rendimiento de 6.1 kg/m². Martínez-Córdova y Peña-Messina (2005) cultivaron camarón blanco (*L. vannamei*) y camarón azul (*L. stylirostris*) en mono y policultivo y encontraron que el camarón blanco tuvo mejor crecimiento, sobrevivencia, producción y TCA en el policultivo, mientras que el camarón azul solo tuvo un mejor crecimiento en policultivo pero menor sobrevivencia y producción, sin que se observaran diferencias en la TCA.

1.1.6. Desempeño de Dietas con Ingredientes Alternativos

Existe en la literatura científica mucha información relacionada con el uso de ingredientes alternativos en las dietas para camarón, sobre todo para sustituir parcial o totalmente la harina de pescado (Gaxiola *et al.* en prensa); sin embargo pocos de estos estudios precisan la eficiencia de estas dietas bajo diversas condiciones de cultivo. Investigaciones de hace ya algunas décadas (Venkataramiah *et al.* 1975) mostraban que para juveniles de *Penaecus aztecus* el crecimiento disminuía cuando el nivel de proteína se incrementaba por encima de

40 % y que la inclusión de ingredientes vegetales mejoraba la eficiencia de asimilación proteica. Amaya *et al.* (2007) substituyeron la harina de pescado en la dieta de *L. vannamei* cultivado al exterior, por harina de soya y gluten de trigo a diferentes niveles de inclusión; al final del experimento de 18 semanas en estanques de 0.1 Ha, no encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de producción. En otro estudio los mismos autores (Amaya *et al.* 2007b), utilizaron harina de subproductos avícolas para substituir parcialmente la harina de pescado, fabricando dietas con 9, 6, 3 y 0 % de harina de pescado y comparándola con una dieta basada en ingredientes vegetales; los resultados no mostraron diferencias significativas en la respuesta productiva. Harter *et al.* (2011) substituyeron un 25 y 50 % de la harina de pescado en dietas de camarón blanco juvenil, por harina destoxificada de *Jatropha curcas* y encontraron un mejor crecimiento y ganancia de biomasa en las dietas con sustitución de la harina de pescado. Cruz-Suárez *et al.* (2007) demostraron que las macroalgas pueden ser incluidas como ingredientes de dietas para *L. vannamei* en sistemas con recirculación al interior, mostrando un desempeño adecuado en cuanto a la respuesta productiva de los camarones, sobre todo la especie *Ulva clathrata*. Un reciente estudio llevado a cabo por Bulbul *et al.* (2013) evaluó dietas para *Marsupenaeus japonicus* reduciendo la harina de pescado desde un 40 %, a 28, 24, 20 y 16 %, substituyéndola por una mezcla de harina de soya y harina de canola. Se encontró que la reducción hasta el nivel de 20 % no tuvo efectos significativos en la respuesta productiva del camarón.

Los anteriores resultados implican que el camarón blanco puede utilizar eficientemente dietas basadas mayormente en ingredientes vegetales, siempre y cuando se le cultive en condiciones en que la productividad natural tenga una participación importante en su nutrición.

1.2. Características físicas de los alimentos

Los alimentos acuícolas deben cumplir con ciertas características para poder ser eficientemente aprovechados por los organismos que se cultivan. Entre estas características destacan: tamaño, forma, flotabilidad e hidroestabilidad. Para el caso del camarón se ha encontrado que los alimentos no deben tener ninguna flotabilidad ya que el organismo se alimenta en el fondo; la forma más adecuada es la de chorizos o “pellets” con un tamaño y grosor que van aumentando con la talla del organismo. Respecto a la hidroestabilidad, se requiere que sea de al menos 4 horas dados los hábitos alimenticios del camarón que es un comedor lento e intermitente (Cruz-Suárez *et al.* 2006). Desde luego pueden utilizarse alimentos con menos hidroestabilidad, siempre y cuando se aumente la frecuencia de alimentación y se disminuya el tamaño de las raciones. La hidroestabilidad de los alimentos depende en gran medida de factores ambientales, sobre todo de la temperatura y la salinidad. Obaldo *et al.* (2002), llevaron a cabo un estudio en donde encontraron que tanto la temperatura como la salinidad afectaron significativamente la retención de materia seca y la lixiviación del alimento, siendo menor el porcentaje de retención y mayor la pérdida de nutrientes, a más altas temperaturas y más bajas salinidades. Esto dependió también de la dieta utilizada (experimental o comercial) y del método de agitación empleado: estático, agitación horizontal o agitación vertical. La mayor retención se encontró con el método estático para dietas comerciales, a temperaturas bajas y salinidades altas (93%) y la menor con el método de agitación vertical en dietas experimentales a temperaturas altas y salinidades bajas (72%). Esto traducido a términos prácticos, implica en primer término que las dietas deben ser fabricadas con procesos e ingredientes que garanticen una adecuada hidroestabilidad, lo cual no se logra siempre al fabricar dietas experimentales; en segundo término, que para establecer los tamaños de las raciones y las frecuencias de alimentación, se deben considerar la temperatura y la salinidad de la columna de agua. Si por ejemplo, se tienen temperaturas altas y salinidades bajas, el tiempo entre raciones debe disminuirse, o lo que es lo mismo, aumentar la frecuencia de alimentación, disminuyendo el tamaño de las raciones. El caso contrario sería cuando se tienen bajas temperaturas y altas salinidades, aquí es factible aumentar el tamaño de las raciones y disminuir la frecuencia. Igualmente es necesario considerar que si se está trabajando en estanques con agitación

vertical (aireadores de paleta), las raciones deben ser menores y las frecuencias mayores que si se trabaja en sistemas sin agitación (aireación).

II. Selección de estrategias de alimentación

II.1. Tasa de Alimentación (TA)

La cantidad de alimento suplementada por día puede y debe variar significativamente de acuerdo a diversos factores y condiciones de cultivo tales como: talla, edad o estado de desarrollo de los organismos; aporte de la productividad natural; intensificación y densidad de siembra; parámetros ambientales; estado de muda y de salud del camarón, entre otros.

II.1.1. Ajuste de la TA en base a la talla

Tal como se ha comentado previamente el metabolismo de todos los organismos, incluyendo los camarones, se modifica con su desarrollo, y en base a esto es que su tasa de alimentación debe ajustarse a estos cambios. En términos generales se ha encontrado que los camarones juveniles tienen un metabolismo más acelerado que los sub-adultos o adultos y que por lo tanto la ración alimenticia debe ser mayor respecto a su biomasa. Es necesario sin embargo tomar en cuenta, que por lo general la participación de la productividad primaria es comúnmente más alta al inicio del cultivo cuando los camarones están más pequeños, y por tanto la necesidad de alimento suplementario es menor. Nunes y Parsons (2000) reportan que para *Penaeus subtilis*, el consumo de alimento en términos de biomasa total se incrementó directamente en función de la talla, pero en términos de porcentaje, decreció con la talla. Diversos estudios han sugerido que para postlarvas y juveniles de hasta 0.5 g, se utilice una tasa de alimentación de 8 % diario de la biomasa; para organismos de 0.5 a 3 g; la tasa se baje a 6 %; de 3 a 5 g, al 5 %; de 5 a 10 g, al 4 % y de 10 g en adelante al 3 %. Sin embargo esto varía significativamente de acuerdo a las condiciones previamente mencionadas. En condiciones de alta productividad, se ha encontrado que los camarones crecen adecuadamente, aún sin alimento (Martínez Córdova, 2006).

II.1.2. Ajuste de la TA en base a las condiciones ambientales

Considerando que los parámetros ambientales, especialmente la temperatura, tienen una influencia significativa en el metabolismo de los camarones y consecuentemente el consumo y asimilación de alimento, las tasas de alimentación deben ser congruentes con esto. Wyban *et al.* (1995) realizaron 5 experimentos para evaluar el efecto de la temperatura en el consumo de alimento, crecimiento y tasa de conversión alimenticia del camarón blanco de diferentes tallas. En los tres primeros, probaron temperaturas de 23, 27 y 30 °C, y un control de temperatura ambiental de 26.2 °C. Las tallas de siembra fueron de 3.9, 10.8 y 16 g. El consumo de alimento y el crecimiento se vieron incrementados con el aumento de la temperatura, pero en diferente proporción según la talla. La TCA no varió con la temperatura en la talla más pequeña, pero si lo hizo en la intermedia y grande. En base a esto se hizo un siguiente experimento probando dos tallas y tres temperaturas, en el que nuevamente el crecimiento y la TCA se vieron influenciadas por el aumento de temperatura, pero en el caso de la TCA fue mayormente dependiente de la talla. La conclusión del estudio fue que para camarones de menos de 5 g, la temperatura óptima es de alrededor de 30 °C, mientras que para organismos mayores de 10 g, es de 27 °C. Se esperaría que el crecimiento y consumo de alimento se redujeran para cualquier talla, cuando la temperatura sea menor de 23 °C y para tallas grandes, cuando sobrepasara los 30°C. Para propósitos prácticos, esta información nos indica que cuando la temperatura del estanque está por debajo de 23 °C (por ejemplo en abril cuando se siembra en Sonora y Sinaloa), la tasa de alimentación debería reducirse en una proporción que dependería de la talla de siembra, siendo la reducción un poco menor si se sembraran postlarvas o juveniles pequeños y un poco mayor si se sembraran juveniles más grandes.

II.1.3. Ajuste de la TA en base a la productividad natural

Varios estudios se han realizado para establecer la tasa de alimentación adecuada en relación a la productividad natural del sistema. Martínez *et al.* (1998) establecieron que para el camarón blanco, la tasa de alimentación podía reducirse de 3 hasta 1.5 % diario sin menoscabo del crecimiento y de la producción, cuando la biomasa de alimento natural útil

superaba los 40 g/m³. Roy *et al.* (2012) cultivaron camarón blanco en tres tipos de sistemas: estáticos, de flujo continuo y con reposición de agua; en todos los casos se usó agua verde proveniente de cultivos comerciales, ofreciendo a los organismos diversos porcentajes de la ración diaria normal. No encontraron diferencias entre ofrecer la ración completa y ofrecer un 60 o un 80 % de la misma, en términos de crecimiento y producción, demostrando con ello la significativa participación de la productividad natural en este tipo de cultivos. Estos estudios demuestran que las tasas de alimentación para sistemas con alta productividad natural debieran ajustarse a la baja, en relación a las que normalmente se utilizan en cultivos en donde no se promueve adecuadamente la productividad natural.

II.2 Formas de Suplementación y Distribución del Alimento

La forma en que se pone el alimento a disposición de los camarones cultivados puede ser variable y esta variación afectar la respuesta productiva de los organismos. Para los sistemas semi-intensivos e intensivos, las formas más comunes son la alimentación al boleo y la alimentación en charolas. Para sistemas hiperintensivos puede manejarse también la alimentación automatizada. La alimentación al boleo puede hacerse en forma manual utilizando lanchas que recorren el estanque, o puede hacerse mecánicamente a través de sopladores instalados en vehículos que recorren los bordes de los estanques. La selección de la mejor estrategia depende de varios factores entre ellos la intensificación y el tipo de instalaciones que se tengan. Para cultivos intensivos en donde es conveniente aumentar la frecuencia de alimentación, sería más práctico utilizar la alimentación mecanizada, porque se reduce el tiempo de suministro y es posible hacer más alimentaciones por día. En sistemas semi-intensivos bajos esta forma de suministro no es rentable por los costos que implica. Casillas-Hernández *et al.* (2007) evaluaron la alimentación al boleo y la alimentación en charolas para el cultivo semi-intensivo del camarón blanco, encontrando que el crecimiento promedio así como la recuperación de nitrógeno y fósforo como biomasa de camarón fueron mejores en donde se utilizó alimentación en charolas.

II.3. Frecuencia de Alimentación

La frecuencia de alimentación es un aspecto de gran trascendencia en el cultivo de organismos acuáticos incluyendo el camarón, ya que de ella depende en gran medida el aprovechamiento óptimo o la pérdida de materia orgánica y nutriente (lixiviación). No existe una frecuencia de alimentación ideal para todas las condiciones y sistemas de cultivo.

II.3.1. Ajuste de la frecuencia en base a la talla

Es por lo general un supuesto entendido que la frecuencia de alimentación debiera ser mayor a menor talla, considerando que a medida que los organismos crecen, su eficiencia de conversión alimenticia disminuye. Sedgwick (1979) encontró que juveniles tempranos de *Penaeus mergiensis* crecieron mejor y utilizaron más eficientemente el alimento, cuando se les alimentó 4 veces al día, que cuando se les alimentó solo una vez.

II.3.2. Ajuste de la frecuencia en base a la intensificación

En términos generales se ha encontrado que entre más intensivo sea el sistema, se requiere una frecuencia mayor; sin embargo esta no es una regla que aplique para todos los casos. Velazco et al. (1999) evaluaron 5 frecuencias de alimentación para el camarón en un sistema estático usando una dieta con 19.5 % de proteína. En un primer experimento en que las dietas se proporcionaron automáticamente a tiempos iguales (3, 5, 8, 11 y 15 veces al día), no se encontraron diferencias en sobrevivencia, crecimiento y acumulación de N en la columna de agua. En un segundo experimento en el que las dietas se distribuyeron manualmente a intervalos diferentes (1, 2, 3, 4 y 6 veces al día), no se encontraron diferencias en sobrevivencia y crecimiento, pero la acumulación de nitrógeno fue menor en aquellas alimentadas dos veces al día.

Aguilar Carvalho y Nunes (2006) realizaron un experimento en estanques al exterior cultivando *L. vannamei* a una densidad de 80 org/m², en el que evaluaron 5 diferentes frecuencias de alimentación (2, 3, 4, 5 y 6 veces al día). En este caso, la frecuencia de

alimentación no afectó significativamente la respuesta productiva de los organismos, aunque se obtuvo una respuesta ligeramente mejor a 5 veces por día; adicionalmente se encontró que después de una inmersión de 8 horas en el agua, el alimento perdió hasta casi un 40 % de proteína y más de 9 % de lípidos, aunque no se encontraron diferencias en la lixiviación ente los tratamientos sobre el período de estudio.

Para densidades más intensivas (100 Pl/m^2), Tacon *et al.* (2002) encontraron que alimentando 8 veces al día se obtuvieron mejores parámetros productivos. Contrariamente, para *P. monodon* a densidades de 25 org/m^2 , Smith *et al.* (2002) no encontraron diferencias en los parámetros de producción utilizando frecuencias de alimentación de 3, 4 y 5 veces al día.

Estos resultados confirman que para cultivos hiperintensivos, es necesario incrementar las frecuencias de alimentación, además de utilizar formulaciones más completas.

II.3.3. Distribución diaria de la ración alimenticia.

Existen informaciones contradictorias en relación a si los camarones deben alimentarse en el día o en la noche; mientras que hay reportes de que estos organismos comen mayormente de noche, hay quienes afirman que lo hacen mejor de día. Robertson *et al.* 1993, afirma que *L. vannamei* respondió mejor, en términos de crecimiento, a la alimentación diurna que a la nocturna. Tacon *et al.* (2002) probaron dietas experimentales y comerciales en una corrida de 8 semanas para engordar camarón a altas densidades ($100/\text{m}^2$) al interior y al exterior, usando 3 diferentes estrategias de alimentación: 4 veces en el día, 4 veces en la noche y 8 veces (4 día y 4 noche). Los mejores crecimientos se obtuvieron al exterior alimentando con dietas experimentales para camarón 8 veces al día. En cultivos semi-intensivos es recomendable la alimentación diurna debido a que en las etapas finales del cultivo la carga orgánica dentro de los estanques es elevada (Miranda *et al.* 2007), incrementando considerablemente la respiración que puede llegar a niveles cercanos a 2 mg/L en las primeras horas del día; bajo estas condiciones el camarón se encuentra en un estado de estrés fisiológico.

Conclusiones

A manera de conclusión y en base a todas las experiencias recabadas en la presente revisión, nos hemos permitido elaborar la siguiente tabla, como una guía general para seleccionar los alimentos y las estrategias de alimentación más adecuadas para diferentes tipos de cultivo, tallas y participación de la productividad natural. Es importante considerar que esto no es una receta y que las sugerencias se pueden modificar en razón de situaciones particulares de cada cultivo, por ejemplo: cambios en las condiciones ambientales; bajas importantes de oxígeno en la columna de agua, muda del camarón, períodos prolongados de alta nubosidad, etc. Si se utiliza la biotecnología actual para la promoción y aprovechamiento de los microorganismos en la nutrición de los camarones (biopelículas y bioflóculos), los niveles de proteína animal en la dieta y la tasa de alimentación se puede reducir aún más, aprovechando ingredientes vegetales alternos.

Tabla 1. Guía para la selección de alimentos y estrategias de alimentación para diferentes tipos de cultivo, tallas y participación de la productividad natural en el sistema.

Tipo de cultivo	Talla de los organismos	Productividad natural	Alimento, frecuencia y tasa de alimentación
Semi-intensivo Bajo en estanques de tierra 8 a 12 Pl/m ²	Postlarva a juvenil temprano (< 5 g)	Buena	Dieta estándar o RHP* con 25 a 30 % PC Boleo 2 veces al día; 6 a 4 % de biomasa por día
		Baja	Dieta estándar o RHP, con 30 a 35 % de PC Boleo 2 veces al día; 8 a 5 % de biomasa por día
	Juvenil a sub-adulto (> 5 g)	Buena	Dieta estándar o RHP, con 18 a 25 % de PC Boleo 2 veces al día; 4 a 2.5 % de biomasa por día
			Dieta estándar con 25 a 30 % de PC Boleo 2 veces al día; 4 a 3.5 % de

		Baja	biomasa por día	
Semi-intensivo medio a alto en estanques de tierra 15 a 40 Pl/m ²	Postlarva a juvenil temprano (< 5 g)	Buena	Dieta estándar o RHP con 30 a 32 % de PC Boleo 2 veces al día Mecánica 3 veces al día; 6 a 4 % de biomasa por día	
		Baja	Dieta estándar con 32 a 35 % de PC Boleo 2 veces al día Mecánica 3 veces al día; 7 a 4.5 de biomasa por día	
		Buena	Dieta estándar o RHP con 30 a 32 % de PC Mecánica 3 veces al día; 4 a 3 % de biomasa por día	
		Baja	Dieta estándar o HP** con 32 a 35 % de PC Boleo 2 veces a día o Mecánica 3 veces al día; 4.5 a 3.5 % biomasa por día	
	Intensivo a intensivo alto en estanques con liners, concreto; raceways. 50 a 100 Pl/m ²	Postlarva a juvenil temprano (< 5 g)	Buena	Dieta estándar a HP con 35 % de PC Mecánica 3 a 4 veces al día; 8 a 4 % de biomasa por día
			Baja	Dieta HP con 35 a 40 % de PC Mecánica 3 a 4 veces por día; 8 a 4.5 % de biomasa por día
		Juvenil a sub-adulto (> 5 g)	Buena	Dieta estándar a HP con 32 a 35 % de PC Mecánica 3 a 4 veces por día; 4 a 3 % de biomasa por día
			Baja	Dieta HP con 35 % de proteína Mecánica 3 a 4 veces por día; 4.5 a 3.5 % de biomasa por día.

RHP* Reducida en harina de pescado (ingredientes vegetales alternativos)

HP** Dieta alto desempeño (high performance) (uso de inmunoestimulantes, probióticos, etc.)

Referencias

- Anand, PSS; Kohli, MPS; Roy, SD; Sundaray, JK; Kumar, S; Sinha, A; Pailan, GH; Sukham, MK. 2013. Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 392:59-68
- Amaya, E.A., Davis, D.A., and Rouse, D.V. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*, 262:393–401.
- Amaya, E., Davis, D.A. and Rouse, D.B. 2007b: Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 262:419-425.
- Anaya-Rosas R., Bückle Ramírez F. 2012. Cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en un sistema con agua de mar recirculada, como alternativa a los cultivos semi-intensivos tradicionales. *Biotecnología*, 14:16-24.
- Arnold, S.J., Sellars, M.J., Crocos, P.J., and Coman, G.J. 2005. Response of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*) to intensive culture conditions in a flow through tank system with three-dimensional artificial substrate. *Aquaculture*, 246:231-238.
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., I. de Abreu, Wasielesky Jr. W. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*, 16:163-172.
- Browdy, CL; Bharadwaj.; Venero, JA.; and Nunes, AJP. 2012. Supplementation with 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMTBa) in low fish meal diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 18:432-440.
- Bulbul, M, Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, M., and Kader, M.A. 2013. Performance of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* fed diets replacing fishmeal with a combination of plant protein meals. *Aquaculture*, 372-375: 45-51.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., and Pearson, D.C. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219:393-411.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., and Pearson, D.C. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, 232:525–537.
- Campaña-Torres, A., Martínez-Cordova, L.R., Villarreal-Colmenares, H. & Cortés-Jacinto, E. 2010. Evaluation of different concentrations of adult live *Artemia franciscana* (Kellogg 1906) as natural exogenous feed on the water quality and production parameters of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) intensively pre grown. *Aquaculture Research* 42(1): 40-46.

- Casillas-Hernández, R., Magallón-Barajas, F., Portillo-Clarck, G., and Páez-Osuna, F. 2007. Nutrient mass balances in semi-intensive shrimp ponds from Sonora, Mexico using two feeding strategies: Trays and mechanical dispersal. *Aquaculture*, 258: 289-298.
- Cruz-Suárez, L.E., Ruiz-Díaz, P.P., Cota-Cerecer, E., Martha Nieto-López, M.G., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., Villarreal-Cavazos, D., and Ricque-Marie, D. 2006. Revisión sobre algunas características físicas y control de calidad de alimentos comerciales para camarón en México. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Noviembre de 2006, Monterrey, N.L.
- Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Guajardo-Barbosa, C., and Ricque-Marie, D. 2007. Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition*, 15:421-430.
- Cruz-Suárez, L.E., León, A., Peña-Rodríguez, A., Rodríguez-Peña, G., Moll, B., and Ricque-Marie, D. 2010. Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture*, 301:64-68.
- Epp, M.A., Zeimann, D.A., Schell, D.M. 2002. Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture Research* 33, 839-846.
- Hari, B., Kurup, B.M., Varghese, J.T., Schrama, J.W., and Verdegem, M.C.J. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture*, 241:179-194.
- Kureshy, N., and Davis, D.A. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 204: 125-143.
- López-Tarin Francina. 2011. Efecto de la sustitución parcial de una dieta comercial complementada con floc en el crecimiento y la sobrevivencia de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en un sistema intensivo con cero recambio de agua. Tesis de Maestría en Ciencias en Tecnologías de Cultivos Acuícolas. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora, Navojoa, Sonora 60p.
- Martínez-Cordova, L., Campaña-Torres, A. and Porchas-Cornejo, M. 2002. The effect of variation in feed protein level on the culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in low water exchange experimental ponds. *Aquaculture Research*. 33:995-998.
- Martínez-Cordova, L., Campaña-Torres, A. and Porchas-Cornejo, M. 2003. Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition*. 9(3):155-160.
- Martínez Córdova, L. 2009. *Camaronicultura Sustentable*. Editorial Trillas, México, D.F. 176 pp.
- Martínez-Cordova, L.R., Campaña-Torres, A., Villarreal-Colmenares, H., Ezquerro Brauer, J.M., Martínez-Porchas, M., and Cortes-Jacinto, E. 2013. Evaluation of partial and total replacement of formulated feed by live insects, *Trichocorixa* sp. (Heteroptera:Corixidae), on the productive and nutritional response and postharvest quality of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). *Aquaculture Nutrition* 19:218–226

- Miranda-Baeza, A., Voltolina, D., Brambila-Gómez, M.A., Frías-Espericueta M.G., Simental, J. 2007. Effluent characteristics and nutrient loading of a semi-intensive shrimp farm in NW México. *Vie Et Milieu - Life And Environment* 57, 21-27.
- Nunes, A.J.P., and Parsons, G.J. 2000. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture* 187:133-151.
- Robertson, L., Lawrence, A.L., and Castille, F. 1993. Interaction of Salinity and Feed Protein Level on Growth of *Penaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture*, 2:43-54.
- Robertson, L., Lawrence, A.L., and Castille, F. 1993. Effect of feeding frequency and feeding time on growth of *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 24:1-6.
- Roy, L.A; Davis, DA; Whitis, G.N. 2012. Effect of feeding rate and pond primary productivity on growth of *Litopenaeus vannamei* reared in inland saline waters of West Alabama. *North American Journal of Aquaculture*, 74:20-26.
- Sedgwick, R.W. 1979. Effect of ration size and feeding frequency on the growth and food conversion of juvenile *Penaeus merguensis* de Man. *Aquaculture* 16:279-298.
- Smith, D.M., Burford, M.A., Tabrett, S.J., Irvin, S.J., and Ward, L. 2002. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 207:125-136.
- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P., and Decamp, O.E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8:121-137.
- Teichert-Coddington, D.R., and Rodriguez, R. 1995. Semi-intensive commercial grow-out of *Penaeus vannamei* fed diets containing differing levels of crude protein during wet and dry seasons in Honduras. *Journal of the World Aquaculture Society*, 26:72-79.
- Venkatarameiah, A., Lakshmi, G.J., and Gunter, G. 1975. Effect of protein level and vegetable matter on growth and food conversion efficiency of brown shrimp. *Aquaculture*, 6:115-125.
- Viau, VE; de Souza, DM; Rodriguez, EM; Wasielesky, W; Abreu, PC; Ballester, ELC. 2013. Biofilm feeding by postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, 44:783-794
- Wyban, J., Walsh, W.A., and Godin, D.M. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138:267-279.
- Xia, S., Li, Y., Wang, W., Rajkumar, M., Vasagam, K.P.K., and Wang, H. 2010. Influence of dietary protein levels on growth, digestibility, digestive enzyme activity and stress tolerance in white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), reared in high-density tank trials. *Aquaculture Research*, 41: 1845-1854.
- Zhao, P.; Huang, J.; Wang, XH.; Song, XL.; Yang, CH.; Zhang, XG.; Wang, GC. 2012. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 354:97-106.

Use of Corn Protein Products in Practical Diets for the Pacific White Shrimp

Denghang Yu^{a,b}, Xiaoyun Fang^a, Yangen Zhou^a, Melanie Rhodes^a, D. Allen Davis^{a,*}

^a School of Fisheries Aquaculture and Aquatic Sciences,
Auburn University, AL 36849-5419, USA

^b College of Fisheries, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China Tel.: +1 334 844 9312; fax: +1 334 844 9208

E- Mail address: davisda@auburn.edu

Abstract

Corn protein products are commonly used to balance the amino acid profile of practical diets especially those with low levels of methionine. Yet, there is little information regarding the efficacy of their use. Consequently, the objective of this study was to evaluate the production response of *Litopenaeus vannamei* fed diets with increasing percentages of corn protein products. Three standard indoor tank trials and a pond production trial were conducted. In trial 1, three diets were formulated to contain corn gluten meal (CGM) (8%) and increasing levels (6.5 and 13.0%) of corn protein concentrate (CPC). Five diets were evaluated in Trial 2, with diets 1 to 4 using increasing levels (0, 4, 8 and 16%) of CPC replacing soybean meal, while diet 5 contained a CPC with a better AA profile specifically higher levels of lysine, designated CPCL. The production diets contained increasing percentages (0, 4, 8, and 12%) of CPC as a replacement for fish meal. The diets were commercially produced and evaluated in 0.1 ha production ponds using four replicates per diet. Nursed juvenile shrimps (0.023 g initial weight) were stocked at 38 shrimp m⁻² and were cultured under standardized pond production conditions for 16 weeks. At the conclusions; net yield (5007-5440 kg/ha), final mean weight (17.2-20.5 g), survival (64.9-83.6 %), and FCR (1.27-1.38) were evaluated with no significant differences between dietary treatments. The results from this study demonstrated that corn protein concentrate inclusion up to 12% CPC in diet can be used in commercial feed formulations for *L. vannamei* without causing negative effect on growth, feed conversion, survival and net yield.

Keywords: Pacific white shrimp, Corn protein concentrate, Production pond

Introduction

Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is one of the most popularly cultured shrimp in the world. It is a good species for intensive production because of its rapid growth, low mortality in high-density culture and disease resistance (Williams *et al.* 1996; Ponce-Palafox *et al.* 1997). To reduce culture costs, considerable amount of work has been put towards reducing the cost of shrimp feed formulations by replacing relatively expensive ingredients with more economical alternatives. The study to reduce feed costs has concentrated on development of alternative protein sources, which is the most expensive component of the diet and is a major nutrient required for maintenance and growth of shrimp (Shiau 1998). The development of commercial aquatic feeds has traditionally been dependent on fish meal (FM) as the main protein source because of its balanced essential amino acid (EAA) profile and high protein content (Hardy 1996). Fish meal is also an excellent source of essential fatty acids (EFAs), digestible energy, vitamins and minerals. However, because of the high cost and limited availability feed formulations have shifted to increasing levels of alternative protein sources using limited amounts of fish meal or animal proteins.

Among alternative protein ingredients, soybean meal is a widely available, economical protein source with relatively high digestible protein and energy contents and good amino acid profile (Hertrampf & Piedad-Pascual 2000). Several studies have been conducted to evaluate the nutritional value of soybean products in shrimp diets (Lim & Dominy 1990, 1992; Piedad-Pascual *et al.* 1990; Sudaryono *et al.* 1995; Cruz-Suarez *et al.* 2001; Smith *et al.* 2001; Samocha *et al.* 2004; Amaya *et al.* 2007a,b; Ray *et al.* 2009). The use of soybean meal in shrimp feed formulations has been reviewed by Sookying *et al.* (2013). However, the utilization of soybean meal has limitations because of its moderate protein content and its relatively low level of essential amino acids such as methionine. The low level of methionine often becomes limiting requiring the blending of other ingredients or the supplementation of synthetic forms. High protein plant ingredients are being studied as their nutrient density allows for added room in the formulations and if appropriately chosen, they can complement the amino acid profiles of the other protein sources.

Various processes are being used to concentrate the protein in cereal grains and are being studied to compliment and/or replace other protein sources. Corn Protein Concentrate is the dried protein fraction of the corn primarily originating from the endosperm after removal of the majority of the non-protein components by enzymatic solubilization of the protein stream obtained from the wet-mill process. Corn protein concentrate, used in the present study, is high in protein (79.7%) and a rich source of methionine (1.77%). Corn gluten meal is another high protein corn product produced by wet milling. In the wet milling process, corn is soaked in a solution to soften the kernel in order to facilitate the separation of the various component parts to produce a range of co-product including corn gluten meal. For the product used in these studies the protein content was analyzed at 64.8% with 1.45% methionine. These corn by-products could be used as nutrient dense protein sources that have the advantage of having a high methionine level and thus help balance the amino acid profile of plant-based feed formulations. Consequently, the objective of this line of research was to evaluate the use of corn byproducts as components of practical diets for marine shrimp.

Materials and Methods

Three corn products, Corn protein concentrate (CPC: Empyreal 75, Cargill Corn Milling, Cargill, Inc., Blair, NE, USA), corn protein concentrate produced using a modified process which enhances the AA profile and increases the lysine content (CPCL: Lysto, Cargill Corn Milling, Cargill, Inc., Blair, NE, USA) and corn gluten meal (CGM, Grain Processing Corporation, Muscatine, IA) were obtained for the evaluation of their potential as ingredients in aquaculture feeds for *L. vannamei*. Primary ingredients used in the diet formulations were characterized for proximate analysis and amino acid analysis (Table1) and incorporated into the test diets for independent growth trials. Pacific white shrimp, *L. vannamei*, post larvae were obtained from Shrimp Improvement Systems (Islamorada, FL) and nursed before stocking experimental systems.

Research test diets (36% protein, 8% lipid) were prepared in the Aquatic Animal Nutrition Laboratory at the Department of Fisheries and Allied Aquaculture, Auburn University (Auburn, AL, USA) using standard procedures for the laboratory production of shrimp feeds. Pre-ground dry ingredients and oil were mixed in a food mixer (Hobart Corporation, Troy, OH, USA) for 30 min. Hot water was then blended into the mixture to obtain a consistency appropriate for pelleting. Diets were pressure-pelleted using a meat grinder with a 3-mm die, air dried (<50 C) to a moisture content of 8-10 %. After drying, pellets were crumbled, packed in sealed plastic bags and stored in a freezer until needed.

Growth Trial I

Three experimental diets (Table 2), using soybean meal as the primary protein source, were utilized to evaluate the biological response of shrimp. Diets 1 to 3 were formulated to contain CGM (8%) and increasing levels (6.5 and 13.0%) of CPC and 36% protein and 8% lipid. Juvenile shrimp (0.52 ± 0.04 g) were hand sorted for uniform size and stocked into 12 tanks (60 L) at 10 shrimp tank⁻¹. Group weights were recorded by tank and a one-way ANOVA was performed to ensure there were no statistically significant differences between mean weights of the shrimp. Dissolved oxygen (DO), temperature, and salinity were monitored twice daily using an YSI 650 multi - parameter instrument (YSI, Yellow Springs, OH).

Shrimps were fed four times daily with the initial ration of feed determined based on an estimated weight gain (0.8 g/week), FCR of 2 and 100% survival. This data is based on the results of previous studies conducted in this system. Shrimp were counted weekly and the feed was adjusted based on survival and observations of feeding. At the conclusion of the 6 weeks growth trial, shrimp were counted and group weighed. Mean final weight, final biomass, percent survival, and feed conversion ratio were determined.

Growth Trial II

Five experimental diets (Table 2) were evaluated. Diets 1 to 4 were formulated to contain increasing levels (0, 4, 8 and 16% diet) of CPC replacing soybean meal on an iso-nitrogenous basis. This represents 0, 8.8, 17.7, 35.4 and 36.6% of the total protein for diets 1 to 5, respectively. Diets 2, 3 and 4 were supplemented with crystalline lysine to ensure lysine was replete. Diet 5 utilized 9.7% corn protein concentrate with a modified AA profile having a higher lysine content (CPCL) as a partial replacement for CPC and crystalline lysine. All the five experimental diets contained approximately 36% protein and 8% lipid and were prepared as previously described.

This growth trial utilized five treatments with four replicates. Fifteen Pacific white shrimp were stocked in each of the twenty 220L- polyethylene tanks (bottom area of 0.36 m²) in an indoor recirculating system, with mean initial weight of 0.36g. Tanks in the experimental system were connected to an Aquadyne bead filter (1.2 Ft² media, 24" x 42") and a 0.25 hp centrifugal pump (RK2) to maintain water quality. All the water quality parameters were measured as previously described and maintained in acceptable ranges for pacific white shrimp. A diel light: dark cycle was set at 14:10 h.

Shrimp were offered test diets four times daily. Daily ration of feed was calculated based upon an estimated weight gain of 0.8g/week and expected FCR of 1.8. At the conclusion of the 10-week growth trial, shrimp were counted and group weighed. Mean final weight, final biomass, percent survival, and feed conversion ratio were determined. Five shrimp from each aquaria were frozen at -20 C until analysis of protein and dry matter were conducted. Upon analysis, each subsample was defrosted and blended in a food processor to produce a homogenous sample. Dry matters of shrimp were determined by placing representative portions of each sample in an oven at 95 °C until constant weight was obtained. Protein content of whole shrimp samples were determined by the micro-Kjeldahl method (Ma & Zuazaga 1942).

Commercial diets

To evaluate the potential of corn protein concentrate under commercial conditions, four diets were manufactured by Rangen Inc. (Angleton, TX, USA) as a sinking 3 mm extruded pellet. All experimental diets contained approximately 36% protein and 10% lipid (Table 3). The basal diet was designed to contain 15% fish meal which was replaced with graded levels of CPC (0, 4, 8 and 12%).

Growth Trial III

The 44 day growth trial was conducted using similar methods as previously described, in terms of PI source, water quality measurements and feed management. This growth trial utilized the four commercial diets with 15 replicates. Ten juvenile shrimp ($0.128\text{g} \pm 0.005\text{g}$) were stocked in each of 60 aquaria (80 l). Each aquaria was connected to a common sump tank, aquadyne bead filter (1.2 Ft² media, 24" x 42"), 150 gal fluidized bed biological filter and a 0.25 hp centrifugal pump (RK2) and submerged thermostat-controlled heater.

Pond Trial

Pond trials were conducted at the Alabama Department of Conservation and Natural Resources Marine Resource Division, Claude Petet Mariculture Center in Gulf Shores, Alabama. The growth trials of post larvae *L. vannamei* were conducted under an outdoor pond system.

Experimental animals

Shrimp post larvae (PL) were obtained from a commercial hatchery, Shrimp Improvement System, Islamorada, FL. The shrimp were nursed using standard practices as described by Garza de Yta *et al.* (2004). At the end of two weeks nursery period, each tank was partially drained to concentrate the shrimp. The shrimp were then collected by dip nets. Six sub-samples were taken from each tank to determine average wet weight of the shrimp (g).

Once the number of shrimp per unit weight was determined, shrimp were harvested and small groups weighed (around 100g per group) and then distributed into one of 16 buckets (1 bucket per pond) each representing one production pond. Shrimp from each nursery tank were distributed across all ponds to minimize any bias from variation in nursery tanks. The shrimp were then transferred to the corresponding pond and stocked.

Pond Management

Juvenile *L. vannamei* (initial weight of 0.023 g) were collected from nursery system and stocked in the production ponds at the rate of 38 shrimp m⁻². Standard production practices were conducted as described by Amaya *et al.* (2007a). In summary, ponds used for the grow-out phase were approximately 0.1 ha in surface area, (rectangular 46 x 20 m) with a 1.0 m average depth and lined with 1.52 mm thick high-density polyethylene lining (HDPE). The bottom of each pond was covered with a 25-cm deep layer of sandy-loam soil. All ponds were provided base aeration (about 10 hp ha⁻¹) using 1-hp paddlewheels aerators (Little John Aerator, Southern Machine Welding Inc. Quinton, AL) with either 1-hp or 2-hp Aire-O₂ aerators (Aire-O₂, Aeration Industries International, Inc. Minneapolis, Minnesota) as backup and/or supplemental aeration to maintain dissolved oxygen above 3 mg L⁻¹, the additional aerator was used when dissolved oxygen fell below 3 mg L⁻¹. This study was developed on a sustainable, semi-intensive system which was well managed. Feeding schemes were appropriate and water exchanged was minimized.

Four test diets were randomly assigned to 16 production ponds using four replicates per diet. Test diets were divided to two feedings per day, early morning 0800 h and late afternoon 1600 h. Feed inputs were based on historical results as well as current observations. A small amount of commercial feed was applied to promote natural productivity in pond water during the 1st to 4th weeks. Thereafter, feed input was calculated based upon an expected weight gain of 1.3 g wk⁻¹, a feed conversion of 1.2, and a survival of 75% during the pond culture period. The feed input initially started with 7.9 kg/ha and increased to maximum, input of 79.7 kg/ha after which it was slowly decreased to account for mortality up to week 12; thereafter, input remained at 76.4 kg/ha. During the

experimental period, shrimp growth was monitored on a weekly basis by sampling 70 to 100 animals per pond.

Water quality variables (*e.g.* dissolved oxygen (DO), temperature, salinity, and pH) were monitored three times a day, at sunrise (0500 h - 0530 h), during the day (1400 h - 1430 h), and at night (2000 - 2100 hr), using a YSI ProPlus meter (Yellow Spring Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA). Secchi disk readings and TAN were monitored on a weekly basis. Water samples were taken from all ponds at the depth of 80 cm in the water column and TAN was determined using the Orion ammonia electrode probe (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

The shrimp were harvested at the end of the 16-week culture period. The night before harvest, the water was drained down about two thirds of the ponds and aeration provided using paddlewheel aerators to keep shrimp alive and minimize erosion of the pond bottom. On harvest day, the remaining water was drained and the shrimp were pump harvested from the catch basin using a hydraulic fish pump equipped with a 25-cm diameter suction pipe (Aqualife-Life pump, Magic Valley Heli-arc and Mfg, Twin Falls, Idaho, USA). The pump was placed in the catch basin and shrimp pumped, de-watered and collected in a hauling truck. The shrimp were rinsed and weighed. Approximately 150 shrimps from each pond were randomly selected to measure individual weight and size distribution. At the conclusion, mean final weight, net yields, percent survival, and FCR were determined. The results of one replicate from treatment fed diet containing 0% CPC and two replicates from 8% CPC were excluded from the statistical analysis because of low survival of shrimp caused by aerator failure.

Statistical analysis

Differences in yield, final mean weights, FCR, and survival were statistically analyzed using one-way analysis of variance to determine if significant differences ($P < 0.05$) existed among treatment means, followed by the Student–Neuman–Keuls multiple comparison test

to determine significant differences between treatment means (Steel & Torrie 1980). All statistical analyses were carried out using SAS (V9.1. SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

The growth performance of *L. vannamei* in the 3 tank trials is presented in Table 4. At the conclusion of the 6 week culture period for Trial 1, there were no significant differences in final mean weight, weight gain, FCR or survival. There were also no significant differences at the conclusion of trial 2, the dry matter content of shrimp after 10-week culture ranged from 23.1% to 25.4%, with no significant differences among treatments ($P = 0.3738$). The crude protein of shrimp (dry weight) ranged from 62.1% to 66.9 %, with no significant differences among treatments ($P = 0.1133$). No significant difference was found among treatments for protein retention efficiency ($P = 0.1114$). The results from trial 3 showed significant differences in final biomass, final weight and FCR. Water quality parameters remained in acceptable levels for each of the growth trials (Table 5).

The overall means, standard deviations, and ranges of morning, afternoon, and night water quality variables observed throughout the 16-week pond production trial are displayed in Table 6. Water quality conditions were within a reasonable range for the culture of this species under pond production conditions. High dissolved oxygen readings (above 10 mg L⁻¹) were observed in the afternoon due to photosynthesis activity. On the other hand, low dissolved oxygen readings (below 2.5 mg L⁻¹) were observed due to the phytoplankton die off.

Growth performance of *L. vannamei* reared under production pond condition is summarized in Table 7. There were no differences ($P > 0.05$) in any of the measured production parameters. Treatment fed diet containing 12% CPC had slightly larger yield of 5440.1 kg ha⁻¹ compared with 8% CPC (5420.5kg ha⁻¹), 4% CPC (5190.0 kg ha⁻¹), and 0% CPC (5007.8 kg ha⁻¹), respectively. Likewise, treatment fed diet containing 8% CPC had numerally lower FCR at 1.27 compared with 12% CPC (1.29), 4% CPC (1.34), and 0% CPC (1.38), respectively. However, there were no differences in survival and mean final

weight among treatments. Shrimp survival ranged from 64.9% (0% CPC) to 75.9% (12% CPC), and mean final weight ranged from 20.5 g to 18.7 g, but these differences were not significant (Table 7). The estimated value of the produced shrimp was determined based on the size distribution and the local price for each size class. The cost of each feed was also provided by the feed mill to allow for the calculation of feed costs per unit of production. As feed costs were different, costs per unit of shrimp were also significantly different (Table 7).

Discussion

The quality and cost effectiveness of commercial feeds are a primary concern for the farmer and feed manufacturer. In order to produce a quality feed one has to understand variations in ingredient cost, quality, and availability. Additionally, the effects of the ingredient on processing, nutrient content of the ingredient and the response of the animal must be understood to consistently make a high quality diet that meets the nutrient requirements of the culture species. Such diets are typically a mixture of a few primary ingredients that produce the desired results. Despite the common practice of using corn protein products in commercial feed formulations for shrimp, there are few studies evaluating the efficacy of these products. In the reported research, a series of diets were formulated with corn gluten and corn protein concentrate as replacements for SBM and/or fishmeal in practical feed formulations to systematically evaluate the response of the shrimp.

The basal diet used in this research is a variation to diets used in a range of culture systems and in a number of research trials with positive results (Ray *et al.* 2009; Sookying & Davis 2011; Sookying *et al.* 2011, Zhu *et al.* 2013). In the first two trials, the replacement of CGM with CPC as well as increasing levels of CPC replacing soybean meal. In the later experiment, increased levels of CPC represented 0, 8.8, 17.7, 35.4 and 36.6% of the total protein for diets CP0, CP4, CP8, CP16 and CP+LCP, respectively. The similar performance seen in trials I and II, indicates that it is applicable to replace soybean meal with up to 16% CPC representing around 36% of the protein, thus indicating that digestibility and nutrient availability of the meals should be similar.

Lysine, arginine and methionine are often thought of as the most limiting essential amino acids for shrimp in commercial feed formulations (Akiyama *et al.* 1991). Soybean meal is considered to be high in lysine and low in methionine, while corn protein is low in lysine and high in methionine. Consequently, replacement of soybean meal by CPC will improve the methionine levels but if used at high levels it will reduce lysine levels, which could be solved by the blending of other intact proteins or supplements of crystalline lysine. Fox *et al.* (1995) reported that the requirement for lysine by *L. vannamei* fed 35% protein diet was 1.6% of the diet, and 2.1% of the diet if fed 45% protein diet. The total lysine content of the diets from the second growth trial were designed to be in slight excess of the reported requirement which was confirmed by the similar growth performance of shrimp. Additionally, the present study demonstrated that there were no significant growth performance differences between shrimp fed diet 4 (16% CPC+L) and diet 5 (6.81% CPC and 9.7% CPCL). This result provides initial evidence that this co-product provided adequate dietary lysine levels for *L. vannamei* in diet 5, and can be used to partially substitute soybean meal without addition of crystalline lysine.

The primary reason for the inclusion of CPC is to enhance the methionine level of the diet without using crystalline sources. In the present study, calculated methionine contents of the experimental diets were 1.68%, 1.73%, 1.78%, 1.88% and 1.93%, while the sulfur amino acid (methionine + cystine) contents were 2.99%, 3.05%, 3.11%, 3.21% and 3.35% of crude protein, respectively for the five diets in the second growth trial. A methionine requirement for *L. vannamei* has not been firmly established, but the requirement for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, Atlantic ditch shrimp *Palaemonetes varians* and kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* are 2.4-2.9%, 2.0-2.4%, 1.4% of dietary protein, respectively (Millamena *et al.* 1996; Teshima *et al.* 2002; Palma *et al.* 2009; Richard *et al.* 2010). The similar growth performance of shrimp fed five experimental diets indicated that all the five diets should meet the total sulfur amino acid requirement of *L. vannamei*.

The second component of this research was the commercial production of feeds using increasing levels of CPC as a replacement for fishmeal. The feeds were formulated to contain 35% protein and 8% lipid. Based on proximate analysis of the diets, the lipid

content was significantly higher than the formulated value, which may confound the results as lipid levels generally increased with reductions in fish meal. The increased lipids and/or reduced fishmeal and increase CPC did result in significant difference under clear water conditions with the higher levels of CPC and lower levels of fishmeal resulting in reduced performance of the shrimp. As results from experiment 1 and 2 were favorable, the reduced performance is most likely linked to the elevated lipids. As these differences were not observed under pond production conditions the use of high levels of CPC in production diets is still warranted.

Under pond production conditions, the four test diets were fed to shrimp under semi-intensive conditions, leading to a final average production of 5,264 kg/ha and FCR of 1.32. Which are typical production values for this facility when shrimp are farmed at around 35 individuals per meter over a 16 week culture period. Using ingredient and manufacturing costs determined by the feed mill, a production cost (\$/kg shrimp) can be calculated. This cost ranged from \$1.11 to \$1.60 per kg of shrimp produced (Table 7). These results demonstrate that the use of alternative feed formulations such as CPC results in reduced feed cost but also reduced production costs. Hence, the use of CPC as an alternative protein source should be encouraged.

In general, high levels of CPC inclusions in shrimp feed, with the concomitant reduction of expensive fish meal, are viable when essential nutrients in the diet are properly balanced to meet nutrient requirement of shrimp. Corn protein concentrate has been studied as an alternative protein source in many aquatic species such as, turbot *Psetta maxima* (Kaushik *et al.* 1999), Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Kikuchi, 1999), rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Morales *et al.* 1994), gilthead sea bream *Sparus aurata L.* (Olivia-Teles & Pereira, 2003), yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Shimeno *et al.* 1993) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Wu *et al.* 1995). Oliva-Teles and Pereira (2003) indicated that corn gluten meal can replace up to 60% fish meal protein in diets for gilthead sea bream juveniles without negative effects on fish growth.

In summary, CGM and more recently CPC have been used by commercial feed manufacturers as a protein-rich ingredient having high levels of methionine. Results of the reported trials indicate that both CGM and CPC are viable protein sources for use in commercial shrimp feed formulations.

Acknowledgements

The authors would like to extend their gratitude to those who have taken the time to critically review this manuscript as well as those who helped support this research at the Claude Peteet Mariculture Center and at Auburn University. This publication was supported in part by ACESAG, USDA HATCH project for “Nutrition and feed management for warm water fish and shrimp”. Some student participation was supported through the China Scholarship Council student exchange programs. Supplemental support for biochemical analysis was provided by Cargill Corn Milling, Cargill, Inc., Blair, NE, USA and the United Soybean Board. The mention of trademarks or proprietary products does not constitute an endorsement of the product by Auburn University and does not imply its approval to the exclusion of other products that may also be suitable.

Literature Cited

- Akiyama, D. M., W. G. Dominy, and A. L. Lawrence, 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry - revised. Pages 80-90 in Akiyama, D. M. and R. K. H. Tan, Editors. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia, Sept. 19-25. American Soybean Association, Singapore.
- Amaya, E. A., D. A. Davis, and D. B. Rouse, 2007a. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture* 262: 393-401.
- Amaya, E. A., D. A. Davis, and D. B. Rouse, 2007b. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 262: 419-425.
- Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, McCallum IM, Hickling D. 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 196:87-104
- Fox, J. M., A. L. Lawrence, and E. Li-chan, 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture* 131: 279-290.
- Garza de Yta, A., Rouse, D.B., Davis, D.A., 2004. Influence of nursery period on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 35, 357-365.
- Hardy, R. W., 1996 Alternate protein source for salmon and trout diets. *Animal Feed Science and Technology* 59, 71-80.
- Hertrampf, J. W., and F. Piedad-Pascual, 2000. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Kaushik, S. J., J., Arzel, and C. Regost, 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180: 99-117.
- Kikuchi, K., 1999. Partial replacement of fish meal with corn gluten meal in diets for Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of The World Aquaculture Society* 30 (3): 357-363.
- Lim, C. and W. Dominy, 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 87: 53-63
- Lim, C., and W. Dominy, 1992. Substitution of full-fat soybeans for commercial soybean meal in diets for shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture* 1: 35-46.
- Ma, T., and G. Zuazaga. 1942. Micro-Kjeldahl determination of nitrogen. A new indicator and an improved rapid method. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition* 14: 280-282.
- Morales, A. E., G. Cardenete, M. D. Higuera, and A. Sanz, 1994. Effect of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 124: 117-126.
- Millamena, O. M., M. N. Bautista, and A. Kanazawa, 1996. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 143: 403-410.

- Oliva-Teles, A. and T. G. Pereira, 2003. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture Research* 34 (13): 1111-1117.
- Palma, J., D. P. Bureau, A. Lemme, M. Correia, and J. P. Andrade, 2009. Quantitative dietary requirement of juvenile Atlantic ditch shrimp *Palaemonetes varians* (Leach) for lysine, methionine and arginine. Unpublished. (Abstract ISFNF 2006)
- Piedad-Pascual, F., E.M. Cruz, A. Sumalangcay Jr., 1990. Supplemental feeding of *Penaeus monodon* juveniles with diets containing various levels of defatted soybean meal. *Aquaculture* 89, 183–191.
- Ponce-Palafox, J., C.A. Martinez-Palacios, L.G. Ross, 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107–115.
- Ray, A. J., B. L. Lewis, C. L. Browdy, and J. W. Leffler, 2009. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299: 89-98.
- Richard, L., P. P. Blanc, V. Rigolet, S. J. Kaushik, and I. Geurden, 2010. Maintenance and growth requirements for nitrogen, lysine and methionine and their utilization efficiencies in juvenile black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using a factorial approach. *British Journal of Nutrition* 103: 984-995.
- Samocha, T.M., D.A. Davis, I.P. Saoud, K. DeBault, 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 231, 197–203.
- Shiau SY 1998 Nutrient requirements of penaeid shrimps 1. *Aquaculture* 164:77–93
- Shimeno, S., T. Masumoto, T. Hujita, T. Mima, and S. Ueno, 1993. Alternative protein sources for fish meal in diets of young yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 137-143.
- Smith, D. M., G. L. Allan, K. C. Williams, and C. G. Barlow, 2001. Fishmeal replacement research for shrimp feed in Australia. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Ed.), *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Sookying, D. and D. A. Davis. 2011. Pond production of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed high levels of soybean meal in various combinations. *Aquaculture*. 319: 141-149.
- Sookying, D., F. S. D. Silva, D. A. Davis, and T. Hanson. 2011. Effects of Stocking Density on the Performance of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Cultured under Pond and Outdoor Tank Conditions Using a High Soybean Meal Diet. *Aquaculture*. 319: 231-239.
- Sookying, D., D. A. Davis and F. S. D. Silva. 2013. A review of the development and application of soybean based diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 19:441-448.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrics Approach*. McGraw–Hill, New York, NY, USA.
- Sudaryono A, M.J. Hoxey, S.G. Kailis, L.H. Evans, 1995. Investigation

- of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 134:313–323
- Teshima, S., M. S. Alam, S. Koshio, M. Ishikawa, and A. Kanazawa, 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicas* (Bate). *Aquaculture Research* 33: 395-402.
- Williams A.S., D.A. Davis, C.R. Arnold, 1996. Density- dependent growth and survival of *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* in semi-closed recirculating system. *Journal of the World Aquaculture Society*, **27**, 107-112.
- Wu, Y. V., R. R. Rosati, D. J. Sessa, and P. B. Brown, 1995. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in tilapia diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1585-1588.
- Zhu X., D.A. Davis, T.M. Samocha, J.P. Lazo, and L.A. Roy, 2013. Response of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to three sources of solvent extracted soybean meal. *Journal of the World Aquaculture Society*. 44 (3):396-404.

Table 1. Proximate compositions and amino acid profile (As-is basis, units %) for the major ingredients.

	Menhaden fish meal ^a	Solvent extracted soybean meal ^b	Corn gluten meal ^c	CPC ^d	CPCL ^e
Moisture	9.39	11.64	8.41	9.84	11.61
Protein	64.3	49.9	64.8	79.7	79.8
Fat	10.7	1.19	0.46	2.36	2.58
ADF ^f	<0.2	2.83	2.82	9.8	7.5
Ash	15.1	5.34	6.63	0.91	0.91
Alanine	6.45	1.72	5.32	8.26	6.17
Arginine	4.99	3.26	2.03	2.11	2.16
Aspartic acid	6.84	6.55	3.72	3.89	4.10
Cystine	0.43	0.88	1.10	1.28	1.27
Glutamic acid	9.70	9.64	12.89	14.2	14.06
Glycine	6.05	1.89	1.79	1.84	1.83
Histidine	2.21	1.16	1.30	2.05	1.40
Isoleucine	3.10	1.86	2.51	2.36	2.99
Leucine	5.50	3.36	10.04	10.4	11.95
Lysine	6.04	2.81	1.03	1.37	5.66
Methionine	1.47	0.82	1.45	1.77	1.67
Phenylalanine	2.97	2.16	3.88	5.00	4.57
Proline	4.48	2.36	5.82	7.42	6.78
Serine	3.37	1.95	2.97	3.53	2.78
Threonine	3.46	1.56	2.02	2.42	2.19
Tyrosine	2.50	1.49	3.08	3.74	3.75
Tryptophan	1.10		0.34	0.55	0.37
Valine	4.09	1.78	3.03	2.85	3.29

^aOmega Protein Inc., Reedville, Virginia, USA.

^bDe-hulled solvent extracted soybean meal, Faithway Feed Co. Inc., Guntersville, Alabama, USA.

^cCorn gluten meal, Grain Processing Corp. Muscatine, Iowa

^dCorn protein concentrate, Empyreal® 75, Cargill Corn Milling, Cargill, Inc., Blair, NE, USA

^eCorn protein concentrate (CPCL) Lysto™, Cargill Corn Milling, Cargill, Inc., Blair, NE, USA.

^fADF: Acid Detergent Fiber

Table 2. Ingredient composition (g 100g⁻¹ of feed) of experimental diets use in a six weeks growth trial. All diets were developed to contain 36% protein and 8% lipids. Diets were designed to use various soybean meals produced from different varieties of soybeans at an equal protein inclusion level.

	Trial 1			Trial 2				
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	CP0	CP4	CP8	CP16	CP+L
Corn Gluten meal ^a	8.00	-	-	-	-	-	-	-
CPC ^b	-	6.50	13.00	0.00	4.00	8.00	16.00	6.81
CPCL ^b	-	-	-	-	-	-	-	9.7
Soybean meal ^c	52.70	52.7	42	58.83	52.40	45.74	32.43	32.43
Menhaden fish meal ^d	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Menhaden Fish Oil ^d	0.27	0.27	0.27	5.76	5.76	5.76	5.76	5.76
Soy oil ^e	5.90	5.90	6.00	-	-	-	-	-
Corn oil ^e	-	-	-	0.06	0.04	0.03	-	-
Corn Starch ^f	7.98	9.48	13.38	5.35	7.61	9.97	14.69	14.60
Whole wheat ^f	13.00	13.00	13.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00
Trace Mineral premix ^g	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamin premix ^h	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Stay C 250 mg/kg using 25% ⁱ	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
CaP-diebasic ^j	2.50	2.50	2.50	2.35	2.52	2.70	3.05	3.05
Lecithin, soy ^k	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol ^f	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Lysine ^f				-	0.02	0.16	0.42	-

^a Grain Processing Corporation, Muscatine, IA, USA.

^b CPC (Empyrean® 75); CPCL (Lysto®), Cargill Corn Milling, Cargill, Inc., Blair, NE, USA

^c Faithway Feed Co., Guntersville, AL, USA.

^d Omega Protein Inc., Reedville, VA, USA.

^e Archer Daniels Midland,

^f MP Biomedicals Inc., Solon, Ohio, USA

^g Trace mineral premix without Mg (g 100g⁻¹): cobalt chloride 0.004, cupric sulphate pentahydrate 0.250, ferrous sulfate 4.0, manganous sulphate monohydrate 0.650, potassium iodide 0.067, sodium selenite 0.010, zinc sulfate heptahydrate 13.193, filler 81.826.

^h Vitamin premix (g kg⁻¹): thiamin HCl 0.5, riboflavin 3.0, pyridoxine HCl 1.0, DL Ca-pantothenate 5.0, nicotinic acid 5.0. ⁱ Stay C®, (L-ascorbyl-2-polyphosphate), Roche Vitamins Inc., Parsippany, NJ, USA.

^j T. Baker®, Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA.

^k Enhance D-97, The Solae Company, St. Louis, MO, USA

Table 3. Ingredients composition (g 100g⁻¹ of feed) of commercially produced feed formulations and proximate analysis. Diets were used in the third growth trial and the pond production trial.

	CPC0	CPC4	CPC8	CPC12
Soybean meal	46.69	46.63	46.48	46.32
Milo	26.20	26.31	26.48	26.67
Menhaden Fish Meal	15.00	9.99	5.00	
Corn protein concentrate		4.00	8.00	12.00
Squid meal	2.00	2.00	2.00	2.00
Menhaden fish oil (sprayed)	4.58	4.86	5.15	5.45
Soy lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix	0.33	0.33	0.33	0.33
Trace mineral premix	0.52	0.52	0.52	0.52
Stay C 350 mg/kg (35%)	0.02	0.02	0.02	0.02
Calcium phosphate dibasic	2.00	2.68	3.36	4.03
Copper sulfate	0.01	0.01	0.01	0.01
Bentonite	1.50	1.50	1.50	1.50
Mold inhibitor	0.15	0.15	0.15	0.15
Crude Protein	36.38	36.61	36.48	37.68
Crude Fat	10.28	10.47	13.52	12.91
Moisture	7.62	7.89	5.15	3.79
Crude Fiber	2.22	2.18	2.03	2.17
Ash	10.76	9.60	8.95	8.83

Table 4. Growth performance of Pacific white shrimp for each tank trial. Trial 1, mean initial weight 0.52 g cultured for 6 weeks. Trial 2 mean initial weight 0.35 g cultured for 10 weeks. Trial 3, mean initial weight 0.148 g cultured for 6 weeks. PSE=Pooled Standard Error

Trial	Final Weight (g)	Weight gain (%)	Feed conversion ratio	Survival (%)
1 (n=4)				
Diet 1	4.3	698.1	2.2	87.5
Diet 2	4.6	763.0	2.1	80.0
Diet 3	4.2	743.8	2.2	75.0
PSE	0.1639	44.35	0.109	7.02
P-value	0.4377	0.5877	0.2767	0.4777
2 (n=4)				
CP0	10.17	2747.6	1.72	83.3
CP4	9.83	2700.6	1.78	98.3
CP8	10.37	2885.7	1.59	95.0
CP16	10.03	2727.3	1.75	93.4
CP+L	10.25	2781.7	1.72	90.0
PSE	0.14	39.5	0.03	1.9
P-value	0.76	0.63	0.25	0.17
3 (n=15)				
CPC12*	4.61 ^c	3058.2 ^b	1.56 ^a	80.71
CPC8	4.95 ^{bc}	3196.3 ^b	1.45 ^{ab}	82.00
CPC4	5.38 ^{ab}	3515.7 ^a	1.32 ^{bc}	81.33
CP0	5.71 ^a	3752.9 ^a	1.25 ^c	86.00
PSE	0.0796	54.9910	0.0247	1.5570
P-value	<0.0001	0.0002	0.0003	0.6252

*n=14

Table 5. Summary of water quality variables for each of the growth trials for *L. vannamei* cultured in recirculating systems. Values represent the mean±standard deviation.

	Temperature (C)	Salinity (ppt)	Dissolved Oxygen (mg/L)
Trial 1	26.0 ± 1.49	4.55 ± 0.83	5.56 ± 0.76
Trial 2	28.5 ± 0.86	24.4 ± 0.73	5.57 ± 0.28
Trial 3	28.5 ± 1.06	6.44 ± 0.59	6.78 ± 0.26

Table 6. Summary of water quality variables monitored over a 16-week growth trial for *L. vannamei* cultured in 0.1-ha ponds. Values represent the mean±standard deviation and values in parenthesis represent minimum and maximum readings.

	Temperature (° C)	Salinity (ppt)	Dissolved Oxygen (mg/L)	pH	Secchi Depth (cm)	TAN (mg/L)
Morning	28.34 ± 2.89 (18.00, 32.40)	11.51 ± 3.36 (4.01, 17.10)	3.91 ± 1.21 (0.08, 10.41)	7.01 ± 0.54 (4.91, 9.12)	30.56 ± 16.25 (10, 105)	0.57 ± 1.22 (0, 10)
Afternoon	30.50 ± 2.84 (21.30, 35.30)	11.54 ± 3.33 (3.99, 17.03)	9.68 ± 2.59 (1.12, 19.41)	8.40 ± 0.78 (4.90, 9.96)		
Night	30.40 ± 2.73 (21.00, 34.60)	11.50 ± 3.36 (4.01, 17.07)	8.04 ± 2.42 (0.03, 7.56)	8.17 ± 0.80 (5.13, 10.06)		

Table 7. Growth performance of Pacific white shrimp after 16 weeks of culture. Average initial weight of 0.023 ± 0.002 g.

	Final weight (g)	Yield (kg/ha)	Survival (%)	FCR	Production value (\$)	Feed Cost (\$)	Feed \$/Kg Shrimp
CPC0	20.51 ^a	5007.8 ^a	64.92 ^a	1.38 ^a	2106.72 ^a	791.41 ^a	1.60 ^a
CPC4	17.48 ^a	5190.0 ^a	77.58 ^a	1.34 ^a	1808.40 ^a	715.69 ^b	1.39 ^{ab}
CPC8	17.17 ^a	5420.5 ^a	83.60 ^a	1.27 ^a	1844.05 ^a	651.31 ^c	1.20 ^b
CPC12	18.71 ^a	5440.1 ^a	75.91 ^a	1.29 ^a	2018.08 ^a	598.16 ^d	1.11 ^b
PSE	0.5289	117.3565	2.3024	0.03487	65.2261	4.0777	0.0369
P-value	0.2112	0.5601	0.1423	0.6898	0.3727	<0.0001	0.0049

FCR: Feed Conversion Ratio

Utilización de Algas como Ingrediente Alternativo en la Alimentación de Peces Marinos

A.J.Vizcaíno¹, J.A.Jiménez¹, J.Camacho², A.M. Barros¹, G. López¹, L. Hidalgo¹, M.I.Sáez¹, F.G.Acién², M.C.Cerón², T.F.Martínez¹ y F.J. Alarcón¹

Dpto. Biología y Geología⁽¹⁾ y Dpto. Ingeniería⁽²⁾, Escuela Politécnica Superior y Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Almería-CEIA₃, España.

Resumen

El empleo de las algas en acuicultura tiene un gran potencial por la creciente preocupación de hacer un uso de los recursos naturales más sostenible y respetuoso con el medio ambiente. Su aplicación en la alimentación de peces tiene interés desde una doble perspectiva; i) reduciendo la dependencia de insumos derivados de las pesquerías, y ii) mejorando el estado de condición de los animales. Como ejemplo aplicado de esta temática, en el presente estudio se evalúa el potencial de la microalga *Scenedesmus almeriensis* como ingrediente alternativo a la harina de pescado en la alimentación de la dorada (*Sparus aurata*, L.). En un experimento *in vivo* se ensayan cinco dietas experimentales en las que se sustituye la proteína de la harina de pescado por biomasa liofilizada de microalga a distintos niveles, y se analiza 1) el crecimiento de los peces y el aprovechamiento nutritivo, 2) la influencia en la composición química y en el perfil de ácidos grasos, 3) los efectos que ejerce en la estructura del hígado e intestino, 4) el efecto sobre diversas actividades enzimáticas digestivas y sobre la ultraestructura de la mucosa intestinal, y finalmente, 4) se realiza una valoración económica de su utilización en piensos para acuicultura.

Palabras clave: dorada, enzimas digestivas, evaluación nutritiva, intestino, algas, peces marinos, *Scenedesmus almeriensis*.

Introducción

Las distintas especies que se cultivan tienen que ser alimentadas en función de sus necesidades nutricionales y fisiológicas intrínsecas. Por ejemplo, los peces y crustáceos marinos presentan como norma general una dieta carnívora. Debido a ello, históricamente los principales ingredientes utilizados en la elaboración de alimentos para peces cultivados han sido la harina y el aceite de pescado, procedente de peces capturados en las principales pesquerías del mundo. Por ejemplo, por cada kg producido de salmón, de otros peces o de langostinos se deben consumir como alimento entre 2,5 y 5 kg de otras especies de peces (Naylor *et al.*, 2000). En el caso de las granjas de atún, este valor es aún más elevado, hasta 20 kg por cada kg de biomasa producida (Volpe, 2005). Esto hace que el cultivo de peces carnívoros requiera en la mayoría de las ocasiones de más biomasa de la que se produce en las granjas (Tacon & Forster, 2003). Y por ello, en vez de aliviar la presión sobre las pesquerías, el incremento en la producción de especies carnívoras puede incrementar la presión sobre las poblaciones de peces que viven en su medio natural. Es probable que, como consecuencia de una mayor intensificación de la acuicultura, así como de la diversificación de las especies cultivadas, la demanda de harina y de aceite de pescado llegue a superar la oferta actual, lo cual es, sin duda alguna, insostenible.

La harina y el aceite de pescado son materias primas cuya comercialización está globalizada. Para producir estos insumos se utilizan cerca de 28 millones de toneladas de pescado (un 30% de las capturas mundiales) y 5 millones de toneladas de desechos que se generan durante el procesado del pescado destinado al consumo humano. La industria de alimentos para organismos acuáticos utiliza cerca del 50% de la producción mundial de harina de pescado, y más del 80% de la producción de aceite de pescado (FAO, 2010). La disponibilidad de harina de pescado depende básicamente de las capturas, además de que un importante porcentaje de la pesca de especies usadas para la elaboración de la harina de pescado actualmente se destina a consumo humano. En este contexto, la utilización de la harina de pescado como fuente de proteína mayoritaria en los piensos para acuicultura puede llegar a ocasionar un incremento en los costes de producción en acuicultura a la par que determina que este sector no llegue a ser una actividad sostenible, al precisar para su

crecimiento de mayor cantidad de derivados de la pesca extractiva. Por todo esto, y teniendo en cuenta las recomendaciones de la FAO en las que se pedía la disminución en el uso de harinas y aceites procedentes de la pesca extractiva para producir alimentos en acuicultura, se inició un importante esfuerzo en la búsqueda de fuentes proteicas alternativas que pudieran reemplazar total o parcialmente a este insumo en la elaboración de los alimentos (Silva *et al.*, 2010).

En la selección de fuentes proteicas alternativas es necesario tener en cuenta que éstas sean sostenibles y renovables, y que no ocasionen efectos negativos en el pez. En este contexto, las algas (tanto microalgas como macroalgas) despiertan cada vez más un mayor interés como posibles ingredientes en las dietas para peces, como fuente alternativa de proteínas, y de aporte complementario de vitaminas y lípidos. Sin embargo, su cultivo intensivo aún resulta costoso, lo que es un factor a tomar en cuenta cuando se considera el concepto de sostenibilidad.

Las harinas derivadas de microalgas pueden ser una alternativa potencial a la harina de pescado (Nandeeshya *et al.* 2001), ya que poseen un alto contenido proteico, son la fuente de alimento natural de numerosas especies marinas, contienen niveles altos de ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos, vitaminas y minerales, y son una excelente fuente de pigmentos naturales (Spolaore *et al.* 2006).

Las microalgas se requieren durante un breve período para la nutrición de larvas, ya sea para consumo directo, como en el caso de los moluscos y crustáceos o indirectamente como alimento para la presa viva con la que se alimentan las larvas de peces (Muller-Feuga, 2000). Los géneros más frecuentemente empleados son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* (Yamaguchi, 1997; Borowitzka, 1997; Muller-Feuga, 2000). Pero además, la biomasa de las microalgas también pueden ser cosechada, secada e incorporada en las dietas para peces juveniles y adultos (Benemann, 1992). Adicionalmente, y en el marco de la política general de mejora de la sostenibilidad y calidad de los productos de acuicultura, las microalgas

tienen un enorme potencial en la sustitución de algunos de los componentes de los piensos de engorde de peces.

Hasta la fecha existen numerosos estudios en los que se incluyen microalgas en alimentos para peces. Las diversas investigaciones que se han realizado para evaluar el efecto de la inclusión de las algas en piensos inertes para diferentes especies, tales como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) o dorada (*Sparus aurata*) destacan como efectos positivos el incremento significativo de las tasas de crecimiento y utilización del alimento (El Sayed, 1994; Mustafa *et al.* 1994; Mustafa & Nakagawa, 1995), las mejoras en la asimilación de proteínas (Nakagawa *et al.* 1997), el efecto positivo sobre el metabolismo lipídico (Nakagawa *et al.* 1987; Robin & Vincent, 2003), la mejora en la coloración de los animales, el incremento en la función hepática (Nematipour *et al.*, 1987; Nakagawa *et al.* 1995), la mejora en la respuesta al estrés (Nakagawa *et al.* 1997), y el incremento en la resistencia a enfermedades (Sato *et al.* 1987). En la actualidad, a las ventajas nutritivas que tienen, se les une la mejora en la tecnología para su producción a gran escala si se cultivan en los biorreactores apropiados, y el incremento en su contenido proteico, hechos que hacen de esta materia prima un ingrediente novedoso, que recibe una creciente atención en la formulación de piensos para peces (Lahaye *et al.* 1995; Pinchetti *et al.* 1998). Además de su valor nutricional, en los últimos años se ha generado un gran interés por el uso de la biomasa de microalgas por sus beneficios económicos al poderlas utilizar con distintos propósitos (Pulz & Gross, 2004). De este modo, un cultivo de microalgas puede ser utilizado para la depuración de efluentes, y el contenido lipídico de la biomasa obtenida emplearse en la producción de biocombustibles y, finalmente, la materia resultante tras la extracción de los aceites, destinarse a la alimentación animal (Olguín *et al.* 2012).

En este contexto, en la Universidad de Almería y en el marco del proyecto P09-AGR-5334, se estudian diferentes microalgas con el objetivo de desarrollar la tecnología para su producción masiva con el fin último de emplearlas en alimentación de peces de acuicultura. Una de las microalgas estudiada es *Scenedesmus almeriensis*. La microalga *S. almeriensis* es una especie nueva que fue aislada por investigadores de la Universidad de Almería y de

la Estación Experimental “Las Palmerillas” de la Fundación CAJAMAR (Almería), siendo protegida mediante patente europea EP-1849858-B1, e identificada como “microorganismo no previamente registrado” por la Experimental Phycology and Culture Collection of Algae—SAG de la Universidad de Gottingen (Sánchez-Fernández, 2008). Las ventajas que tiene esta microalga frente a otras microalgas es que es tolerante a un amplio rango de temperaturas (10 a 40°C), presentando óptimos de crecimiento a temperaturas a las que las otras especies no crecen (30°C), y que se cultiva en agua dulce, y por lo tanto no es necesario lavar la biomasa para retirar las sales marinas. Además, la materia seca resultante tras la producción del biocombustible, sigue teniendo un alto valor nutricional, debido a su alto contenido en proteínas (hasta un 40%). De esta forma, *S. almeriensis* se convierte en una muy buena candidata como ingrediente alternativo a la harina de pescado, por su bajo coste de producción al poder ser cultivada en diversos efluentes, y por el doble uso que se le puede dar a su biomasa, energético y alimenticio, lo que incrementa su rentabilidad.

Como se ha indicado anteriormente, las referencias bibliográficas en las que se realizan estudios zootécnicos para evaluar el crecimiento de los peces cuando éstos son alimentados con piensos que incluyen microalgas son abundantes, pero a día de hoy no son tan numerosos los estudios que analizan los efectos que produce la utilización de estos ingredientes sobre la fisiología del pez desde un enfoque holístico, y en el caso particular de los juveniles de dorada (*Sparus aurata*, L.), una especie de gran interés en la acuicultura europea, no se tiene conocimiento de que se haya publicado alguno. Es por ello que resulta de particular relevancia analizar qué otros efectos se producen con la utilización de esta microalga en el alimento. Precisamente uno de los aspectos que está relacionado con la alimentación del animal a considerar es el estudio de los procesos que están implicados en la digestión y absorción del alimento.

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo general del presente estudio es realizar una evaluación global del potencial de la microalga *Scenedesmus almeriensis* para ser utilizada como fuente proteica alternativa a la harina de pescado en la alimentación de juveniles de dorada, *S. aurata*. Este objetivo general se desglosa en los siguiente objetivos parciales que son; 1) evaluar el crecimiento de juveniles de *S. aurata* alimentados con dietas en las que la

harina de pescado se sustituye parcialmente por harina de la microalga *S. almeriensis*, 2) cuantificar el aprovechamiento nutritivo de dichas dietas, 3) analizar su influencia en la composición química, de ácidos grasos de los peces, y en la estructura y funcionalidad del intestino, y 4) realizar una valoración económica del uso de *S. almeriensis* en alimentos para acuicultura de peces marinos carnívoros.

Material y Métodos

Animales e instalaciones

El bioensayo se realizó en el acuario del campo de prácticas de la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Almería. En los ensayos se emplearon juveniles de dorada (*Sparus aurata*) procedentes de la empresa Predomar S.L. (Carboneras, Almería, España). Durante la aclimatación a las condiciones del acuario de la Universidad de Almería, las doradas fueron alimentadas con una dieta comercial (Skretting) hasta alcanzar un peso de aproximadamente 8 gramos. A partir de este momento se realizó la selección, y los peces fueron distribuidos aleatoriamente en los tanques experimentales. Se repartieron 225 individuos en 15 tanques a razón de 15 peces por tanque. El sistema utilizado consta de 15 tanques de polipropileno de color gris oscuro, fondo plano y con capacidad de 40L. Los ensayos se realizaron en un circuito cerrado, que constaba de dos tanques de reserva, un filtro físico para la retención de residuos sólidos, un filtro biológico para la eliminación de amonio y una lámpara ultravioleta para evitar la proliferación de microorganismos. La salinidad osciló del 23 al 28‰ y la temperatura osciló de 17 a 19°C, y con fotoperiodo natural. La duración del experimento se prolongó hasta que los peces triplicaron su peso inicial. Los tratamientos se ensayaron por triplicado, los piensos se suministraron a una razón del 3 al 4% de la biomasa total del tanque al día. El alimento fue suministrado en dos tomas diarias a las 9:00 y a las 13:00 horas. Los tanques se sifonaban antes de cada toma, además cada día se anotaba la temperatura y salinidad antes de cada toma. Tras la primera toma se medía también el amonio por colorimetría con un kit de análisis rápido de agua, cuando su concentración superaba los 0,4 mg L⁻¹ se procedía a renovar el agua del sistema. Cada 15 días los peces se anestesiaban suavemente en un baño de aceite de clavo (25ppm)

y se pesaban, para recalcular la dosis diaria de pienso, devolviéndolos posteriormente a sus respectivos tanques.

Biomasa algal

La biomasa se produjo a escala industrial en condiciones externas con fotobiorreactor tubular de 3000L, en modo continuo a una tasa de dilución de 0,4L día⁻¹, en el mes de marzo de 2011. Los cultivos se realizaron a pH 8,0 con inyección de CO₂ a demanda, y la temperatura fue mantenida a 30°C con un termostato, haciendo pasar el agua por un intercambiador de calor localizado en el interior del fotobiorreactor. Posteriormente la biomasa se recogió por centrifugación y fue sometida a una serie de procesos para obtener un preparado seco (Cerón *et al.* 2008). Brevemente, para la obtención de harina de *S. almeriensis*, el cultivo de las microalgas previamente cosechadas por centrifugación, fue congelado a -18°C para su posterior liofilización. Una vez liofilizada la biomasa de *S. almeriensis*, fue molida en un molino de bolas y pasada por un tamiz de 300µm, una vez tamizada la harina quedó lista para su posterior inclusión en los piensos experimentales.

Piensos experimentales: diseño y elaboración

Se elaboraron 5 piensos experimentales en los que se sustituyó parcialmente la proteína de la harina de pescado por harina de la microalga *Scenedesmus almeriensis*. Así la proteína de la harina de pescado se fue sustituyendo en niveles de un 25% (SC25); 37,5% (SC37); 50% (SC50) y un 75% (SC75), siendo un total de 4 piensos experimentales más uno que se utilizó como control que no contenía harina de *S. almeriensis* (CT). En todos los casos se incluyó una proporción fija de harina de calamar (un 5%) que actuase como atrayente para los peces. También se incluyó en la formulación, un enriquecedor de lípidos que aportase ácidos grasos poliinsaturados, un concentrado de proteína de soja, lecitina de soja (como fuente extra de fosfolípidos), y una premezcla de vitaminas y minerales (con 20% de vitamina C), con el fin de que los piensos formulados fuesen lo más completos posible, evitando déficit en aminoácidos o ácidos grasos esenciales. Todos los piensos fueron formulados para ser isoproteicos e isoenergéticos.

Para la fabricación de los piensos, los ingredientes sólidos fueron mezclados durante 20min en una amasadora Sammic BM-11 (Sammic S.L. Azpeitia, España), posteriormente se añadieron los ingredientes líquidos y el cloruro de colina que fue disuelto en agua destilada (500mL aproximadamente). La mezcla resultante fue amasada de nuevo durante un periodo adicional de 15min. Una vez obtenida la masa, se procedió a su granulación mediante una picadora de carne Braher P22-82 (Braher Internacional SA. Andoain, España), obteniendo gránulos de 1 a 2mm de diámetro y de 2 a 4mm de longitud aproximadamente. El secado de los piensos se realizó en el laboratorio de producción animal garantizando que fuera un lugar fresco y seco, el secado se completó en 24 horas, y una vez elaborados, éstos fueron almacenados a -20°C hasta su uso. La Tabla 1 detalla los ingredientes utilizados en la elaboración de los piensos experimentales así como su composición química.

Tabla 1. Composición de los piensos experimentales utilizados en el ensayo con dorada.

Ingredientes (%MS)	Control	SC25	SC37	SC50	SC75
Harina de pescado LT ¹	51,6	43,5	39,5	35,5	27,4
Biomasa de <i>S. almeriensis</i>	0,0	12,9	19,4	25,8	38,7
Harina de calamar ³	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hidrolizado de pescado CPSP90 ⁵	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Concentrado de soja ⁴	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Aceite de pescado ¹	2,2	2,0	1,8	1,7	1,4
Enriquecedor de lípidos ⁶	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Lecitina de soja ¹	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Dextrina	24,1	19,5	17,2	14,9	10,4
Carboximetilcelulosa ²	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Cloruro de colina ²	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Premix de vitaminas y minerales ¹	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Goma guar	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Alginato ²	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Composición química (%MS)					
Proteína bruta	47,1	47,7	47,8	47,0	46,6
Grasa bruta	8,4	11,0	10,6	9,6	8,3
Cenizas brutas	14,2	14,7	16,5	16,7	18,8
Fibra bruta	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3

1 Proveedor local (Almería, España). 2 Sigma (España). 3 Rieber&Son (Noruega). 4 DSM (Francia). 5 Concentrado proteico soluble de pescado, Sopropêche (Francia). 6 INVE (Bélgica).

Alarcón *et al.* 2013. Utilización de Algas como Ingrediente Alternativo en la Alimentación de Peces Marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 127-190.

Toma de muestras biológicas

En la toma de muestras correspondiente al inicio del experimento, se tomaron 15 individuos al azar antes de distribuir a las doradas en sus correspondientes unidades experimentales, se anestesiaron en un baño de aceite de clavo (2ppm), y a continuación se sacrificaron mediante una incisión en la columna vertebral a la altura de los opérculos (Directiva Comunitaria 2010/63/UE). Se midió la longitud de cada uno de los individuos mediante un ictiómetro, posteriormente se pesaron en una balanza de precisión, a continuación se extrajeron las vísceras y se anotó el peso del intestino, el hígado y la carcasa. Tanto los hígados como las carcasas se congelaron a -20°C y se liofilizaron, para, posteriormente, volver a utilizarse en posteriores análisis. En la toma de muestras correspondiente al final del experimento, se sacrificaron todos los individuos, mediante el mismo procedimiento que en la toma de muestras correspondiente al inicio. A continuación se anotaron las longitudes de los peces y los pesos frescos, de las canales, hígados e intestinos, al igual que en el muestreo inicial. También se prepararon 5 muestras de intestino distal, intestino proximal e hígado de cada unidad experimental; para su análisis histológico, posteriormente tanto los hígados, como las carcasas, fueron congeladas a -20°C , liofilizadas y congeladas de nuevo al igual que en el muestreo inicial. Por otra parte se utilizaron muestras de intestino para la preparación de extractos enzimáticos, y de otro, muestras de 0,5 cm de longitud del intestino proximal para su análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM).

Determinación de los parámetros zootécnicos y morfométricos

A partir de los datos obtenidos en el apartado anterior se calcularon los siguientes parámetros zootécnicos y morfométricos: Incremento de peso (WG) = $(P_f/P_i) \times 100$; Tasa de crecimiento específico (SGR) (%) = $(\text{Ln}(P_f) - \text{Ln}(P_i) / \text{días}) \times 100$, donde P_f y P_i son el peso fresco final e inicial y t es la duración del ensayo en días; Tasa de crecimiento absoluto (AGD) (g día^{-1}) = $(P_f - P_i) / \text{días}$; Factor de condición (K) = $(P_f / \text{longitud final}^3) \times 100$; Índice viscerosomático (IV) (%) = (peso seco del digestivo / peso seco del individuo)

x 100; Índice hepatosomático (IH) (%) = (peso seco del hígado / peso seco del individuo) x 100; Índice de conversión = g de pienso suministrados / incremento de biomasa.

Determinación de la composición proximal

Para la determinación de la composición proximal se homogeneizaron la totalidad de las carcasas previamente liofilizadas y una muestra de cada uno de los piensos utilizados. La composición proximal de los piensos y de las muestras de tejidos se determinó analizando su contenido en agua, proteína cruda, lípidos totales, cenizas y por diferencia se estimó el contenido de carbohidratos. La humedad de los peces fue determinada por gravimetría, una vez pesadas las muestras frescas y liofilizadas (Cryodos, Ima-Telstar. Tarrasa, España). La proteína cruda mediante un analizador elemental Fisons Carlo Erba EA 1108 (Fisons Instruments, Beverly, MA, USA), multiplicando el contenido de nitrógeno de la misma por 6,25. Las cenizas fueron determinadas por gravimetría tras incineración de 1g del filete liofilizado en un horno mufla a 550°C durante 24h según el método estándar (AOAC, 1995). El contenido de lípidos totales fue cuantificado mediante la metodología descrita por Christie (1982). Brevemente, los lípidos fueron extraídos con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) con 0,01% de hidroxitoluenobutilado (BHT) como antioxidante. Seguidamente el solvente orgánico fue evaporado con nitrógeno, y el contenido lipídico se determinó por gravimetría.

Determinación del perfil de ácidos grasos

Para la extracción de ácidos grasos se usaron muestras de músculo e hígado de la totalidad de las doradas, previamente liofilizadas, junto con las muestras de cada uno de los piensos experimentales, utilizando el protocolo diseñado por Rodríguez *et al.* (1998). La determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos contenidos en la biomasa se realizó a partir de sus ésteres metilados mediante cromatografía de gases. Se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 4890 Series II (Hewlett Packard Company, Avondale, PA). En esencia el cromatógrafo de gases determina ésteres metilados, por lo tanto los ácidos grasos son metilados. Se ha utilizado una modificación

del método de transesterificación directa y descrito por Lepage y Roy (1984) que no necesita separación previa de la fracción lipídica y que permite un ahorro de tiempo y reactivos (Rodríguez *et al.* 1998). En primer lugar, se homogeneizó la muestra a analizar con mortero. Posteriormente se pesó una cantidad determinada de la muestra y se añadió la misma cantidad de alúmina y se molturó durante 5min con fuerza. De ahí se cogió una porción de unos 10mg de biomasa y se depositaron en un tubo de rosca pirex con tapón con almohadilla. Seguidamente se adicionó 1mL de mezcla metilante (20:1 v/v metanol / cloruro de acetilo). Se añadieron 5 μ L de patrón (25mg de patrón C:19 en 1mL de tolueno) y 0,5mL de hexano. La metilación se realizó a 100°C en el termobloc durante 20min, evitando la evaporación del hexano. Pasados los 10min se dejó que la mezcla alcanzase la temperatura ambiente. Se le añadió 1mL de agua destilada para diferenciar bien las fases, y se extrajo la capa hexánica, que se introdujo en un vial, se cerró, y se inyectó en el cromatógrafo de gases. El análisis cuantitativo se realizó utilizando como patrón interno ácido nonadecanoico (19:0). Cada muestra contenía 5 μ L de disolución de patrón interno (0,125mg de 19:0). El detector FID presenta la misma respuesta o sensibilidad para cada uno de los ácidos grasos, por tanto el factor de corrección para los solutos y para el patrón interno es el mismo, siendo su valor la unidad. Para el estudio de los ácidos grasos se calcularon los sumatorios de los ácidos grasos saturados (Σ SFA), monoinsaturados o monoenoos (Σ MUFA), poliinsaturados (Σ PUFA), por otra parte, también fueron clasificados como n-3 (Σ n-3), n-3 altamente insaturados (Σ n-3 HUFA), n-6 (Σ n-6) y n-9 (Σ n-9). Además se obtuvieron ciertos ratios de interés entre dichos sumatorios (n-3/n-6; MUFA/ n-3 HUFA, MUFA/PUFA, MUFA/SFA) y entre ácidos grasos que relacionan el ácido docosahexanoico (DHA o 22:6n3), ácido eicosapentanoico (20:5n3 o EPA) y ácido araquidónico (20:4n6 o AA).

Preparación de los extractos enzimáticos digestivos

Los tejidos de tres peces se agruparon al azar por cada extracto enzimático obteniendo cuatro extractos por cada tanque experimental. Los intestinos se homogenizaron en agua destilada y el homogenado fue sonicado en frío (4°C) mediante tres pulsos cortos de 10 segundos. Seguidamente se centrifugó (12.000rpm, 12min, 4°C), y el sobrenadante se repartió en alícuotas para su conservación a -20°C hasta su posterior uso. A estos extractos se les determinó la concentración de proteína soluble, usando seroalbúmina bovina (1mg mL⁻¹) como estándar (Bradford, 1976).

Determinación de las actividades enzimáticas digestivas

Las actividades proteasa alcalina, tripsina, quimotripsina y amilasa se cuantificaron como indicadores de la capacidad digestiva, mientras que las actividades leucina-aminopeptidasa y fosfatasa alcalina se analizaron como indicadores de la absorción a través del epitelio. Brevemente, la actividad proteasa alcalina se determinó empleando una modificación del método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984) usando como sustrato caseína tamponada en Tris-HCl 100mM a pH 9. La mezcla de reacción (extracto enzimático más caseína tamponada) se incubó durante 20min a 37°C, y la reacción enzimática se detuvo con ácido tricloroacético (TCA) al 20%. La liberación de péptidos se cuantificó determinando la absorbancia del sobrenadante a 280nm. La actividad específica (U mL⁻¹) se calculó utilizando como coeficiente de extinción molar de la tirosina (CEM) el valor de 0,008. El resto de actividades se cuantificó mediante cinética midiéndose el incremento de absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 405nm utilizando sustratos específicos para cada una de ellas. Así, se usó BAPNA (N-benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida) 0,5mM para la cuantificación de la actividad tripsina, SAPNA (succinil-(Ala)₂-Pro-Phe-P-nitroanilida) 0,2mM para la actividad quimotripsina, para la actividad amilasa se usó un sustrato comercial Amylase MR (ref. KR10065, Clonatest, Barcelona, España), para las actividades leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina, L-leucina p-nitroanilida (LpNa) 2mM y p-nitrofenilfosfato 450mM, respectivamente. La actividad específica (U mL⁻¹) se calculó utilizando un valor de CEM de la P-nitroanilida de 8.800

para tripsina, quimotripsina y L-aminopeptidasa y un CEM para el P-nitrofenol de 17.800 para las actividades amilasa y fosfatasa alcalina. Finalmente, todos los valores de actividad obtenidos se expresaron en U g de tejido⁻¹.

Visualización de la actividad proteasa mediante electroforesis

La electroforesis se realizó según el método descrito por Laemmli (1970), empleando geles de poliacrilamida al 12% y con un tamaño de 8x10x0,075cm. Las muestras enzimáticas se diluyeron (1:1, v/v) con tampón de muestra (Tris-HCl 0,125mM pH 6,8, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,04% y SDS 2%). La electroforesis se desarrolló a un voltaje continuo de 100V por gel durante una hora a 4°C. Seguidamente, los geles fueron tratados según se describe en Alarcón *et al.* (1998) con el fin de revelar la actividad proteasa presente en de los extractos. En breve, éstos se lavaron con agua destilada, se les añadió una solución de caseína 0,75% preparada en Tampón Tris-HCl 50mM a pH 9, y se incubaron durante 30min a 4°C, después fueron transferidos a una solución fresca del mismo sustrato durante 90min a 37°C. Después de esto, se retiró la solución de caseína, se lavaron los geles varias veces con agua destilada y se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 12% durante 10min antes de proceder a su tinción con azul brillante (Coomassie Brilliant Blue R-250) en una solución con metanol y ácido acético glacial durante 12h. Para desteñir los geles se empleó la misma solución pero sin colorante. A los pocos minutos pudo apreciarse una serie de bandas blancas sobre un fondo azul que se corresponden con las fracciones activas con actividad caseinolítica presente en los extractos enzimáticos.

Evaluación de factores anti nutritivos en los piensos experimentales

El objetivo fue analizar la presencia de inhibidores de proteasas tanto de la harina de microalga como de cada uno de los cinco piensos empleados en el bioensayo. Para ello, se realizaron extractos acuosos de las harinas algales y los piensos con el propósito de extraer los potenciales inhibidores contenidos en ellos. En breve, 1g de materia se suspendió en 10mL de agua destilada. El conjunto se sonicó en frío durante tres pulsos de 12 segundos. La mezcla resultante se almacenó a 4°C durante 12h, y seguidamente se centrifugó a

12.000rpm durante 15min a 4°C, recuperándose la fracción del sobrenadante (en el que se encuentran los potenciales inhibidores de proteasa) que finalmente fue almacenada a -20°C hasta su uso.

Para analizar la presencia de inhibidores de proteasa, un extracto enzimático de referencia (preparado a partir de tejidos de peces alimentados con pienso control) se preincubó con los extractos acuosos de la harina algal y los piensos. Durante esta fase se pretende que los potenciales inhibidores se acomplejen con las proteasas digestivas para impedir posteriormente que ejerzan su actividad catalítica. De este modo, 10µL de extracto enzimático se preincubaron durante una hora a temperatura ambiente con 10µL del extracto con potencial efecto inhibidor en 500µL de tampón Tris-HCl 100 mM a pH 9. Se incluyó un control enzimático en el que en lugar de la solución con potencial efecto inhibidor se dispensaron 10µL de agua destilada. Finalizado este tiempo, se realizó un ensayo de actividad proteasa alcalina con caseína como sustrato siguiendo a partir de este punto el mismo protocolo expuesto anteriormente. Cada ensayo se realizó por triplicado y con su correspondiente blanco. Los valores obtenidos fueron expresados en porcentaje de actividad residual, utilizando como referencia los valores de absorbancia del ensayo control cuya preincubación se realizó con agua destilada en lugar de con extracto acuoso de alga o pienso.

Análisis histológico de los tejidos hepático e intestinal

Las muestras de tejidos (hígado e intestino) fueron fijadas en solución Davidson, incluidas en parafina, y cortadas en un microtomo (6µm). Una vez que fueron desparafinadas se tiñeron con hematoxilina-eosina para la observación histomorfológica de los tejidos. Las fotografías de las secciones se realizaron con un microscopio invertido OLYMPUS IX51 equipado con el software cell[^]B versión 2.6 (Olympus Soft Imaging Solutions GmdH. Muenster, Alemania). Se analizó la morfometría del tejido hepático e intestinal de los peces a partir de las imágenes de los tejidos obtenidas al microscopio óptico. En concreto se determinó el área y la longitud del diámetro mayor de los hepatocitos, y la altura de las vellosidades y de los enterocitos en las preparaciones de intestino, empleando el programa

de software libre UTHSCA ImageTool (Universidad de Texas HealthScience Center, San Antonio, TX, disponible en el enlace <http://ddsdx.uthscsa.edu>). Los resultados se expresaron como medias y desviación estándar de al menos 32 determinaciones realizadas sobre 20 preparaciones histológicas de hígado y de 9 determinaciones realizadas sobre 25 preparaciones histológicas tanto de intestino distal como proximal, a razón de 5 por tratamiento.

Análisis ultraestructural y morfométrico de la mucosa intestinal

Para el análisis mediante microscopía electrónica (TEM y SEM) las secciones de intestino proximal se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5% y formaldehído al 2%, preparada en tampón PBS pH 7,5. Las muestras destinadas a su observación por SEM en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Almería se sometieron a sucesivos lavados con etanol a distintas concentraciones (desde etanol al 10% a etanol absoluto) para su deshidratación progresiva. A continuación se realizó una desecación de las muestras en la que se sustituyó el etanol absoluto por CO₂ líquido empleando un equipo Critical Point CPD 030, seguidamente se eliminó el CO₂ líquido y se pasaron las muestras a un desecador. Las muestras desecadas se montaron en los correspondientes soportes, se fijaron con grafito (PELCO® Colloidal Graphite). Una vez fijadas y montadas, éstas se metalizaron empleando la técnica de recubrimiento mediante pulverización catódica o *método Sputtering*, para lo cual se utilizó un equipo Sputter Coater SCD 005. Por último se visualizaron las muestras ya procesadas empleando un microscopio electrónico de scanning (SEM) HITACHI modelo S-3500. Por otro lado, las muestras destinadas a su observación mediante TEM se lavaron tres veces con PBS durante 20min y fueron enviadas al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (España) para su inclusión en resina y obtención de cortes ultrafinos. A partir de ambos tipos de muestras se obtuvo una galería de imágenes (al menos 10 imágenes TEM y 10 SEM por tratamiento) para su posterior análisis morfométrico. Las imágenes obtenidas mediante SEM y TEM fueron utilizadas para evaluar el estado de la mucosa intestinal de los juveniles de dorada mediante el análisis morfométrico de las mismas. Para realizar este estudio se empleó un programa

de software libre UTHSCA ImageTool. En concreto se realizaron las siguientes mediciones.

- i) Imágenes TEM: se obtuvo información sobre la altura y el diámetro de las microvellosidades. se realizaron al menos 100 medidas por tratamiento. Teniendo en cuenta que la morfología de las microvellosidades se aproxima a la de un cilindro, los datos anteriores se utilizaron para estimar la superficie de absorción por enterocito empleando la siguiente fórmula $(2 * \pi * r * h) + \pi * r^2$ siendo r y h la mitad del diámetro y altura de los microvilli, respectivamente.
- ii) Imágenes SEM: en este caso se cuantificó el área apical por enterocito, y se realizaron al menos 50 mediciones por tratamiento.

El análisis ultraestructural permite estimar la superficie media de absorción por enterocito en función del tratamiento que han recibido los peces, así como analizar cuál es el efecto que produce el uso de la microalga sobre la integridad física de la mucosa intestinal de los peces. De igual modo, también se establece si existe o no relación entre estos datos y los niveles de actividad de las enzimas asociadas a las microvellosidades intestinales (aminopeptidasa y fosfatasa alcalina).

Evaluación económica del uso de la biomasa algal en dietas para peces.

Se realizó una valoración económica considerando dos precios hipotéticos de la biomasa algal, i) por un lado un valor de 7 € kg⁻¹ que ha sido propuesto para la biomasa de la especie *Phaeodactylum tricorutum* que es una microalga cuya composición bioquímica es muy similar a *S. almeriensis* (Belarbi *et al.* 2000) y, ii) de otro 12,6 € kg⁻¹ que es el precio de producción propuesto por Acién *et al.* (2012) en la Planta Experimental de “Las Palmerillas”. Desde otra perspectiva, se realizó un análisis de coste-beneficio considerando, por un lado el precio del pienso calculado con las dos opciones anteriores (criterio económico), y de otro el balance FIFO (Fish In–Fish Out) resultante de sustituir la harina de pescado por *S. almeriensis* (criterio ambiental). Con este planteamiento, de los puntos de corte entre ambas curvas se podrían obtener valores hipotéticos de inclusión del alga en los que el precio del pienso estaría justificado por una menor presión sobre las pesquerías.

Análisis estadístico

Los valores presentados en las tablas corresponden a la media \pm desviación estándar (sd) de al menos tres determinaciones. En las figuras se representa la media \pm error estándar de la media (sem). Los datos en porcentajes fueron normalizados mediante la raíz del arco seno de la observación de forma previa al análisis estadístico, que se realizó con el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows (Rockville, Maryland, USA). En todos los casos se comprobó la normalidad y homogeneidad de la varianza. En el caso en que los datos no cumplieran una de esas dos premisas se procedió a transformarlos mediante el logaritmo neperiano o la raíz cuadrada de la variable, en función del menor valor del número de Barletts. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía en los datos con distribución paramétrica o Kruskal-Wallis en aquellas variables con distribución no paramétrica. En el caso de que las variables presentaran diferencias significativas entre los valores medios de los distintos tratamientos, estos últimos fueron analizados mediante test de comparación múltiple; i) test de Tukey para los datos paramétricos, o ii) mediante una gráfica de cajas y barras (*Box and Whisker Plot*) para los no paramétricos. En los casos en que se compararon dos tratamientos se utilizó una comparación de medias (t-student). Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significación de 0,05.

Por último se utilizaron análisis multivariante clúster (método del vecino más alejado con los datos estandarizados). Los distintos parámetros fueron considerados como variables diferentes, y por lo tanto el efecto de cada fórmula alimenticia fue analizado por número elevado de variables. Los datos fueron estandarizados antes del análisis con el propósito de que tuviesen la misma relevancia, independiente de cómo fueran las diferencias de magnitud entre las distintas variables. Este tipo de análisis determina la similitud entre los distintos tratamientos al proporcionar dendrograma en el que se agrupan éstos en función de la distancia que hay entre ellos.

Resultados

Crecimiento y aprovechamiento nutritivo de los piensos

En general, los peces del tratamiento SC37 mostraron valores medios mayores en la mayoría de los índices zootécnicos que el del resto de tratamientos, a excepción de los registrados en los parámetros IVS y el IHS, en los que el tratamiento control (CT) presentó valores más altos (Tabla 2). Cuando los piensos incluyeron niveles de sustitución superiores al 50% se observó una reducción significativa en el peso final, y en los valores de ADG, WG, IVS e IHS. De los peces alimentados con microalgas, los del tratamiento SC25 mostraron valores más bajos en todos los parámetros zootécnicos, a excepción de los registrados para IHS que fueron ligeramente mayores que en los peces alimentados con SC75. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni en la longitud final ni en el factor de conversión, si bien en SC37 se encontraron valores medios más altos en ambos parámetros. El valor del balance FIFO (del inglés, Fish In - Fish Out ratio) mostró un descenso gradual conforme se aumentó el contenido de biomasa de *S. almeriensis*.

Tabla 2. Crecimiento, índices de aprovechamiento nutritivo e índices morfométricos de los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con piensos experimentales que incluyen distintos niveles de biomasa de *S. almeriensis*.

	Control	SC25	SC37	SC50	SC75
P_i (g)¹	8,23 ± 1,53	8,37 ± 1,45	8,29 ± 1,48	8,21 ± 1,28	8,15 ± 1,40
P_f (g)²	25,01 ± 3,83 ^{ab}	23,37 ± 3,57 ^a	26,56 ± 3,50 ^b	24,96 ± 2,85 ^{ab}	24,13 ± 4,43 ^a
L_f (cm)³	9,81 ± 0,43	9,66 ± 0,52	9,97 ± 0,42	9,91 ± 0,43	9,79 ± 0,56
SGR⁴	1,46 ± 0,07 ^{ab}	1,30 ± 0,04 ^a	1,57 ± 0,08 ^b	1,46 ± 0,05 ^{ab}	1,40 ± 0,08 ^{ab}
ADG⁵	0,18 ± 0,01 ^{ab}	0,16 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,01 ^{ab}	0,10 ± 0,01 ^a
IC⁶	1,92 ± 0,22 ^{ab}	2,11 ± 0,06 ^b	1,70 ± 0,03 ^a	1,86 ± 0,14 ^{ab}	1,91 ± 0,18 ^{ab}
PER⁷	0,95 ± 0,10 ^{ab}	0,86 ± 0,03 ^a	1,07 ± 0,02 ^b	0,98 ± 0,07 ^b	0,96 ± 0,10 ^{ab}
WG (%)⁸	303,9 ± 6,9 ^{ab}	279,2 ± 3,6 ^a	320,4 ± 8,3 ^b	304,0 ± 4,6 ^{ab}	296,1 ± 7,8 ^a
IVS⁹	8,04 ± 0,92 ^b	7,31 ± 1,05 ^{ab}	7,99 ± 1,25 ^b	7,47 ± 1,01 ^b	7,32 ± 1,07 ^a
IHS¹⁰	2,30 ± 0,38 ^b	2,09 ± 0,44 ^b	2,23 ± 0,45 ^b	2,06 ± 0,36 ^b	1,82 ± 0,39 ^a
FIFO¹¹	3,65 ± 0,23 ^c	3,49 ± 0,11 ^b	2,56 ± 0,04 ^b	2,44 ± 0,06 ^c	2,00 ± 0,19 ^a

Los valores representan la media \pm sd (n = 45). Dentro de cada fila las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo parámetro se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$). ¹ Peso inicial en g; ² Peso final en g; ³ Longitud final en cm; ⁴ Tasa de crecimiento específico (% día⁻¹): $SGR = 100 \times (\ln P_f - \ln P_i) / t$; ⁵ Peso medio diario ganado (g día⁻¹): $ADG = \Delta P / t$, donde el ΔP es el incremento de peso; ⁶ Índice de conversión, IC = alimento seco ingerido / ΔP ; ⁷ Tasa de eficiencia de la proteína, PER = $\Delta P / g$ proteína ingerida; ⁸ Ganancia de peso (%), $WG = (P_f / P_i) \times 100$; ⁹ Índice viscerosomático (%), $IVS = (P_{visceral} / P_f) \times 100$; ¹⁰ Índice hepatosomático (%), $IHS = (P_{hígado} / P_f) \times 100$; ¹¹ FIFO = (% de harina de pescado en pienso + % de aceite de pescado en pienso) / (% rendimiento de extracción de harina de pescado en peces pelágicos + % rendimiento de extracción de aceite de pescado en peces pelágicos) \times IC.

Composición química de los peces

La inclusión de biomasa liofilizada de *S. almeriensis* no modifica la composición química de las doradas de manera significativa (Tabla 3). Sin embargo, los valores mayores de proteína se encontraron en los individuos alimentados con la dieta SC37, aunque sin presentar diferencias significativas respecto al resto de tratamientos. En cuanto al contenido lipídico de las carcasas, tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, si bien con la dieta SC25 los peces presentaron los valores más altos.

Tabla 3. Composición proximal (% peso seco) de las carcasas de los ejemplares juveniles de *S. aurata*. Los valores representan la media \pm sd (n = 3).

Tratamiento	Proteínas totales	Lípidos totales	Cenizas
Control	73,67 \pm 4,15	17,2 \pm 4,47	8,93 \pm 0,23
SC25	72,82 \pm 3,64	17,74 \pm 4,16	9,09 \pm 0,43
SC37	74,96 \pm 1,11	15,52 \pm 1,28	9,37 \pm 0,49
SC50	72,94 \pm 5,22	17,60 \pm 5,90	9,11 \pm 0,68
SC75	74,42 \pm 5,39	15,90 \pm 5,84	9,36 \pm 0,50

Perfil de ácidos grasos en los tejidos de los peces

La Tabla 4 muestra el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de cada uno de los piensos experimentales. Los resultados indican que los piensos elaborados con harina algal presentan un mayor contenido en ácidos grasos de las series n-3 y n-6 que el control (CT). Por el contrario los niveles de HUFAs y n-3 HUFAs fueron menores en los piensos con *S. almeriensis*. Así el pienso con mayor contenido en DHA es el control, apreciándose una

reducción en el contenido de este ácido graso en los piensos que contenían harina microalgal, fenómeno también se observado en el contenido de EPA. En cuanto a los ácidos grasos saturados no se dieron diferencias significativas, a excepción del pienso SC37 que presentó un contenido del 36%. El pienso control presentó el mayor contenido en monoeno (19,63%). Con respecto al ácido linoleico (18:2n-6), su contenido fue superior en los piensos elaborados con biomasa de *S. almeriensis*. Se encontró una correlación lineal entre el contenido de ciertos ácidos grasos y el nivel de inclusión de la harina algal, como es el caso de 14:00 ($y = -0,013x + 3,006$; $R^2 = 0,8993$, $P = 0,0140$) o de 18:3n-3 ($y = 0,022x + 0,880$; $R^2 = 0,9735$, $P = 0,0018$).

La Tabla 5 muestra el perfil de ácidos grasos en la fracción lipídica del tejido hepático de las doradas alimentadas con los piensos experimentales. Los resultados obtenidos evidencian que el contenido de ácidos grasos saturados en este tejido sigue un patrón similar al que contienen los distintos piensos. En cuanto al contenido de ácidos grasos poliinsaturados (HUFAs), se observó una reducción significativa en los peces alimentados con el pienso SC37. Los ácidos grasos de la serie n-9 se incrementaron significativamente en los hígados de los peces de los tratamientos SC37 y SC75. Los ácidos grasos de la serie n-6 alcanzaron su máximo contenido en el tejido hepático de los peces del grupo SC25, aunque no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ácido araquidónico. Se apreció un notable descenso en el contenido de ácidos grasos n-3 en SC37, si bien en el resto de tratamientos no se encontraron diferencias significativas. Un fenómeno similar se evidenció para los ácidos grasos del grupo n-3 HUFAs. Los niveles de EPA experimentaron un descenso significativo en los peces alimentados con los piensos que incluyen harina de algas con respecto a los del tratamiento control. Por su parte, los niveles DHA solo se redujeron de forma significativa en los ejemplares de SC37. Las razones entre ácidos grasos mostraron diferencias significativas en los valores de AA/EPA, AA/DHA, MUFA/n-3 HUFAs y MUFA/SFA, para los que el mayor valor se obtuvo con los tratamientos SC75, SC37, SC37 y SC75, respectivamente.

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica del músculo se detalla en la Tabla 6. El estudio de los ácidos grasos reveló diferencias significativas entre tratamientos en el

contenido de HUFAs, observándose una ligera reducción, aunque significativa, de éstos en los peces alimentados con SC37 y SC75. Los mayores niveles de ácidos grasos pertenecientes a las series n-3 y n-6 se encontraron en el tejido muscular de los peces de SC50 y SC75, respectivamente. En cuanto al contenido de n-3 HUFAs, se encontró una reducción significativa de éstos en los tratamientos SC37 y SC75. El contenido de DHA en los peces alimentados con SC37 fue ligeramente menor que en el resto de tratamientos ($P < 0,05$). El contenido de EPA fue significativamente inferior en todos los peces alimentados con piensos que incluían harina de *S. almeriensis*. No se observaron diferencias significativas en la composición en ácidos grasos saturados y monoinsaturados. En general, las razones entre ácidos grasos no mostraron diferencias significativas, a excepción de n-3/n-6 y de EPA/DHA que en ambos casos el mayor valor se encontró en los animales del tratamiento control.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del preparado microalgal y de los piensos experimentales.

Ácidos grasos	<i>S. almeriensis</i>	CT	SC25	SC37	SC50	SC75
14:00 mirístico	0,99	4,38 ± 0,14 ^c	3,75 ± 0,32 ^b	3,89 ± 0,08 ^b	3,56 ± 0,32 ^b	3,32 ± 0,08 ^a
16:00, palmítico	15,89	22,33 ± 0,25 ^a	20,81 ± 1,71 ^a	22,99 ± 0,33 ^b	22,71 ± 2,14 ^b	23,65 ± 0,35 ^b
16:1n7	0,78	5,28 ± 0,20 ^b	4,42 ± 0,41 ^a	4,57 ± 0,11 ^a	4,35 ± 0,50 ^a	4,36 ± 0,38 ^a
18:00, esteárico	0,35	5,58 ± 0,18 ^d	4,87 ± 0,46 ^c	5,16 ± 0,09 ^{cb}	4,83 ± 0,46 ^b	4,65 ± 0,05 ^a
18:1n9, oleico	5,19	12,65 ± 0,28	11,47 ± 0,89	12,47 ± 0,29	12,21 ± 1,17	12,47 ± 0,20
18:2n6, linoleico	6,32	11,43 ± 0,30 ^a	10,99 ± 1,00 ^b	12,64 ± 0,24 ^c	12,76 ± 1,35 ^c	13,99 ± 0,10 ^d
18:3n3, linoléico	27,90	2,43 ± 1,49 ^a	5,34 ± 0,40 ^b	8,21 ± 0,25 ^c	8,93 ± 1,05 ^c	11,58 ± 0,27 ^d
18:4n3	1,35	1,16 ± 0,05 ^{ab}	1,10 ± 0,14 ^a	1,28 ± 0,04 ^b	1,23 ± 0,15 ^a	1,26 ± 0,05 ^b
20:4n6, ARA	-	1,77 ± 0,13 ^b	1,58 ± 0,10 ^a	1,64 ± 0,09 ^{ab}	1,55 ± 0,20 ^a	1,53 ± 0,15 ^a
20:5n3, EPA	-	10,08 ± 0,39 ^e	8,48 ± 0,88 ^d	8,90 ± 0,11 ^c	8,12 ± 0,66 ^b	7,72 ± 0,10 ^a
20:1n9	-	1,70 ± 0,13 ^c	1,35 ± 0,16 ^b	1,41 ± 0,03 ^{ab}	1,40 ± 0,15 ^a	1,42 ± 0,05 ^{ab}
22:5n3	-	1,91 ± 0,17	1,56 ± 0,21	1,63 ± 0,19	1,48 ± 0,25	1,33 ± 0,17
22:6n3, DHA	-	16,45 ± 0,61 ^e	13,99 ± 1,52 ^d	14,75 ± 0,28 ^c	13,82 ± 1,34 ^b	13,06 ± 0,29 ^a
Saturados (SFA)	17,24	32,29 ± 0,39 ^{ab}	29,43 ± 2,48 ^a	36,01 ± 7,19 ^b	31,10 ± 2,90 ^{ab}	31,62 ± 0,40 ^{ab}
Monoenos (MUFA)	7,33	19,63 ± 0,52 ^c	17,23 ± 1,44 ^{ab}	18,45 ± 0,40 ^a	17,95 ± 1,72 ^b	18,24 ± 0,30 ^a
HUFA	-	29,90 ± 1,28 ^e	25,22 ± 3,00 ^d	26,31 ± 0,88 ^c	24,78 ± 2,19 ^b	23,31 ± 0,62 ^a
n-3	29,26	31,71 ± 1,02 ^{ab}	30,09 ± 3,46 ^a	34,16 ± 1,09 ^b	33,39 ± 3,12 ^b	34,62 ± 0,50 ^b
n-6	6,32	13,21 ± 0,35 ^{ab}	12,57 ± 1,02 ^a	14,28 ± 0,21 ^b	14,30 ± 1,32 ^b	15,52 ± 0,22 ^c
n-9	5,19	14,35 ± 0,38 ^b	12,81 ± 1,05 ^a	13,88 ± 0,29 ^{ab}	13,60 ± 1,31 ^{ab}	13,89 ± 0,18 ^{ab}
n-3 HUFA	-	28,13 ± 1,28 ^c	23,64 ± 2,99 ^{ab}	24,67 ± 0,95 ^b	23,23 ± 2,13 ^{ab}	21,78 ± 0,71 ^a
n-3/n-6	4,63	2,40 ± 0,10 ^b	2,39 ± 0,10 ^b	2,39 ± 0,07 ^b	2,33 ± 0,06 ^a	2,23 ± 0,06 ^a
EPA/DHA	-	0,61 ± 0,00 ^c	0,61 ± 0,01 ^{bc}	0,60 ± 0,01 ^{bc}	0,59 ± 0,02 ^{ab}	0,59 ± 0,01 ^a
AA/EPA	-	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,02
AA/DHA	-	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01

MUFA/n-3 HUFA	-	0,70 ± 0,03 ^a	0,73 ± 0,04 ^a	0,75 ± 0,04 ^a	0,77 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,03 ^b
MUFA/HUFA	-	0,66 ± 0,03 ^a	0,69 ± 0,03 ^a	0,70 ± 0,04 ^a	0,72 ± 0,02 ^a	0,78 ± 0,03 ^b
MUFA/SFA	0,43	0,61 ± 0,01 ^b	0,59 ± 0,01 ^{ab}	0,53 ± 0,09 ^a	0,58 ± 0,02 ^{ab}	0,58 ± 0,01 ^{ab}

Los valores representan la media ± sd (n = 4). En cada fila las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo ácido graso se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en el hígado de juveniles de *S. aurata* al inicio del ensayo y tras 45 días de alimentación con los piensos experimentales.

Ácidos grasos	Inicio	CT	SC25	SC37	SC50	SC75
14:00	3,04 ± 0,02 ^{bc}	2,97 ± 0,20 ^c	2,83 ± 0,26 ^{bc}	2,42 ± 0,37 ^{ab}	2,63 ± 0,16 ^{abc}	2,20 ± 0,30 ^a
16:00	22,64 ± 0,15	23,26 ± 1,29	22,24 ± 0,96	23,24 ± 1,20	21,31 ± 1,56	21,71 ± 0,44
16:1n7	5,24 ± 0,01 ^{ab}	5,38 ± 0,21 ^b	5,42 ± 0,29 ^b	4,73 ± 0,30 ^a	5,34 ± 0,36 ^b	4,73 ± 0,36 ^a
16:2n4	0,76 ± 0,05 ^{ab}	0,71 ± 0,04 ^a	0,84 ± 0,03 ^b	0,71 ± 0,07 ^a	0,87 ± 0,02 ^b	0,87 ± 0,09 ^b
16:3n4	0,62 ± 0,01 ^c	0,59 ± 0,02 ^c	0,60 ± 0,04 ^c	0,48 ± 0,03 ^a	0,63 ± 0,12 ^{bc}	0,52 ± 0,08 ^{ab}
18:00	8,90 ± 0,03 ^b	8,89 ± 0,16 ^b	8,36 ± 0,25 ^a	10,25 ± 1,27 ^c	8,41 ± 0,43 ^a	8,91 ± 0,20 ^b
18:1n9	19,20 ± 0,40 ^a	27,05 ± 0,98 ^c	25,67 ± 2,99 ^b	34,51 ± 0,95 ^f	29,64 ± 1,23 ^d	32,17 ± 6,25 ^e
18:2n6	5,23 ± 0,05 ^b	5,78 ± 0,14 ^d	6,43 ± 0,35 ^e	4,66 ± 0,27 ^a	6,53 ± 0,75 ^d	5,71 ± 1,32 ^{cd}
18:3n3	0,47 ± 0,01 ^a	0,75 ± 0,08 ^b	1,62 ± 0,14 ^d	1,41 ± 0,10 ^c	2,06 ± 0,24 ^f	2,03 ± 0,54 ^c
18:4n3		0,49 ± 0,05 ^a	0,64 ± 0,06 ^{bc}	0,53 ± 0,06 ^{ab}	0,79 ± 0,07 ^c	0,77 ± 0,15 ^c
20:4n6	2,48 ± 0,04 ^b	1,49 ± 0,36 ^{ab}	1,58 ± 0,47 ^{ab}	1,14 ± 0,12 ^a	1,24 ± 0,31 ^a	1,42 ± 0,33 ^a
20:4n3	0,85 ± 0,00 ^c	0,84 ± 0,29 ^b	0,89 ± 0,12 ^c	0,61 ± 0,08 ^a	0,70 ± 0,16 ^{ab}	0,78 ± 0,18 ^{abc}
20:5n3	7,55 ± 0,01 ^e	5,80 ± 0,27 ^d	5,69 ± 0,83 ^c	3,84 ± 0,28 ^a	5,07 ± 0,21 ^c	4,42 ± 1,02 ^b
20:1n9	0,88 ± 0,00 ^a	1,15 ± 0,09 ^{bc}	1,15 ± 0,23 ^{bcd}	1,14 ± 0,04 ^b	1,19 ± 0,07 ^c	1,03 ± 0,06 ^b
22:5n3	2,40 ± 0,02 ^c	1,93 ± 0,24 ^{bc}	2,23 ± 0,46 ^c	1,30 ± 0,11 ^{ab}	1,73 ± 0,20 ^{abc}	1,46 ± 0,42 ^{ab}
22:6n3	19,38 ± 0,25 ^c	12,84 ± 1,80 ^b	13,67 ± 2,65 ^{bc}	8,65 ± 0,89 ^a	11,53 ± 0,36 ^{ab}	11,21 ± 3,02 ^{ab}
Saturados (SFA)	34,59 ± 0,20 ^{ab}	35,13 ± 1,45 ^{ab}	33,43 ± 1,33 ^{ab}	35,91 ± 2,64 ^b	32,35 ± 1,74 ^a	32,81 ± 0,80 ^a
Monoenos (MUFA)	25,32 ± 0,42 ^a	33,59 ± 1,21 ^c	32,24 ± 3,34 ^b	40,38 ± 1,06 ^f	36,17 ± 0,83 ^d	37,94 ± 6,61 ^e
HUFA	32,66 ± 0,27 ^c	22,90 ± 2,45 ^b	24,05 ± 4,18 ^{bc}	15,53 ± 1,45 ^a	20,27 ± 0,59 ^b	19,29 ± 4,94 ^{ab}
n-3	30,88 ± 0,09 ^c	22,65 ± 2,26 ^{bc}	24,73 ± 3,69 ^{bc}	16,34 ± 1,35 ^a	21,88 ± 0,84 ^b	20,68 ± 5,27 ^b
n-6	7,72 ± 0,09 ^c	7,27 ± 0,47 ^b	8,01 ± 0,53 ^c	5,80 ± 0,32 ^a	7,77 ± 0,67 ^b	7,13 ± 1,65 ^b
n-9	20,08 ± 0,41 ^a	28,21 ± 1,02 ^{bc}	26,82 ± 3,06 ^{ab}	35,65 ± 0,97 ^d	30,83 ± 1,17 ^{bcd}	33,21 ± 6,27 ^{cd}
n-3 HUFA	30,17 ± 0,23 ^c	21,41 ± 2,22 ^b	22,47 ± 3,76 ^{bc}	14,40 ± 1,33 ^a	19,04 ± 0,56 ^{ab}	17,88 ± 4,61 ^{ab}

n-3/n-6	4,00 ± 0,06 ^b	3,12 ± 0,21 ^a	3,08 ± 0,36 ^a	2,82 ± 0,13 ^a	2,83 ± 0,13 ^a	2,88 ± 0,19 ^a
EPA/DHA	3,15 ± 0,02	3,02 ± 0,28	2,62 ± 0,50	2,95 ± 0,12	2,96 ± 0,30	3,09 ± 0,28
AA/EPA	0,33 ± 0,01 ^c	0,26 ± 0,06 ^a	0,27 ± 0,06 ^a	0,30 ± 0,02 ^a	0,24 ± 0,06 ^{ab}	0,32 ± 0,01 ^{bc}
AA/DHA	0,13 ± 0,00 ^b	0,12 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,02 ^{abc}	0,13 ± 0,00 ^c	0,11 ± 0,03 ^{abc}	0,13 ± 0,01 ^{abc}
MUFA/n-3 HUFA	0,84 ± 0,02 ^a	1,59 ± 0,21 ^{ab}	1,49 ± 0,43 ^{ab}	2,82 ± 0,24 ^c	1,90 ± 0,08 ^{bc}	2,35 ± 1,08 ^{bc}
MUFA/HUFA	0,78 ± 0,02 ^a	1,48 ± 0,20 ^{ab}	1,40 ± 0,41 ^{ab}	2,62 ± 0,22 ^b	1,79 ± 0,07 ^b	2,18 ± 0,99 ^b
MUFA/SFA	0,73 ± 0,02 ^a	0,96 ± 0,01 ^{ab}	0,96 ± 0,09 ^{abc}	1,13 ± 0,10 ^{bc}	1,12 ± 0,07 ^{bc}	1,16 ± 0,19 ^c

Los valores representan la media ± sd (n = 4). En cada fila las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo ácido graso se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en el músculo de juveniles de *S. aurata* al inicio del ensayo y tras 45 días de alimentación con los piensos experimentales.

Ácidos grasos	Inicio	CT	SC25	SC37	SC50	SC75
14:00	3,81 ± 0,01 ^d	3,54 ± 0,07 ^c	3,33 ± 0,24 ^c	3,20 ± 0,04 ^b	3,11 ± 0,07 ^b	2,97 ± 0,16 ^a
16:00	20,78 ± 0,06 ^a	22,27 ± 0,47 ^b	21,71 ± 0,31 ^{ab}	22,03 ± 0,52 ^b	21,69 ± 0,20 ^{ab}	22,16 ± 0,53 ^b
16:1n7	6,72 ± 0,03 ^c	0,71 ± 0,15 ^c	0,75 ± 0,44 ^c	0,72 ± 0,34 ^b	0,72 ± 0,35 ^{bc}	0,78 ± 2,07 ^a
16:2n4		0,72 ± 0,04 ^b	0,64 ± 0,02 ^{ab}	0,58 ± 0,03 ^{ab}	0,56 ± 0,03 ^a	0,72 ± 0,02 ^b
16:3n4		0,41 ± 0,02 ^c	0,40 ± 0,07 ^b	0,38 ± 0,04 ^a	0,37 ± 0,05 ^a	0,36 ± 0,05 ^{bc}
18:00	6,19 ± 0,05 ^c	5,97 ± 0,16 ^{abc}	5,86 ± 0,22 ^a	6,04 ± 0,17 ^{abc}	6,03 ± 0,04 ^a	6,35 ± 0,28 ^c
18:1n9	15,88 ± 0,13 ^a	23,04 ± 0,34 ^b	23,78 ± 0,99 ^b	23,90 ± 0,40 ^b	23,23 ± 0,59 ^b	24,26 ± 1,01 ^b
18:2n6	6,51 ± 0,06 ^a	6,89 ± 0,18 ^a	7,32 ± 0,27 ^b	7,28 ± 0,04 ^b	7,46 ± 0,13 ^b	7,87 ± 0,38 ^c
18:3n3	0,86 ± 0,01 ^a	0,95 ± 0,11 ^a	2,23 ± 0,53 ^b	2,64 ± 0,07 ^c	2,61 ± 0,07 ^c	3,15 ± 0,57 ^d
18:4n3	0,98 ± 0,09 ^c	0,72 ± 0,05 ^a	0,81 ± 0,06 ^{ab}	0,82 ± 0,07 ^{abc}	0,86 ± 0,01 ^{bc}	0,83 ± 0,09 ^{abc}
20:4n6	1,57 ± 0,02	1,06 ± 0,20	1,08 ± 0,08	1,08 ± 0,04	1,12 ± 0,04	1,09 ± 0,05
20:4n3		0,88 ± 0,12	0,88 ± 0,03	0,90 ± 0,03	0,94 ± 0,05	0,91 ± 0,07
20:5n3	11,06 ± 0,12 ^c	7,49 ± 0,16 ^b	7,08 ± 0,27 ^a	6,89 ± 0,15 ^a	7,08 ± 0,17 ^a	6,87 ± 0,33 ^a
20:1n9	0,92 ± 0,02 ^a	1,29 ± 0,04 ^c	1,24 ± 0,12 ^{bc}	1,22 ± 0,09 ^{bc}	1,13 ± 0,06 ^b	1,19 ± 0,13 ^{bc}
22:5n3	3,94 ± 0,11 ^c	2,45 ± 0,06 ^{ab}	2,48 ± 0,17 ^b	2,30 ± 0,08 ^a	2,34 ± 0,04 ^a	2,33 ± 0,15 ^a
22:6n3	20,03 ± 0,42 ^c	14,33 ± 0,41 ^b	13,90 ± 0,80 ^{ab}	13,73 ± 0,31 ^a	14,42 ± 0,56 ^{ab}	13,88 ± 0,76 ^{ab}
Saturados (SFA)	30,77 ± 0,12	31,78 ± 0,65	30,90 ± 0,42	31,27 ± 0,65	30,84 ± 0,29	31,48 ± 0,74
Monoenos (MUFA)	23,53 ± 0,18 ^a	31,59 ± 0,50 ^b	31,72 ± 0,90 ^b	31,52 ± 0,41 ^b	30,81 ± 0,44 ^b	30,61 ± 1,65 ^b
HUFA	36,59 ± 0,63 ^c	26,22 ± 0,55 ^b	25,43 ± 1,16 ^{ab}	24,90 ± 0,54 ^a	25,89 ± 0,77 ^{ab}	25,08 ± 1,26 ^a
n-3	36,87 ± 0,73 ^c	26,83 ± 0,45 ^a	27,39 ± 0,89 ^{ab}	27,29 ± 0,49 ^{ab}	28,25 ± 0,68 ^b	27,96 ± 0,76 ^{ab}
n-6	8,08 ± 0,04 ^{ab}	7,95 ± 0,32 ^a	8,39 ± 0,30 ^{ab}	8,36 ± 0,04 ^{ab}	8,58 ± 0,15 ^{bc}	8,96 ± 0,35 ^c
n-9	16,81 ± 0,15 ^a	24,33 ± 0,36 ^b	25,03 ± 1,02 ^b	25,12 ± 0,42 ^b	24,36 ± 0,61 ^b	25,45 ± 0,99 ^b
n-3 HUFA	35,02 ± 0,65 ^c	25,15 ± 0,47 ^b	24,35 ± 1,10 ^{ab}	23,82 ± 0,51 ^a	24,78 ± 0,74 ^{ab}	23,99 ± 1,22 ^a
n-3/n-6	4,56 ± 0,07 ^c	3,38 ± 0,14 ^b	3,27 ± 0,12 ^{ab}	3,26 ± 0,05 ^{ab}	3,29 ± 0,04 ^{ab}	3,13 ± 0,17 ^a

EPA/DHA	2,81 ± 0,05	ab	3,06 ± 0,13	c	2,86 ± 0,11	a	3,00 ± 0,07	abc	3,02 ± 0,04	bc	2,95 ± 0,09	abc
AA/EPA	0,14 ± 0,00	a	0,14 ± 0,03	ab	0,15 ± 0,01	ab	0,16 ± 0,00	b	0,16 ± 0,00	b	0,16 ± 0,00	b
AA/DHA	0,08 ± 0,00		0,07 ± 0,01		0,08 ± 0,00		0,08 ± 0,00		0,08 ± 0,00		0,08 ± 0,00	
MUFA/n-3 HUFA	0,67 ± 0,01	a	1,26 ± 0,04	b	1,31 ± 0,09	b	1,32 ± 0,04	b	1,24 ± 0,05	b	1,28 ± 0,10	b
MUFA/HUFA	0,64 ± 0,01	a	1,21 ± 0,04	b	1,25 ± 0,09	b	1,27 ± 0,03	b	1,19 ± 0,05	b	1,22 ± 0,10	b
MUFA/SFA	0,76 ± 0,00	a	0,99 ± 0,03	b	1,03 ± 0,03	b	1,01 ± 0,03	b	1,00 ± 0,01	b	0,97 ± 0,07	b

Los valores representan la media ± sd (n = 4). En cada fila las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo ácido graso se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

Estudio de las actividades enzimáticas digestivas

Este estudio se realizó con el objetivo de conocer cuál es la influencia de la inclusión de *S. almeriensis* sobre las actividades enzimáticas digestivas en juveniles de dorada. En el análisis se han considerado dos grupos de enzimas distintas: i) aquellas indicadoras de la capacidad digestiva como son la proteasa alcalina total, tripsina, quimotripsina y amilasa, y ii) aquellas otras que se pueden utilizar como marcadores de la capacidad de absorción a nivel intestinal como la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa.

La Tabla 7 muestra los valores obtenidos para cada una de estas actividades en función del alimento que se suministró a los peces. La inclusión de *S. almeriensis* no ejerció un efecto negativo sobre las actividades enzimáticas estudiadas. De forma general, los peces alimentados con piensos suplementados con la microalga presentaron unos niveles de actividad más altos que los peces alimentados con el pienso control, observándose en algunas actividades como son la tripsina, la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa, la existencia de diferencias significativas respecto al control. De manera más específica, los individuos alimentados con los piensos SC25 y SC37 mostraron mayores niveles de actividad, destacando la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa en los peces alimentados con SC37, y la tripsina en los alimentados con SC25.

Con el propósito de visualizar las proteasas intestinales presentes en los extractos intestinales se realizó un zimograma para analizar si la inclusión de biomasa algal modificó el patrón de enzimas de los peces. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para los peces de cada tratamiento, observándose que todos ellos presentan un patrón de proteasas similar caracterizado por cinco enzimas proteolíticas claramente visibles.

Tabla 7. Actividades enzimáticas digestivas (U/g tejido) en los juveniles de dorada alimentados con piensos que contienen biomasa algal (media \pm DS).

Actividad enzimática	Control	SC25	SC37	SC50	SC75
Capacidad digestiva					
Proteasa alcalina (x1000)	2,13 \pm 0,47	2,26 \pm 0,54	2,38 \pm 0,864	2,23 \pm 0,673	2,79 \pm 0,659
Tripsina	0,20 \pm 0,03 ^b	0,25 \pm 0,03 ^a	0,21 \pm 0,04 ^{ab}	0,23 \pm 0,04 ^{ab}	0,23 \pm 0,04 ^{ab}
Quimotripsina	5,05 \pm 1,99	6,67 \pm 0,98	5,31 \pm 1,46	5,57 \pm 0,88	5,56 \pm 1,61
Amilasa	1,77 \pm 0,87	1,77 \pm 0,31	1,96 \pm 0,44	1,79 \pm 0,48	2,06 \pm 0,50
Capacidad de absorción					
Leucina aminopeptidasa	0,77 \pm 0,10 ^c	1,05 \pm 0,25 ^{ab}	1,10 \pm 0,43 ^a	0,92 \pm 0,13 ^{ab}	0,72 \pm 0,19 ^c
Fosfatasa alcalina	29,33 \pm 5,13 ^b	33,13 \pm 9,76 ^{ab}	38,62 \pm 9,70 ^a	29,88 \pm 4,74 ^{ab}	23,87 \pm 4,56 ^b

En cada fila, los valores con distinto superíndice presentan diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$).

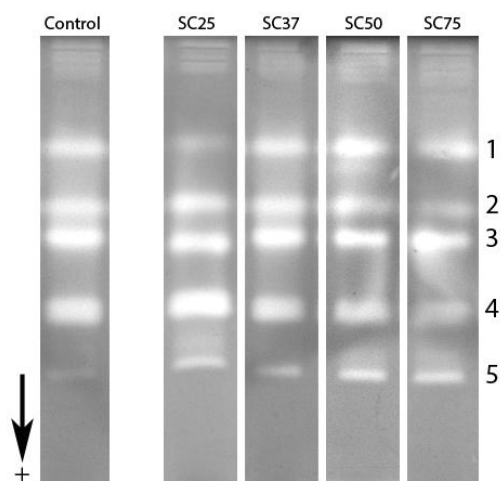


Figura 1. Substrato-SDS-PAGE de los extractos intestinales de los juveniles de *S. aurata* alimentados con piensos que incluyen distinta proporción de harina algal. En cada carril se incluyeron 2 unidades de actividad proteasa alcalina de un extracto enzimático elaborado a partir de los tejidos de 3 peces distintos de un mismo tratamiento.

Estudio de la presencia de factores antinutritivos en la biomasa algal y en los piensos experimentales.

Para evaluar la presencia de sustancias antinutritivas se realizó un ensayo de inhibición empleando como potencial solución inhibitoria cada uno de los extractos preparados a partir de la harina de microalga y los piensos experimentales. Los resultados obtenidos indican que ni la biomasa algal ni las dietas experimentales contienen sustancias que tengan la capacidad de inhibir a las proteasas digestivas de los ejemplares juveniles de dorada (resultados no mostrados). Además, este resultado corrobora el hecho de que en el zimograma (Figura 4) no se evidencie alteración alguna del patrón de bandas característico de la dorada cuando los ejemplares son alimentados con los distintos piensos experimentales.

Estudio de la estructura histológica del hígado e intestino

La estructura tisular del hígado de los ejemplares de *S. aurata* se muestra en la Figura 2. En general, a menor aumento no se apreció la existencia de alteraciones estructurales en el tejido hepático como consecuencia de la ingesta de piensos que incluyesen *S. almeriensis*. En todos los casos los hepatocitos presentaron núcleos ligeramente excéntricos y polarizados hacia el centro de las rosetas y, en su conjunto, dirigidos hacia los capilares hepáticos ramificados (Figura 2A, B, E y F). A mayor detalle se evidenció que las doradas alimentadas con SC37 presentaron algunos hepatocitos ligeramente mayores, con cierto grado de vacuolización intracelular (véase Figura 2D). A pesar de lo anterior, los peces alimentados con microalgas mostraron hepatocitos normales, con núcleos evidentes y con patentes nucleolos, y una abundante ramificación de los capilares y sinusoides, observándose en general una estructura tisular compacta. Los acinos pancreáticos contenidos en hígado presentaron una apariencia normal con patentes gránulos de zimógeno (Figura 2E y C).

La estructura tisular del intestino de los peces se muestra en las Figuras 3 y 4. En la Figura 3 se ilustra el tejido intestinal de las doradas del tratamiento control. La morfología del intestino proximal (IP) y del distal (ID) mostraron una apariencia normal, con vellosidades largas en las que los enterocitos se disponen regularmente con sus núcleos alineados (véase en la Figura 3A la disposición típica de los núcleos de los enterocitos en la vellosidad a modo de “dedos en un guante”). Se observan células mucosas distribuidas de forma regular a lo largo de las vellosidades intestinales. Las microvellosidades intestinales se aprecian como una banda más densa en la superficie de la mucosa (véase la Figura 3D). La lamina propia está constituida por una delgada capa de células en la base de los enterocitos, y en ella se aprecian leucocitos distribuidos de forma regular, siendo ambos hallazgos característicos de una mucosa intestinal sana. En la Figura 4 se muestra el detalle de la estructura histológica del intestino proximal de los peces alimentados con piensos que incluyen *S. almeriensis*. En general, el estudio histológico reveló que no se producen alteraciones de la estructura tisular en comparación con los peces del tratamiento control, a excepción del ligero incremento en el número de células caliciformes observado en el intestino proximal de algunos de los peces alimentados con SC50 (Figura 4G).

A partir de las imágenes obtenidas al microscopio del hígado se estimó la longitud del eje mayor y el área de los hepatocitos (Tabla 8). En general, los hepatocitos de los peces alimentados con SC50 presentaron un tamaño menor que en el resto de los tratamientos. Los valores del eje mayor fueron menores en SC50, aunque solo con diferencias significativas respecto a los peces de SC75. Por su parte, el área de los hepatocitos fue significativamente menor en SC50 ($P < 0,05$).

La Tabla 9 muestra los valores resultantes tras las mediciones realizadas en las preparaciones histológicas de intestino. Todos los peces alimentados con piensos que incluyen harina algal mostraron una mayor longitud de las vellosidades en el intestino distal respecto al control. En cuanto a la altura de los enterocitos, en general ésta fue mayor en los piensos que incluían *S. almeriensis*, aunque sin presentar diferencias significativas respecto al control.

Tabla 8. Longitud del eje mayor y área de los hepatocitos en los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con los piensos experimentales (media \pm sd, n = 4 individuos).

Tratamiento	Longitud del eje mayor (μm)			Área (μm^2)		
SC25	21,82	\pm 3,00	ab	238,55	\pm 55,13	b
SC37	21,50	\pm 3,25	ab	230,88	\pm 68,51	b
SC50	19,96	\pm 2,49	a	192,85	\pm 42,93	a
SC75	22,09	\pm 3,16	b	234,46	\pm 45,56	b

En cada variable las diferencias significativas se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

Tabla 9. Altura de las vellosidades y de los enterocitos del intestino proximal y distal de los juveniles de *S. aurata* alimentados con los piensos experimentales (media \pm sd, n = 4 individuos).

		Altura de las vellosidades (μm)	Altura de los enterocitos(μm)
Intestino proximal	Control	560,61 \pm 174,87	35,97 \pm 9,08 ab
	SC25	533,67 \pm 228,92	38,01 \pm 7,36 ab
	SC37	451,20 \pm 144,29	32,74 \pm 9,38 a
	SC50	526,59 \pm 189,21	44,31 \pm 6,70 b
	SC75	618,15 \pm 201,87	43,40 \pm 8,97 ab
Intestino distal	Control	334,90 \pm 125,51 a	41,81 \pm 12,87 ab
	SC25	450,06 \pm 153,05 ab	48,24 \pm 15,64 b
	SC37	560,61 \pm 174,87 bc	35,97 \pm 9,08 a
	SC50	566,95 \pm 145,09 bc	46,12 \pm 7,18 ab
	SC75	657,85 \pm 92,95 c	42,13 \pm 16,05 ab

En cada variable las diferencias significativas se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

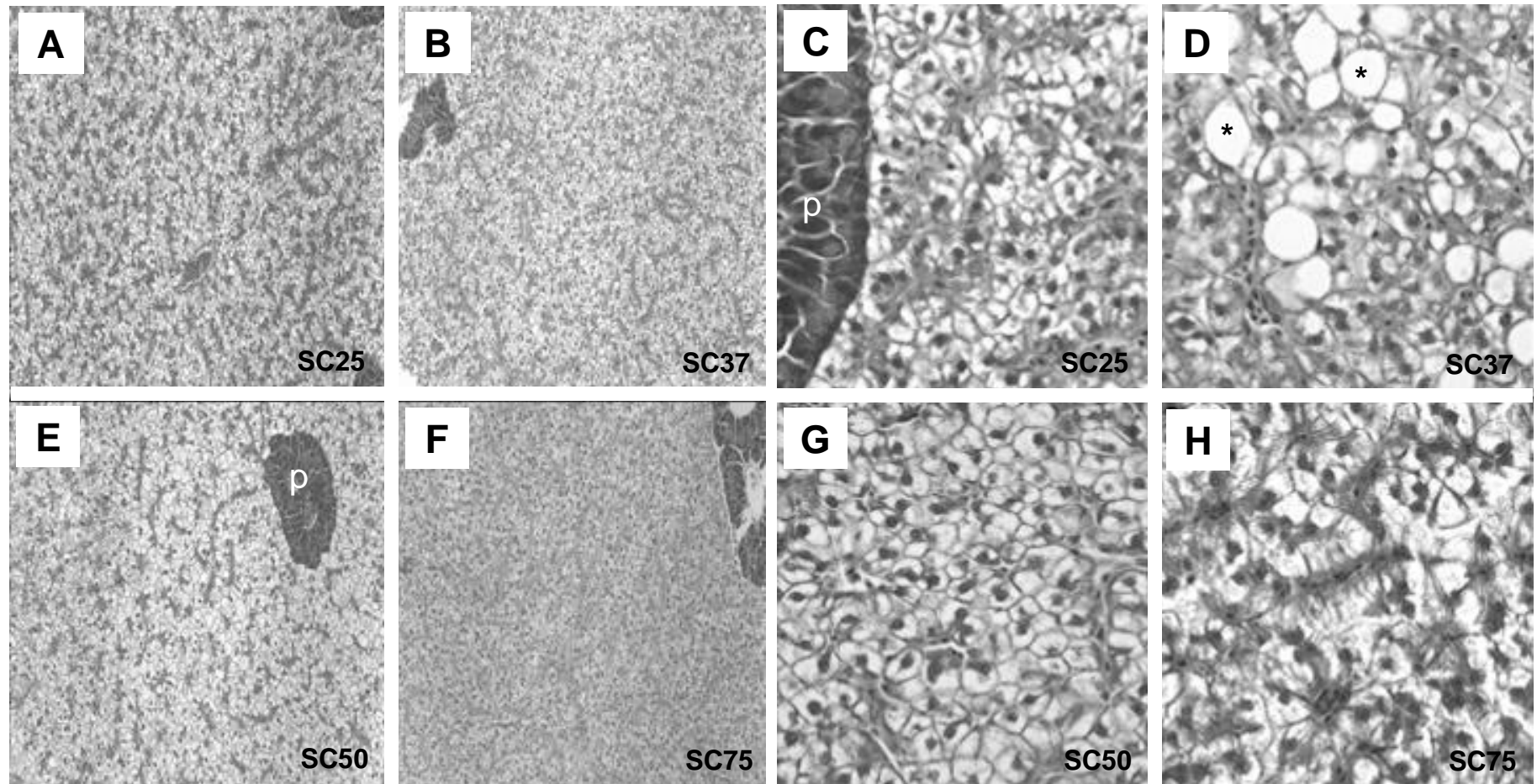


Figura 2. Detalle de la estructura tisular del hígado en los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con SC25 (A y C), SC37 (B y D), SC50 (E y G), y SC75 (F y H). En A, B, E y F: Tinción H&E, 40X. En C, D, G y H: Tinción H&E, 400 X. (p: tejido pancreático, * inclusiones lipídicas).

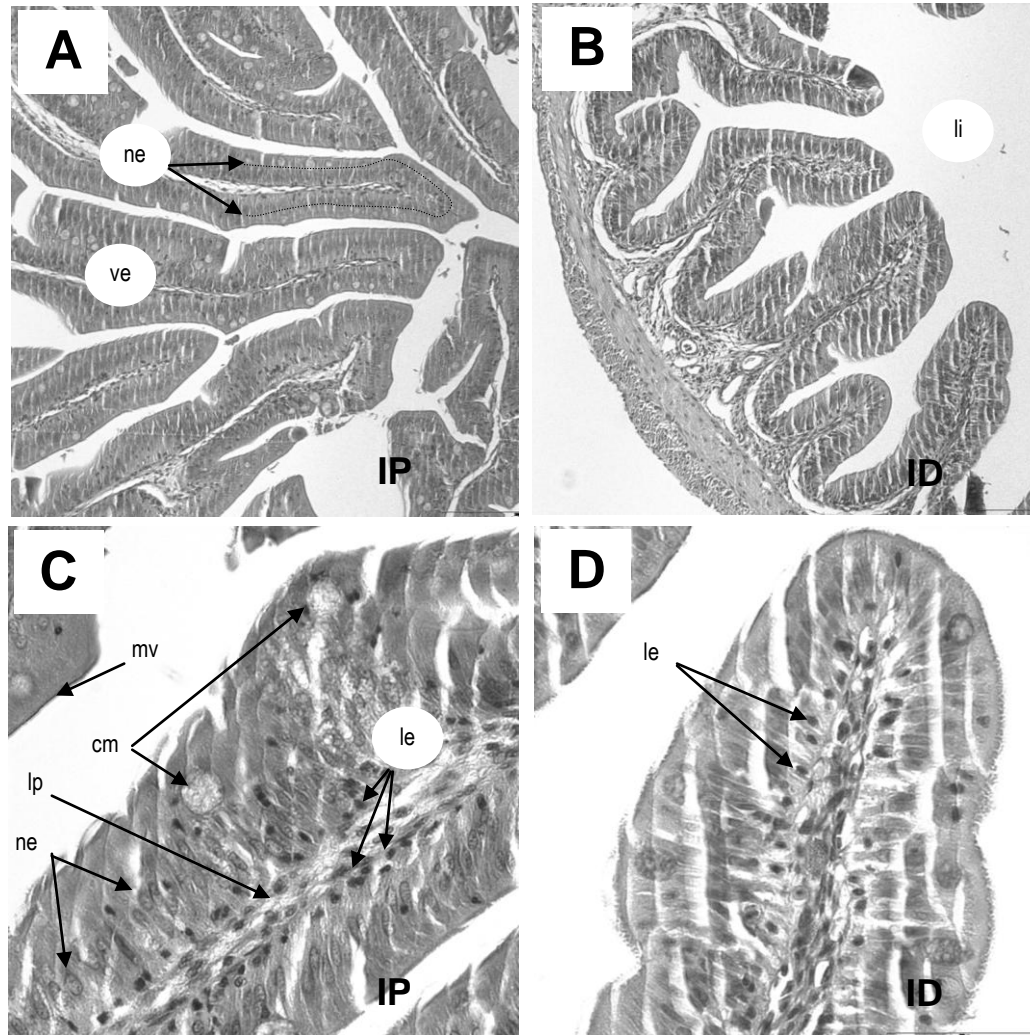


Figura 3. Detalle de la estructura tisular del intestino proximal (IP en A y C) y distal (ID en B y D) de los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con el pienso control (CT). En A y B: Tinción H&E, 40X. En C y D: Tinción H&E, 400 X. (cm: células mucosas, le: leucocitos, li: luz intestinal, lp: lamina propria, mv: microvellosidades intestinales, ne: núcleos de los enterocitos, ve: vellosidad intestinal).

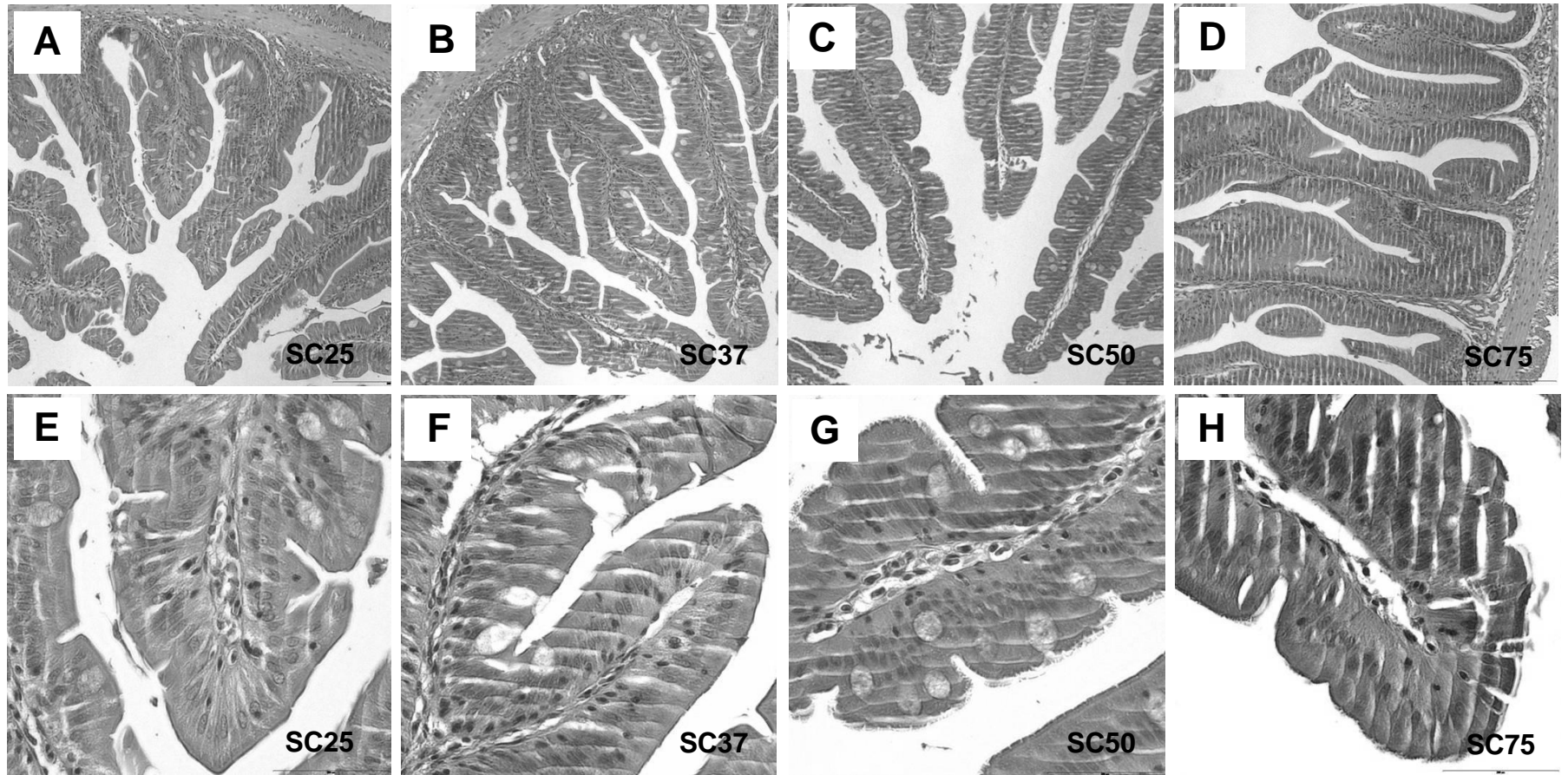


Figura 4. Detalle de la estructura tisular del intestino proximal en los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con SC25 (A y E), SC37 (B y F), SC50 (C y G), y SC75 (D y H). En A, B, C y D: Tinción H&E, 40X. En E, F, G y H: Tinción H&E, 400 X.

Estudio de la ultraestructura de la mucosa intestinal

Con el propósito de estudiar el efecto de la suplementación con *S. almeriensis* sobre la estructura de la mucosa intestinal se obtuvieron una serie de imágenes tanto por TEM como por SEM para la zona proximal del intestino. Estas imágenes se analizaron mediante el programa de software libre UTHSCA ImageTool para conocer y comparar el efecto que produce cada uno de los tratamientos en la superficie de absorción de nutrientes.

Las Figuras 5 y 6 muestran algunas de las imágenes TEM y SEM obtenidas del intestino proximal. A partir de las mediciones efectuadas sobre las imágenes TEM se comprobó la existencia de diferencias significativas en la altura de las microvellosidades intestinales (Figura 5). En concreto en los peces de los tratamientos SC37 y SC75, la altura de éstas fue casi del doble de magnitud que la presente en los peces de los demás tratamientos. También se apreciaron diferencias significativas en la superficie apical de los enterocitos (Figura 6), que también fue mayor en los animales alimentados con los piensos SC37 y SC75.

La Tabla 10 recoge los resultados del análisis morfométrico efectuado a partir de las imágenes con el programa UTHSCA ImageTool. En general, los peces alimentados con microalgas presentaron mayor altura y diámetro de sus microvellosidades intestinales y sus enterocitos fueron de mayor tamaño. De igual forma, la superficie de absorción por enterocito fue significativamente mayor en los peces alimentados con microalgas que en los animales del control. En particular, los peces de los grupos SC37 y SC75 presentaron los valores más altos llegando a superar de forma notable los valores obtenidos con el pienso Control.

De los resultados obtenidos es evidente que en la zona proximal del intestino la suplementación con *S. almeriensis* ocasiona un incremento en la superficie de absorción de la mucosa intestinal. El valor máximo en el intestino proximal se alcanzó con SC37.

Tabla 10. Resultados (media \pm sd) del análisis morfométrico efectuado en la mucosa del intestino proximal a partir de las imágenes TEM y SEM. Los valores con distinto superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$).

Parámetros	Control	SC25	SC37	SC50	SC75
Altura microvilli (μm)	2,07 \pm 0,25 ^b	1,83 \pm 0,17 ^c	2,64 \pm 0,66 ^a	1,57 \pm 0,09 ^d	1,95 \pm 0,50 ^c
Diámetro microvilli (μm)	0,09 \pm 0,01 ^d	0,12 \pm 0,01 ^b	0,12 \pm 0,01 ^b	0,14 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,01 ^c
Área apical enterocito (μm^2)	11,3 \pm 4,0 ^c	18,9 \pm 5,2 ^b	28,8 \pm 4,1 ^a	14,2 \pm 3,8 ^c	20,6 \pm 3,1 ^b
Superficie absorción/enterocito (μm^2)	693,9 \pm 82,0 ^d	769,2 \pm 72,2 ^c	1522,6 \pm 379,6 ^a	414,1 \pm 23,6 ^e	1014,1 \pm 256,9 ^b

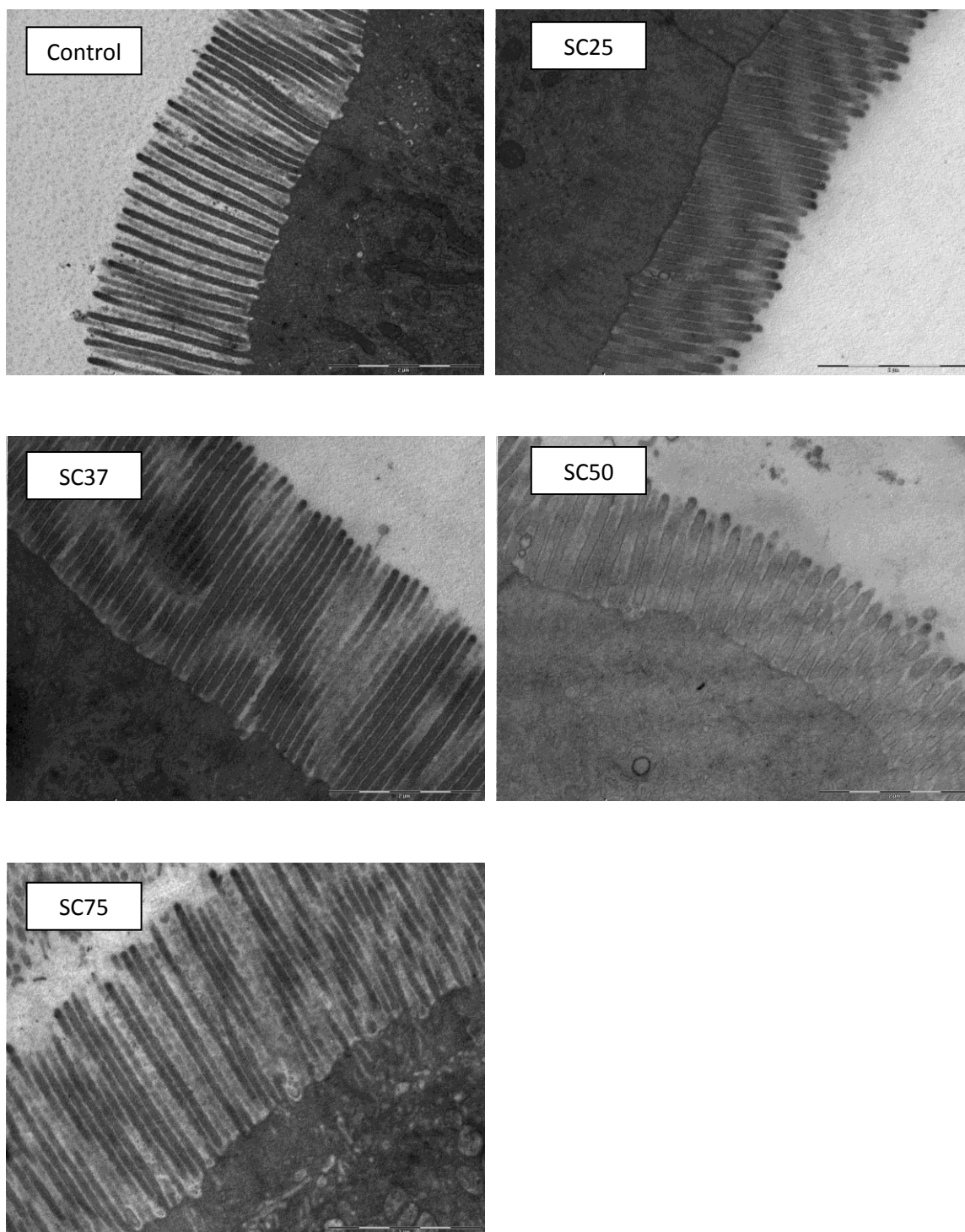


Figura 5. Detalle de las microvellosidades intestinales del intestino proximal de los juveniles de dorada alimentados con pienso control, SC25, SC37, SC50 y SC75. Imágenes TEM (en el margen inferior derecho se indica la escala de cada imagen).

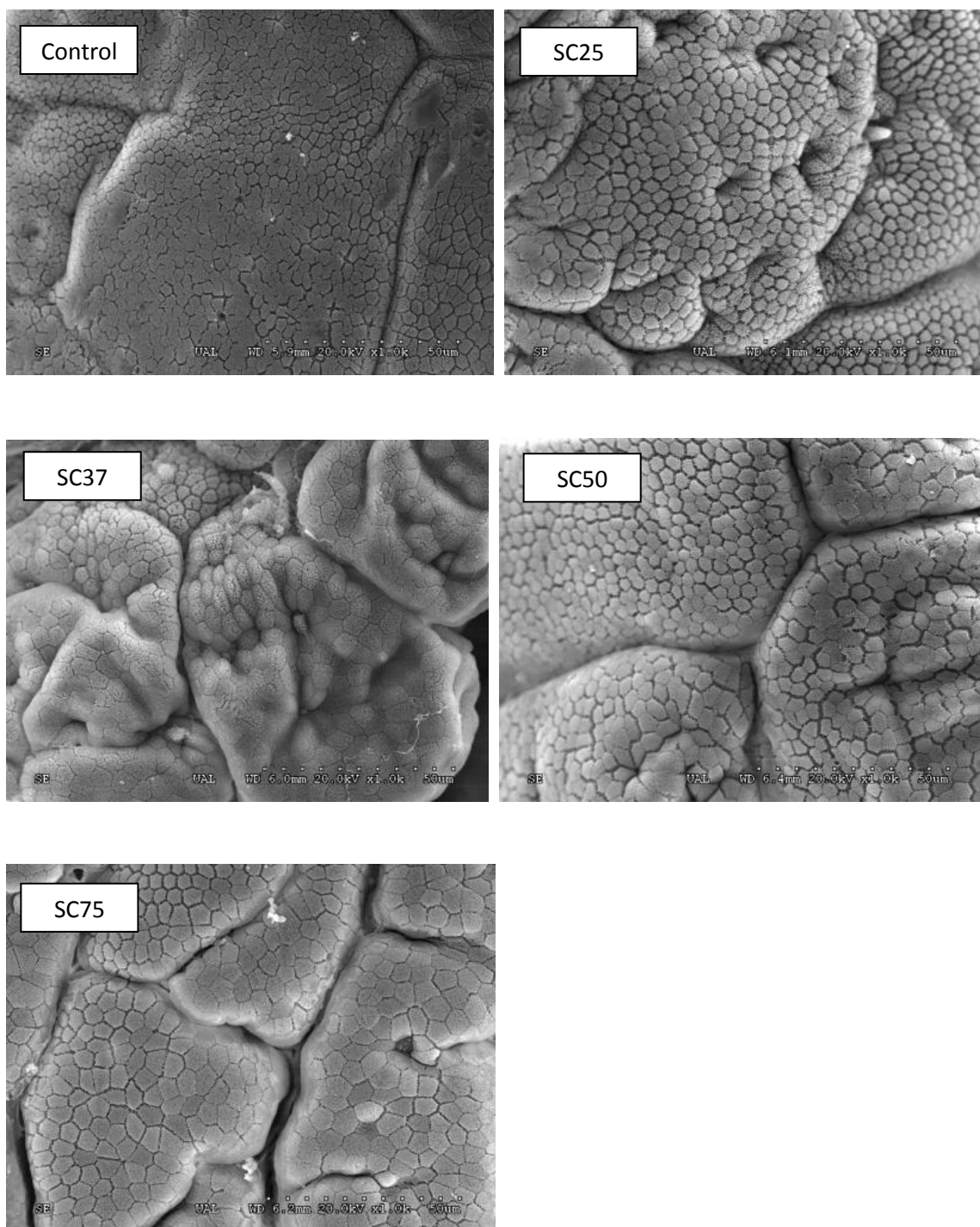


Figura 6. Detalle de la cara apical de los enterocitos del intestino proximal de los juveniles de dorada alimentados con pienso control, SC25, SC37, SC50 y SC75. Imágenes SEM (en el margen inferior derecho se indica la magnificación de cada imagen).

Análisis global de los resultados

Con el propósito de realizar una evaluación global del agrupamiento de los distintos tratamientos experimentales y ver la similitud entre ellos se realizó un análisis de clúster. Por un lado se utilizaron los parámetros zootécnicos contenidos en la Tabla 2 y de otro se realizó un segundo dendrograma considerando en el análisis todas las variables obtenidas en el estudio (parámetros zootécnicos, datos del estudio histológico, composición proximal, y de ácidos grasos del hígado y músculo). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7, y evidencian una fuerte separación de los tratamientos SC25 y SC75 del resto, cuando en el estudio se consideraron únicamente los parámetros zootécnicos (Figura 7A). Los tratamientos SC37 y SC50 aparecen más cercanos al control, con un 16% y un 8% de similitud, respectivamente. Por otra parte, en la Figura 7B se muestra el dendrograma cuando se utilizan todas las variables. En este caso SC25, SC50 y SC75 quedan claramente separados del resto de tratamientos, y finalmente la dieta SC37 se muestra más cercana al alimento control.

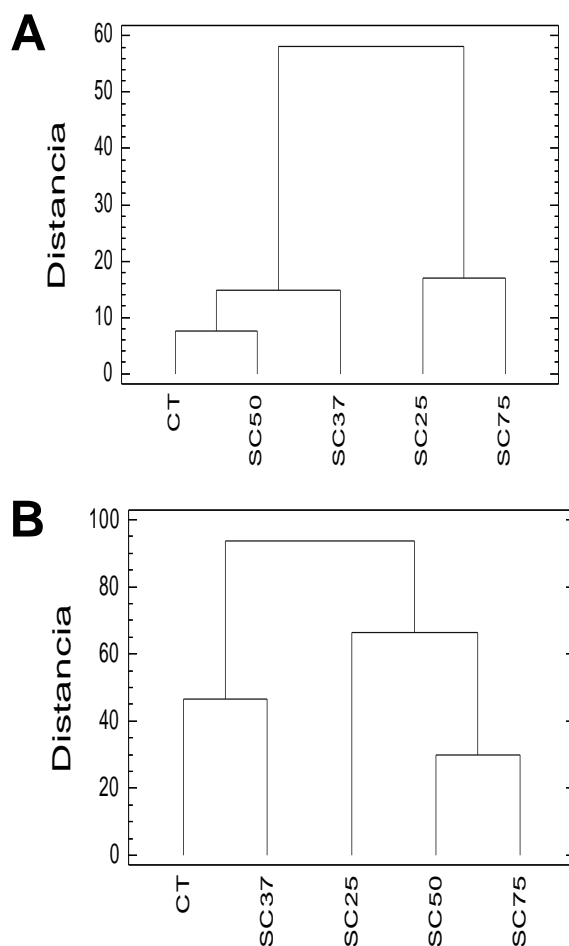


Figura 7. Resultados del análisis de clúster multivariante realizado con (A) los parámetros zootécnicos y (B) con todos los parámetros (zootécnicos, perfil de ácidos grasos, variables del estado inmune, datos histológicos y composición proximal) obtenidos en el estudio.

Evaluación económica de la inclusión de *S. almeriensis* en piensos para peces marinos carnívoros

La Tabla 11 recoge los datos, resultados de la evaluación económica derivada de sustituir la harina de pescado por biomasa de *S. almeriensis* en los piensos para juveniles de dorada. Para el cálculo se han considerado dos precios hipotéticos, i) por un lado un valor de 7 € kg⁻¹ que ha sido propuesto para la biomasa de la especie *Phaeodactylum tricorutum* que es una microalga cuya composición bioquímica es muy similar a *S. almeriensis* (Belarbi *et al.*

2000) y, ii) de otro 12,6 € kg⁻¹ propuesto por Ación *et al.* (2012) para esta misma especie cuando se producen en planta 200 ton año⁻¹. La diferencia de precio de mercado entre los derivados del pescado y la biomasa microalgal determina que se produzca un notable sobrecoste del producto final a medida que se incrementan los niveles de microalga en el pienso, a pesar de que paralelamente se reduce la proporción de materias primas derivadas de la pesca extractiva. Cuando se utiliza un nivel de sustitución del 25%, el precio hipotético del pienso se incrementa entre 0,7 y 1,4 veces (según el precio de la biomasa algal considerado) en comparación con un alimento elaborado básicamente con derivados del pescado.

Tabla 10. Evaluación económica hipotética derivada de la sustitución de la harina de pescado por biomasa de *S. almeriensis* en piensos comerciales para el preengorde de *S. aurata*.

	Control	SC25	SC37	SC50	SC75
Opción 1: Gasto 1 en <i>S. almeriensis</i> (€/t) ¹	-	903	1.358	1.806	2.709
Opción 2: Gasto 2 en <i>S. almeriensis</i> (€/t) ¹	-	1.625,4	2.444,4	3.250,8	4.876,2
Ahorro en derivados del pescado (€/t)		90	136	181	273
Precio Opción 1 (€/kg) ³	0,59	1,31	1,67	2,03	2,75
Precio Opción 2 (€/kg) ³	0,59	2,03	2,76	3,48	4,92
Incremento precio Opción 1 (€/kg)	-	0,72	1,09	1,44	2,16
Incremento precio Opción 2 (€/kg)	-	1,44	2,17	2,89	4,33

¹ Gasto 1: 7 €/kg de harina microalgal. Gasto 2: 12,6 €/kg harina microalgal. ² Los precios utilizados para las estimaciones realizadas son 1,09 €/kg para la harina de pescado (valor medio en 2011 para la harina de pescado chilena con 65% de proteína, según el Fondo Monetario Internacional, <http://www.imf.org>) y 1,06 €/kg para el aceite de pescado (valor medio de 2011 según la FAO, <http://dx.doi.org/10.1787/888932428253>). ³ Estimación del gasto en derivados de pescado y en microalgas por cada kg de pienso. No se incluyen en el estudio los gastos derivados de otros macronutrientes, aditivos, microelementos, maquinaria, etc.,

La Figura 8 muestra la representación del análisis de coste-beneficio considerando, por un lado el incremento del precio del pienso estimado con los dos precios distintos de la biomasa *S. almeriensis*, y de otro el balance FIFO (Fish In–Fish Out) resultante de sustituir la harina de pescado por biomasa algal. A partir de la representación se puede determinar el punto de equilibrio entre ambos factores con el propósito de determinar si los posibles beneficios derivados (fundamentalmente medioambientales al reducir la presión por pesca

extractiva) de la reducción de harina de pescado están en proporción con el incremento de los costes derivados del uso de biomasa microalgal. De la gráfica se desprende que, cuando se considera al balance FIFO como principal beneficio de la reducción del uso de la harina de pescado, los valores recomendables de inclusión de *S. almeriensis* son un 43,5% y 75% para la Opción 1 y 2, respectivamente.

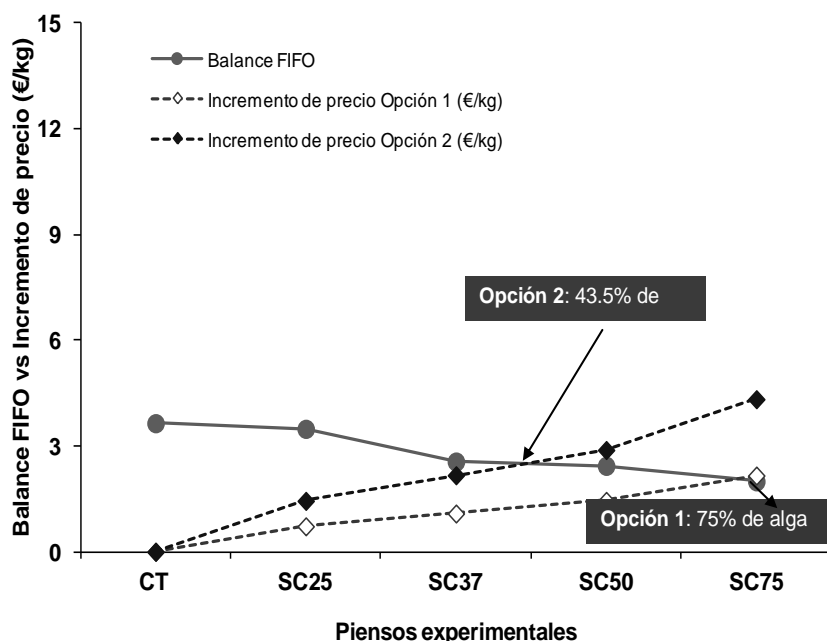


Figura 8. Análisis de costes-beneficios derivados de la sustitución progresiva de harina de pescado por biomasa de *S. almeirensis* en piensos para el preengorde comercial de *S. aurata*.

Discusión

La utilización de harinas derivadas de macroalgas y microalgas en la alimentación de peces de agua dulce y agua marina ha sido descrita con anterioridad por numerosos autores (Appler & Jauncey, 1983; Nakagawa *et al.* 1997; Lu *et al.* 2004; Kumar *et al.* 2004; Atalah *et al.* 2007; Dallaire *et al.* 2007; Hasan & Chakrabarti, 2009; Rico, 2012). En particular, las microalgas han sido identificadas como un potencial recurso de proteínas para la alimentación animal debido a su alto contenido proteico con una proporción interesante de aminoácidos esenciales, así como de vitaminas y minerales. En este sentido las microalgas

y sus derivados constituyen una fuente proteica alternativa de interés en producción acuícola (Ehremberg, 1980).

Crecimiento y aprovechamiento nutritivo de los piensos

Son numerosos los estudios publicados hasta la fecha que describen los efectos de la utilización de los derivados de harinas de microalgas y pastos marinos sobre el crecimiento de peces marinos cuando los primeros se utilizan como aditivos o componentes secundarios en la alimentación de los segundos. Por ejemplo, Mustafa *et al.* (1994) describen que un nivel de inclusión del 5% de las algas *Ascophyllum* y *Spirulina* incrementa las tasas de crecimiento y utilización del alimento en ejemplares de *Pagrus major* de un año de edad. También, Mustafa *et al.* (1995) evaluaron la eficacia de tres macroalgas marinas (*Ascophyllum nodosum*, *Porphyra yezoensis* y *Ulva pertusa*) utilizando el mismo nivel de inclusión en esta misma especie, y describiendo resultados similares. No obstante, existen estudios en los que se pone de manifiesto que la utilización de estos ingredientes disminuyen el crecimiento de los peces, como ocurre en los alevines de salmonete gris (*Chelon labrosus*) alimentados con piensos que contienen un 8 y 18% sobre el total del alimento biomasa de biomasa de *Porphyra purpurea* (Davies *et al.* 1997). Todo apunta a que el efecto puede variar según el tipo de alga utilizada y la especie de pez que se alimente con ella. En cualquier caso en la revisión Hasan & Chakrabarti (2009) se indica que aproximadamente entre el 10-15% de las necesidades de proteína de cada especie pueden ser sustituidas por proteína algal sin que ello comprometa el crecimiento o la utilización del alimento por parte del pez. Además parece que existe una reducción progresiva del crecimiento conforme se incrementan los niveles de microalgas en el alimento. No obstante lo anterior, en el presente estudio los ejemplares juveniles de dorada aceptaron sin problemas todos los piensos experimentales sin evidenciarse que hubiese un rechazo del alimento producido por la inclusión de la harina algal a los niveles ensayados. Además, al final del ensayo la mayoría de los peces triplicaron su peso inicial, registrándose tan solo dos bajas durante el experimento.

Los resultados obtenidos indican que el crecimiento de los juveniles de dorada no se ve afectado negativamente por la sustitución parcial de la harina de pescado por biomasa liofilizada de *Scenedesmus almeriensis*, observándose incluso una mejora significativa en el peso final de los animales alimentados con los piensos SC37. La sustitución parcial de la harina de pescado por biomasa algal ha sido realizada con éxito en diversas especies de peces como la carpa (Nandeeshya *et al.* 2001), la tilapia (Isik *et al.* 1999) y la trucha arcoíris (Dallaire *et al.* 2007), además sin que ello ejerza un efecto negativo sobre el crecimiento de los animales. En el presente estudio también se pone de manifiesto que la inclusión de la harina algal no solo no ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento de los peces sino que además, cuando el porcentaje de sustitución de la proteína de la harina de pescado es del 37,5% se incrementa el peso medio final de los peces, aunque solo con diferencias significativas respecto a los peces alimentados con SC25 y SC75. Del mismo modo, parece haber un efecto dosis-respuesta ya que los niveles de sustitución inferiores y superiores al 37% ocasionan que los peces presenten pesos medios corporales más bajos respecto a SC37, aunque sin diferencias significativas respecto al tratamiento control.

En diversos estudios se ha puesto de manifiesto que el nivel óptimo de sustitución de la harina de pescado por harina algal varía en función de la especie de microalga que se utilice. Así Olvera-Novoa *et al.* (1998) ensayaron niveles de sustitución del 20 al 80% de la proteína de origen animal por proteína de *Spirulina maxima* en piensos para tilapia (*Oreochromis mossambicus*), sin encontrar efectos negativos sobre el crecimiento hasta un 40% de sustitución. Sin embargo, estos mismos autores describieron que la menor ingesta observada para niveles de sustitución más altos fue debida a un aumento en la dureza de los gránulos, como consecuencia del mayor contenido de microalga. Por el contrario, en el presente estudio no se ha observado que se produzca una reducción en los niveles de ingesta que sean achacables a la inclusión de *S. almeriensis*. De igual modo, Kumar *et al.* (2004) utilizaron biomasa seca de la microalga *Spirogyra* en piensos para carpa (*Catla catla*), con niveles de inclusión del 10 al 40%, sin observar efectos negativos en el crecimiento. En este caso, estos últimos autores indican que los buenos resultados obtenidos son atribuibles a la abundancia de aminoácidos esenciales en esta microalga así

como a la degradación de la fibra del alimento por las bacterias presentes en el intestino de la carpa. Por su parte, en otro estudio Dallaire *et al.* (2007) utilizaron como ingrediente alternativo a la harina de pescado una mezcla obtenida a partir de las microalgas *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp. y las cianobacterias *Lyngbya major* e *Hydrococcus rivularis* en un experimento con alevines de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), observando que la inclusión de un 12,5% de la mezcla anterior no produce efectos negativos sobre el crecimiento de los peces. No obstante, cuando se utilizaron niveles más altos de inclusión se evidenció una reducción del crecimiento de los animales como consecuencia de que tales piensos resultaron deficitarios en energía y proteína, y no satisficieron las necesidades mínimas de esta especie. En este caso, el diseño experimental del estudio tiene como principal limitación el que los piensos experimentales no fueron isoproteicos (por ejemplo, 58% de proteína cruda en el control vs un 41% en el que incluye un 50% de microalgas) e isoenergéticos, y por tanto los resultados obtenidos pudieron ser consecuencia de cualquiera de los dos factores (el nivel de algas o el desequilibrio de nutrientes) o, incluso, a la interacción entre ambos. En el presente estudio y para minimizar este efecto todos los piensos experimentales fueron formulados para que resultasen isoproteicos e isoenergéticos.

Adicionalmente, en su estudio Dallaire *et al.* (2007) apuntaron que la reducción del crecimiento y de la tasa de eficiencia de la utilización del alimento, cuando el porcentaje de inclusión de microalgas es alto, puede deberse a la presencia de factores antinutritivos y/o al exceso de sales minerales, los cuales pudieron haber ocasionado un menor aprovechamiento digestivo del alimento y/o un aumento en la retención de líquidos a nivel intestinal que generaría una tasa mayor de excreción, respectivamente. Sin embargo, estos autores no presentan resultados que confirmen la primera de las hipótesis, lo que podría haberse contrastado fácilmente con la realización de un ensayo de detección de inhibidores de proteasa en los extractos acuosos preparados a partir de las harinas de microalgas.

Llegados a este punto, es preciso diferenciar claramente las dos formas distintas que se utilizan en la literatura científica para indicar el grado de inclusión de harinas de algas en

los alimentos experimentales. Por un lado i) cuando se hace referencia al nivel de inclusión de la biomasa algal en porcentaje sobre peso seco del alimento, y ii) de otro cuando se considera el porcentaje de la proteína de la harina de pescado que es reemplazada por la proteína procedente de las algas. Así, mientras en algunos trabajos (Ergün *et al.* 2009; Dallaire *et al.* 2007; Wassef *et al.* 2001) se considera el porcentaje de biomasa algal incluida en el alimento, en otros (Olvera-Novoa *et al.* 1998; Nandeeshha *et al.* 1998) se tiene en cuenta el nivel de sustitución de la proteína de origen animal por proteína de origen algal. Lo anterior debe tenerse en cuenta cuando se comparan los resultados de distintos estudios, de forma que para evitar confusiones en el primero de los casos se indicará como la “inclusión” de harina algal y en el segundo como “sustitución” de la harina de pescado por harina algal. A título de ejemplo, y considerando las dos perspectivas, para el pienso SC37 el nivel de sustitución de la proteína de pescado por proteína algal es de un 37%, mientras que este valor se corresponde con un el nivel de inclusión de la biomasa algal en el pienso de un 20%. De este modo, en el presente estudio el porcentaje de inclusión de la biomasa de *S. almeriensis* más alto que se ha ensayado se corresponde con un valor cercano al 40%.

Los valores obtenidos para la tasa de crecimiento específico (SGR) fueron similares a los descritos en otros experimentos llevados a cabo con juveniles de dorada por otros autores (Sánchez Lozano *et al.* 2007; Andrew *et al.* 2004; Gomez-Requeni *et al.* 2004). También se ha descrito que la sustitución total de la harina de pescado por biomasa de *Spirulina platensis* incrementa la tasa de crecimiento específica en *Labeo rohita*, pero no así *Catla catla* (Nandeeshha *et al.* 2001), lo que evidencia que el efecto parece ser especie específico. Además, en otros casos se ha descrito que la inclusión de microalgas reduce las tasas de crecimiento de los peces. Por ejemplo, Zhao *et al.* (2006) encontraron que la inclusión de un 59% de *Microcystis aeruginosa* en piensos de primera edad para alevines de carpín dorado (*Carassius auratus*) reduce el crecimiento y el valor de SGR. En general, en el presente estudio ninguno de los parámetros de aprovechamiento nutritivo se vieron afectados por la utilización de harina algal al no existir diferencias significativas respecto a los peces alimentados con el tratamiento control.

El índice hepatosomático (IHS) se utiliza para evaluar si las variaciones en la composición del alimento ocasionan un aumento o una disminución del tamaño del hígado del pez. El valor medio de IHS se redujo conforme se incrementó la inclusión de harina de microalga en el alimento. El hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de los peces y cualquier desequilibrio en la alimentación suele verse reflejado en este órgano como un incremento de su tamaño, debido a la acumulación de lípidos. Diversos autores han demostrado que existe una clara relación entre el porcentaje que representa la fracción hepática en el conjunto del pez y la composición química del alimento que éste ingiere. La reducción progresiva del valor de IHS en este estudio parece indicar que se produce una mayor tasa de uso metabólico y/o movilización de lípidos hepáticos conforme se incrementa el contenido en microalga en los piensos. En efecto, se ha confirmado que se incrementa el metabolismo lipídico, especialmente el de las rutas lipolíticas en peces alimentados con piensos que incluyen macro- y microalgas (Nakagawa, 1997). En concreto si se considera el perfil de ácidos grasos, Caballero *et al.* (2004) describieron que los niveles altos de 18:3n-3 en el alimento favorecen la utilización metabólica de los lípidos hepáticos en la dorada, reduciéndose el tamaño de este órgano, y por lo tanto, el valor del índice hepatosomático. Ergün *et al.* (2009) apuntaron que la inclusión de algas marinas favorece la movilización de los lípidos del alimento para ser utilizados como fuente de energía en el metabolismo del animal. Este fenómeno ha sido igualmente descrito por Piedecausa *et al.* (2007), quienes observaron que al sustituir el aceite de pescado por aceite de linaza (rico en ácido linolénico) en piensos para sargo (*Diplodus puntazo*) se reduce el valor del índice hepatósomático respecto al de los peces alimentados con un pienso control que no incluye microalgas. En relación con esto último, uno de los ácidos grasos más abundantes en la biomasa de *S. almeriensis* es el ácido linolénico, lo cual queda reflejado en el incremento que se produce en la proporción de este ácido graso en el pienso conforme se aumenta el nivel de sustitución de la microalga, y esto a su vez también queda reflejado en los perfiles de ácidos grasos del músculo y el hígado de las doradas alimentados con estos piensos experimentales.

El balance FIFO (del inglés “*Fish-in: Fish-out ratio*”) es un parámetro que se ha introducido recientemente para calcular la cantidad de pescado salvaje necesaria para producir 1kg de pescado de acuicultura (Jackson, 2009; Kaushik & Troell, 2010). En los piensos comerciales de dorada, el nivel de inclusión de harinas y aceites de pescado es del orden de 500g kg⁻¹ y 150g kg⁻¹, respectivamente (Kaushik & Troell, 2010). Con los resultados obtenidos en el presente estudio, el FIFO obtenido para esta etapa del preengorde de la dorada con el pienso SC37, que contiene 395g kg⁻¹ de harina de pescado y 180g kg⁻¹ de aceite, es de 2,56. De este modo, con algo más de 2kg de pescado salvaje se podría obtener 1kg de biomasa de peces de preengorde en comparación con los 3,5kg de biomasa necesarios si se utiliza el pienso control. A la luz de los datos, y si la producción de *S. almeriensis* puede llevarse a cabo a un precio competitivo, es evidente que la utilización de esta microalga puede contribuir a que la producción acuícola en un futuro pueda ser una actividad más sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

Composición química de los peces

La composición proximal corporal de los juveniles de *S. aurata* no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos experimentales. El contenido lipídico y proteico en la canal de los juveniles de *S. aurata* es similar al descrito por varios autores para individuos de esta especie con un mismo peso (Robaina *et al.* 1998; Ibeas *et al.* 1997, 1996). No obstante, los peces alimentados con SC37 y SC75 presentaron un mayor contenido de proteína y menor de lípidos que los peces de los demás tratamientos, aunque sin ser las diferencias estadísticamente significativas. En general, estos resultados son similares a los descritos para otras especies en los que se sustituyó la harina de pescado por harina algal (Zhao *et al.* 2006; Nandeesha *et al.* 2001; Olvera-Novoa *et al.* 1998). Sin embargo, existen numerosos experimentos en los que se modifica la composición corporal de los peces cuando se sustituye la harina de pescado por harina algal. Por ejemplo, Dallaire *et al.* (2007) y Nandeesha *et al.* (1998) comprobaron que el incremento del nivel de inclusión de harina algal disminuye la proporción de la fracción lipídica contenida en la canal de los alevines de trucha arcoíris y carpa común, y este hecho que concuerda con el

aumento de la actividad lipolítica que ocasiona el consumo de microalgas (Nakagawa, 1997). Pero este efecto parece no ser igual en todas las especies ya que la inclusión del alga *Spirogyra* incrementa significativamente el contenido graso de los tejidos de *Catla catla* (Kumar *et al.*, 2004), y el uso de biomasa de *Spirulina* ejerce el mismo efecto en *C. catla* y *Labeo rohita* (Nandeeshha *et al.* 2001). El hecho de que en el presente estudio no se modifique la composición proximal de los peces parece indicar que los piensos tienen una composición equilibrada, y que se produce un buen aprovechamiento del alimento con independencia de cuál sea la proporción de microalga utilizada para su preparación.

Perfil de ácidos grasos en los tejidos de los peces

De Pauw & Persoone (1988) indican que las microalgas son un elemento clave en la alimentación de numerosas especies que son cultivadas. Además, las microalgas suelen presentar un perfil sencillo de ácidos grasos que facilita su purificación, constituyendo por tanto, un recurso ilimitado que puede ser producido en cantidades industriales bajo condiciones ambientales controladas. Además, los cultivos son muy versátiles pudiéndose modificar la composición de ácidos grasos en función de la especie y medios de cultivo utilizados (Medina *et al.* 1998). Los ácidos grasos de mayor interés presentes en las microalgas son los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, en particular EPA y DHA, por lo que resultan de gran interés como ingrediente alternativo a la harina de pescado. El contenido de ácidos grasos de las microalgas depende no solo de la especie considerada sino también de factores relacionados con las condiciones de cultivo como son la composición del medio, pH, aireación, temperatura, intensidad de luz, y edad del cultivo (Medina *et al.* 1998). En el caso concreto particular de *S. almeriensis*, el porcentaje de ácidos grasos linoleico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3) es 5 y 6 veces más alto, respectivamente, que en la harina de pescado. Tal y como era de esperar, los piensos experimentales que incluían biomasa de *S. almeriensis* presentaron ciertas diferencias en su composición de ácidos grasos con respecto al pienso control (que fue formulado fundamentalmente con derivados de pescado), y principalmente estuvieron caracterizados

por un incremento en la proporción de linoleico y linolénico, y una ligera reducción del contenido de EPA y DHA a medida que se incrementó el nivel de microalgas.

De este modo, el perfil de ácidos grasos de los tejidos hepático y muscular reflejó el perfil de los distintos piensos experimentales. Este un hecho ampliamente descrito en peces que la composición de ácidos grasos del alimento se refleja en la de sus propios tejidos (Benedito-Palos, 2010). Así, el mayor contenido de 18:2n-6 y 18:3n-3, y el menor de EPA y DHA, se encontró en los peces alimentados con los piensos que incluían mayor proporción de la microalga *S. almeriensis*. El análisis discriminante confirma que efectivamente se produce una separación de los distintos tratamientos en función del perfil de ácidos grasos que presenten los peces en sus tejidos, cuando se usan los datos del tejido hepático y del tejido muscular. Estos resultados concuerdan con los descritos en otros estudios en los que se pone de manifiesto que la composición de ácidos grasos de los tejidos de los peces marinos refleja la de los lípidos que ingieren con el alimento (Izquierdo *et al.* 2005; Ganuza *et al.* 2008). Así, la inclusión de harina algal dio como resultado un aumento en el porcentaje de 18:3n-3 en la fracción lipídica de los filetes de *S. aurata*. El aumento en el contenido en ácido linolénico en el filete de las doradas alimentadas con piensos con harina de *S. almeriensis* podría mejorar la calidad nutritiva del pez, ya que este ácido graso puede reducir el riesgo de infarto en un 70% (De Lorgeril *et al.* 1994, 1999). A pesar de su importancia en nutrición humana, hay pocos alimentos ricos en este ácido graso, así que su incremento en el filete de dorada podría suponer un beneficio extra en su valor nutricional cuando los peces fuesen engordados con piensos que incluyen esta microalga.

Como se ha indicado, la inclusión de harina de *S. almeriensis* dio como resultado una ligera reducción en los porcentajes de EPA y DHA en los tejidos. No obstante, en el músculo del pez la reducción de EPA fue algo más marcada que para DHA, aunque los valores prácticamente no se vieron modificados respecto al tratamiento control. Este hecho podría estar relacionado con la preferencia del uso metabólico del EPA sobre el DHA. Se ha descrito que en el músculo blanco la beta-oxidación mitocondrial se prioriza sobre la oxidación peroxisomal (Froyland *et al.* 2000). De este modo, al metabolizarse

preferentemente el EPA en las mitocondrias sobre el DHA en los peroxisomas (Madsen *et al.* 1998) se produciría cierto incremento del segundo respecto al primero en el tejido muscular.

El ligero incremento del contenido de ácidos grasos saturados en el tejido hepático podría tener relación con su uso como sustrato energético para el metabolismo general del animal. En otras especies también se ha documentado una mayor proporción de ácidos grasos saturados en este órgano (Mourente & Vázquez, 1996; Villalta *et al.* 2007, Martins *et al.* 2007, Lee & Kim, 2001, Lee & Cho, 2009, Biswas *et al.* 2009). Se ha descrito que los peces obtienen la energía para el crecimiento y el mantenimiento de su actividad metabólica sobre todo de las grasas saturadas y ácidos grasos monoinsaturados (16:0, 18:1n-9, 20:1n-9) del alimento (Ibeas *et al.* 1996; Tocher, 2003). Estos grupos de ácidos grasos son más fáciles de catabolizar vía β -oxidación que los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (Sargent *et al.* 2002). Adicionalmente, los procesos de lipogénesis de ácidos grasos se producen principalmente en el hígado (Bell *et al.* 1999; Martins *et al.* 2007), y los productos resultantes se suelen depositar en los tejidos en forma de triacilglicéridos (Sargent *et al.* 2002). Así, el importante papel que juega el hígado en el metabolismo lipídico del pez justificaría el citado incremento en la proporción este tipo de ácidos grasos en este tejido.

Estudio de las actividades enzimáticas digestivas

El nivel de actividad de diversas enzimas digestivas ha sido empleado como un indicador para estimar la capacidad digestiva en peces de acuicultura (Alarcón *et al.* 1998). En el presente estudio se comprueba que la utilización de *S. almeriensis* no produce ningún efecto negativo sobre las actividades enzimáticas analizadas, sino todo lo contrario ya que en algunas de ellas se incrementa significativamente el nivel de actividad respecto al grupo control (peces alimentados sin microalga). Tal es el caso de la tripsina, que es una enzima clave en los procesos de digestión de proteína y como enzima activadora de otras enzimas proteolíticas. De igual forma, las actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina,

localizadas fundamentalmente en la membrana del borde en cepillo de la superficie de los enterocitos y que están implicadas en las etapas finales de hidrólisis y absorción de los nutrientes, también se incrementan significativamente con la inclusión de microalga en el alimento. Resulta evidente que la combinación de ambos efectos determina una mejor eficiencia de los procesos de digestión y absorción que tienen lugar a nivel intestinal. De este modo la mayor tasa de crecimiento observada en los juveniles de dorada cuando son alimentados con *S. almeriensis* podría estar relacionada con una mejor eficiencia en la utilización del alimento como consecuencia del incremento del nivel de actividad de algunas de las enzimas implicadas en el proceso digestivo.

Estudio de la presencia de factores antinutritivos

Otro aspecto a tener en cuenta cuando se utilizan ingredientes alternativos a la harina de pescado es la presencia de factores antinutritivos que puedan interferir con los procesos de digestión y absorción que tienen lugar en el tracto digestivo (Alarcón *et al.* 1999). Considerando el papel que tiene la proteína en la alimentación de los peces de acuicultura, los más importantes son los inhibidores de proteasas ya que tienen la capacidad de inhibir a las enzimas proteolíticas. De hecho en algunas algas marinas se ha descrito la presencia de inhibidores de tripsina y amilasa (Oliveira *et al.* 2009). No obstante, en base a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede descartar la presencia de inhibidores de proteasa en la biomasa de *S. almeriensis* y en los piensos formulados con ella. Por un lado, en el zimograma se comprueba que los peces de todos los tratamientos presentan el mismo patrón de enzimas, y de otro, en el ensayo de inhibición *in vitro* se confirma la ausencia de inhibidores de proteasa tanto en los piensos experimentales como en la harina algal.

Estudio de la estructura histológica del hígado e intestino

Los resultados del análisis histológico de los tejidos no evidencian la existencia de alteraciones estructurales en el hígado e intestino de las doradas alimentadas con piensos que incluye *S. almeriensis*. No se pudo establecer una relación entre el contenido en la microalga *S. almeriensis* en piensos para dorada y el tamaño de los hepatocitos presentes en el tejido hepático. Sin embargo, el análisis morfométrico de las imágenes puso de manifiesto que se produce un incremento significativo de la altura de las vellosidades en el intestino distal conforme se aumenta la inclusión de harina algal. Este hecho pone de manifiesto que existe un incremento de la superficie de absorción en los tramos posteriores del intestino en los peces alimentados con *S. almeriensis*. El incremento en la longitud de las vellosidades también se ha descrito en ejemplares de sargo (*Diplodus puntazzo*) alimentados con piensos en los que se sustituyó la harina de pescado por harina de girasol (Nogales *et al.*, 2010). Por su parte, Liu *et al.* (2008) incluyeron la harina de la microalga *Synechocystis* sp. y su variante transgénica, *Synechocystis* sp. PCC6803, en piensos para platija (*Paralichthys olivaceus*) sin encontrar efectos negativos en la estructura tisular del hígado e intestino. Por el contrario, Atalah *et al.* (2007) incluyeron las microalgas *Cryptothecodinium cohnii* y *Phaeodactylum tricornutum* en piensos de primera edad para dorada, comprobando que se produjo una degeneración local en el epitelio del intestino proximal en los peces que fueron alimentados con *P. tricornutum*, pero no con *C. cohnii*. Este fenómeno se debe a que la estructura de la cubierta externa de *P. tricornutum* presenta ornamentaciones silíceas que causan abrasión en el epitelio intestinal.

Estudio de la ultraestructura de la mucosa intestinal

Además de las actividades enzimáticas digestivas, la morfología y la estructura de la mucosa intestinal cumplen una función muy importante para el correcto desarrollo de los individuos aumentando la superficie de absorción de nutrientes y proporcionando una barrera física frente a la acción de potenciales microorganismos patógenos que circulan por la luz del tubo digestivo. En este sentido, Merrifield *et al.* (2009) describen que en

ejemplares de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) la inclusión de harina de soja provoca alteraciones en los enterocitos, disminuyendo de la longitud, grosor y densidad de las microvellosidades lo que a su vez incrementa la exposición de los enterocitos frente a los patógenos, y disminuye la eficacia del epitelio como barrera defensiva. Sin embargo, en el presente estudio se confirma que el empleo de *S. almeriensis* no ejerce efectos negativos sobre la ultraestructura de la mucosa intestinal, sino todo lo contrario. Además, en los juveniles dorada se produce un incremento tanto en la altura como en la densidad de las microvellosidades, fenómeno que determina una mejora en la contribución de la mucosa intestinal como barrera física. Por su parte, el incremento de la superficie apical de los enterocitos se puede traducir, desde una perspectiva nutricional, como un incremento en la capacidad de absorción de nutrientes a través de la mucosa intestinal. De esta manera, la utilización de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* tiene un enorme interés aplicado en la formulación de alimentos para juveniles de dorada por los efectos beneficiosos que produce en su fisiología digestiva.

Evaluación económica de la inclusión de *S. almeriensis* en piensos para peces marinos carnívoros

Desde una perspectiva hipotética se ha realizado un análisis de costes en el que se observa cómo se produce un incremento del precio del pienso conforme se aumenta el nivel de sustitución de la harina de pescado por harina de *S. almeriensis*. Esto es debido a que el coste de la biomasa de microalga liofilizada es superior al de la harina de pescado. A pesar de esto se podrían conseguir precios de producción competitivos con niveles de sustitución de hasta un 37%, cuando se tiene en cuenta el precio de algunos de los piensos que se comercializan para peces de acuicultura marina (por ejemplo, la empresa española Acuinuga comercializa algunos piensos, de composición química similar a los utilizados en el presente estudio que también contienen microalgas, a un precio de 1,711 €/kg). No obstante, podría ser interesante en futuros trabajos realizar una evaluación económica considerando a la harina de *S. almeriensis* como un subproducto y no como el producto principal de un proceso biotecnológico. Este podría ser el caso del subproducto resultante

de la utilización de la microalga para la obtención de biodiesel por saponificación-esterificación que podría generar un ingrediente proteico con un coste menor, y que permitiría producir piensos a un precio de mercado más competitivo. En cualquier caso, y hasta que no se abaraten los costes de producción de estas microalgas, su utilización estaría limitada a las fases de cultivo larvario y/o de preengorde o para su uso en especies de alto valor económico.

Principales conclusiones

Para concluir, los resultados obtenidos permiten establecer que el nivel óptimo de sustitución de la proteína de la harina de pescado por biomasa de *S. almeriensis* en piensos para juveniles de dorada es de un 37%. Por otra parte, no se han encontrado efectos negativos sobre los parámetros zootécnicos, ni la composición proximal, ni en la estructura tisular del hígado e intestino de los juveniles de *S. aurata* cuando se emplean niveles de sustitución de hasta un 75%. Se ha observado que la inclusión de *S. almeriensis* en los piensos incrementa el nivel de ácidos grasos de la serie n-3, especialmente de linolénico, en el tejido muscular de los peces. La utilización de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* como ingrediente alternativo a la harina de pescado no ejerce ningún efecto negativo sobre las actividades enzimáticas digestivas estudiadas en los juveniles de dorada. La inclusión de esta microalga incrementa significativamente el nivel de fosfatasa alcalina y aminopeptidasa, y este hecho es indicativo de que se produce una mejora de la eficiencia de los procesos de absorción a través de la membrana intestinal. La biomasa algal no contiene factores antinutritivos que afecten a las proteasas digestivas de los juveniles de dorada. El empleo de *Scenedesmus almeriensis*, especialmente a un nivel de sustitución del 37%, produce una mejora significativa en la integridad y en la capacidad de absorción de la mucosa intestinal en los juveniles de dorada. Por último, desde una perspectiva económica, los piensos que incluyen biomasa algal serían más caros, pero desde una perspectiva medioambiental se reduce la tasa FIFO por lo que las fórmulas resultantes serían más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos Junta de Andalucía-AGR5334, MCYT-AGL2010-20052 y los fondos FEDER. Los autores agradecen especialmente a la Fundación CAJAMAR por su colaboración durante la realización de este trabajo y a la empresa Predomar S.L. por la cesión de los peces. Las instalaciones para el mantenimiento de los peces y la preparación de las dietas experimentales pertenecen al CEIA₃-Universidad de Almería (Servicio de Piensos Experimentales; http://www.ual.es/stecnicos_spe).

Bibliografía

- Acién F.G., Fernández J.M., Magán J.J. y Molina E. (2012) Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances* 30(6), 1344-53.
- Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J. y Abellán, E. (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 257–267.
- Alarcón, F.J., Moyano, F.J. and Diaz, M. (1999) Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Resources* 12, 233-238.
- Andrew, J.E., Holm, J., Kadri, S. y Huntingford, F.A. (2004) The effect of competition on the feeding efficiency and feed handling behavior in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) held in tanks. *Aquaculture* 232, 317-331.
- AOAC (1995) Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC International, Washington, DC.
- Appler, H.N. y Jauncey, K. (1983) The utilization of a filamentous green alga (*Cladophora glomerata* (L.) Kutzin) as a protein source in pelleted feeds for Sarotherodon (*Tilapia niloticus*) fingerlings. *Aquaculture* 30, 21-30.
- Atalah E., Hernández Cruz C.M., Izquierdo M.S., Rosenlund G. y Caballero M.J. (2007) Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricorutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 270, 178-185.
- Belarbi H., Molina E. y Chisti Y. (2000) A process for high and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 516–29.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M., McVicar, A.H. y Sargent, J.R. (1999) Effects of essential fatty acid-deficient diets on growth, mortality, tissue histopathology and fatty acid compositions in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 263-277.
- Benedito-Palos, L. (2010) Sustitución de aceites de pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*) ricas en proteínas vegetales. Efectos sobre el crecimiento y los perfiles de ácidos grasos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 214 pp.
- Benemann, J. R. (1992). Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology* 4, 233-245.
- Biswas, B.K., Ji, S.C., Biswas, A.K., Seoka, M., Kim, Y.S., Kawasaki, K-I. y Takii, K. (2009) Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. *Aquaculture* 288, 114-119.
- Borowitzka, M. A. (1997) Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* 9, 393-401.
- Bradford, 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.

- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Fernández, A.J. y Rosenlund, G. (2004) Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases* 27, 531-541.
- Cerón, M. C., Campos, I., Sánchez, J. F., Acién, F. G., Molina, E. y Fernández-Sevilla, J. M. (2008) Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11761–11766.
- Christie, W.W. (1982) *Lipid analysis*. Permagon Press Canada Ltd., Toronto, Ont.
- Dallaire, V., Lessard, P., Vandenberg, G. y de la Noüe J. (2007). Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Bioresource Technology* 98, 1433–1439.
- Davies, S.J., Brown, M.T. y Camilleri, M. (1997) Preliminary assessment of the seaweed *orphyra purpurea* n artificial diets for thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*). *Aquaculture* 152, 249-258.
- De Lorgeril, M., Renaud, S., Mamelle, N., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Guidollet, J., Touboul, P. y Delaye, J. (1994) Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 343, 1454-1459.
- De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Delaye, J. y Mamelle, N. (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99, 779-785.
- De Pauw, N. y Persoone, G. (1988) Microalgae for aquaculture. In: Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (Eds.). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 197-221.
- Ehrember, M. (1980) Microalgae: a fish faro feed for the future. *Fish Farming International* 7, 15-18.
- El-Sayed, A.F.M. (1994) Evaluation of soybean meal, Spirulina meal and chicken offal meal as protein sources for silver seabream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings. *Aquaculture* 127, 169-176.
- Ergün, S., Soyuturk, M., Guroy, B., Guroy, D. y Merrifield, D. (2009). Influence of Ulva meal on growth, feed utilization and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. *Aquaculture International* 17, 355-361.
- F.A.O. (2010) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. FAO Viale delle Terme di Caracalla, Roma, Italia, 242 p.
- Froyland, L., Lie, O. y Berge, R.K. (2000) Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition* 6, 85-89.
- Ganuza, E., Benítez-Santana, T., Atalah, E., Vega-Orellana, O., Ganga, R. e Izquierdo, M.S. (2008) *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture* 277, 109–116.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S. y Pérez-Sánchez, J. (2004) Protein growth performance, amino acid utilization and

- somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 439-510.
- Hasan, M.R. y Chakrabarti, R. (2009) Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. no. 531. Rome, FAO. 2009. 123p.
- Ibeas, C., Cejas, J., Gómez, T., Jerez, S. y Lorenzo, A. (1996) Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. *Aquaculture* 150, 91-102.
- Ibeas, C., Cejas, J.R., Fores, R., Badía, P., Gómez, T. y Lorenzo Hernández A. (1997) Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPADHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 150, 91-102.
- Isik, O., Sarihan, E., Kusvuran, E., Gül, Ö. y Erbatur, O. (1999) Comparison of the fatty acid composition of the freshwater fish larvae *Tilapia zillii*, the rotifer *Brachionus calyciflorus*, and the microalgae *Scenedesmus abundans*, *Monoraphidium minimum* and *Chlorella vulgaris* in the algae-rotifer-fish larvae food chains. *Aquaculture* 174, 299-311.
- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G. y Ginés, R. (2005) Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.
- Jackson, A. (2009) Fish in - fish out ratios explained. *Aquaculture Europe* 34, 5-10.
- Kaushik, S.J. y Troell, M. (2010) Taking the Fish-in Fish-out ratio a step further. *Aquaculture Europe* 35, 15-17.
- Kumar, M., Gajaria, S.C. y Radha, K.S. (2004) Growth and development of catla (*Catla catla*) fed with different levels of diet containing *Spirogyra* sp. *Bioresource Technology* 95, 73-76.
- Kunitz, M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *Journal of General Physiology* 30, 291-310.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lahaye, M., Gomez-Pinchetti, J.L., Rio, M.J. y García-Reina, G. (1995) Natural decoloration, composition and increase in dietary fibre content of an edible marine algae, *Ulva rigida* (Chlorophyta) grown under different nitrogen conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68, 99-104.
- Lee, S.M. y Cho, S.H. (2009) Influences of dietary fatty acids on growth, body composition and blood chemistry in juveniles fad cod (*Hexagrammos otakii* Jordan et Starks). *Aquaculture Nutrition* 15, 19-28.
- Lee, S.M. y Kim, K.D. (2001) Effects of dietary protein and energy levels on the growth, protein utilization and body composition of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou* Brevoort). *Aquaculture Research* 32, 39-45.

- Liu, S., Zhang, X., Zang, X. y Liu, B., Arunakumara, K.K.I.U., Xu D. y Zhang, X. (2008) Growth, feed efficiency, body muscle composition, and histology of flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed GH transgenic *Synechocystis*. *Aquaculture* 277, 78-82.
- Lu, J., Takeuchi, T. y Satoh, H. (2004) Ingestion and assimilation of three species of freshwater algae by larval tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 238, 437-449.
- Madsen, L., Froyland, L., Dyroy, E., Helland, K. y Berge, R.K. (1998) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids are differently metabolized in rat liver during mitochondria and peroxisome proliferation. *Journal of Lipid Research* 39, 583- 593.
- Martins, D., Valente, L.M.P. y Lall, S.P. (2007) Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile Atlantic halibut (*H. hippoglossus* L.). *Aquaculture* 263, 150-158.
- Medina, A.R., Grima, E.M., Jiménez, G.A. y González, M.J. (1998) Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acid. *Advanced BioTechnology* 16 (3), 517-580.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M. y Davies, S.J. (2009) Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32, 755–766.
- Mourente, G. y Vázquez, R. (1996) Changes in the content of total lipid, lipid classes and fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* Kaup. *Fish Physiology and Biochemistry* 15, 221-235.
- Muller-Feuga, A. (2000) The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology* 12, 527-534.
- Mustafa, M.G. y Nakagawa, H. (1995) Effects of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency, and body composition in red sea bream. *Fisheries Science Tokyo* 61, 25-28.
- Mustafa, M.G. y Nakawaga, H. (1995) A review: dietary benefits of algae as an additive in fish feed. *Badmidgeh-The Israeli Journal of Aquaculture* 47, 155-162.
- Mustafa, M.G., Takeda, T., Umino, T., Wakamatsu, S. y Nakagawa, H. (1994) Effects of *Ascophyllum* and *Spirulina* meal as feed additives on growth performance and feed utilization of red sea bream, *Pagrus major*. *Journal Faculty of Applied Biological Science* 33, 125-132.
- Nakagawa, H. (1997) Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 51, 345-348.
- Nakagawa, H., Kasahara, S. y Sugiyama, T. (1987) Effect of *Ulva* meal supplementation on lipid metabolism of black sea bream, *Acanthopagrus schelegeli* (Bleeker). *Aquaculture* 62(2), 109-121.
- Nakagawa, H., Takeda, T.A., Tetsuya, U., Mustafa, M.D.G. y Yamashita, H. (1995) Effects of feeding regime on biometric parameters and hepatic enzyme activities of young red sea bream, *Pagrus major*. *Applied Biological Science, Higashi-Hiroshima* 34(2), 167-178.
- Nakagawa, H., Umino, T. y Tasaka, Y. (1997) Usefulness of *Ascophyllum* meal as a feed additive for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 151(1-4), 275-281.

- Nandeesh, M.C., Gangadhar, B., Varghese, T.J. y Keshavanash, P. (1998) Effects on feeding spirulina platensis on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common carp, *Ciprurus carpio*, L. Aquaculture Research 29, 305-312.
- Nandeesh, M.C., Gangadhara, B., Manissery, J. K. y Venkataraman, L.V. (2001) Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. Bioresource Technology 80(2), 117-120.
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kaustky, N., Beveridge, M.C., Clay, J., Folk, C., Lubchenco, J., Mooney, H. y Troell, M. (2000) Effect of aquaculture on world supplies. Nature 405, 1017-1024.
- Nematipour, G.R., Nakagawa, H., Nanba, K., Kasahara, S., Tsujimura, A. y Akira, A. (1987) Effect of *Chlorella* -extract supplement to diet on lipid accumulation of ayu. Nippon Suisan Gakkaishi 53, 1687-1692.
- Nogales, S., Tomás-Vidal, A., Martínez-Llorens, S. y Jover-Cerdá, M. (2010) Sunflower meal as a partial substitute in juvenile sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) diets: Amino acid retention, gut and liver histology. Aquaculture 298, 275-281.
- Olguín, E.J. (2012) Dual purpose microalgae bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. Biotechnology Advances. 30(5), 1031–1046.
- Oliveira, M.N., Ponte-Freitas, A.L., Urano-Carvalho, A.F., Taveres-Sampaio, T.M., Farias, D.F., Alves-Teixeira, D.I., Gouveia, S.T., Gomes-Pereira, J. and Castro-Catanho de Sena, M.M. (2009) Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil. Food Chemistry 11, 254-259.
- Olvera-Novoa, M.A., Domínguez-Cen, I.J., Olivera Castillo, L. y Martínez-Palacios, C.A. (1998) Effects of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacements in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus*, Peters, fry. Aquaculture Research 29, 709-715.
- Piedecausa, M.A., Mazón, M.J., García García, B., Hernández, M.D. (2006) Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). Aquaculture 263, 211-219.
- Pinchetti, J.L.G., Fernández, E.C., Díez, P.M. y Reina, G.G. (1998) Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). Journal of Applied Phycology 10, 383-389.
- Pulz, O. y Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology 65, 635-648.
- Rico, R.M. (2012) Efecto fisiológico y microbiológico del uso de algas en la alimentación de peces como sustitutivo de harina de pescado. Hacia una acuicultura sostenible. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga, España. 201 p.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero D. (1998) Increase of the dietary $n-3/n-6$ fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations

- induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 281-293.
- Robin, J.H. y Vincent, B. (2003) Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture* 225(1-4), 463-474.
- Rodríguez-Ruiz, J., Belarbi, E. H., García, J. L. y López, D. (1998) Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnology Techniques* 12, 689–691.
- Sánchez Fernández, J.F. (2008) Caracterización de la nueva microalga *Scenedesmus almeriensis*. Producción en fotobiorreactores internos y externos. Tesis Doctoral. Universidad de Almería, España. 165 p.
- Sánchez-Lozano, N., Vidal, A.T., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Espert-Blanco, J., Moñino-López, A., Pla-Torres, M. y Jover-Cerdá, M. (2007) Growth and economic profit of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed sunflower meal. *Aquaculture* 272, 528-534.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. y Bell, J.G. (2002) The lipids. En: *Fish Nutrition*, Third Edition. Editado por Halver, J.E. y Hardy, R.W. Academic Press, New York, pp: 181-257.
- Satoh, K.I., Nakagawa, H. y Kasahara, S. (1987) Effect of Ulva meal supplementation on disease resistance of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53(7), 1115-1120.
- Silva, F.C.P., Nicoli, J.R., Zambonino-Infante, J. L., Le Gall, M.M., Kaushik, S. y Gatesoupe, F.G. (2010) Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 306(1-4), 233-237.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. e Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2), 87–96.
- Tacon, A.G.J. y Forster, I.P. (2003) Aquafeeds and the environment: Policy implications. *Aquaculture* 226, 181-189.
- Tocher, D.R. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107-184.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P y Bell, J.G. (2007) Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture Nutrition* 13, 1-10.
- Volpe, J.P. (2005) Dollars without sense: The bait for big-money tuna ranching around the world. *BioScience* 55(4), 301-302.
- Walter, H.E. (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V, pp. 270–277. Edited by H. J. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinham.
- Wassef, E.A., El-Masry, M.H. y Mikhail, F.R. (2001) Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. *Aquaculture Research* 32, 315-322.

- Yamaguchi, K. (1997) Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of Applied Phycology* 8, 487-502.
- Zhao, M., Xie, S., Zhe, X., Yang, Y., Gan, L. y Song, L. (2006) Effect of inclusion of blue-gree algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Journal of Applied Ichthyology* 22, 72-78.

Avances en el Uso de Aditivos Remediadores de Aflatoxinas en Alimento para Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*

Oscar Daniel García-Pérez, Mireya Tapia-Salazar, Martha Nieto-López,
David Villarreal-Cavazos, Julián Gamboa-Delgado, Denis Ricque-Marie, L.
Elizabeth Cruz-Suárez

¹ Programa Maricultura, Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León, AP F-67. San Nicolás de los Garza, NL 66451,
México. Tel/Fax: +52 81 8352-6380 oscar_garcia83@hotmail.com

Resumen

El remplazo de ingredientes de origen animal por ingredientes de origen vegetal en alimentos para camarón ha ocasionado un aumento de sustancias tóxicas tales como las aflatoxinas. Estas sustancias son producidas por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estudios en camarón muestran que la presencia de granos contaminados con aflatoxinas reduce el consumo de alimento, la ganancia en peso y causa daños en el hepatopáncreas y mortalidades a un nivel de inclusión mayor a 500 ppb. El uso de secuestrantes de micotoxinas en la nutrición de animales terrestres es una estrategia que permite reducir el daño ocasionado por la presencia de estos compuestos tóxicos. En camarón existe muy poca información al respecto, por lo que en el presente trabajo presenta los últimos avances en el uso de secuestrantes de aflatoxinas en camarón *Litopenaeus vannamei*. En una primera fase se evaluó la capacidad secuestrante de algunos productos a base de aluminosilicatos (AL1.- HSCAS y Montmorillonita de Ca; AL2.- Organoaluminosilicato químicamente activado; AL3.- Tierra de diatomeas, Caolinita, sustancias fitofíticas y extractos herbales; y AL4 Bentonita montmorillonita). En una segunda fase se probaron mezclas remediadoras, donde se evaluaron productos con una combinación de paredes de levadura y arcillas (MZ1.- Zeolita y paredes celulares de levadura; MZ2.-Glucomanano de paredes celulares de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y aluminosilicato de calcio y sodio hidratado; y MZ3.-Bentonita, levadura *Trichosporon mycotoxinivorans*, epoxidasa y lactonasa). En una tercera fase se evaluaron algunos antioxidantes que han dado buenos resultados tanto en animales terrestres como acuáticos (Curcumina, harina de alga *Ulva* y ácido linoleico conjugado). En una cuarta fase se evaluó el producto MZ3 a diferentes niveles de inclusión con o sin la presencia de harina de alga *Ulva*. Los resultados sugieren que el uso de algunos de estos productos aminoran los efectos causados por la presencia de aflatoxinas en alimentos para camarón, no obstante algunos pueden llegar a reducir el rendimiento cuando se añaden en una dieta sin contaminar.

Palabras claves: camarón, secuestrantes, biotransformadores, aflatoxinas

Introducción

Los mohos crecen sobre los materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos, además de producir metabolitos secundarios, los cuales son tóxicos para plantas y/o animales. Un ejemplo de estas sustancias son las micotoxinas las cuales enferman o matan a los animales que los consumen (Swanson, 1987).

Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados, mientras que una micotoxicosis secundaria ocurre al ingerir carne o leche de animales que comieron forrajes con micotoxinas (Lillehoj *et al.*, 1991).

Las características de una micotoxicosis son las siguientes (Lillehoj *et al.*, 1991):

- a) No es una enfermedad transmisible.
- b) El tratamiento con drogas o antibióticos tiene poco o ningún efecto.
- c) En los brotes observados en el campo, el problema es estacional debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del hongo.
- d) El brote está comúnmente asociado a un alimento o forraje específico.
- e) El examen del alimento o forraje sospechoso revela signos de actividad fúngica.
- f) La presencia de las micotoxinas en los vegetales puede deberse (Swanson, 1987):
- g) A la infección de la planta en el campo por el hongo patógeno o a la colonización por los saprobios.
- h) Al crecimiento de los mohos saprobios o patógenos post-cosecha sobre los frutos y granos almacenados.
- i) Al desarrollo fúngico saprobio durante el almacenamiento de los materiales ya procesados.

Los hongos productores de micotoxinas son del género *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Verticillium*, aunque su presencia difiere según el vegetal, el clima y la región geográfica (Lacey, 1989; Widstrom, 1992). Las micotoxinas de

mayor importancia en la nutrición de organismos terrestres son las aflatoxinas, zearalenona, deoxivalenol, nivalenol, toxinas T-2 y HT-2, fumonisinas, ocratoxina, patulina, etc.

De todas las micotoxinas conocidas, las aflatoxinas son las más estudiadas y de ellas, la AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ han sido las más investigadas (Bennett y Klich, 2003). La aflatoxina B₁ es la más potente y carcinogénica hepática, la cual es activada por el B,-2,3-epoxido (Williams y Buhler, 1983). Se puede encontrar principalmente en cereales y granos, entrando directamente en la cadena alimenticia (Josephs *et al.*, 2005); no obstante también pueden presentarse en productos de origen animal como la leche (Diaz *et al.*, 2004), carne o huevos (Wolzak *et al.*, 1985; Wolzak *et al.*, 1986). En animales productores de leche, este compuesto es metabolizado a aflatoxina M₁ (Battacone *et al.*, 2009) gracias a la metabolización de la AFB₁ por las enzimas hepáticas microsomales de la familia citocromo P450 (Kuilman *et al.*, 2000).

En crustáceos se ha reportado que tanto la presencia de AFB₁ en forma pura en el alimento o inyectada, así como la presencia de granos contaminados (Tabla 1) reduce el consumo de alimento, la ganancia en peso y genera daños en el hepatopáncreas. A niveles elevados, puede ocasionar mortalidades importantes.

Tabla 1. Resumen de afecciones causadas por AFB1 en camarones peneidos.

Dosis	Tiempo Exposición	Afección	Especie	Referencia
25-160 ppm	24 hrs.*	Hepatopáncreas		
		Órgano Mandibular	<i>P. stylirostris</i>	
	96 hrs.*	Órgano Hematopoyético		Wiseman <i>et al.</i> , 1982
		Hepatopáncreas		
50-300 ppm	4 semanas	Órgano Mandibular	<i>P. vannamei</i>	
		Órgano Hematopoyético		
50 ppb	21 días	Hepatopáncreas		
		Glándula Antenal		Ostrowski-Meissmer <i>et al.</i> ,
250 ppb		Aumento de TCA	<i>P. vannamei</i>	1995
400 ppb	56 días	Disminuye peso final		
900 ppb		Reduce digestibilidad		
50 - 2500 ppb		Correlación Altamente negativo entre peso final, ganancia de peso y sobrevivencia		
		Atrofia del epitelio tubular	juveniles de <i>P.</i>	
		Hepatopáncreas,	<i>monodon</i>	
		Infiltración Hemocítica y		
500 ppb		Fibrocítica del		
		Hepatopáncreas, Necrosis,		
	8 semanas	Infiltración y degeneración del Hepatopáncreas		Boonyaratpalin <i>et al.</i> , 2001
100 ppb		Reduce sobrevivencia		
		Atrofia del epitelio tubular del Hepatopáncreas,		
		infiltración hemocítica y		
50-2500 ppb		fibrocítica del	adultos de <i>P.</i>	
		hepatopáncreas, necrosis,	<i>monodon</i>	
		inflamación y		
		degeneración del		
		hepatopáncreas		

		afecta el sistema inmunológico incrementa actividad fenoloxidasas		
5 ppb		reduce el crecimiento		
	7-10 días	Aumenta mortalidad		
10 ppb		Daño hepático	<i>P. monodon</i>	Bintvihok <i>et al.</i> , 2002
		reduce actividad de la enzima transaminasa glutámico-oxalacética		
20 ppb		Potencializa actividad digestiva de Tripsina	<i>P. vannamei</i>	Farias y Torres. 2003
10 ng/g				
73.8 ppm	62 días	reduce crecimiento inmunodepresión	<i>P. monodon</i>	Bautista <i>et al.</i> , 2003

*inyección de toxina en vía intramuscular

Métodos de control y/o prevención contra las micotoxinas

Las pérdidas económicas debido a la presencia de micotoxinas son considerables. Una estrategia utilizada para reducir el impacto en la producción animal es la utilización de productos secuestrantes o transformadores, los cuales se incluyen en la fabricación del alimento. Para poder seleccionar estos compuestos, se deben de cumplir los siguientes requerimientos (Piva *et al.*, 1995; Rustom, 1997; Bata y Lásztity, 1999):

- a) Deben destruir, inactivar o remover las micotoxinas;
- b) No deben producir o dejar residuos tóxicos y/o carcinogénicos/mutagénicos al final de la producción o en productos alimenticios obtenidos a partir de los animales alimentados con dicho producto;
- c) No debe provocar efectos adversos en propiedades tanto físicas como sensoriales en el producto;
- d) Debe de ser técnica y económicamente factible.

Las sustancias usadas como secuestrantes incluyen material inorgánico como carbón activado, aluminosilicatos (arcillas, bentonitas, montmorillonita, zeolita, filosilicatos, etc.), carbohidratos indigeribles complejos (celulosa, polisacáridos de paredes celulares, levaduras y bacterias como glucomanano, peptidoglucano, entre otros) y polímeros sintéticos como colessterinas y polivinilpirrolidona y derivados (Diaz *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2004). La mayoría de los estudios desarrollados para aminorar los efectos de la micosis con el uso de adsorbentes están enfocados a la utilización de aluminosilicatos, principalmente zeolitas y aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados (HSCAS) y algunas arcillas en donde se les reemplazó algunos de sus iones por iones de metal de tierras alcalinas (Barrer, 1989; Mumpton, 1999).

En animales terrestres se ha reportado que la inclusión de estos compuestos aminoran de manera importante los efectos causados por la presencia de micotoxinas. En camarón no existe evidencia clara sobre su efectividad y si estos son efectivos para su aplicación en alimentos para camarón, por lo que el presente trabajo presenta datos donde se evaluaron aluminosilicatos, mezclas de productos y compuestos antioxidantes como una estrategia para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* bajo condiciones controladas.

Material y métodos

Dietas experimentales

Las dietas experimentales fueron elaboradas en el Programa Maricultura, que forma parte del departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Estas dietas se realizaron a partir de una fórmula de referencia la cual fue utilizada como dieta control (elaborada con la misma proporción de ingredientes en todos los bioensayos). Esta fórmula fue elaborada utilizando el programa Nutrion 5, la cual fue modificada ligeramente de acuerdo con las necesidades para cada experimento. Posteriormente se determinó la estabilidad de las dietas experimentales en términos de pérdida de materia seca (PMS) utilizando el método de Ricque-Marie *et al.* (2006). Además se calculó el porcentaje de

absorción de agua de las dietas experimentales, que fue determinado siguiendo la metodología descrita por Nieto-López *et al.* (2011).

Experimento 1: Evaluación de la efectividad de diferentes arcillas para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*

En este primer experimento, se comprobó la efectividad de diferentes secuestrantes a base de aluminosilicatos en camarones *L. vannamei* (592±6 mg) alimentados con dietas contaminadas con aflatoxinas y sin contaminar por un periodo de 42 días. Para esto se elaboraron dos dietas controles, una libre de micotoxinas y otra contaminada con 75 ppb de AF totales, a partir de estas se elaboraron 8 dietas más conteniendo uno de cuatro secuestrantes (AL1.- HSCAS y Montmorillonita de Ca; AL2.- Organoaluminosilicato químicamente activado; AL3.- Tierra de diatomeas, caolinita, sustancias fitofíticas y extractos herbales; y AL4.- Bentonita montmorillonita) a un nivel de 2.5 a 5.0 g/kg de acuerdo con el nivel recomendado por el fabricante para cada producto. Para la elaboración de las dietas contaminadas se utilizó harina de maíz contaminado (reemplazando a la harina de trigo). Cada tratamiento se evaluó en 3 acuarios replicados (acuarios de 60 L con doble fondo) con una densidad de 10 camarones por acuario. Los parámetros zootécnicos de los camarones fueron evaluados cada 7 días.

Experimento 2: evaluación de la efectividad de diferentes secuestrantes de aflatoxinas a base de mezcla de arcillas con otros compuestos para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*

En este experimento se comprobó la efectividad de diferentes mezclas de aluminosilicatos con paredes de levadura y otros productos contra alimentos contaminados con aflatoxinas durante 42 días. Al igual que con el experimento anterior, se formularon dos dietas controles: una libre de aflatoxinas y otra contaminada con 75 ppb de aflatoxinas totales. A partir de estas dietas se elaboraron 6 dietas más conteniendo una de las mezclas remediadoras (MZ1.- Zeolita y paredes celulares de levadura; MZ2.-Glucomanano de paredes celulares de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y aluminosilicato de calcio y sodio

hidratado; y MZ3.-Bentonita, levadura *Trichosporon mycotoxinivorans*, epoxidasa y lactonasa) en un nivel de inclusión de 2.5 a 5.0 g/kg de acuerdo con lo recomendado por el fabricante. Para la elaboración de las dietas contaminadas se utilizó harina de maíz contaminado (reemplazando a la harina de trigo). Cada tratamiento se evaluó en 4 replicados (acuarios de 60 L sin doble fondo) con una densidad de 10 camarones por acuario con un peso promedio inicial de 210 ± 4 mg. Los camarones fueron alimentados a saciedad con 2 raciones diarias (9:00 y 17:00h). Los parámetros zootécnicos de los camarones fueron evaluados cada 7 días.

Experimento 3: evaluación de la efectividad de diferentes antioxidantes para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*

En este bioensayo se evaluó la efectividad de diferentes tipos de antioxidantes (harina de alga *U. clathrata*, curcumina, ácido linoleico conjugado) en dietas contaminadas con aflatoxinas por 42 días. Para esto se elaboraron dos dietas controles: una libre de aflatoxinas y otra contaminada con 120 ppb de aflatoxinas totales, a partir de estas se elaboraron 6 dietas más conteniendo uno de los antioxidantes a evaluar. Los niveles de inclusión para la *Ulva*, curcumina y CLA fueron de 40.0, 0.14 y 4.0 g/kg respectivamente. El nivel de inclusión se determinó por la efectividad indicada en la bibliografía [Peña-Rodríguez (2011); Gowda *et al.* (2008); Denli *et al.* (2004)]. Para la elaboración de las dietas contaminadas se utilizó harina de maíz contaminado (reemplazando a la harina de trigo). Cada tratamiento se evaluó en 3 replicados (acuarios de 60L sin doble fondo) con una densidad de 12 camarones por acuario con un peso promedio inicial de 326 ± 3 mg. Los parámetros zootécnicos de los camarones fueron evaluados cada 7 días.

Experimento 4: Efectividad de diferentes niveles de la MZ3 solo o en combinación con *U. clathrata* para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón

Para el último bioensayo se comprobó la efectividad de la mezcla remediadora 3 (Bentonita, levadura *Trichosporon mycotoxinivorans*, epoxidasa y lactonasa) a diferentes dosis, sola o en combinación con harina de *U. clathrata* en alimentos contaminados para camarón blanco. Para esto se formularon 2 dietas, una libre de aflatoxinas y la otra dieta contaminada con 120 ppb de aflatoxinas totales. A partir de la DCC se elaboró una con la inclusión de 2% de alga *U. clathrata*, posteriormente se prepararon 3 pares de dietas con 2.5, 3.0 y 5.0 g/kg de la MZ3 sola o en combinación con la harina de alga. Para la elaboración de las dietas contaminadas se utilizó harina de maíz contaminado (reemplazando a la harina de pescado y en mayor proporción a la harina de trigo), cada tratamiento se evaluó en 3 replicados (acuarios de 60L sin doble fondo) con una densidad de 12 camarones por acuario con un peso promedio inicial de 310 ± 4 mg. Los camarones fueron alimentados a saciedad en dos raciones diarias (9:00 y 17:00 h). Los parámetros zootécnicos de los camarones fueron evaluados cada 14 días.

Análisis estadísticos

Para los parámetros zootécnicos evaluados en los camarones de los experimentos 1, 2 y 3 se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y en el caso de detectar diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizó una comparación múltiple de medias por el método de Tukey por producto a un nivel de significancia de 0.05. Para el último bioensayo se realizó un ANOVA de una vía y una comparación múltiple de medias por el método de Tukey para todos los tratamientos a un nivel de significancia de 0.05. En el caso de los análisis de estabilidad y absorción de agua de las diferentes dietas, los resultados fueron sometidos a un ANOVA; en caso de presentarse diferencias significativas, se realizó una comparación múltiple de medias Tukey a un nivel de significancia de 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SPSS versión 15.0. (SPSS. Inc., Chicago IL, USA).

Resultados y discusiones

Estabilidad del alimento y absorción de agua de las dietas experimentales.

La manufacturación de alimentos para consumo animal envuelve una serie de procesos que intervienen en la calidad final del pellet, sin embargo, la incorporación de algunos ingredientes, tales como las arcillas minerales, juegan un papel clave en algunos de los parámetros físicos del alimento (Thomas *et al.*, 1998). La inclusión de las arcillas AL3 y AL4, evaluadas en el primer experimento, redujo la pérdida de materia seca de 12 a 16% tanto en la dieta control limpia así como la control contaminada (Fig. 1a). De la misma forma, se observó una mayor absorción de agua (7-17%) en comparación con las dietas sin suplementar (Fig. 1b). Pfof y Young (1973) reportan que la inclusión de bentonitas de sodio tienen efectos beneficiosos en la durabilidad del alimento, en promedio 5% más alta que para las dietas sin suplementar. El incremento en la capacidad de absorción de agua debido a la presencia de montmorillonita y vermiculita en los alimentos es debido a la presencia de espacios intercalados en las moléculas de estos productos (Vaught *et al.*, 2006). La mayor capacidad de absorción de agua en estas dietas fue para las que contenían AL3 y AL4, lo que confirma la presencia de montmorillonita.

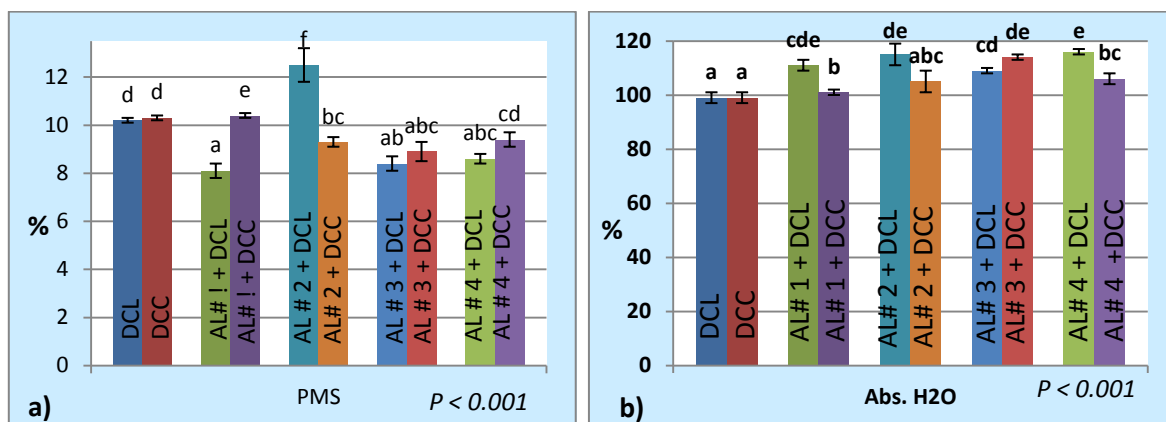


Figura 1. (a) Pérdida de materia seca (PMS) y (b) Absorción de agua (Abs H₂O) de las dietas experimentales a las que se les añadió diferentes productos a base de aluminosilicatos.

Para el experimento 2, en donde se añadieron las mezclas remediadoras, la PMS de las dietas controles oscilaron entre el 10.2 y 10.3% y la suplementación de las mezclas remediadoras mejoró la estabilidad de las dietas reduciendo la PMS de un 19 a un 38%. La absorción de agua en las dietas experimentales se mantuvo sin diferencias significativas, oscilando entre 87.7 y 108.7%. Se ha reportado que la inclusión de fibras solubles (arabinosilanos y pectinas) y β -glucanos mejoran la calidad del pellet (Thomas *et al.*, 1998; Thammakiti *et al.*, 2004; Zechner-Krpan *et al.*, 2009). Las observaciones previas confirman que la inclusión de los productos de levadura mejora la calidad del pellet.

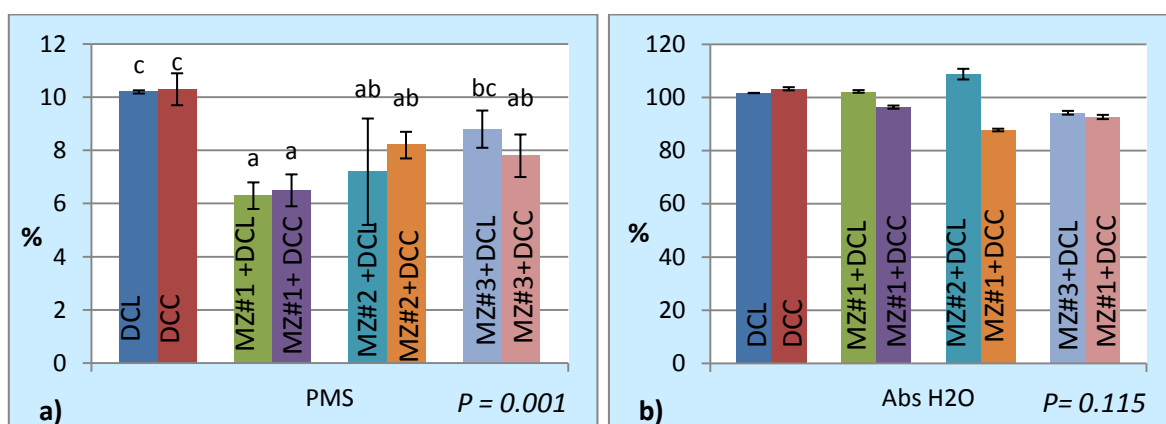


Figura 2. (a) Pérdida de materia seca (PMS) y (b) Absorción de agua (Abs H₂O) de las dietas experimentales a las que se les añadió secuestrantes de micotoxinas a base de arcillas, más la presencia de otros productos.

Para el experimento tres, la inclusión de CLA y la harina de alga aumentó de manera significativa la pérdida de materia seca y la absorción de agua (Figs. 3a, 3b). Estos resultados son contradictorios a los anteriormente reportados ya que se ha reportado que la inclusión de harina de macroalgas mejora la estabilidad de los alimentos para organismos acuáticos: Hashim y Mat-Saat (1992) reportan que la incorporación de 5% de harina de *Ulva ssp.* incrementó la estabilidad de las dietas para pez haruan (*Channa striatus*). De igual manera, Peñaflores y Golez (1996) enfatizaron la buena capacidad de estabilidad de las dietas suplementadas con harina de alga roja *Kappaphycus alvarezii* (6-7% de PMS). Por su parte Peña-Rodríguez (2011), encontró una mejor estabilidad de dietas para camarón *L. vannamei* observando que al agregar harina de alga *Ulva clathrata*, la PMS de la dieta

disminuía en un 19.1%. Sin embargo, en el presente estudio los valores PMS observados en las dietas a las que se les añadió harina de alga, son similares a los reportados por Peñaflorida y Goles (1996) donde encontraron una PMS del 12% en dietas que contenían harina de alga *Gracilaria heteroclada*. Aunque las dietas suplementadas con harina de alga y CLA presentan una mayor PMS en comparación con las dietas sin suplementar y las suplementadas con curcuminas, los valores de PMS se encuentran dentro de los valores reportados para alimentos para camarón. Para la absorción de agua de los diferentes tratamientos se observó que la inclusión de la harina de alga aumenta de manera significativa este parámetro. Estos resultados coinciden con los reportados por Peña-Rodríguez (2011), quien observó un incremento (28%) en la absorción de agua cuando incluyó 6% de harina de *Ulva clathrata* en dietas para camarón. Cruz-Suárez *et al.* (2009) mencionan que la harina de ulva otorga una mayor capacidad de absorción agua gracias a la presencia de grupos sulfatados en fracciones de polisacáridos y/o el efecto sinérgico con los restos sacáridos presentes en la ulva. En el presente experimento, observamos que la inclusión de harina de alga *U. clathrata* incrementó la absorción de agua en un promedio de 42%, confirmándose que la inclusión de este ingrediente modifica este parámetro en el alimento para camarón, mientras que la inclusión de CLA presentó un incremento del 20%. La ausencia de efecto en este parámetro debido a la presencia de curcuminas era de esperarse por su bajo nivel de inclusión en el alimento.

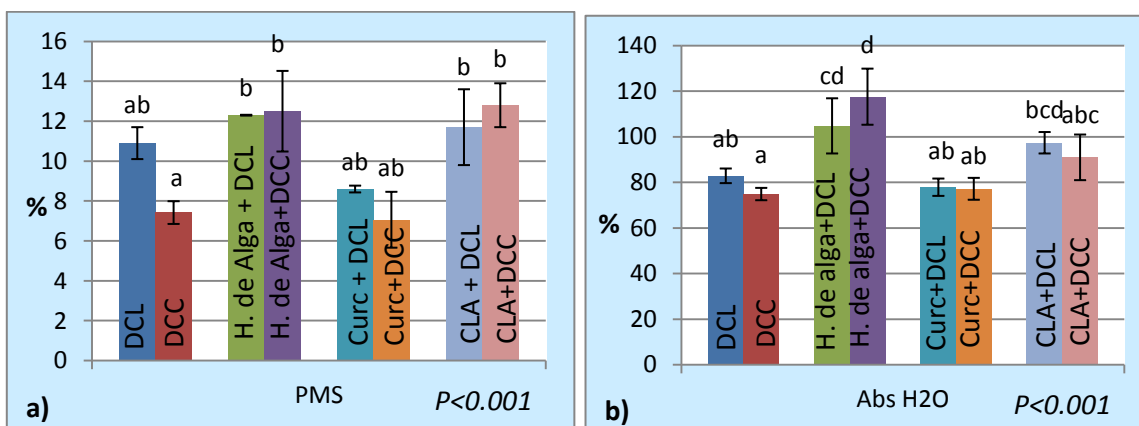


Figura 3. (a) Pérdida de materia seca (PMS) y (b) Absorción de agua (Abs H₂O) de las dietas experimentales a las que se les añadió los antioxidantes.

Para el cuarto experimento, la inclusión de 5 g de MZ3 (ya sea solo o en combinación de harina de alga) generó la mayor pérdida de materia seca (Fig. 4a). Esto puede deberse a la

alta concentración de la mezcla remediadora interviniendo en la estabilidad de la dieta. La inclusión de 2.5 g/kg del producto MZ3 obtuvo la mayor absorción de agua (137.6%), seguida de la dieta 2.5 g/kg de harina de alga a dieta DCC, en contraste, la dieta DCL obtuvo la menor absorción de agua oscilando en 118.8% (Figura 4b), lo que difiere de los resultados en el experimento anterior, esto puede deberse al menor nivel de inclusión de la harina de alga.

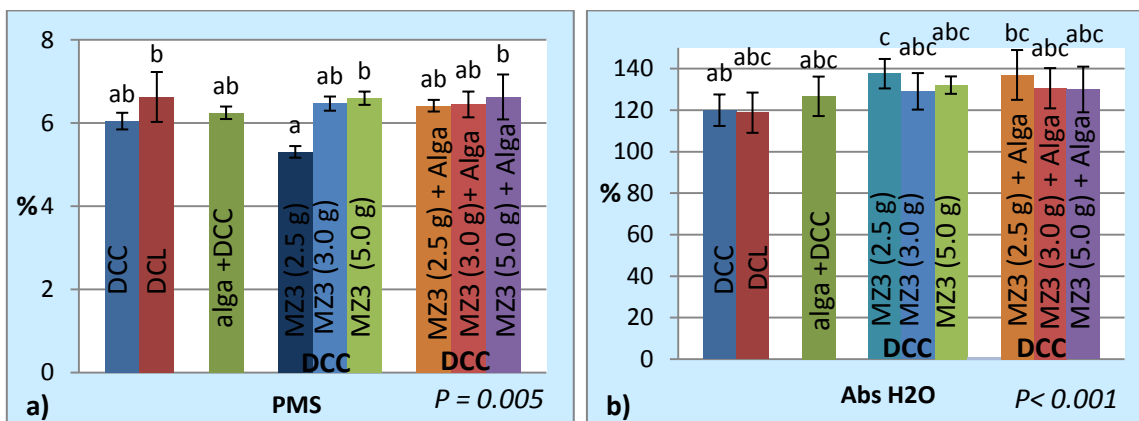


Figura 4. (a) Pérdida de materia seca (PMS) y (b) Absorción de agua (Abs H₂O) de las dietas experimentales a las que se les añadió la MZ3 solo o en combinación con la harina de alga

Parámetros de rendimiento

Presencia de aflatoxinas en el alimento

En todos los bioensayos realizados se confirma que el uso de granos contaminados reduce de manera significativa el consumo de alimento (20%) y la ganancia en peso (22%). Estos resultados concuerdan con los reportados por Tapia-Salazar *et al.* (2012), quienes observaron que a partir de un nivel de inclusión de 60 ppb de AF totales existe una significativa reducción en la tasa de crecimiento, mientras que a partir de 120 ppb de AF totales ocurre una reducción en el consumo de alimento. La reducción del consumo de alimento puede deberse a la presencia de compuestos inapetecibles generados en el grano durante el crecimiento de moho. No se observó una reducción de la sobrevivencia en los diferentes estudios, lo cual concuerda con lo documentado por Tapia-Salazar *et al.* (2012) para *L. vannamei* (hasta 500 ppb de AF totales utilizando granos naturalmente

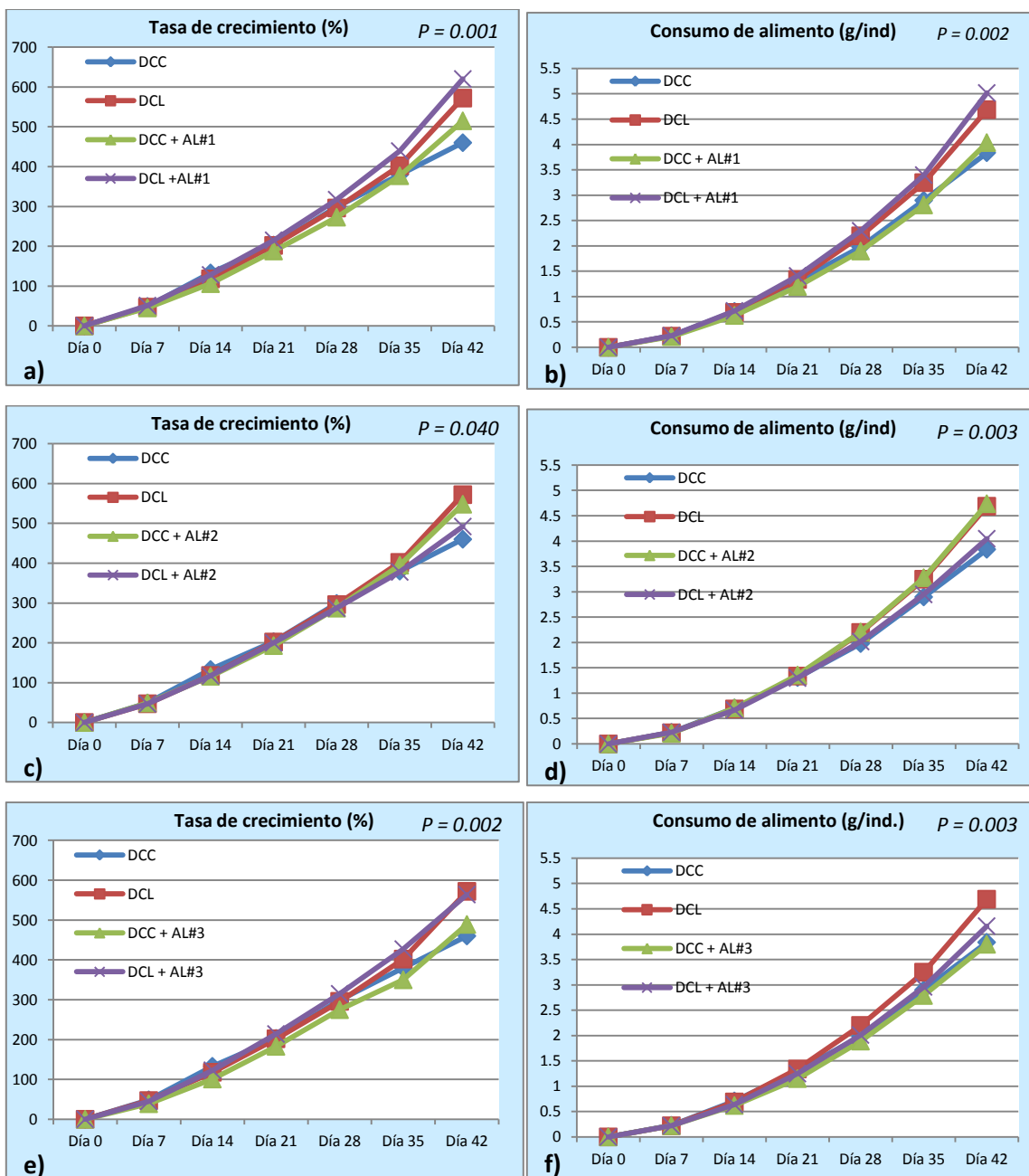
contaminados) y por Boonyaratpalin *et al.* (2001) y Gopinath y Raj (2009) para *P. monodon* (de 15 a 2500 ppb de AFB1 en forma pura).

Uso de arcillas para reducir la aflatoxicosis en camarón blanco *L. vannamei*

Existen diferentes estudios en donde se ha observado un efecto positivo en el uso de los aluminosilicatos en alimentos no contaminados para animales terrestres, esto podría deberse a que las arcillas ayudan a la lenta transición de los nutrientes en el sistema digestivo, lo cual conduce a un mejor aprovechamiento de los mismos (Mumpton y Fishman, 1977) dando como resultado un incremento en los parámetros de rendimiento, esto fue confirmado por Edrington *et al.* (1997) quienes al incorporar de carbón activado a la dieta inocua para aves de engorda (Peterson x Hubbard) aumentaba la ganancia de peso en un 4.3%. Por su parte Denli y Okan (2006), observaron en la misma especie que al añadir HSCAS a una dieta libre de micotoxinas no afectaba la ganancia de peso ni la tasa de conversión alimenticia, sin embargo, al integrar carbón activado o diatomita (2.5 g/kg de alimento) la ganancia de peso disminuyó en un 4 y 6% y aumentó la tasa de conversión alimenticia en un 2.8 y 3.4% respectivamente. En animales acuáticos también existen resultados contradictorios. Por ejemplo, estudios realizados con alevines de bagres alimentados con dietas libres de micotoxinas adicionadas con 0.3% y 0.6% de aluminosilicato de calcio y sodio hidratado, se observó una reducción el peso final en un 10% y 26% respectivamente (Lopes *et al.*, 2009), mientras que para la trucha arcoíris, se observó un mayor incremento de peso y conversión alimenticia cuando se alimentó con dietas libres de aflatoxinas suplementadas con bentonita de sodio o mordenita (Eya *et al.*, 2008). En el presente bioensayo, al utilizar cada una de las arcillas con la DCL se observó que los camarones que consumieron AL2, AL3 y AL4 presentaron una disminución en el consumo de alimento (\approx 11-13%) y la tasa de crecimiento (\approx 1.5-14%). En contraste, los individuos alimentados con la dieta DCL+ AL1 mostraron un mayor consumo de alimento (7.1%) y una mejor tasa de crecimiento (8%). Estas diferencias en los resultados, según Macháček *et al.* (2010), radican principalmente en el tipo de zeolita utilizada, su pureza, características físicas y químicas y su concentración en la dieta. Otros autores mencionan que la disminución del consumo de alimento es debido que las zeolitas secuestran

compuestos nitrogenados (Nguyen y Tanner, 1998) las cuales son atractivos para el camarón (Suresh *et al.*, 2011).

Para especies acuáticas, algunos estudios han demostrado que la incorporación de bentonitas y montmorillonita (a trucha arcoíris y tilapia respectivamente) a dietas contaminadas con aflatoxinas reduce su absorción en el tracto intestinal (Ellis *et al.*, 2000; Hassan *et al.*, 2010). Por otro lado, existen estudios que han mostrado que la inclusión de aluminosilicatos en dietas contaminadas con esta micotoxina para bagres y trucha arcoíris no produjo una disminución de sus efectos tóxicos (Lopes *et al.*, 2009; Arana *et al.*, 2011). Estudios realizados en camarón por Suppadit *et al.* (2006) y Soonngam y Hutacharoen (2007) encontraron que la inclusión de HSCAS y vermiculita disminuyó los efectos negativos causados por la alimentación de dietas contaminadas con aflatoxinas en *L. vannamei* y *P. monodon*. Sin embargo estas mejoras no fueron estadísticamente similares a las dietas sin contaminar. En el presente experimento solamente los camarones alimentados con la dieta DCC adicionada con AL2 obtuvieron un consumo de alimento (CA) y una tasa de crecimiento (TC) similares a los alimentados con la DCL; al contrario, la incorporación de AL1, AL3 y AL4 a la DCC mejoró ligeramente la tasa de crecimiento aunque no mejoró de manera significativa la ingesta de alimento. La tasa de conversión alimenticia es el valor correspondiente del consumo de alimento aunado al aumento de peso, en los organismos que consumieron el alimento DCC se observó una disminución de este parámetro. La inclusión de arcillas en las dietas experimentales no ocasionó efectos adversos en la sobrevivencia. Tales resultados coinciden con los publicados anteriormente por Soonngam y Hutacharoen (2007), quienes alimentaron camarón *P. monodon* con dietas que incluían HSCAS y vermiculita.



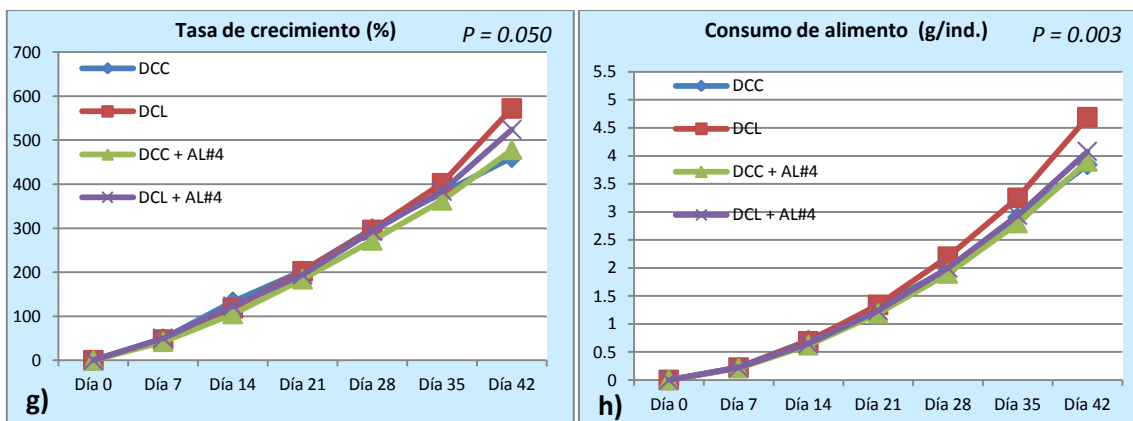


Figura 5. Tasa de crecimiento (a, c, e, g) y Consumo de alimento (b, d, f, h) de las diferentes dietas experimentales utilizando los diferentes aluminosilicatos.

Uso de productos a base de arcillas y otras sustancias para reducir la aflatoxicosis en camarón blanco *L. vannamei*

La suplementación de carbohidratos indigeribles (como la celulosa, polisacáridos provenientes de las paredes celulares de levaduras y bacterias tales como el glucomanano y peptidoglicanos) han servido como promotores del crecimiento al ser añadidos a dietas inocuas. En aves se ha encontrado un efecto promotor del crecimiento en la suplementación de paredes celulares de levadura *S. cerevisiae* a la dieta, aumentando la ganancia de peso en pollos de engorda hasta un 5% y el consumo de alimento en un 2%, además de mejorar la tasa de conversión alimenticia (4.6%; Arce *et al.*, 2005). Por su parte Parlat *et al.* (2001) encontraron en codorniz japonesa un aumento en la ganancia de peso y consumo de alimento de un 40 y 41% respectivamente comparado con la dieta control. Estos resultados confirman lo publicado por de los Santos *et al.* (2007) quienes señalan que varios promotores nutricionales influyen en la función del intestino, ya que las paredes celulares de levadura *S. cerevisiae* favorecen la longitud de las vellosidades intestinales, ejerciendo un efecto positivo en su tamaño, esto a su vez podría favorecer la superficie disponible para la absorción de nutrientes. Por otro lado, se ha observado que el uso de algunos productos como polímeros de glucomanano disminuyen el peso final en aves de engorda en un 2.5 y 4.8% a dosis de 0.5 y 1 g/kg de alimento respectivamente (Basmacıoglu *et al.*, 2005). En

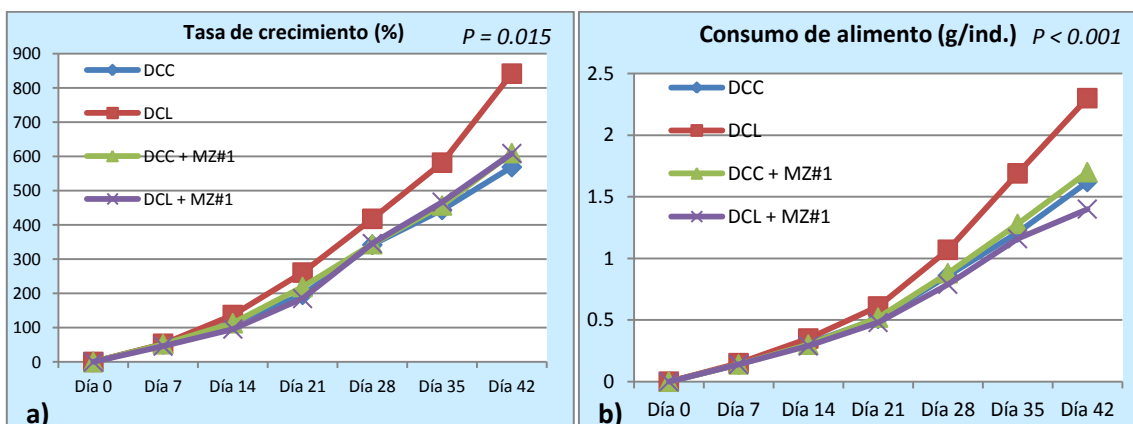
cerdos, de igual manera se observa una ligera reducción del peso promedio al añadir a la dieta 2 g del polímero por kg de alimento (Battacone *et al.*, 2007).

En organismos acuáticos, para el caso de la trucha arcoíris, estudios realizados por Staykov *et al.* (2007) muestran que la suplementación en la dieta del 2 g/kg de oligosacáridos de manano derivado de paredes celulares de *S. cerevisiae*, incrementa el promedio de peso final en un 12 y 10%; y disminuye la tasa de conversión alimenticia en 9.6 y 11.2%; esto para organismos mantenidos en jaulas y en raceways (o canaletas) respectivamente. Utilizando el mismo producto a una concentración de 2 g /kg de alimento, Torrecillas *et al.* (2007) observaron un aumento del 9% (en la TCA?) en lubina (*Dicentrarchus labrax*) comparados con organismos alimentados con la dieta control. De igual manera se observa un aumento en el peso promedio final (12%) y consumo de alimento (12.3%) en carpa común (*Cyprinus carpio*) cuando fueron alimentadas con una dieta que contenía 1 g/kg de levadura. En el presente bioensayo, al utilizar las mezclas remediadoras con las dietas sin contaminar se observó que los camarones que consumieron las dietas suplementadas con MZ1 y MZ2 disminuyeron el consumo de alimento en un 39 y 20%, además de presentar una menor tasa de crecimiento (52 y 23% respectivamente). En contraste, al incorporar MZ3 no se encontraron diferencias significativas tanto en consumo de alimento como la ganancia en peso.

La capacidad de los polisacáridos indigeribles para disminuir el efecto de las micotoxinas ha sido bien documentada en animales terrestres (Parlat *et al.*, 2001; Kamalzadeh *et al.*, 2009). Dentro de este grupo, el uso de la levadura *S. cerevisiae* ha mostrado ser muy útil como secuestrante de micotoxinas. Devegowda *et al.* (1998) observaron que el extracto de fracción de paredes celulares de *S. cerevisiae* es capaz de secuestrar micotoxinas *in vitro*. Santin *et al.* (2003) encontraron que las paredes celulares mejoraban la tasa de conversión alimenticia de las aves expuestas a aflatoxinas; por su parte Basmacioglu *et al.* (2005), utilizaron glucomanano esterificado extraído de las paredes celulares, y observaron una mejora significativa en la ganancia de peso en un 59 % al ser añadido al alimento contaminado con aflatoxinas. Raju y Devegowda (2000) añadieron glucomanano de levadura a una dieta contaminada y reportaron un incremento en el consumo de alimento y

peso promedio final de aves de engorda en un 4.5 y 1.6% respectivamente. El modo de acción en el cual el glucomanano de levadura reduce los efectos de la aflatoxicosis no ha sido elucidado. Sin embargo, se ha hipotetizado que las moléculas de aflatoxinas son absorbidas dentro de la matriz del glucomanano, previniendo su absorción en el tracto gastrointestinal (Kamalzadeh *et al.*, 2009).

En estudios realizados con el producto que contiene bentonita, levadura *Trichosporon mycotoxinivorans*, epoxidasa y lactonasa se ha reportado que a partir de un nivel de inclusión de 0.05% disminuye los residuos de AFB₁ y AFM₁ en musculo e hígado de aves alimentadas con dietas contaminadas con aflatoxinas (Bintvihok y Kositcharoenku, 2003; Gargees y Shareef, 2009). También se ha evidenciado que este producto aminora otros problemas desarrollados por la presencia de AF: Nešić *et al.* (2012) observaron que la inclusión de este producto en dietas contaminadas con la toxina T-2 y ofrecidas a aves de engorda, promovían un aumento del peso final (+9.4%), pero también se redujeron las ulceraciones bucales provocadas por la presencia de esta micotoxina. Para el presente bioensayo se observó que al añadir MZ1 a la dieta contaminada no se observó mejora alguna en los parámetros en general, en contraste al añadir la MZ2 y MZ3 se incrementó el consumo de alimento y la tasa de crecimiento en un 15.6 y 20% y en un 5% 23% respectivamente, además de mejorar la tasa de conversión alimenticia en un 14%.



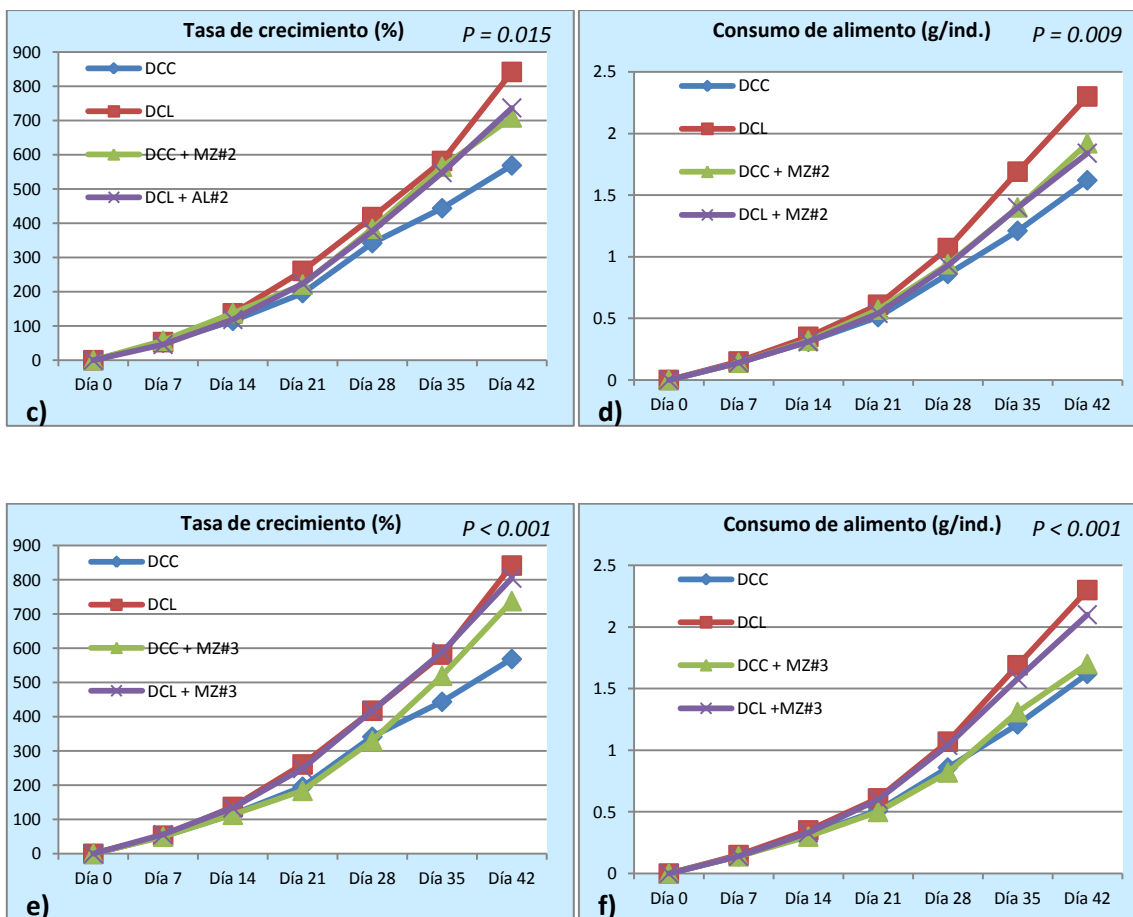


Figura 6. Tasa de crecimiento (a, c, e) y Consumo de alimento (b, d, f) de las diferentes dietas experimentales utilizando los diferentes mezclas remediadoras.

Uso de productos antioxidantes para reducir la aflatoxicosis en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

Existen diferentes estudios que han reportado que el uso de sustancias con propiedades antioxidantes mejoran los parámetros de rendimiento en dietas para organismos acuáticos. Chen *et al.* (2013) reportan que niveles de inclusión de 0.1, 0.2 y 0.4% de la flor madre selva japonesa [*Lonicera japónica*; utilizada por la medicina tradicional China gracias al contenido de polifenoles (Xagorari *et al.*, 2001)] no afectó el consumo de alimento pero la tasa de crecimiento se incrementó conforme el nivel de inclusión, mientras que la tasa de conversión alimenticia se mejoró en un 43.7%. Estudios conducidos en

peces, por Ji *et al.*, (2007) utilizaron *Artemisia capillaries* y *Cnidium officinale*, las cuales poseen un alto contenido de polifenoles (Gundidza *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993), para comprobar su efecto promotor en el crecimiento de pargo japonés (*Pagrus major*) y encontraron que el nivel de inclusión de 0.5 g/100g de dieta aumentó el peso final en un 20.5 y 20.6%, y la eficiencia alimenticia en un 21 y 19.2% respectivamente. Para el caso del CLA, Valente *et al.* (2007) utilizaron diferentes inclusiones (0.5%, 0.75 y 1%) con la finalidad de encontrar un efecto en el crecimiento en trucha arcoíris, no obstante, se pudo observar una disminución de un 2, 12 y 6.3% respectivamente, aunque estas diferencias no fueron significativas. Makol *et al.* (2009) concluyeron que la inclusión de 0, 0.5, 1 y 2% de CLA en alimentos para lubina *Dicentrarchus labrax* no afectó la ganancia en peso pero redujo el consumo de alimento en un 9% a un nivel de inclusión del producto en un 2% de CLA. Peña-Rodríguez (2011) reporta que niveles de inclusión de 2, 4 y 6% de harina de alga *U. clathrata* no afectaron la tasa de crecimiento ni el consumo de alimento. Por el contrario, Peñaflores y Golez (1996) con *Penaeus monodon* reportan que la inclusión de 5% de harina *K. alvarezii* a la dieta control, mejora el peso final en un 11.4%. Para el caso de la curcumina, Sahu *et al.* (2008) evaluó este extracto (0, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 g/kg) en dietas para el pez *Labeo rohita* y observa que ninguno de los niveles evaluados afectaron los parámetros de rendimiento. Resultados similares fueron encontrados en aves de engorda por Gowda *et al.* (2008), quienes al incluir 0.5% de curcumina a la dieta, no encontraron diferencias en el consumo de alimento y tasa de conversión alimenticia. En el presente estudio al añadir la curcumina, el CLA o la harina de alga a la dieta control sin contaminar se observó un aumento en el consumo de alimento de un 6.4, 15.2 y 32% respectivamente.

Se ha reportado que la inclusión de compuestos antioxidantes, tales como carotenoides, fenoles, terpenoides y polisacáridos sulfatados; reducen los procesos de oxidación celular causado por la presencia de aflatoxinas (Abd El-Baky *et al.*, 2008). Las algas marinas poseen un sinnúmero de compuestos bioactivos tales como carotenoides (Peña-Rodríguez *et al.*, 2011), polifenoles (Kang *et al.*, 2003) y vitaminas (García-Casal *et al.*, 2009), los cuales exhiben una actividad antioxidante importante. Estudios realizados por Abdel-Wahhab *et al.* (2006) indican que al incluir extractos de *Laurencia obtusa* o *Caulerpa prolifera* a dietas para ratas contaminadas con aflatoxinas, aumenta el consumo de alimento

y la ganancia de peso. Esto coincide con los resultados obtenidos por Manoharan *et al.* (2008), quienes observaron un restablecimiento de la ganancia de peso, peso del hígado, proteína total y niveles de albumina en suero por la presencia de esta micotoxina en alimentos para ratas cuando se suministraron extractos acuosos de *Gracilaria carticata* (250 mg/kg de alimento). Por otra parte, diferentes compuestos con actividad antioxidante encontrados en las plantas han sido objeto de investigación, gracias a su efecto inhibidor en la biotransformación de aflatoxinas. La curcumina es otro ingrediente activo el cual se encuentra en *C. longa* ($\approx 3\%$). Algunos investigadores han reportado que este compuesto tiene la capacidad de reducir los efectos negativos causados por la presencia de aflatoxinas: Gowda *et al.* (2008) encontraron que al incluir 0.5% de extracto tumeric (74 mg de curcumina / kg de alimento) a una dieta contaminada con 1 mg/kg aflatoxina en aves de engorda aumentaba la ganancia de peso y el consumo de alimento en un 12.6 y 6% respectivamente; por su parte Rangsz y Ahangaran (2011) utilizando la misma especie de animal, encontraron que al incluir 74 mg de curcumina / kg a una dieta contaminada con 3 mg/kg de aflatoxinas, la ganancia de peso y el consumo de alimento incrementaron en un 26 y 11.5%, respectivamente; además de disminuir la tasa de conversión alimenticia en un 22%, aunque ninguno de estos parámetros mostro diferencias significativas. Otro compuesto activo que ha sido reconocido por tener propiedades antioxidantes y anticarcinógenas en ratones es el CLA (Ha *et al.*, 1987). Este compuesto posee propiedades antioxidantes muy fuertes e inclusive es más potente que el α -tocofenol y casi tan efectivo como el butilhidroxitolueno (antioxidante sintético procedente de la industria petrolera; Ha *et al.*, 1990). Diferentes investigadores indican que el CLA posee una elevada actividad anticancerígena (Pariza y Ha, 1990; Ip *et al.*, 1995). Existen pocas investigaciones que han comprobado la efectividad del CLA sobre las aflatoxinas. Estudios llevados a cabo en aves por Denli *et al.* (2004) demostraron que al agregar CLA (2 o 4g/kg) a dietas contaminadas con aflatoxinas (200 o 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$), aumentó la ganancia de peso de 5.5-6.8% a 7.1%. Estos mismos autores, en el 2005 y utilizando los mismos tratamientos encontraron una reducción en los niveles de colesterol (4.2-14.8% a 3-6.7%) y triglicéridos en sangre (18.3-21.9% a 5.9-18.3%) causados por la inclusión de este antioxidante. En el presente bioensayo, se observa que la inclusión de curcuminas, CLA y harina de alga ulva a la dieta contaminada incrementaron la ingesta de alimento y la tasa de crecimiento en un 9.3% y 20.5%, de un 12

y 21% y de 27 y 23%. Aunque los resultados no son equivalentes a una dieta contaminada, se observa una ligera mejora para los camarones que fueron alimentados con la dieta contaminada. Se requiere más información para poder establecer el modo de acción de estos compuestos en camarón. Por ejemplo, investigar si estos compuestos modifican las enzimas ligadas a los procesos de oxidación celular.

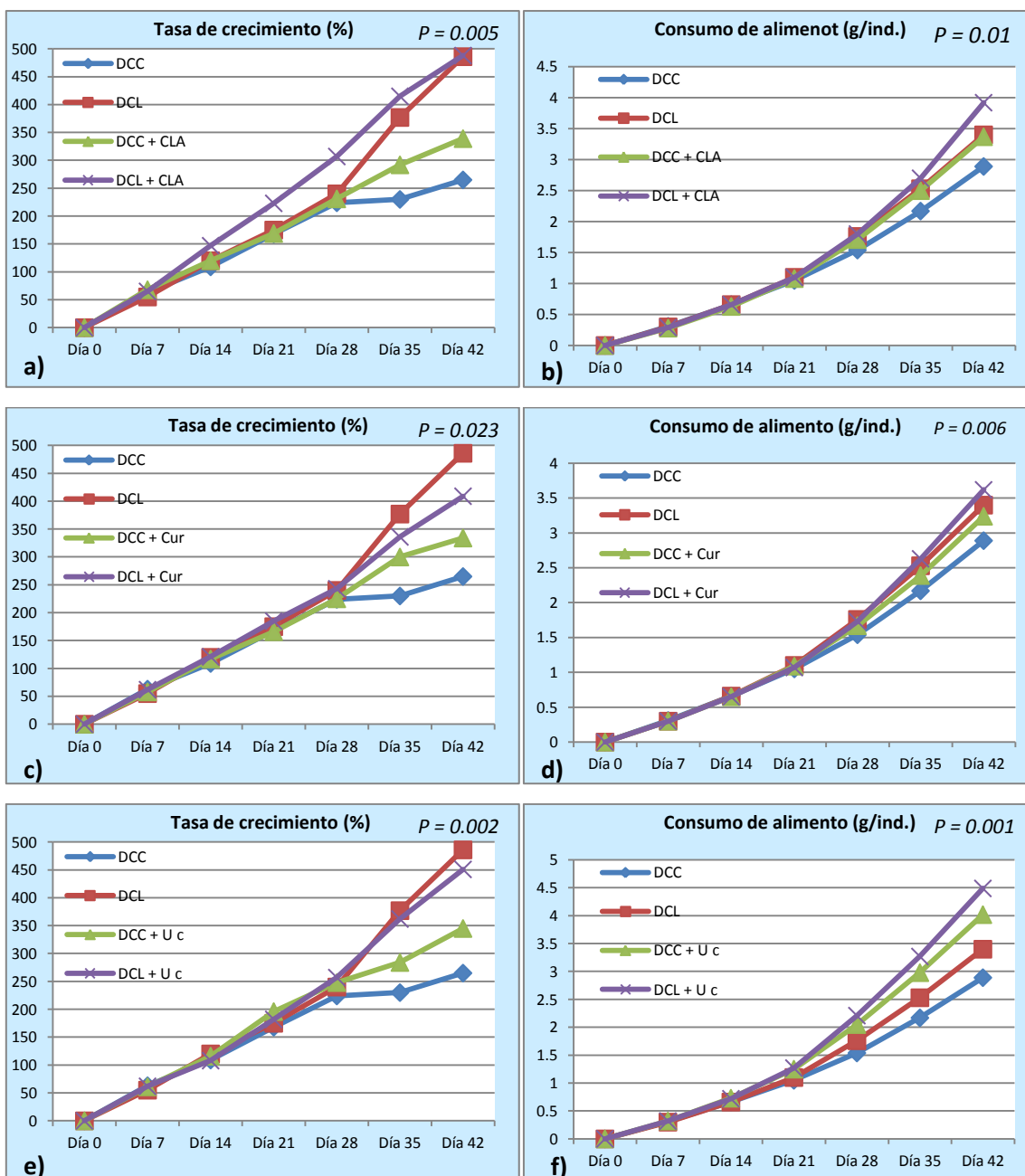


Figura 7. Tasa de crecimiento (a, c, e) y Consumo de alimento (b, d, f) de las diferentes dietas experimentales utilizando los diferentes antioxidantes.

Uso de productos niveles crecientes de MZ3 solo o en combinación con *U. clathrata* para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón

La inclusión del producto MZ3 a la dieta DCC mejoró el consumo de alimento y la ganancia en peso, aunque niveles de inclusión mayores a 2.5g/kg MZ3 causaron una menor tasa de crecimiento. Al incluir la harina de alga en las dietas, se observa una ligera mejora en los parámetros de crecimiento. Estos resultados coinciden con los observados por Kiyothong *et al.* (2012), quienes al suplementar el mismo producto usado en el presente experimento a concentraciones de 0, 15, 30 y 45 g por día a vacas alimentadas con una dieta contaminada con diferentes micotoxinas (DON, fumomisin B₁, zeralenona, ocratoxina A, AFB₁ y T-2) encontraron que el consumo de alimento se mantenía a dosis de 30 y 45 g por día de la mezcla remediadora y se observaba que el peso final disminuía ligeramente con la dosis más alta (45 g de la mezcla remediadora por día), pero no de manera significativa, al igual que el presente estudio.

La tendencia observada en la disminución de la tasa de crecimiento de los camarones conforme se aumenta la inclusión del MZ3 puede deberse a lo mencionado por Ramos y Hernández (1997), quienes sugieren que el uso de aluminosilicatos u otros compuestos absorbentes usados para el control de las micotoxinas pueden secuestrar nutrientes, tales como vitaminas o minerales, los cuales son de suma importancia para el crecimiento del organismo. Por otro lado el efecto sinérgico o antagónico otorgado por la harina de alga en el presente estudio no es muy claro, por lo tanto, estudios futuros en los cuales se determinen factores como las actividades antioxidantes en el camarón o el efecto protector del alimento serán útiles para determinar la factibilidad del uso de la harina de alga en combinación con los secuestrantes.

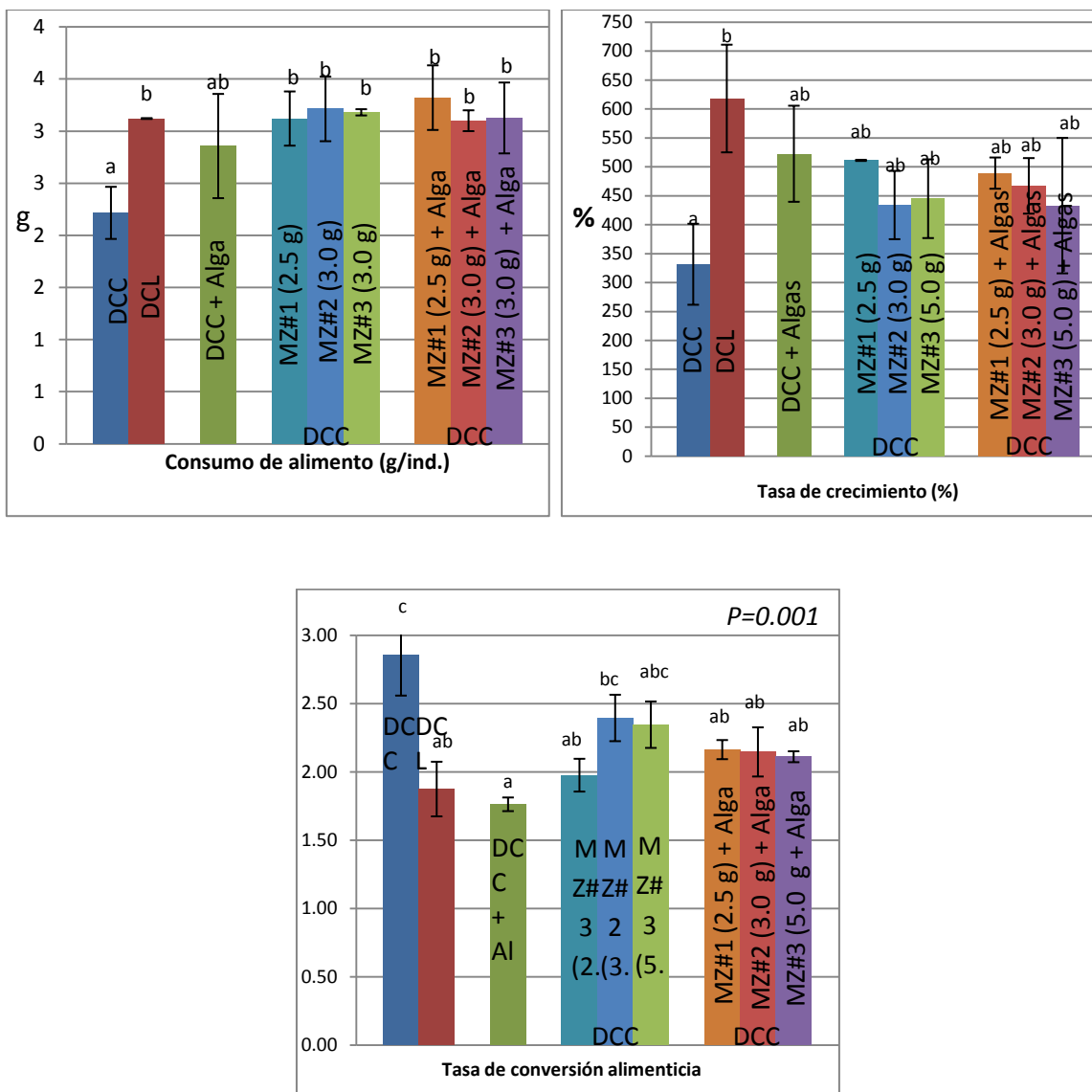


Figura 8. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales con la MZ#3 solo o en combinación con la harina de alga *U. clathrata*.

Conclusiones

- 1) La inclusión de secuestrantes de aflatoxinas en alimentos para camarón modifica los parámetros de calidad del pellet, de manera general reduce la pérdida de materia seca e incrementa la absorción de agua.
- 2) La presencia de aflatoxinas provenientes de granos contaminados por hongos reduce el rendimiento de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*.

- 3) La inclusión de los productos secuestrantes de aflatoxinas a las dietas sin contaminar reduce algunos de los parámetros de rendimiento de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*.
- 4) Algunos de los productos evaluados reducen algunos de los efectos negativos causados por la presencia de aflatoxinas tales como el consumo de alimento y ganancia en peso.
- 5) Se evaluaron los efectos en los parámetros de rendimiento del camarón blanco *L. vannamei* provocados por la inclusión de productos comerciales como mezclas de arcillas con otros productos en dietas para camarón.
- 6) La inclusión de 2.5 g/kg del producto MZ3 redujo la aflatoxicosis en camarón y niveles superiores tienden a reducir la ganancia en peso.

Bibliografía

- Abd El-Baky H H, El-Baz F K, El-Baroty G S. 2008. Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. International Journal of Food Science & Technology 44(9): 1688-1695.
- Abdel-Wahhab MA, Ahmed HH, Hagazi MM. 2006. Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. Journal of Applied Toxicology, 26(3), 229-238. doi: 10.1002/jat.1127.
- Arana S, Dagli MLZ, Sabino M, Tabata YA, Rigolino MG, Hernandez-Blazquez, FJ. 2011. Evaluation of the efficacy of hydrated sodium aluminosilicate in the prevention of aflatoxin-induced hepatic cancer in rainbow trout. Pesquisa Veterinária Brasileira, 31, 751-755.
- Arce MJ, Avila GE, López CC, García EA, García GF. 2005. Efecto de paredes celulares (*Sacharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. Tec Pecu Mex; 43:155-162.
- Barrer RM. 1989. Shape-selective sorbents based on clay minerals; a review. Clays and Clay Minerals, 37(5), 385-395.
- Basmacioglu H, Oguz H, Ergul M, Col R, Birdane YO. 2005. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. Czech Journal of Animal Science, 50, 31-39.
- Bata Á, Lásztity R 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. Trends in Food Science & Technology, 10(6-7), 223-228. doi: 10.1016/S0924-2244(99)00050-3.
- Battacone G, Carboni GA, Nicolussi P, Ligios C, Pulina G. 2007. Use of a glucomannan polymer to reduce the effects of mycotoxin-contaminated diets in finishing pigs. pp. 673-675.
- Battacone G, Nudda A, Palomba M, Mazzette A, Pulina G. 2009. The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. Journal of Dairy Science, 92, 4997-5004.
- Bautista MN, Lavillapitogo CR, Subosa PF, Begino ET. 1994. Aflatoxin B-1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus-monodon*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 65(1), 5-11. doi: 10.1002/jsfa.2740650103
- Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews, 16(3), 497- 516. doi: 10.1128/cmr.16.3.497-516.2003
- Bintvihok A, Kositcharoenkul S. 2003. Aflatoxin B1 and its metabolites residues in tissues and fecal excretion levels of aflatoxin B1 and its metabolites of ducklings given feed containing aflatoxin and esterified glucomannan. Bangkok, Thai Veterinary Medical Association: P104-P105
- Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, Suprasert D. 2001. Effects of aflatoxin B₁ on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Aquaculture Research, 32, 388-398.

- Chen X, Lin H-Z, Jiang S-G, Wu K-C, Liu Y-J, Tian L-X, Niu J. 2013. Dietary supplementation of honeysuckle improves the growth, survival and immunity of *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(1), 161-169. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.020>
- Cruz-Suárez L E, León A, Peña-Rodríguez A, Rodríguez-Peña G, Moll B, Ricque-Marie D. 2010. Shrimp/Ulva co-culture: a sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301(1-4):64-68.
- de los Santos FS, Donoghue AM, Farnell BM, Huff GR, Huff WE, Donoghue DJ. 2007. Gastrointestinal Maturation is Accelerated in Turkey Poult Supplemental with a Mannan-Oligosaccharide Yeast Extract (Alphamune). *Poultry Science* 86(5): 921-930.
- Denli M, Okan F, Doran F, Inal T C. 2005. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on carcass quality, serum lipid variables and histopathological changes of broiler chickens infected with aflatoxin B-1. *South African Journal of Animal Science*, 35(2), 109-116.
- Denli M, Okan F, Doran F. 2004. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the performance and serum variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxin B-1. *South African Journal of Animal Science*, 34, 97-103.
- Denli M, Okan F. 2006. Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B 1 in broiler diets. *South African Journal of Animal Science*, 36, 222-228.
- Devegowda G, Raju MVLN, Afzali N Swamy HVLN. 1998. Mycotoxin picture world wide: Novel solutions for their counteraction, in: LYONS, T.P. & JACQUES, K.A. (Eds) *Biotechnology in the Feed Industry*, pp. 241–255 (Kentucky, Alltech Inc.).
- Diaz DE, Hagler WM, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson KL, Jones FT, Whitlow LW. 2004. Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, 157, 233-241.
- Diaz DE, Hagler WM, Hopkins BA, Whitlow LW. 2003. Aflatoxin binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* 156(3): 223-226
- Edrington TS, Kubena LF, Harvey RB, Rottinghaus GE. 1997. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poultry Science*, 76(9), 1205-1211.
- Ellis RW, Clements M, Tibbetts A, Winfree R. 2000. Reduction of the bioavailability of 20 µg/kg aflatoxin in trout feed containing clay. *Aquaculture*, 183, 179-188.
- Eya JC, Parsons A, Haile I, Jagidi P. 2008. Effects of dietary zeolites (bentonite and mordenite) on the performance of juvenile rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. *Aust. J. Bas. Appl. Sci.* 2: 961–967.
- García-Casal MN, Ramírez J, Leets I, Pereira AC, Quiroga MF. 2009. Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp., *Sargassum* sp. and *Porphyra* sp.) in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 101(01), 79-85.
- Gargees MT, Shareef AM. 2009. Reducing liver aflatoxin M1 residues in chicks with mycofix plus 3.0 during aflatoxicosis. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23(3), 37-44.

- Gopinath R, Raj RP. 2009. Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius (1798) given aflatoxin B-1-incorporated diets. *Aquaculture Research*, 40(11), 1235-1242. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02207.x
- Gowda NKS, Ledoux DR, Rottinghaus GE, Bermudez AJ, Chent YC. 2008. Efficacy of Turmeric (*Curcuma longa*), Containing a Known Level of Curcumin, and a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Ameliorate the Adverse Effects of Aflatoxin in Broiler Chicks. *Poultry Science*, 87(6), 1125-1130. doi: 10.3382/ps.2007-00313.
- Gundidza M. Antifungal activity of essential oil from Artemisia. (1993). *Afra. Jacq. Cent. Afr. J. Med*; 39: 140–142.
- Ha YL, Storkson J, Pariza MW. 1990. Inhibition of Benzo(a)pyrene-induced Mouse Forestomach Neoplasia by Conjugated Dienoic Derivatives of Linoleic Acid. *Cancer Research* 50(4): 1097-1101.
- Ha YL, Storkson J, Pariza MW. 1990. Inhibition of Benzo(a)pyrene-induced Mouse Forestomach Neoplasia by Conjugated Dienoic Derivatives of Linoleic Acid. *Cancer Research* 50(4): 1097-1101.
- Hashim R, Mat-Saat NA, 1992. The utilization of seaweed meals as binding agents in pellet feeds for snakehead (*Channa striatus*) fry and their effects on growth. *Aquaculture*, 108, 299– 308.
- Hassan AM, Kenawy AM, Abbas TW Abdel-Wahhab MA 2010. Prevention of cytogenetic, histochemical and biochemical alterations in *Oreochromis niloticus* by dietary supplement of sorbent materials. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(8): 1890-1895.
- Ip C, Scimeca JA, Thompson H. 1995. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutrition and Cancer* 24(3): 241-247.
- Ji S-C, Takaoka O, Jeong G-S, Lee S-W, Ishimaru K, Seoka M, Takii K. 2007. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 73(1), 63-69. doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01302.x
- Josephs RD, Ulberth F, Van Egmond HP, Emons H. 2005. Aflatoxin M1 in milk powders: Processing, homogeneity and stability testing of certified reference materials. *Food Additives & Contaminants*, 22, 864-874.
- Kamalzadeh A, Hosseini A, Moradi S. 2009. Effects of yeast glucomannan on performance of broiler chickens. *Int. J. Agr. Biol*, 11, 49-53.
- Kang K, Park Y, Hwang H, Kim S, Lee J, Shin HC. 2003. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Archives of Pharmacal Research* 26(4): 286-293.
- Kim JS, Lee GD, Kwon JH, Yoon HS. 1993. Antioxidative effectiveness of ether extract in *Crataegus pinnatifida* Bunge and *Terminalia chebula* Rets. *J. Korean Agric. Chem. Soc*; 36: 154–157.
- Kiyothong K, Rowlinson P, Wanapat M, Khampa S. 2012. Effect of mycotoxin deactivator product supplementation on dairy cows. *Animal Production Science*, 52(9), 832-841.
- Kuilman MEM, Maas RFM, Fink-Gremmels J. 2000. Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1 in bovine hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 14, 321-327.

- Lacey J. 1989. Pre and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 11S–25S.
- Lillehoj EB, Cleveland TE, Bhatnagar D. 1991. Mycotoxins in feedstuffs: production in novel substrates. In: J. E. Smith and R. S. Henderson (Ed.) *Mycotoxins in Animal Foods*. pp 399-413. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lopes PRS, Pouey J, Enke DBS, Mallmann CA, Kich HA, Soquetta MB. 2009. Use of adsorbent in diets containing aflatoxin for silver catfish fingerlings. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 38(4), 589-595.
- Macháček M, Večerek V, Mas N, Suchý P, Straková E, Šerman V, Herzig I. 2010. Effect of the Feed Additive Clinoptilolite (ZeoFeed) on Nutrient Metabolism and Production Performance of Laying Hens. *Acta Veterinaria Brno*, 79(9), 29-34.
- Madhusudhanan N, Kavithalakshmi SN, Shanmugasundaram ERB, Shanmugasundaram KR. 2006. Aflatoxin B1-Induced DNA Damage in *Labeo rohita*: Protective Effect of an Antioxidant Supplement, Amrita Bindu. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(5), 473-479.
- Makol A, Torrecillas S, Fernández-Vaquero A, Robaina L, Montero D, Caballero MJ, Izquierdo M. 2009. Effect of conjugated linoleic acid on dietary lipids utilization, liver morphology and selected immune parameters in sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(2), 179-187. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.06.001>
- Manoharan N, Sampathkumar S, Dheebe B, Sheikabdulla S, Vinothprasanna G, Vinothkannan R, Shanmugasundaram A. 2008. Potential Hepatoprotective Effect of Aqueous Extract of *Gracilaria corticata* in AFB1 Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats. *Journal of Biological Sciences*, 8(8), 1352-1355.
- Mumpton FA, Fishman PH. 1977. The Application of Natural Zeolites in Animal Science and Aquaculture. *Journal of Animal Science*, 45(5), 1188-1203.
- Mumpton FA. 1999. La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3463-3470.
- Nešić V, Radmila R, Marinković D, Ksenija N, Lazarević M, Nešić S, Sanja A-K. 2012. Efficacy of t-2 toxin detoxifying agent in broiler chickens. *EFIKASNOST DETOKSIKUJUĆEG AGENSA KOD T-2 TOKSIKOZE BROJLERA*. 62(2/3): 171-182.
- Nguyen ML, Tanner CC. 1998. Ammonium removal from wastewaters using natural New Zealand zeolites. *N. Z. J. Agric. Res.* 41: 427-446.
- Nguyen QT, Ogle B, Pettersson H. 2008. Efficacy of bentonite clay in ameliorating aflatoxicosis in piglets fed aflatoxin contaminated diets. *Tropical Animal Health and Production*, 40, 649-656.
- Nieto-López M, Tapia-Salazar M, Ricque-Marie D, Villarreal-Cavazos D, Lemme A, Cruz-Suárez LE. 2011. Digestibility of different wheat products in White shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 319: 369–376.

- Pariza M, Ha Y. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: A new class of anticarcinogens. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy* 7(2-3): 169-171.
- Parlat SS, Özcan M, Oguz H. 2001. Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Research in Veterinary Science* 71(3): 207-211.
- Peña Rodríguez A. 2011. Uso potencial de la macroalga verde *Ulva clathrata* en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* [por] Alberto Peña Rodríguez (Doctoral dissertation, UANL).
- Peñaflorida VD, Golez NV. 1996. Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. 143:393-401.
- Pfost HB, Young LR. 1973. Effect of colloidal binders and other factors on pelleting. *Feedstuffs* 45: 21-22.
- Piva G, Galvano F, Pietri A, Piva A. 1995. Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutrition Research*, 15(5), 767-776. doi: 10.1016/0271-5317(95)00042-h
- Raju MV, Devegowda G. 2000. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*, 41, 640-650.
- Ramos AJ, Hernández E. 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by Means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 65(1-4), 197-206. doi: 10.1016/s0377-8401(96)01084-x
- Rangsaz N, Ahangaran MG. 2011. Evaluation of turmeric extract on performance indices impressed by induced aflatoxicosis in broiler chickens. *Toxicology & Industrial Health*, 27(10), 956-960. doi: 10.1177/0748233711401262.
- Ricque-Marie D, Peña-Rodríguez A, Tapia-Salazar M, Nieto Lopez MG, Villarreal-Cavazos D, Guajardo-Barbosa C, Cruz Suarez LE, Locateli ML. 2006. Effect of pré-prandial nutrient leaching in seawater and different binders on apparent amino acid digestibility coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *International Aquafeed* 9(5), 32-33.
- Rustum IYS. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food chemistry*, 59(1), 57-67.
- Sahu S, Das BK, Mishra BK, Pradhan J, Samal SK, Sarangi N. 2008. Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 39(16), 1720-1730. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02048.x
- Santin E, Paulillo AC, Krabbe EL, Alessi AC, Polveiro WJC, Maiorka A. 2005. Low level of aflatoxin in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeast as adsorbent of aflatoxin: *Archives of Veterinary Science*.
- Soonngam CAL, Hutacharoen R. 2007. Vermiculite and hydrated sodium calcium aluminosilicates as the agent of aflatoxin B1 absorption for black tiger shrimp diets. *Environ. Nat. Resour. J.* 5: 50-58.

- Staykov Y, Spring P, Denev S, Sweetman J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International* 15(2): 153-161
- Suppadit T, Jaturasitha S, Pripwai N. 2006. Utilization of hydrated sodium calcium aluminosilicate and vermiculite for aflatoxin B-1 adsorption in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) diets. *Journal of Applied Animal Research*, 29(2), 129-132.
- Suresh AV, Kumaraguru-vasagam KP, Nates S. 2011. Attractability and palatability of protein ingredients of aquatic and terrestrial animal origin, and their practical value for blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, fed diets formulated with high levels of poultry byproduct meal. *Aquaculture* 319: 132–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.039>
- Swanson BG. 1987. *Acta Horticulturae* 207: 49-61.
- Tapia-Salazar M, García-Pérez OD, Velásquez-Soto RA, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos D, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2012. Growth, feed intake, survival, and histological response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing grains naturally contaminated with aflatoxin. *Cienc. Mar.* 38: 491–504.
- Thammakiti S, Suphantharika M, Phaesuwan T, Verduyn C. 2004. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science & Technology* 39(1): 21-29
- Thomas M, van Vliet T, van der Poel AFB. 1998. Physical quality of pelleted animal feed 3: Contribution of feedstuff components. *Anim. Feed Sci. Tech.* 70: 59–78.
- Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, Montero D, Robaina L, Real F, Sweetman J, Tort L, Izquierdo MS. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology* 23(5): 969-981.
- Valente LMP, Bandarra NM, Figueiredo-Silva AC, Rema P, Vaz-Pires P, Martins S, Nunes ML. 2007. Conjugated linoleic acid in diets for large-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, chemical composition and sensory attributes. *British Journal of Nutrition*, 97(2), 289-297. doi: 10.1017/s000711450733729x
- Vaught R, Brye KR, Miller DM. 2006. Relationships among coefficient of linear extensibility and clay fractions in expansive, stoney soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70: 1983–1990.
- Widstrom NW. 1992. Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. pp. 23-58 en: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar D et al., editores. Marcel Dekker, New York.
- Williams DE, Buhler DR. 1983. Purified form of cytochrome-p-450 from rainbow-trout with high-activity toward conversion of aflatoxin-b1 to aflatoxin-B1-2,3-epoxide. *Cancer Research*, 43, 4752-4756.
- Wiseman MO, Price RL, Lightner DV, Williams RR. 1982. Toxicity of Aflatoxin B1 to Penaeid Shrimp. *Applied & Environmental Microbiology*, 44(6), 1479.

- Wolzack A, Pearson AM, Coleman TH, Pestka JJ, Gray JI, Chen C. 1986. Aflatoxin carryover and clearance from tissues of laying hens. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 37-41.
- Wolzack A, Pearson AM, Coleman TH, Pestka JJ, Gray JI. 1985. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food and Chemical Toxicology*, 23, 1057-1061.
- Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. 2001. Luteolin Inhibits an Endotoxin-Stimulated Phosphorylation Cascade and Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(1), 181-187.
- Zechner-Krpan V, Petravić-Tominac V, Panjkota-Krbavčić I, Grba S, Berković K. 2009. Potential Application of Yeast β -Glucans in Food Industry. *Agriculturae Conspectus Scientifici* cus. Vol. 74 277-282.

Uso Eficiente de los Recursos Pesqueros y Acuícolas: Extracción de Moléculas Bioactivas de los Subproductos para su Empleo en el Sector Farmacéutico

Elpidio García¹, Carlos Rosas², Sergio Rodríguez Morales*³

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. ²Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, UNAM. ³Laboratorio de Productos Naturales Marinos, Unidad de Química en Sisal, Facultad de Química, UNAM. E-mail: marvinmx@yahoo.com

Resumen

De la producción pesquera que se captura (70 %) y se cultiva (30%) aproximadamente el 25 % se desecha, ya sea al mar o en un basurero. Un caso extremo es el fileteo, solo 40 % del organismo cultivado/capturado se consume y el 60% se desecha (aletas, cabeza, esqueleto, vísceras, etc). Aunque existen desarrollos tecnológicos para utilizar estos subproductos: surimi, fertilizantes, alimentos para animales, la mayoría son desarrollos de productos con un valor más bajo que el original. Una aplicación nueva e interesante, es la extracción de moléculas de alto valor agregado con un uso potencial en el área farmacéutica. En el caso de la acuicultura y pequería del pulpo rojo de Yucatán, de los subproductos (10%) se han aislado polipéptidos con actividad neurotóxica, en los cuales se determinará su potencial farmacológico en la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: *moléculas bioactivas, subproductos*

Introducción

En México, actualmente la población costera asciende a casi 25 % de la población total y posee una tasa de crecimiento cercana al 2 % anual, siendo su principal actividad económica la pesca, o alguna actividad relacionada con ella. Sin embargo, de acuerdo al último censo del INEGI, el 60 % de las pesquerías económicamente importantes están en su máximo potencial, mientras que un 20% se encuentran en deterioro. Por esto, es importante empezar a encontrar una alternativa que ayude al desarrollo sustentable de las zonas costeras de México. Una alternativa es la acuicultura, la cual genera el 30 % del alimento marino que se consume en el mundo.

Ahora bien, no todo lo que se pesca o se cultiva es utilizado, algunas estimaciones recientes revelaron que los desechos de la pesca en el mundo superan los 20 millones de toneladas equivalentes al 25% de la captura (FAOSTAT FAO, 2001).

Por ejemplo, cuando se producen filetes, generalmente se desperdicia un 60% del pescado utilizado. Además, estos desperdicios (entre los que se encuentran la cabeza, la piel, las glándulas, las vísceras, etc.), casi siempre son tirados al mar, lo cual genera problemas de contaminación si se desechan cerca de la costa (Blanco *et. al.* 2007).

En el caso de camarón, que generalmente se exporta congelado sin exoesqueleto, cerca del 45-48% en peso fresco se desecha como desperdicio, dependiendo de la especie (Kandra *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, es importante observar que se utilizaron recursos para la captura o cultivo de los organismos; entre ellos combustibles, horas-hombre, alimento; y que gran parte del recurso se está tirando sin aprovechar. Por lo tanto, existe un gran potencial para convertir y utilizar estos subproductos.

Muchos de estos subproductos de los recursos pesqueros son transformados para producir productos como el aceite, harina y ensilado de pescado, fertilizantes y alimentos para mascotas (Kim, S.K. and Mendis, E., 2006). Sin embargo, en un inicio los productos recuperados eran vendidos en un valor menor al que les dio origen.

No obstante, de estos mismos desechos se han desarrollado productos de valor agregado con aplicaciones interesantes:

a) Industria de la moda, principalmente se curte la piel de peces (salmón, percha, entre otros) para la fabricación de zapatos, tenis, carteras, y ropa (ver sitio atlantic leather: <http://www.atlanticleather.is/en/products>)(Kristbergsson, K. and Arason, S, 2005).

b) Cosmética, investigación en la actividad de enzimas psicrófilas del bacalao llevaron al desarrollo del sistema antienvjecimiento PENZYME, que se comercializa como cosmético en Europa.

c) Biofarmacéutica, un ejemplo fascinante es la adición de ácido docosahexaenoico (DHA) en la formulación de infantes, ya que se ha demostrado su papel central en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, de la visión y del sistema reproductivo, (Kim., S.K. and Mendis, E., 2006) originalmente el DHA era uno de los ácidos poliinsaturados presentes en el aceite de hígado de bacalao (emulsión de Scott), y que mediante técnicas de enriquecimiento, y luego de aislamiento, llevo a la generación del DHA en polvo. (Nandakishore, 2013).

Los ejemplos anteriores son sólo una muestra de casos exitosos, en la literatura se encuentran excelentes trabajos donde se busca la extracción de compuestos con alguna actividad farmacológica de los subproductos de los recursos pesqueros (Je *et al.*, 2005 and Blunt, 2008)). Estos compuesto bioactivos pueden ser extraídos y purificados con tecnologías que van de simples a complejas, dependiendo de su estructura química: péptidos, oligosacáridos, ácidos grasos, enzimas, minerales solubles en agua y biopolímeros para su posible aplicación biotecnológica y farmacéutica.

II. Pulpo rojo de Yucatán como modelo

El pulpo rojo (*Octopus maya*) es un molusco cefalópodo marino y carnívoro y es endémico de la península de Yucatán. Tiene una importancia económica importante, ya que es la primera pesquería del estado con capturas promedio de 12,000 ton (1995-2005) (CONAPESCA e ITESM, 2004), y una derrama de 500 millones de pesos; además, se ubica en tercer lugar nacional en importancia, después del camarón y el atún (INEGI, 2006).

En el caso del pulpo rojo de Yucatán, se utiliza el 90 % de lo capturado, sin embargo, el 10% (aproximadamente 1,200 Ton de vísceras) es lanzado al mar o confinado en un basurero. Dentro de estas vísceras, se encuentran las glándulas salivales posteriores (GSP) donde se produce la saliva, que se ha demostrado ser vital en la mayoría de los octópodos, ya que muchos de ellos la utilizan para paralizar y matar a sus presas (Udheim, *et al.*, 2010). De otras especies de cefalópodos, (Nara *et al.*, 2011) se han aislado moléculas de las GSP para su empleo como herramientas farmacológicas o medicamentos, por ejemplo la eledoisina (polipéptido aislado del pulpo *Eledona moschata*), se ha utilizado como antihipertensivo o en oftalmología como agente lacrimógeno (Erspamer 1962).

La eledoisina, pertenece a un grupo de neuropéptidos conocidos como taquiquininas: neurotransmisores con actividad moduladora sobre el sistema nervioso central y el sistema nervioso entérico. Una actividad novedosa de las taquiquininas es su integración en la placa β -amiloide, induciendo su polimerización y disminuyendo de esta forma la toxicidad del oligómero que desencadena la enfermedad de Alzheimer (Pradeep & M. Samir 2012).

II. Obtención de compuestos bioactivos de los subproductos de la acuicultura del Pulpo rojo de Yucatán (*Octopus maya*)

Octopus maya es un pulpo de gran tamaño, que habita en la plataforma continental, primordialmente en aguas someras cercanas a la costa. Es un octópodo de hábitos bentónicos, que no presenta estadio larval y presenta un desarrollo embrionario directo;¹⁶

García *et al.* 2013. Uso Eficiente de los Recursos Pesqueros y Acuícolas: Extracción de Moléculas Bioactivas de los Subproductos para su Empleo en el Sector Farmacéutico. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 224-237.

por lo que es un buen candidato para desarrollar su acuicultura. En la Unidad Académica Sisal, ya existe todo un estudio biotecnológico para el cultivo de *O. maya*, que ha dado frutos interesantes (Vázquez 2013).

De las investigaciones que se llevaron a cabo en red académica del pulpo, se recolectaron en un periodo de seis meses cerca de 60 pares de GSP. Para ello, aproximadamente 60 pulpos se anestesiaron con agua helada y aeración, y se procedió a su disección para retirar a las glándulas salivales (Fig. 1 a, b). Las glándulas se liofilizaron, molieron y se maceraron con agua para extraer la saliva.



Figura 1. Obtención de las GSP mediante disección. a) Grupo de trabajo del Dr. Carlos Rosas, colaborador del proyecto. b) GSP expuestas (flecha)

Para observar el efecto de este extracto, se utilizó el modelo de nuerotoxicidad en cangrejo playero (*Ocypode quadrata*) (Sánchez and Cruz, 2006), se preparó una concentración de 4 mg/mL y se le inyectaron 100 uL en la tercer apéndice caminador de un cangrejo de 20 g. Los resultados demostraron que el extracto presento la actividad esperada, el cangrejo se paraliza en 50 s, y es notorio, ya que disminuye su actividad y baja sus quelípedos (quelas o tenazas) y en un minuto empieza a temblar, sus extremidades se relajan distendiéndose, y muere a los 10 minutos (figura 2). Es importante señalar que el extracto es una suma de varios efectos: el efecto de la enzimas (proteasas principalmente) y de los compuestos que causan la parálisis y el efecto neurotóxico.



a)



b)



c)



d)

Figura 2. Efecto del extracto crudo de las GSP. A) Colecta de cangrejos fantasma para la determinación del efecto neurotóxico. B) Inyección en la tercer apéndice caminador del crustáceo. C) Control positivo. Es notoria la posición de ataque del cangrejo, junto con las quelas. D) Efecto neurotóxico del extracto de GSP (13.5 mg de extracto/ 100 μ L solución salina), se puede observar la relajación de los músculos de los apéndices, así como la poca coordinación del crustáceo.

Considerando que la mayoría de las proteasas reportadas en la saliva de otros cefalópodos (entre ellos *O. vulgaris*) tienen un rango de 20-30 KDa, y que el efecto neurotóxico está asociado con polipéptidos, se decidió emplear una membrana que separe por peso molecular. Así, el extracto general se separó con una membrana Amicon (Millipore, Inc.) con 3KDa de corte. La fracción con peso menor a 3 KDa se liofilizó para remover el exceso de agua, y se reconstituyó en 500 μ L de SSI. En cuanto a la fracción mayor a 3 KDa, durante la separación con la membrana esta se concentra en 500 μ L, por lo que su preparación es directa.

García *et al.* 2013. Uso Eficiente de los Recursos Pesqueros y Acuícolas: Extracción de Moléculas Bioactivas de los Subproductos para su Empleo en el Sector Farmacéutico. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 224-237.

La evaluación de los extractos separados en el cangrejo fantasma reveló que la inyección del extracto menor a 3 KDa, presentó el efecto neurotóxico: movimientos rápidos de los ojos, relajación de todas sus extremidades y temblores. Es importante señalar que el efecto se manifiesta en los primeros 50 segundos, y el cangrejo se mantiene sedado por espacio de 2 horas, regresando a su estado original. El efecto del extracto con peso mayor a 3 KDa, solo provocó la muerte del cangrejo, sin presentar el efecto neurotóxico, lo cual era esperado, dado que este extracto contiene las enzimas digestivas, las cuales tienen un peso molecular mayor a 3 KDa.

III. Obtención de las glándulas salivales en condiciones de los subproductos de la pesquería del pulpo.

Desde su etapa inicial, se considero conseguir las GSP de la pesquería del pulpo para tener una mayor cantidad. Con la ayuda de la Cooperativa "Tigres del Mar" se logro la obtención de cerca de 2 Kg de GSP (figura 3), las cuales fueron tratadas de manera análoga a las GSP en condiciones de acuacultura.



a)



b)

Figura 3. Colecta de GSP mediante los desechos de la pesquería del Pulpo rojo. A) Bote con los subproductos de la pesca del pulpo. B) Colecta de las GSP de los pulpos eviscerados en el puerto de Abrigo de Sisal.

Sin embargo, la mayoría de las GSP vienen contaminadas con la tinta del pulpo, y por otra parte, al contener enzimas digestivas (proteasas y quitinasas) (Undheim *et al.*, 2010) muy probablemente el tejido y las proteínas se encuentren degradados, por lo que se procedió a la verificar que la actividad se mantenía, y compararla con las GSP en condiciones de acuicultura.

Después de someter a las GSP al proceso de extracción, es evidente el grado de degradación del tejido, ya que es necesaria una mayor cantidad de agua para homogenizar (100 g GSP/ 5 L agua) y diluir la solución de extracción, de otra forma se forma una solución muy viscosa (mucoide) que es difícil de trabajar. Estudios similares en otros cefalópodos utilizan GSP frescas las cuales son homogenizadas con buffers, (Grisley and Boyle 1990) los cuales no describen si las GSP se aglutinan.

La evaluación de la actividad *in vivo* de los extractos en el bioensayo neurotóxico mostró que existe actividad equiparable de los extractos obtenidos mediante los subproductos de la pesquería del pulpo rojo, con respecto a las glándulas conseguidas en condiciones de acuicultura.

Con los extractos generados en gran cantidad, se procedió a una búsqueda parcial de la identidad de la(s) molécula(s) causantes de la actividad, así que el extracto se sometió a prefraccionamiento mediante Extracción de Fase Sólida (SPE) utilizando cartuchos de fase reversa C18U, y de intercambio catiónico (phenomenex, Gigatube, 1g de fase) para separar los componentes activos siguiendo un esquema de separación biodirigida, (Beutler 2009), es decir, se separan los extractos, y cada fracción obtenida es sometida a la prueba de actividad, aquella fracción o fracciones que resulten activas se someten a una nueva separación. En las tablas 1 y 2 se presentan los resultados obtenidos en la separación. En la figura 4 y 5 se presentan los cromatogramas obtenidos de la fracción por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Tabla 1. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho Strata C18-U de la fracción neurotóxica (F1.2, 114.5 mg)

Fracción	Elución correspondiente	Cantidad Obtenida (mg)
F2.1	100 % H ₂ O	41.2
F2.2	90/10 % H ₂ O/AcCN	12.8
F2.3	80/20 % H ₂ O/AcCN	4.7
F2.4	50/50 % H ₂ O/AcCN	-

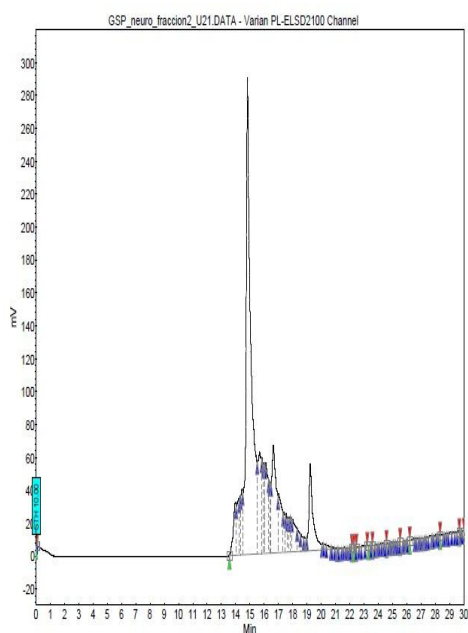


Figura 4. Cromatograma de la fracción F2.2 en CLAR analítico. Se muestra solo un pico principal. Sistema CLAR Varian 211 (Varian Inc. USA), ELSD Ice 2100. Júpiter (C12, RP, 250 X 4.6 mm, 5 μ m) 0.7% TFA: AcCN, 0 a 50 % AcCN grad. en 30 min. ELSD cond. Neb. temp=40°C Evap. Temp. =70 °C, N₂ flujo= 1.0 mL/min; 20 μ L de extracto (2.0 mg/mL).

Tabla 2. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho Strata SCX
(catiónico fuerte (F1.2, 50 mg))

racción	Elución correspondiente	Cantidad Obtenida (mg)
F2_2_1	H2O:TFA 90:10	12.6
F2_2_2	HCl 0.1 N en H2O	7.5
F2_2_3	HCl 0.1 N en MeOH	7.2
F2_2_4	1% NH4OH en MeOH	3.3
F2_2_5	2% NH4OH en MeOH	1.6

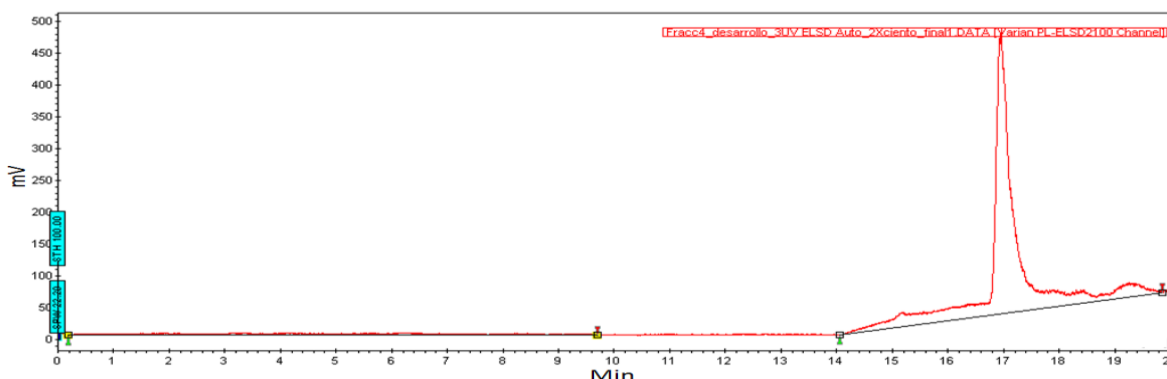
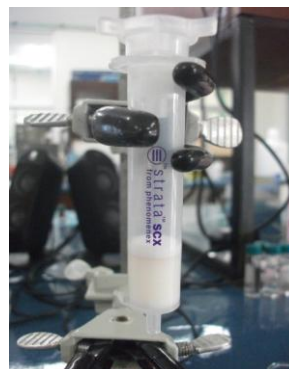


Figura 5. Cromatograma de la F2_2_5 en CLAR analítico se muestra solo una señal principal. *Sistema HPLC*: Sistema Binario Varian 211 (Varian Inc. USA), Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD, ELSD en inglés). *Condiciones de separación*: Columna LUNA (C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, 5 μ m de partícula Phenomenex, INC. USA), Fase móvil AcCN: Agua, en gradiente de 0-18 % acetonitrilo en un tiempo de 20 minutos de corrida. Detección, ELSD, Temp. nebulización=40°C Temp. evaporación=70 °C, flujo de nitrógeno= 1.0 mL/min; U.V. a 215 nm. Se inyectaron 25 μ l de muestra (1mg/mL).

Para determinar los aminoácidos constituyentes de la señal principal colectada de la fracción (F2_2_5), se realizó la hidrólisis ácida y básica (1.0 mg de la fracción F2_2_5) a

García *et al.* 2013. Uso Eficiente de los Recursos Pesqueros y Acuícolas: Extracción de Moléculas Bioactivas de los Subproductos para su Empleo en el Sector Farmacéutico. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 224-237.

100 °C por 18h y 7h respectivamente. La muestra se limpió por filtración, se derivatizó y se inyectó en el sistema CLAR de Waters. El aminograma se presenta en la Figura 6.

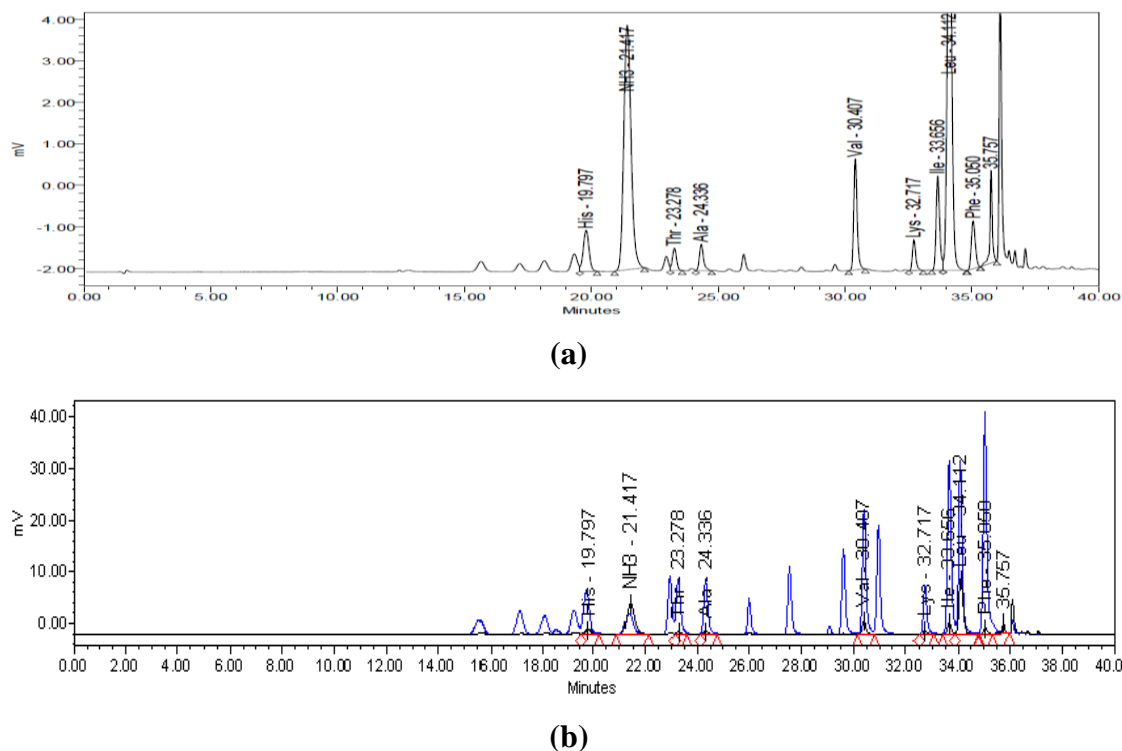


Figura 6. **Aminogramas de la señal principal obtenida de la fracción F2_2_5.**(a) aminograma de la señal principal. (b) integración del aminograma de la señal principal (negro), con el estándar de aminoácidos (azul) de 2.5Mm de 18 aminoácidos, y 1.25 de cisteína, y Acido 2-aminobutírico, AABA, 2.5Mm) en azul. *Sistema HPLC:* Sistema binario Waters 1525 (Waters inc. USA), detector de fluorescencia de onda múltiple Waters 2475, $\lambda_{exc}=250\text{nm}$ y $\lambda_{emss}=395\text{nm}$. *Condiciones de separación:* columna AccQ-TAG (3.9 x 150mm, 4 μm de partícula Waters Inc. USA), fase móvil A (Eluyente A: agua, 1:10 v/v): fase móvil B (acetonitrilo: agua, 60:40 v/v) en un tiempo de 40 minutos de corrida. Se inyectaron 25 μL de muestra (1mg/mL).

En el aminograma es evidente que el pico mayoritario es el NH₃ (amina), que puede tener dos orígenes: alguna compuesto aminado presente en la muestra, sin embargo, en las condiciones de corrida es casi improbable, o bien que la muestra está aminada. En general esta modificación post-transduccional evita la hidrólisis por enzimas exoproteasas, condiciones que están presentes en la saliva del pulpo, ya que contiene proteasas (tripsina y quimotripsina).

Inclusive la eledoisina es un polipéptido aminado, siendo este grupo necesario para la actividad biológica sobre receptores de taquiquinina. Los aminoácidos presentes en la muestra son: glicina, treonina, alanina, fenilalanina, leucina, lisina e isoleucina. Este resultado es interesante, dado que en la literatura no hay reportada alguna taquiquinina que contenga a la treonina, por lo que muy probablemente se trate de una nueva taquiquinina. Pero será necesario realizar más experimentos para determinar la estructura de este nuevo polipéptido, principalmente secuenciación mediante la técnica de degradación de Edman, o bien por LC-MS.

Cuando se evaluó esta última fracción (F2_2_5) en el bioensayo de cangrejo playero (4 mg/mL, 100 uL de inyección), se encontró que la actividad relajante del nuevo péptido se presenta en 10 segundos y se mantiene por dos horas.

IV.- Conclusiones

Después del estudio realizado es factible obtener moléculas bioactivas de los subproductos de los recursos pesqueros, ya que ambos extractos generados con GSP de acuicultura o en condiciones de pesquería son activos en el modelo neurotóxico de cangrejo playero.

El efecto neurotóxico está relacionado moléculas pequeñas (Peso molecular menor a 3 KDa), mientras que el efecto metabólico es asociado a proteasas de alto peso moléculas (mayor a 3 KDa). Ahora sabemos que el extracto neurotóxico tiene tres componentes de la actividad: paraliza, relaja los apéndices caminadores y produce descoordinación al cangrejo, y que estos efectos son causados por un oligopéptido de 7 aminoácidos que se encuentra amidado.

Bibliografía

- INEGI, *Boletín de estadísticas vitales*. **2006**.
- FAOSTAT, FAO statistical databases, fisheries data (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Available from internet: <http://www.fao.org>
<http://www.fao.org>.
- Blanco, M.; Sotelo, C.; Chapela, M.; Pérez Martín, R. Toward sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Food and Science Technology*. **2007**, 18, 29-36.
- Kandra, P.; Challa, MM.; Jyothi, HKP. Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2012**, 93(1), 17-29.
- Kim, S. K. and Mendis, E., Bioactive compounds from marine processing by-products—a review, *Food Research International*, **2006**, 39, 383.
- Kristbergsson, K.; Arason, S. Utilization of by-products in the fish industry. *Department of Food Science and Human Nutrition*. **2005**, 233-258.
- Nandakishore Jeevanrao DURAGKAR, Docosahexaenoic acid (DHA) as polyunsaturated free fatty acid in its directly compressible powder form and method of isolation thereof. *Patente WO2012153345A1*, fecha publicación: 13/mayo/2013.
- Je, J., Park, P. J., and Kim, S.-K., Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolyzate, *Food Research International*, **2005**, 38, 45.
- Jung, W. K. *et al.*, Angiotensin-I lowering enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats, *Food Chemistry* **2006**, 94, 26.
- Blunt, John; Munro, Murray H. G. "Dictionary of Marine Natural Products With CD-ROM" 1st Edition Boca Raton CRC Press, **2008**, Chapter 1-4.
- CONAPESCA e ITESM. Características generales, aspectos oceánológicos y geográficos del pulpo. SAGARPA. **2004**. 175 pp.
- Undheim, EAB; Georgieva, DN; Thoen, HH. "Venom on ice: First insights into Antarctic octopus venoms" *Toxicon* : **2010**, 56 (6), 897-913.
- Nara, R.; Pillai, D.; Joseph, S.; Gomathi, P.; Senan, P.; Sherief, P.M. Cephalopod research and bioactive substances. *Indian journal of Geo-marine Sciences*, **2011**, 40(1), 13-27.
- Erspamer, V. Erspamer, G.V Pharmacological actions of an eledoisin on extravascular smooth muscle. *B. J. Pharmacol.* **1962**, 19, 337.
- Pradeep, Singh; Maji, Samir "Amyloid-like fibril formation by tachykinin neuropeptides and its relevance to amyloid B-protein Aggregation and toxicity" *Cell Biochemical Biophysic*, **2012**, 64: 29-44.
- Voss, G.L.; Solis-Ramiréz, M.J. *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche. *Bulletin of Marine Science*. **1966**, 16, 615-625.
- Vázquez Quiroz, Sandra. *Octopus maya*, tras una tecnología de cultivo. *El faro: la luz de la ciencia*, CIC, UNAM, **2013**, XII, No. 133, pag6-7.

- Sanchez-Rodriguez, J; Cruz-Vazquez, K. "Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860) " *Archives of Toxicology* **2006**, *80*(7), 436-441
- Grisley, M.S.; Boyle, PR. Chitinase, a new enzyme in octopus saliva. *Comp Biochem. Physiol.* **1990**, *95B* (2), 311-316.
- Beutler J.. Natural products as a foundation for drug discovery. *Current protocols in pharmacology.* **2009**, 46: 1-30.

Avances en el Estudio de la Nutrición Larvaria, Expresión y Actividad de Enzimas Digestivas en Totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert 1890) una Especie con Potencial de maricultivo en Baja California

Mario. A. Galaviz^{a*}, Lus. M. López^a, Alejandra García Gasca^b, Enric Gisbert^c,
Alfonso Álvarez^d Gerardo Sandoval^a y Conal .D. True^a.

^a Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas. PO Box 76, Ensenada B.C. 22860, México. E-mail: mgalaviz@uabc.edu.mx

^b Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán, Avenida Sábalo Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa 82010, México

^c Institut de Recercai Tecnologia Agroalimentàries. IRTA Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

^d Laboratorio de Acuicultura Tropical DACBIOL-UJAT, Carr. Vhsa-Cárdenas Km 0.5, Bosques de Saloya, Villahermosa, Tabasco, México.

Resumen

El conocimiento de la fisiología digestiva en larvas de peces marinos es esencial para establecer protocolos de alimentación apropiados para cada etapa de cultivo, y así mismo para desarrollar dietas formuladas de acuerdo a la capacidad digestiva de las larvas en desarrollo. En el presente estudio, el sistema digestivo de totoaba fue caracterizado durante su ontogenia utilizando técnicas bioquímicas y moleculares con el fin de entender la capacidad digestiva de esta especie. La expresión y actividad de tripsina y quimiotripsina fueron observadas en el día pos-eclosión, dpe 1, con incrementos al inicio de la primera alimentación exógena y durante el desarrollo del tracto digestivo. Un incremento significativo en la expresión de pepsina fue detectado en el dpe 16, mientras que el incremento en el nivel de actividad fue detectado al dpe 24, lo cual coincidió con el desarrollo del estómago. Un segundo incremento en el nivel de expresión de pepsina fue detectado en el dpe 35, seguido por un pico de actividad en el dpe 40, coincidiendo con el cambio de alimento vivo a dieta formulada.

Palabras clave: *enzimas, totoaba, larvas.*

1. Introducción

En la acuicultura de peces marinos, uno de los puntos más importantes es la alimentación, especialmente en la etapa larvaria, ya que los cambios anatómicos y fisiológicos durante su desarrollo son los factores que definen sus requerimientos nutricionales. En el medio natural, una vez que el saco vitelino es absorbido, los peces toman su alimento del plancton (alimento vivo) como dieta inicial. El mayor constituyente nutricional del alimento vivo es la proteína, la capacidad proteolítica para la digestión del bolo alimenticio puede ser considerada como la más importante en los estudios nutricionales con larvas de peces (García-Ortega, 2000).

Los esfuerzos de investigación se han dirigido a determinar las condiciones que incrementen la supervivencia y crecimiento de las larvas; estos esfuerzos incluyen estudios de fisiología digestiva con el objeto de planificar mejor las estrategias de alimentación y estos estudios son de suma importancia, ya que de ello depende el éxito del cultivo. Se ha probado que el nivel de actividad de algunas enzimas digestivas puede ser un buen indicador del estado nutricional, la presencia de ciertas enzimas es relevante para establecer el momento óptimo para el destete (Uebershar, 1993) o bien para evaluar el estado general del cultivo.

Una de las razones por las cuales la supervivencia de las larvas de peces marinos en cultivo es muy baja, se debe al desconocimiento de su capacidad digestiva, ya que en muchos de los casos, no se toman en cuenta las transformaciones morfológicas internas más importantes, como la formación y acomodamiento progresivo de los principales órganos y el incremento en su funcionalidad, las cuales normalmente ocurren durante el primer mes de desarrollo (Alarcon, 1997 y Kurokawa *et al.*, 1998). La gran mayoría de los peces marinos al momento de la eclosión carecen de un estómago funcional y su tracto gastrointestinal se desarrolla de forma progresiva (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Diversos autores han realizado estudios en varias especies de peces marinos demostrando que el estómago, el páncreas y el intestino no se encuentran completamente desarrollados y

maduros al momento de la eclosión y que estos órganos presentan algunos cambios morfológicos y funcionales durante el desarrollo larval que difieren dependiendo de la edad y el estado nutricional. Así mismo, estos estudios han establecido las bases para describir y determinar la capacidad digestiva de las distintas especies (Douglas *et al.*, 1999; Zambonino-Infante y Cahu, 1994, 2001; Gisbert *et al.*, 2004, 2008; Murray *et al.*, 2004, 2006; Chen *et al.*, 2006; García-Gasca *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2006, 2008, 2010). Las enzimas digestivas son secretadas en diversos órganos, incluyendo: el estómago, el páncreas, la vesícula biliar y las paredes del intestino. Sin embargo también se ha demostrado que un porcentaje bajo de las enzimas (1 %) pueden provenir de las presas vivas o de las bacterias que conforman la flora intestinal (Lauff y Hoffer, 1984; Kurokawa *et al.*, 1998). Particular atención la ha recibido el tejido pancreático ya que sintetiza y secreta en el lumen del intestino una cantidad de enzimas (proteasas, lipasas y carbohidrasas pancreáticas) en forma de precursores inactivos (zimógenos). Entre las proteasas más importantes se pueden mencionar a la tripsina, la quimiotripsina y la elastasa. Así mismo, entre las lipasas se destacan la lipasa neutra dependiente de sales biliares y las fosfolipasas. Por su parte, entre las carbohidrasas más primordiales se encuentran las amilasas y las maltasas (Kolkovski y Sakakura. 2007).

El hígado es uno de los primeros órganos en desarrollarse y está involucrado en la absorción del saco vitelino. El páncreas y la vesícula biliar, están relacionados con la digestión de proteínas, lípidos y carbohidratos, mismos que fueron observados poco tiempo después, sin embargo son completamente funcionales al momento de la primera alimentación exógena (Lauff y Hoffer, 1984; Kurokawa *et al.*, 1998). Cuando el estómago está completamente desarrollado y funcional, la digestión de proteínas de las larvas de peces inicia en un medio ácido (HCl) el cual activa a la enzima pepsina que es la enzima principal en el estómago. En contraste con aquellas larvas de peces marinos que no secretan ácido clorhídrico y por lo tanto ni pepsinógeno para digerir las proteínas, la digestión se realiza esencialmente con las enzimas pancreáticas e intestinales activas en un medio alcalino (Tanaka 1973; Tanaka *et al.*, 1976, Rønnestad, *et al.*, 2003). Por otro lado, en el intestino la digestión se lleva a cabo a través de procesos tanto intracelulares como extracelulares (Smith, 1989). Las enzimas extracelulares que participan en estos procesos

pueden estar localizadas en el lumen intestinal, por ejemplo, enzimas secretadas por el páncreas como la tripsina y la quimotripsina, así mismo algunas están adheridas a la membrana del epitelio intestinal (borde en cepillo) como lo son la aminopeptidasa y la fosfatasa alcalina. En el caso de las intracelulares el único grupo descrito corresponde a las catepsinas. Watanabe (1984) observó la absorción de proteínas (peroxidasa del rábano) por medio de pinocitosis y su posterior digestión intraenterocítica por medio de lisosomas, lo cual resultó que la digestión intracelular se realiza principalmente en la región posterior del intestino. Este mecanismo de digestión es más importante en larvas que en peces juveniles o adultos, y se cree que la digestión intracelular compensa la baja digestión extracelular exhibida durante la etapa larvaria (Watanabe, 1984; Cahu *et al.*, 1995).

En los últimos años en México se ha incrementado considerablemente el interés del cultivo de peces marinos de importancia comercial y con ello el estudio de su nutrición. Especies como totoaba (*Totoaba macdonaldi*), corvina blanca (*Atractoscion nobilis*), lenguado (*Paralichthys californicus*), jurel aleta amarilla (*Seriola dorsalis*), cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), botete diana (*Sphoeroides annulatus*), pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) están siendo estudiadas con diferentes grados de avances (Civera-Cerecedo *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2003; Gisbert *et al.*, 2004; García-Ortega *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009; Galaviz *et al.*, 2011). El grado de avance difiere entre especies, sin embargo, en la actualidad los cultivos comerciales de peces marinos en México se limitan principalmente a la engorda en jaulas de organismos capturados en medio natural debido a la incapacidad de lograr su cultivo larvario (García-Ortega, 2002; y Avilés-Quevedo, 2005). Los problemas en la larvicultura de peces marinos principalmente están relacionados con los aspectos de nutrición y alimentación.

Recientemente se han realizado estudios en especies con potencial de cultivo en México sobre desarrollo del sistema digestivo, actividad enzimática, requerimientos de proteínas, lípidos y carbohidratos, en especies como *A. nobilis* (Valverde, 2002; López *et al.*, 2006, 2009; Durazo *et al.*, 2010), *P. californicus* (Gisbert *et al.*, 2004; Álvarez-González *et al.*, 2006; Zacarias-Zoto *et al.*, 2006), *S. annulatus* (García-Ortega *et al.*, 2002; García-Gasca *et al.*, 2006; García-Ortega, 2009), *L. guttatus* (García-Ortega *et al.*, 2009; Abdo de la Parra *et al.*, 2006; Galaviz, *et al.* 2013).

al., 2010) y *P. maculatofasciatus* (Peña *et al*, 2003; Álvarez-González *et al*, 2008, y 2010). Se ha logrado un gran avance en estudios sobre fisiología digestiva en etapas larvarias y ampliado el conocimiento sobre los requerimientos nutricionales en etapas de engorda (juveniles y adultos). A pesar de ello, se han presentado diversas dificultades relacionadas con el desconocimiento exacto de las condiciones ambientales óptimas para el cultivo, falta de información acerca de los hábitos alimenticios y requerimientos nutricionales. Los cambios ontogenéticos y del crecimiento larval son información vital para poder llevar a cabo con éxito dicha actividad y mantener un estado nutricional óptimo hasta la etapa de juvenil y/o adulto. En México existen especies de peces marinos con oportunidad de ser explotadas para su cultivo con fines de repoblamiento y comercial, entre la que destaca *Totoaba macdonaldi*.

La totoaba se encontraba clasificada en el género *Cynoscion*, género en el que la totoaba fuera la especie que alcanzaba la mayor talla dentro de su familia (Sciaenidae) con tallas cercanas a los dos metros de longitud (Berdegué, 1955) y pesos superiores a los 135 kg (Cannon, 1966). Actualmente se encuentra clasificada como *Totoaba macdonaldi*, en un género y especie única para esta familia y es un pez endémico del Golfo de California (Cisneros-Mata *et al*, 1997). A partir de 1975 ha sido incluida en la lista de especies en peligro de extinción (CITES, 2005). A principios de 1900 se exportaba su vejiga gaseosa a oriente para ser utilizado como principal ingrediente en una sopa gourmet (Berdegué 1955). En 1942 la captura de esta especie alcanzó un máximo de 2,261 toneladas. Sin importar el incremento en el esfuerzo pesquero, la producción anual fluctuó hasta llegar a capturar sólo 58 toneladas en 1975 (Flanagan y Hendrickson, 1976).

Aunque se han postulado diversas causas probables que afectan a las poblaciones de este importante recurso, la información que existe sobre la totoaba sigue siendo muy limitada. Se han llevado a cabo estudios sobre su desarrollo embrionario (Morales-Ortiz, 1999), desarrollo larval (Sandoval-Garibaldi, 2001) y requerimientos nutricionales. En éstos se ha investigado el efecto de diferentes niveles de ácidos grasos, dietas isoprotéicas, niveles de alimentación, etc. (López *et al*., 2006; Solórzano-Salazar, 2006 y Vizcaíno-Pérez, 2008), sin embargo, se desconoce la capacidad digestiva de las larvas en cautiverio y actualmente

aún se encuentra en desarrollo el protocolo óptimo de alimentación para el desarrollo larval de esta especie.

Actualmente la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, lleva a cabo el desarrollo de la biotecnología de cultivo de esta especie, enfocado a lograr el inicio de un programa de repoblamiento a partir reproductores mantenidos en cautiverio (True *et al.*, 1997, 2001). Sin embargo, la maduración y reproducción logradas han sido generalmente limitadas (calidad de huevo), lo que podría atribuirse al desconocimiento de sus requerimientos nutricionales (López *et al.*, 2006). Aún que ya se ha logrado su cultivo existen limitantes para escalarlo a nivel comercial y una de ellas se centra en la obtención de información detallada sobre la nutrición y fisiología digestiva durante la ontogenia temprana de esta especie. Por lo anterior es indispensable conocer el desarrollo del sistema digestivo y sus capacidades enzimáticas. Por lo que la presente investigación tiene como objetivo, el generar información sobre la expresión y actividad de tripsina, quimiotripsina y pepsina durante el desarrollo del sistema digestivo en larvas y juveniles de totoaba, alimentadas con alimento vivo y durante el periodo de destete.

2. Metodología

1.1. Protocolo de cultivo larvario de totoaba (*T. macdonaldi*)

2.1.1 Obtención de huevos y cultivo larvario

Huevos y larvas de totoaba fueron obtenidos de reproductores mantenidos en cautiverio en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada de acuerdo a los procedimientos establecidos en dicha unidad (True, 2012).

2.1.2. Alimentación

La alimentación de las larvas se proporcionó de acuerdo al protocolo de UBP, el cual inició a partir del dpe 4. El primer alimento vivo que se le proporcionó a las larvas fueron rotíferos vivos a razón de 5 rotíferos mL⁻¹ durante los primeros tres días después de

haber iniciado la primera alimentación exógena. A partir del dpe 8 las larvas se alimentaron tres veces al día hasta el dpe 16, a partir de este día se empezaron a introducir nauplios de *Artemia* a razón de 0.5 mL^{-1} , así la densidad de rotíferos empezó a disminuir hasta que el dpe 18, para posteriormente ser alimentado solo con nauplios de *Artemia*. Los nauplios de *Artemia* fueron en aumento de acuerdo a la edad de la larva llegando a proporcionar cinco nauplios mL^{-1} para el dpe 24 y mantenerse hasta el inicio del cambio de alimento vivo a alimento inerte (destete) (Otohime Japanese Marine Weaning, Red Mariculture; proteína 52.11%, lípidos 16.3% y cenizas 11.2%, tamaño de partículas desde 200 hasta $1410 \mu\text{m}$) que se realizó el dpe 28 en adelante. La cantidad de nauplios de *Artemia* disminuyeron conforme aumentaba el cambio de alimento y fueron sustituidos del tanque de cultivo el dpe 34, mientras que la cantidad (g) de microdieta fue en aumento para completar el destete el dpe 34 (Figura 1).

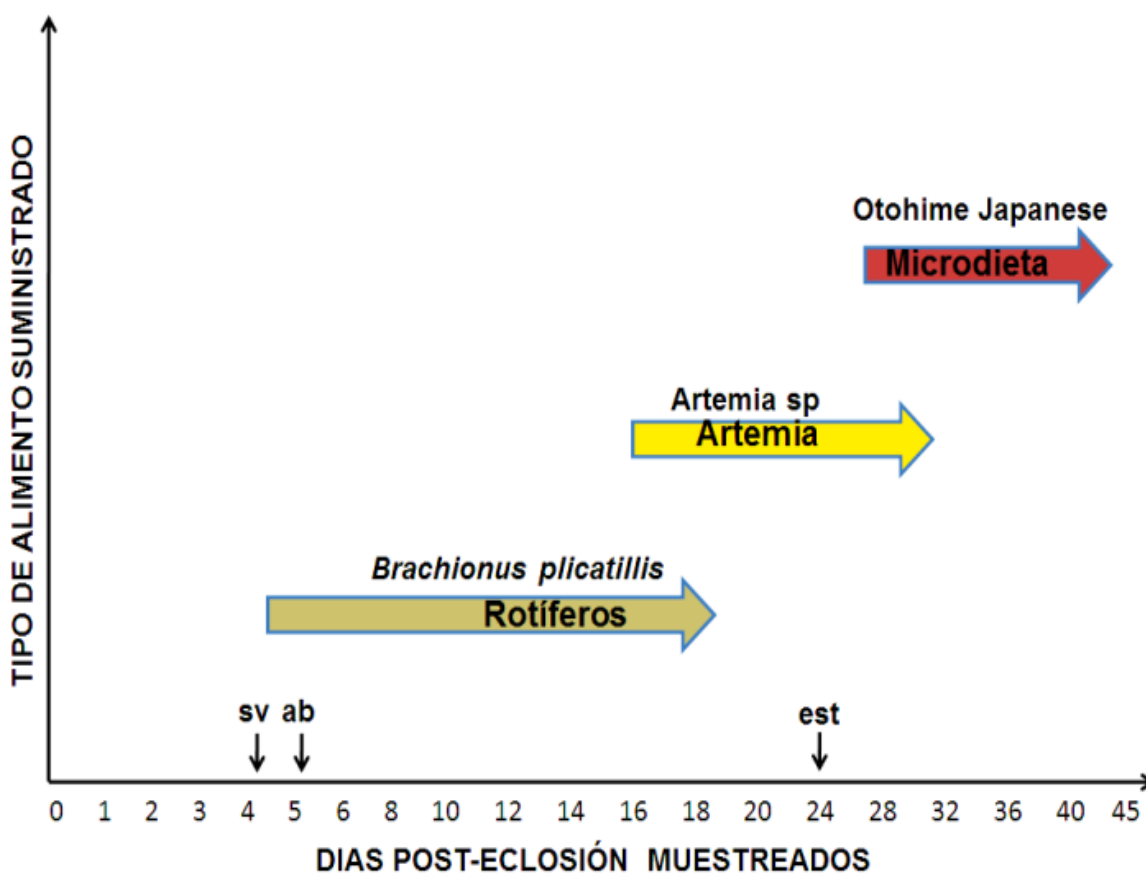


Figura 1. Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo de totoaba (*T. macdonaldi*). (ab), abertura de la boca, (est), estómago, (sv), absorción del saco vitelino.

2.2.0. Colecta de muestras para análisis bioquímico y molecular

Dependiendo de su talla, larvas de totoaba ($n=30-100$) fueron muestreadas de manera aleatoria directamente de los tanques de cultivo experimental, se utilizó una malla de $300\mu\text{m}$. Las muestras fueron colectadas una hora después de la primera alimentación (8.00 a.m.) esto con el fin de descartar posibles efectos de enzimas provenientes de la dieta. Las muestras de larvas fueron colectadas cada día desde el dpe 0 hasta el dpe 6, luego las muestras fueron colectadas cada dos días hasta el dpe 20 y cada cuatro días hasta el final del estudio (dpe 40). Después de haber muestreado las larvas, éstas fueron anestesiadas con tricaina metansulfonato (MS 222), lavadas con agua destilada para remover el exceso de sales y congeladas a -70°C hasta análisis.

Muestras adicionales ($n=10-30$) fueron tomadas cada día para registrar datos de talla en longitud total y peso húmedo desde el dpe 0 hasta el dpe 4 y 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 dpe. La longitud total promedio (mm) fue obtenida mediante la medición de una muestra de larvas (10 larvas) bajo un microscopio usando una cámara digital y el software PAXcam2 (Pax-it versión 6, Mis Inc., USA). El peso húmedo individual de las larvas (mg) fue calculado pesando tres submuestras de larvas ($n=30$) con una balanza analítica (Sartorius, Gottingen, Germany; precisión 1×10^{-4} g).

2.2.1. Preparación de extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos se obtuvieron al macerar las muestras de eleuteroembriones (larvas recién eclosionadas), larvas y juveniles. En larvas mayores a 18 dpe se disecó el sistema digestivo con el propósito de eliminar los inhibidores enzimáticos que pudieran estar presentes en la musculatura, así como otras enzimas relacionadas con el metabolismo de las proteínas musculares y el sistema inmune (Hjelmeland, 1985).

En este caso, las disecciones se realizaron bajo un microscopio estereoscópico y de una lámpara con lupa sobre portaobjetos enfriados en una cama de hielo seco, con el fin de mantener las larvas a baja temperatura durante la disección. Cada muestra proveniente de la

disección contuvo de 10 a 30 larvas (0-16 dpe) o de tres a cinco sistemas digestivos (a partir del día 18 dpe), los cuales se homogenizaron en 1 ml de agua desionizada en baño de hielo (4 °C) utilizando un homogenizador de tejidos (Kontes, USA). Los homogenizados se centrifugaron a 14,000 g durante 30 min a 4°C, en una centrífuga refrigerada (Biofuge Primo R marca Heraeus). El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático y se separó en alícuotas de 200 µl que se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

2.2.3. Cuantificación de la actividad proteolítica

La Tabla II indica los sustratos utilizados para cuantificar por medio de espectrofotometría la actividad de algunas enzimas proteolíticas presentes en los extractos larvarios.

Actividad proteolítica ácida total (pepsina): Para la medición de la actividad proteolítica ácida se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). Se añadieron 150 µl de hemoglobina desnaturalizada a 50 µl de extracto enzimático y la mezcla se incubó a 37°C durante 10 min, después de los cuales la reacción se detuvo con 300 µl de ácido tricloroacético al 5% y se dejó reposar durante 30 min a 4°C.

La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 19,000 g durante 5 min y la absorbancia del sobrenadante se midió a 280 nm contra un blanco en el cual el extracto enzimático se inactivó por adición del ácido antes de iniciar la reacción. Se utilizó pepsina porcina comercial (SIGMA) a una concentración de 10 µg ml⁻¹ como control. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que catalizó la formación de 1 µg de tirosina por minuto.

Actividad tipo tripsina: Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961). Se le añadieron 350 µl de BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida) a 50 µl del extracto enzimático y la mezcla se incubó a 37°C durante 30-60 min; al término de este tiempo la reacción se detuvo con 100 µl de ácido acético al 30% y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia a 410 nm se leyó contra un blanco en el cual el extracto

enzimático se inactivó por adición previa del ácido. Se utilizó como control tripsina comercial (SIGMA Tipo IX, de páncreas de porcino), con una concentración de reacción de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Una unidad de actividad corresponde a 1 μmol de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar 8800 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Actividad tipo quimotripsina: Para la medición de la actividad tipo quimotripsina se utilizó la metodología de Hummel (1959) con las modificaciones realizadas por Applebaum *et al.* (2001). La cantidad de extracto enzimático necesaria para detectar actividad (5-50 μl) se llevó a un volumen final de 50 μl con agua desionizada. La reacción se inició al añadir 450 μl de BTEE (N-Benzoil-L-Tirosina Etil Ester) y la muestra se incubó por 15-30 min a 37°C. La absorbancia a 256 nm se leyó contra un blanco en el cual el extracto enzimático se sustituyó con agua desionizada, usando como control quimotripsina comercial (SIGMA Tipo II, de páncreas de bovino) en una concentración de reacción de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 μmol de BTEE hidrolizado por minuto utilizando el coeficiente de extinción molar 964 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

2.2.4. Cálculo de actividades específicas.

La actividad de un extracto problema se determinó utilizando las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Cálculo de la actividad en unidades por ml.

$$\text{Unidades/ml} = \frac{\Delta \text{ABS} \times \text{volumen final}_{\text{reacción}} (\text{ml})}{\text{CEM} \times \text{tiempo} (\text{min}) \times \text{volumen extracto} (\text{ml})}$$

Ecuación 2. Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

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

Siendo:

ΔABS el incremento de absorbancia a una determina longitud de onda; volumen final (reacción), el volumen final de la reacción; CEM, el coeficiente de extinción molar.

Tabla II. Sustratos utilizados para cuantificar espectrofotométricamente la actividad de diferentes enzimas digestivas en larvas de totoaba

Sustrato	Especificidad	Solvente
Generales:		
Hemoglobina 2% (desnaturalizada) ¹	Proteasas ácidas (pepsina)	
Específicos:		
BAPNA 1 mM ²	Tipo tripsina	DMSO
BTEE 0.56 mM ³	Tipo quimiotripsina	DMSO

1 Metodología de Sarath *et al.* (1989).

2 BAPNA: N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida. Metodología de Erlanger *et al.* (1961).

3 BTEE: N- Benzoil-L-Tirosina Etil Ester. Metodología de Hummel (1959) modificada por Applebaum (2001).

2.3. Análisis molecular

2.3.1. Clonación de genes de enzimas digestivas en larvas de totoaba

El análisis molecular se realizó según la metodología descrita por García-Gasca *et al.* (2006). El ARN total fue extraído de larvas completas (hasta el dpe 16) y de tracto digestivo (desde el dpe 18 hasta el final del estudio), usando reactivo Trizol (Invitrogen), seguido por dos tratamientos de DNAsa para eliminar completamente el ADN genómico. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con 5 μ g de ARN total y la enzima transcryptasa reversa MMLV (Promega) en presencia de random primers.

Para el diseño de los oligos para los genes de las diferentes enzimas se obtuvieron secuencias de nucleótidos de las diferentes enzimas para otras especies de peces usando el programa ENTREZ del NCBI (Nacional Center of Biotechnology Information) a partir del cual fue posible ingresar a la base de datos de GenBank. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Multalin o Clustal-W. Se obtuvieron secuencias consenso de

regiones conservadas para diseñar los oligos degenerados. Estos oligos se diseñaron utilizando el programa PRIMER3.

A partir de estos oligos se realizaron amplificaciones por PCR utilizando ADNc y los productos obtenidos fueron purificados y ligados a un vector pGEM-(Promega), introducidos en bacterias competentes *E. coli* DH5 α y fueron transformados por choque térmico; la extracción del plásmido se realizó mediante lisis alcalina. La secuenciación bidireccional se llevó a cabo utilizando primers universales para secuenciación T7/SP6 (T7: 5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'; SP6: 5'-ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG-3') y un secuenciador LICOR IR2 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras secuencias en base de datos del GenBank mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y editadas mediante el programa BioEdit. Posteriormente se diseñaron oligos específicos para cada enzima para proceder a la cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real.

2.3.2. PCR Cuantitativo (qPCR)

La expresión de genes de tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s ribosomal fue cuantificada de manera relativa con un termociclador de tiempo real SmartCycler (Cepheid) usando SYBER GREEN®. Las muestras de ADNc de larvas de totoaba de los diferentes días post eclosión fueron analizadas por duplicado y se utilizó como control interno el gen 18s ribosomal (los primers para qPCR se muestran en la Tabla IV). Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 95°C por 2.5 minutos, y 40 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 30s. La elaboración de la curva estándar de cada uno de los genes se realizó por medio de diluciones seriadas del ADNc amplificado con los primers de tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s ARNr. Se utilizaron los valores del ciclo umbral (CT) y el número de copias en escala logarítmica (log copy number) obtenidos del análisis de dilución serial para realizar un análisis de regresión lineal y calcular cada una de las curvas estándar.

Para el cálculo del número de copias (C0) en muestras no conocidas se empleó el modelo de regresión lineal:

$$y = a + b (CT)$$

Dónde:

y= nivel de expresión de cada gen, a= intercepto, b= pendiente de la curva estándar y CT= ciclo umbral.

Finalmente para normalizar la C0 de cada muestra se dividió la C0 de cada uno de los genes por el C0 de 18s rRNA y por último cada muestra normalizada se dividió por el calibrador que en este caso fue el día post eclosión uno (dpe 1).

2.4. Análisis estadístico

La actividad específica e individual de las enzimas digestivas en larvas fue expresado como media y desviación estándar (media \pm D.E). Todos los datos fueron analizados para su normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizaron pruebas de análisis de varianzas de una vía (ANOVA), identificando las diferencias con pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Sigma-Plot 11.0 para Windows (Sigma- Plot® 11.0, USA). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

2.0. Resultados

2.1. Expresión y actividad de enzimas digestivas

Tripsina

La expresión de mRNA de tripsina se detectó a niveles muy bajos durante el dpe 1, sin embargo, hacia el dpe 5 la expresión incrementó, la cual coincidió con el inicio de la alimentación a base de rotíferos (Figura 2A). El nivel de expresión volvió a incrementar en el dpe 16 cuando la alimentación cambió de rotíferos a nauplios de *Artemia*, sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) al dpe 16 con respecto a los demás días.

El máximo nivel de mRNA de tripsina fue detectado en el dpe 34, cuando las glándulas gástricas y el estómago estaban completamente desarrollados y las larvas fueron alimentadas exclusivamente con microdieta. En el dpe 40 (al final del experimento) se observó una disminución muy marcada mas no significativa ($P>0.05$) con respecto al nivel de expresión del gen de tripsina.

La actividad específica de tripsina fue detectada desde el dpe 1 (0.39 ± 0.05 mU/mg proteína), manteniéndose baja durante los siguientes días, sin embargo, un incremento significativo ($P<0.001$) fue observado en el dpe 12 (1.06 ± 0.20 mU/mg proteína). Después del dpe 12 la actividad específica de tripsina disminuyó hasta el dpe 16 (0.39 ± 0.01 mU/mg proteína), la cual incrementó de nuevo hacia el dpe 25 (0.99 ± 0.17 mU/mg proteína $P<0.001$), sin embargo, el nivel de actividad específica de tripsina volvió a disminuir durante los siguientes días donde no se observaron diferencias significativas ($P= 0.999$) en la actividad enzimática cuando las larvas fueron alimentadas a base de rotíferos y *Artemia*. El máximo nivel de actividad específica de tripsina se alcanzó el dpe 40 (1.83 ± 0.05 mU/mg proteína) (Figura 3B).

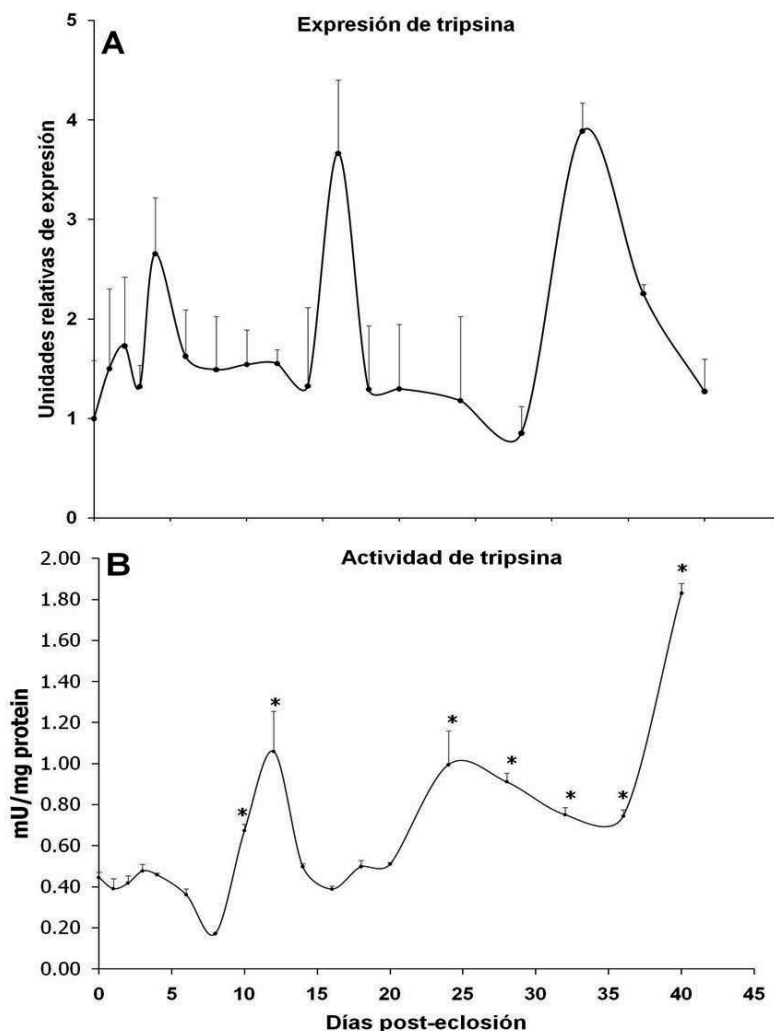


Figura 2. Expresión y actividad de tripsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media \pm DE, n=3). Asteriscos (*) indican diferencias significativas en el tiempo.

Quimotripsina

La expresión de quimotripsina fue detectada a nivel muy bajo en el dpe 1, la cual mostró dos incrementos importantes durante el desarrollo del presente estudio, sin embargo dichos incrementos no fueron significativos ($P > 0.05$). El primer incremento fue observado en el dpe 16 (Figura 3A), coincidiendo con el cambio de alimentación de rotíferos a nauplios de *Artemia*. El segundo incremento fue observado en el dpe 36, cuando las larvas fueron alimentadas con microdieta como dieta exclusiva, luego el nivel de expresión de quimotripsina disminuyó hacia el final del estudio al dpe 40.

Diferencias significativas ($P < 0.001$) fueron observadas en la actividad específica de quimotripsina (Figura 14B), la cual se detectó a un nivel muy bajo en el dpe 1 ($0.18 \pm 0.08 \text{ mU} \times 10^{-3} \text{ mg proteína}^{-1}$), con incremento posterior significativo ($P < 0.001$) en el dpe 12 ($2.57 \pm 0.38 \text{ mU} \times 10^{-3} / \text{mg proteína}$), coincidiendo con la alimentación a base de rotíferos y con el desarrollo del intestino. No se observaron diferencias significativas entre los días 12 y 36 ($P = 0.805$). Sin embargo, un incremento significativo fue observado en el dpe 36 ($1.75 \pm 0.95 \text{ mU} \times 10^{-3} \text{ mg proteína}^{-1}$) ($P < 0.001$). Durante este periodo las larvas estaban por terminar la transición de alimento vivo a inerte. En el dpe 40 la actividad de quimotripsina disminuyó significativamente ($P < 0.001$) con respecto a los dpe 12 y 36 (Figura 3B).

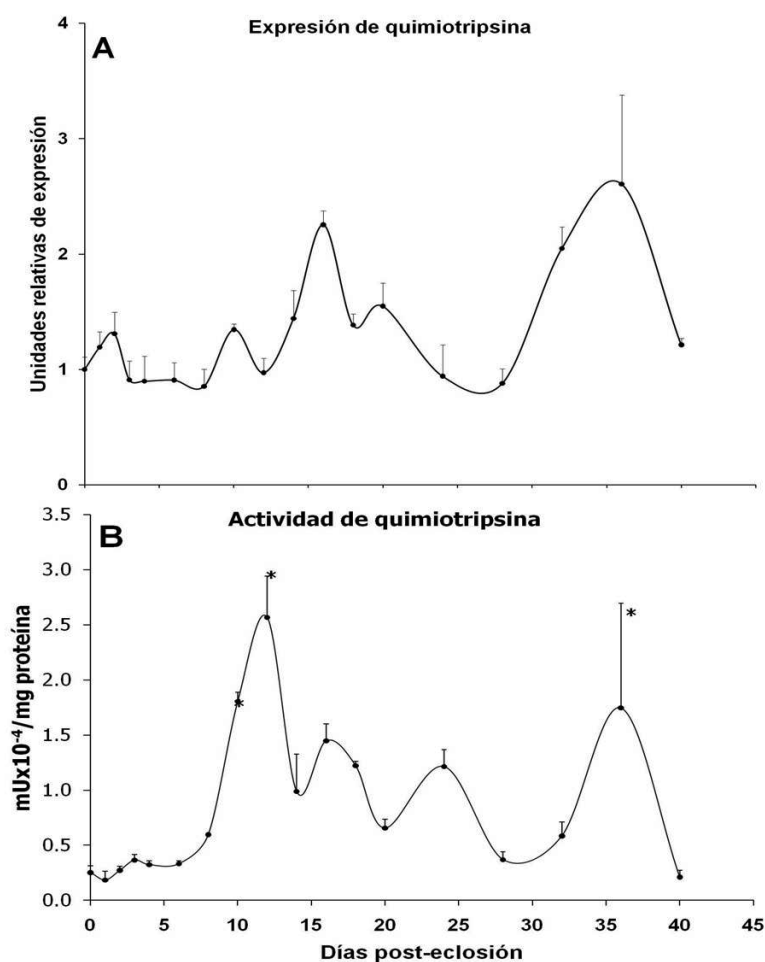


Figura 3. Expresión y actividad de quimotripsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media \pm DE n=3). * indican diferencias significativas en el tiempo.

Pepsina

La expresión del gen de pepsina fue detectada significativamente en el dpe 16, dos días antes de la aparición de las glándulas gástricas (Figura 4A). El máximo nivel de la expresión de pepsina incrementó significativamente en el dpe 36 ($P = 0.025$), el cual coincidió con el desarrollo completo del estómago. Después del dpe 36 y hasta el dpe 40 el nivel de expresión disminuyó (etapa final del bioensayo).

La actividad específica de pepsina fue detectada a niveles muy bajos entre los dpe 18 y 20 (0.20 ± 0.07 U mg proteína⁻¹). El primer incremento significativo en actividad específica fue observado el dpe 24 (2.16 ± 1.17 U mg proteína⁻¹, $P = 0.01$) el cual coincidió con el inicio de la formación del estómago (Figura 4B). Posteriormente la actividad disminuyó entre los días 28 y 32 para luego incrementar significativamente ($P < 0.01$) al final del experimento en el dpe 40. Sin embargo, la expresión de pepsina fue detectada a niveles bajos en el dpe 14, en el dpe 16 se observó un incremento no significativo ($P = 0.715$), para luego disminuir en el dpe 25 y volver a incrementar significativamente ($P = 0.025$) en el día 36 donde alcanzó su nivel máximo.

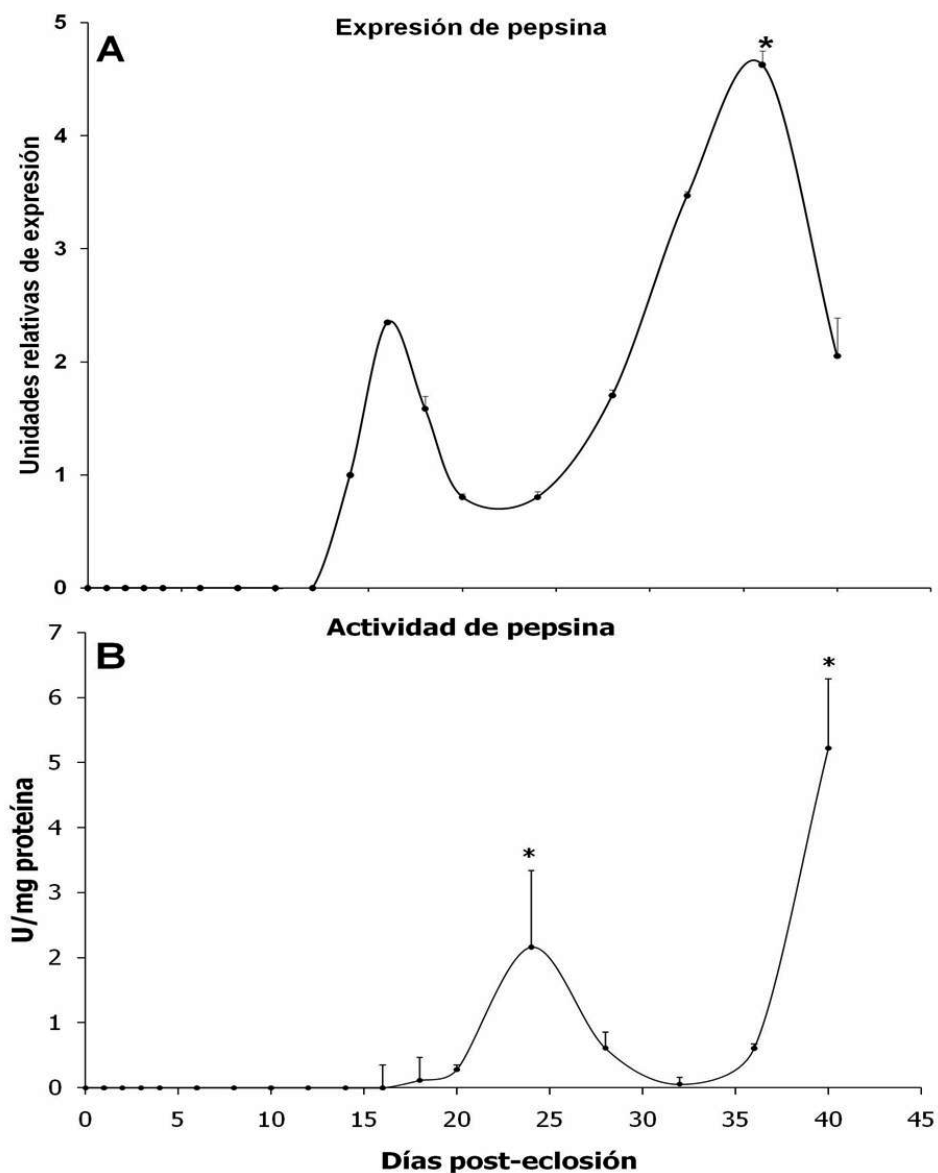


Figura 4. Expresión y actividad de pepsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media \pm DE n=3). * Indican diferencias significativas en el tiempo.

3.0. Conclusiones

En larvas de totoaba, el sistema digestivo está completamente funcional entre los dpe 24 y 28, ya que mediante análisis bioquímicos y moleculares se cuantificaron tres de las principales enzimas digestivas relacionadas con la digestión de proteínas contenidas en la dieta, proporcionando así información relevante para esta especie, esto debido a que no se contaba con información detallada sobre la fisiología digestiva y protocolos de alimentación adecuados para *T. macdonaldi*. Entre los dpe 24 y 28 las larvas de totoaba son capaces de digerir dieta formulada y absorber los nutrientes de la misma, por lo tanto, basándonos en los resultados obtenidos y bajo las condiciones experimentales en las que se realizó este estudio, se propone estandarizar el inicio del período del destete a partir del dpe 24.

Los conocimientos obtenidos en el presente estudio constituyen un aporte importante para el desarrollo del cultivo larvario de especies como totoaba (*T. macdoandli*). Así mismo, estos resultados son clave para apoyar de manera certera el cultivo de esta especie en Baja California, tal y como se realiza con otras especies de peces marinos en otros países. El éxito de dichos desarrollos tecnológicos se basa en un buen control y conocimiento exhaustivo del proceso de alimentación, digestión y nutrición durante el desarrollo fisiológico digestivo en peces.

Referencias

- Abdo-de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, E., Campillo-Martínez, F., Velasco-Blanco, G., García-Aguilar, N., Álvarez-Lajonchère, L.S., Voltolina, D. 2010. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45, 141-146.
- Alarcón-López, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de doctorado. Universidad de Almería. Departamento de Biología Aplicada. Almería. España. Pp. 292.
- Álvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E., Piedrahita, R., 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 31, 83-93.
- Álvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. I: Biochemical analysis. Fish Physiology and Biochemistry 34, 373-384.
- Álvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Nolasco-Soria, H., Tovar-Ramírez, D., Dumas, S., 2010. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. II: Electrophoretic analysis. Fish Physiology and Biochemistry 36, 29-37.
- Avilés-Quevedo, A., 2005. Calidad de huevos y larvas según el manejo de los reproductores de la cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de doctorado. Departamento de Biología Animal, Universidad de Barcelona España. 199 pp.
- Applebaum, S.L., Perez, R., Lazo, J.P., Holt, G.J., 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum *Sciaenops ocellatus*. Fish Physiology and Biochemistry 25, 291-300.
- Berdegué, A.J., 1955. La pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 16(1-4), 45-78.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1995. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. Fish Physiology and Biochemistry 14: 209-214.
- Cannon R. 1966. The Sea of Cortés. Lane Magazine and Book Co., Menlo Park, Calif.
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G. y Clarke, S.M., 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture 260, 264-271.
- Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W., Quinn, J.F., 1997. Projecting of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. Ecol. Appl 7, 968-980.

- CITES. 2005. Appendices I, II and III (12/01/2005). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Geneva, Switzerland, 49 pp.
- Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Nolasco-Soria., Alvarez-González, C.A., Anguas-Vélez, B., Peña-Martínez, R., Rosales-Velazquez, M.O., Carrasco-Chávez, R., García-Gómez, R., Goytortúra-Bores, E., 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. pp. 352-408. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds). VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 3 al 6 de Septiembre de 2002, Cancún, Quintana Roo, México.
- Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandlam, S., Gallant, J.W., 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *Journal of Fish Biology*. 55, 897-915.
- Duncan, N., Rodríguez, G., Alock, D., y Zohar, Y. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRH-a on bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus* spawning. *Aquaculture* 218, 625-635.
- Durazo, E., Cruz, A.C., López, L.M., Lazo, J.P., Drawbridge, M., Viana, M.T., 2010. Effects of digestible protein levels in isonitrogenous diets on growth performance and tissue composition of juvenile *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture Nutrition* 16, 54-60.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-278.
- Flanagan, C. A., Hendrickson, J.R., 1976. Observations on the comercial fishery and reproductive biology of the Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert 1890 in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin* 74(3), 531-544.
- Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A., López, L.M., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in White sea bass *Atractoscion nobilis* larvae. *Aquaculture* 318, 162-168.
- García-Gasca, A., Galaviz, M., Gutiérrez, J.N., García-Ortega, A., 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 256, 366-376.
- García Ortega, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. In: Cruz – Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A & Civera- Cerecedo, R., (Eds). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. p. 287-299.
- García-Ortega A., 2009. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* and bullseye puffer *Sphoeroides annulatus*, new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 69-80.

- Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut *Paralichthys californicus* with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232, 455-470.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology* 23, 1525-1539.
- Hjelmeland, K., Jørgensen, T., 1985. Evaluation of radioimmunoassay as a method to quantify trypsin and trypsinogen in fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 114, 619– 621.
- Hummel, B.C.W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 1393-1399.
- Kolkovski, S. y Sakakura Y. 2007. Yellowtail kingfish culture-Opportunities and problems. *World Aquaculture* 38, 44-48.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M., Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinop melanotictus* larvae. *Aquaculture* 161,491-499.
- Lauff, M., Hoffer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37, 335-346.
- López, L.M., Durazo, E., Viana, M.T., Drawbridge, M., Bureau, D., 2009. Dietary lipid levels effect on performance, body composition and fatty acid profile of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture* 289,101-105.
- Morales-Ortíz C. 1999. Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, 56 pp.
- Murray, H.M., Perez-Casanova, J.C., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in Winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part S* 138, 53-59.
- Murray, H.M., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut *Hippoglossus Hippoglossus* during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture* 252, 394-408.
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M., Ortiz-Galindo, J., 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219, 633- 644.
- Sandoval-Garibaldi G. 2001. Desarrollo morfológico de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert, 1890) durante su estadio larval en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 75 p.
- Sarath, G., De la Monte, R.S., Warner, F.W., 1989. Protease assay methods. Pages 25–56. In: R.J. Beyon and J.S. Bond, editors. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press, New York, New York, USA.

- Smith, L., 1989. Digestive Functions in Teleost Fishes *In* Fish Nutrition. J. Halver (Ed.) Academic Press, Inc. London. Pp 332-422.
- Solórzano Y. 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Maestría Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Tanaka, M., 1972. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. Part 5: Epithelial changes in the posterior gut and protein digestion. Japanese Journal of Ichthyology 19, 172-180.
- True C.D., A. Silva Loera y N. Castro Castro. 1997. Acquisition of *Totoaba macdonaldi* (*Sciaenidae*) broodstock: field handling, decompression and prophylaxis of an endangered species. Progressive Fish-Culturist. 59(3).
- True C.D., N. Castro-Castro, G. Sandoval-Garibaldi y C. Morales-Ortiz. 2001. Reproducción Controlada de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert). Resumen de ponencia oral del VII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés. Pag. 82.
- True, C. D. 2012 Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California. México.
- Ueberschär, B., 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: Significance and application in larval fish research. Part III 233-239 *In*: Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development. Edited by B.T. Walther an H.J. Fhyn. University of Bergen, Norway.
- Valverde-Chavarría, S. 2002. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayes, 1860) (*Sciaenidae*), y selección de fuenes proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y educación superior de Ensenada.
- Vizcaíno E. 2008. Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con dietas isproteicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Watanabe, Y. 1984. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nowawae*. Bulletin of the Japanes Society For the Science of Fish 50, 409-416.
- Zacarías-Soto, M., Muguet, J.B., Lazo, J.P., 2006. Proteolytic activity in California Halibut Larvae *Paralichthys californicus*. Journal of World Aquaculture Society 37 (2), 175-185.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in seabass *Dicentrarchus labrax* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 12, 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology C 130, 477-487.

Gene Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) Erythrocytes under Differing *in vitro* Glycemic Conditions

Madison Powell, Tracy Kennedy, Joyce Faler and Ronald Hardy

Aquaculture Research Institute

University of Idaho

3059F National Fish Hatchery Road

Hagerman, Idaho 83301 USA

Abstract

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) blood cells were maintained *in vitro* over a 24 h period under different glycemic conditions to compare cellular response to prolonged hyperglycemia. In rainbow trout, facilitated glucose transporter 1 (GLUT 1) expression was upregulated within 1 h regardless of glucose concentration and returned to levels similar to initial quantitative values within 24 h. Likewise, expression of heat shock 70 protein (Hsp 70) was also significantly upregulated after 1 h and remained higher under hyperglycemic conditions compared to normoglycemia until 24 h. Expression of constitutive heat shock protein 90 (Hsp 90) showed significant individual variation but remained unchanged. Expression of GLUT 1 in Nile tilapia remained unchanged under normoglycemic conditions but steadily increased over time with hyperglycemia. Hsp70 and Hsp 90 expression in Nile tilapia was highly variable over time with significant increases observed within 1 h and expression of both genes remaining elevated after 24 h. Significant apoptosis was observed with white sturgeon blood cells under 5 mM and 20 mM glucose *in vitro*. Significantly lower glucose concentrations (0 mM and 2 mM) were required for sturgeon cells to survive. Facilitated glucose transport across membranes via GLUT 1 is responsive to extracellular glucose levels in a variety of fish species, suggesting GLUT 1 may be important in cellular functionality under hyperglycemic conditions.

Keywords: *gene, rainbow trout, tilapia*

Introduction

The uptake of sugar into red blood cells has been studied and reviewed for several species (Ingermann *et al.* 1984, 1985; Soengas and Moon 1995) and the subsequent metabolism of this substrate has been characterized in rainbow trout (Walsh *et al.* 1990) and other species (Pesquero *et al.* 1992; Tiihonen and Nikinmaa 1991a, 1991b). Erythrocytes in fish are nucleated and able to fully metabolize glucose for energy (Walsh *et al.* 1990). During stressful events, hepatocytes break down glycogen into glucose and release it into the blood stream as part of a response to different toxicological, hormonal, environmental, pharmacological and nutritional conditions (Polakof *et al.* 2012).

In general, the stress response in fish has also been well characterized (Wendelaar Bonga 1997; Iwama *et al.* 2006) as well as a more specific understanding of the stress response regarding heat shock proteins (Iwama *et al.* 1999; Ojima *et al.* 2005) and stress-related hyperglycemia (Momoda *et al.* 2007; Pemmasani *et al.* 2011) in rainbow trout. Previous work has demonstrated increased gene expression of inducible glucose transporter 1 (GLUT 1) and heat shock protein 70 (Hsp 70) in rainbow trout erythrocytes under heat shock stress (Powell *et al.* 2012). We hypothesize that erythrocytes may also recruit increased numbers of glucose transporters to the cell membrane to facilitate cellular uptake with “nutritional stress” associated with hyperglycemia. Although Santin *et al.* (2013) did show glycated hemoglobin to be a poor indicator of plasma glucose levels over time, the nature of increased cellular uptake of glucose by erythrocytes and the subsequent metabolism or binding of glucose under hyperglycemic conditions remains unclear.

In this study we examined the comparative genetic response of rainbow trout, Nile tilapia and white sturgeon blood cells incubated over 24 hours with 5 mM glucose (normoglycemia) or 20 mM glucose (hyperglycemia).

Materials and methods

Rainbow trout, Nile tilapia, and white sturgeon were raised at Hagerman Fish Culture Experiment Station, University of Idaho, on commercial diets. Rainbow trout (445 ± 23 g) were kept indoors in 140 L tanks at 15°C . Tilapia (418 ± 55 g) were kept indoors in 140 L tanks at 26°C . Sturgeon (2407 ± 180 g) were kept outdoors in 500 L tanks at 15°C . Fish ($N = 22$) were netted from tanks after fasting for ~ 24 hours and anesthetized in phosphate-buffered MS-222 (40 mg/ml); 2.5 ml of blood was drawn from the caudal vein, using 22-gauge needles, into 3.0 ml syringes containing 0.5 ml of 5 mM Citrate Phosphate Dextrose Adenine (CPDA; Hillyer *et al.* 2006). Pre-exposure blood samples were removed directly from the syringes and placed into 2 ml microcentrifuge vials containing 1 ml of TRIzol Reagent for RNA extraction. From the remaining blood, 0.5 ml was transferred into each of two dialysis cassettes (Thermo Scientific, Rockford, IL) per fish and marked as either control (5 mM glucose) or challenge (20 mM glucose). Cassettes were submerged into one of two corresponding 2.5 L Pyrex dishes (Model #08-741H, Fisher Scientific, Waltham, MA) with constant stirring and containing 1032 ml Modified Cortland's salt solution (Houston *et al.* 1985) and 168 ml CPDA with either 5 mM or 20 mM added glucose (pH 7.4, $300\text{-}340\text{ mmol L}^{-1}$ osmolality). Trout and sturgeon erythrocytes were incubated at 15°C , and tilapia erythrocytes were cultured at 26°C under sterile conditions. Approximately 100 μl of blood were removed from each cassette at 1, 4, 8, and 24 h post-exposure to the solution, and placed into 2 ml microcentrifuge vials containing 1 ml of TRIzol Reagent for RNA extraction. A point-of-care blood analyzer, VetScan, i-STAT 1 and C 4+ cartridges (Abaxis, Union City, CA) were used to measure pre-exposure blood parameters from separate 0.1 ml samples taken in 1.0 ml syringes during initial sampling.

RNA extraction and quantitative PCR (qPCR) was carried out according to Wayck *et al.* (2012). Gene sequences examined with qPCR included proteins involved in facilitated glucose transport (GLUT 1) and heat shock response (heat shock protein 70: Hsp70 and heat shock protein 90: Hsp90). Primer and probe sequences for ubiquitin (internal standard for trout), glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (internal standard for tilapia) and Hsp70 were designed using Primer Express v 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Powell *et al.* 2013. Gene Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) Erythrocytes under Differing *in vitro* Glycemic Conditions. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones recientes en alimentación y nutrición acuícola - Memorias del Décimo Segundo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp.262-271.

Primers for GLUT 1 were from Amberg (2008). Primers for Hsp90 were from Wacyk *et al.* (2012). Quantitative PCR was performed using the AB 7500 Fast Real Time PCR system with the TaqMan Universal RT-PCR Master Mix Reagents Kit (ABI, Foster City, CA). Cycle threshold values were obtained for all genes and linear regression carried out as described in the ABI PRISM User Bulletin #2 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Expression was normalized with ubiquitin for trout and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase for tilapia. Gene expression was normalized using the absolute relative method (Bustin 2006). Results were analyzed using repeated measures ANOVA in SAS version 9.3 (Cary, NC) and post-hoc SNK tests with a critical value of $\alpha \leq 0.05$.

Blood smear slides were made pre-exposure and 24 hours post-exposure to the modified Cortland's / CPDA solutions. Smears were air dried, fixed in absolute methanol and stained with Stat stain (Volu-Sol, Salt Lake City, UT) as per the manufacturer's instructions. Slides were photographed using a Zeiss Axioplan 2 imaging light microscope with mounted AxioCam HRc camera, and individual erythrocytes were qualitatively assessed for membrane characteristics and level of vacuolization then measured for overall area using Axiovision imaging software version 4.7.1 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) (n = 100 cells / time point). Results were analyzed using paired *t*-tests in SAS version 9.3 (Cary, NC).

Results and conclusions

Gene expression patterns of rainbow trout and Nile tilapia overall were markedly different which may reflect the differing dietary regimes of each species. Salmonids such as rainbow trout are carnivorous whereas tilapine fish are omnivorous. Expression of GLUT 1 in rainbow trout (Figure 1a) increased within 1 h regardless of glucose concentration and returned to initial levels within 24 h. However, incubation with 20 mM glucose showed a trend toward increased expression and increased variability in 4 and 8 h samples. Likewise, Hsp 70 expression (Figure 1c) mimicked the GLUT 1 expression pattern but unlike GLUT1, Hsp 70 expression levels at 20 mM glucose were significantly higher at 4 and 8 h compared to expression levels at 5 mM glucose. Hsp 70 expression returned to initial levels within 24 h, a pattern also observed with Hsp 70 response to heat stress (Lewis *et al.* 2010).

Hsp 90 expression (Figure 1e) showed elevated expression over initial samples at 8 h at

Powell *et al.* 2013. Gene Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) Erythrocytes under Differing *in vitro* Glycemic Conditions. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones recientes en alimentación y nutrición acuícola - Memorias del Décimo Segundo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp.262-271.

both 5 mM and 20 mM glucose. Hsp 90 expression diminished to levels consisted with initial values by 24 h.

Expression of GLUT 1 in Nile tilapia (Figure 1b) remained unchanged from initial values over time when blood cells were incubated in 5 mM glucose. Incubation at 20 mM glucose showed increased expression of GLUT 1 beginning at 4 h and remaining elevated after 24 h. Hsp 70 expression in Nile tilapia (Table 1d) varied with generally increasing expression over time regardless of the level of glucose in the culture media. Likewise, Hsp 90 expression (Table 1f) was also observed to increase over time with the highest levels at 24 h.

Table 1. Hematological values and cell sizes for rainbow trout, Nile tilapia and white sturgeon erythrocytes cultured for 24 h at 5 mM and 20 mM glucose.

Parameter	Rainbow Trout	Nile Tilapia	White Sturgeon
Hemoglobin (g/dl)	11.6 ± 0.3	6.0 ± 0.2	8.9 ± 0.5
Hematocrit (% PCV)	50.7 ± 1.1	15.7 ± 2.4	29.4 ± 1.3
Initial Glucose Concentration (mM)	3.89 ± 0.11	2.02 ± 0.23	2.52 ± 0.18
<u>Erythrocyte area (µm²)</u>			
Initial	98.06 ± 0.51 ^a	62.39 ± 1.64 ^a	164.75 ± 3.85
24 hours [5 mM glucose]	107.22 ± 0.56 ^b	76.73 ± 1.50 ^b	-
24 hours [20 mM glucose]	104.69 ± 1.62 ^b	82.59 ± 2.39 ^c	-

Hematological values are means of N=6 fish / species ± SEM

Erythrocyte areas are means of N=100 cells / species ± SEM

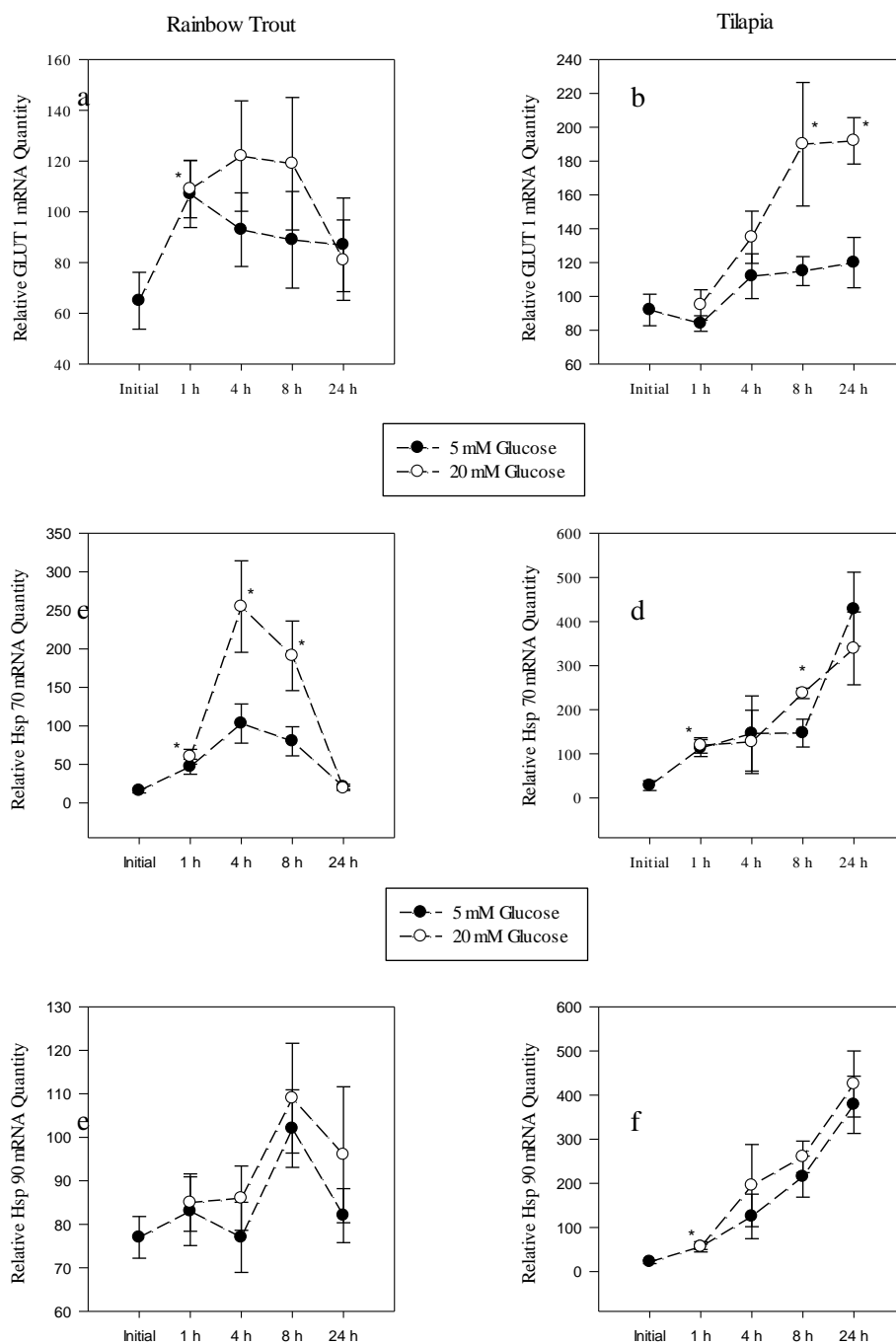


Figure 1. Expression of GLUT 1, Hsp 70 and Hsp 90 genes in rainbow trout and Nile tilapia erythrocytes cultured over 24 h with 5 mM and 20 mM glucose.

Modified Cortland's / CPDA media appeared to be an effective media to incubate rainbow trout blood cells *in vitro*. Cell size of rainbow trout erythrocytes (Table 1) increased by 24 h

from initial measurements but sizes were not significantly different between treatments and did not differ from previously reported cell area measurements (Powell *et al.* 2012). Moreover, quantitative PCR of apoptotic genes (Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9) and other stress related genes (superoxide dismutase, thioredoxin reductase, glutathione peroxidase, carbonic anhydrase) did not indicate evidence of stress in rainbow trout blood cells in a previous study (Powell *et al.* 2012). Modified Cortland's / CPDA may be less effective for incubating Nile tilapia blood cells (Table 1) because there was a significant increase in cell size over time between control (5 mM glucose) and challenge (20 mM glucose) treatments. Hematological values (Hb, Hct and plasma glucose) for rainbow trout, Nile tilapia and white sturgeon (Table 1) were within previously reported ranges for these species (Watson *et al.* 1998; Goda 2008; Zhou and Yue 2008; Polakof *et al.* 2012). Although hematocrit and hemoglobin values obtained from the point-of-care blood analyzer were relatively low for tilapia in comparison with previous studies, these values may reflect differences between the sizes of fish used in this study compared to the much smaller fish previously studied. Quantitative examination of apoptotic and stress related gene expression will be useful to further assess the effectiveness of the protocol for incubating Nile tilapia blood cells since the observed increasing Hsp 70 and Hsp 90 expression over time may indicate accumulating cellular stress. Modified Cortland's / CPDA media did not appear to be appropriate for incubation of white sturgeon cells as evidenced by extensive morphological changes and cellular death by 24 h in both treatment and control samples. As a result, further qPCR analysis was not undertaken with the white sturgeon samples but, further analyses should be undertaken using media with differing (lower) glucose concentrations and differing osmolalities.

The similar increases in expression of GLUT 1 over time in response to higher concentrations of extracellular glucose in rainbow trout and Nile tilapia cultured blood cells (albeit responses differing in timing and duration) suggest indirect evidence that GLUT 1 in fish also belongs to the glucose-regulated protein family of stress-induced proteins as observed in mammals (Wertheimer *et al.* 1991). The differences in GLUT 1 expression between rainbow trout and Nile tilapia erythrocytes may be a consequence of different control mechanisms within the cell or the lack of extracellular control (*e.g.* lack of circulating hormones etc.) in the culture system. Although the uptake and use of glucose in

Powell *et al.* 2013. Gene Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) Erythrocytes under Differing *in vitro* Glycemic Conditions. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones recientes en alimentación y nutrición acuícola - Memorias del Décimo Segundo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp.262-271.

erythrocytes have been examined in several species including rainbow trout, sea raven and American eel (Ferguson and Storey 1991; Sephton and Driedzic 1994; Soengas and Moon 1995), less is known about tilapia red cell uptake and metabolism.

In terms of nutrition or diet formulation for these aquaculture species, rainbow trout erythrocytes appeared to attenuate their response to elevated extracellular glucose within 24 h and culture conditions notwithstanding, tilapia erythrocytes did not. What this says about utilization of dietary glucose or carbohydrates is difficult to decipher. More than likely GLUT 1 plays an important role in erythrocyte functionality during periods of hyperglycemia whether it is induced by diet or acute/cumulative stress. What overarching role this plays in primary or secondary stress responses in erythrocytes as well as any fundamental differences between rainbow trout and Nile tilapia will require further examination of functional genomic pathways.

Acknowledgements

The project described was supported by NIH Grant Number P20 RR016454 from the INBRE Program of the National Center for Research Resources and an Agriculture and Food Research Initiative Competitive Grant no. 2010-65206-20792 from the USDA National Institute of Food and Agriculture.

Citations

- Amberg, J. J. 2008. Diet driven regulation of nutrient transporters of the piscine splanchnic system. Doctoral Dissertation. University of Idaho, Moscow, Idaho.
- Bustin, S. A. 2006. *A-Z of Quantative PCR*, La Jolla, CA: International University Line. 882 pp.
- Ferguson R., Storey K. 1991. Glycolytic and associated enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red cells: in vitro and in vivo studies. *Journal of Experimental Biology* 155:469-485.
- Goda, A. 2008. Effect of dietary ginseng herb (Ginsana G115) supplementation on growth, feed utilization and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society* 39:205-214.
- Hillyer, C. D., Silberstein, L. E., Ness, P. M., Anderson, K. C., Roback, J. D. 2006. *Blood banking and Transfusion Medicine: Basic principles and Practice*, 2nd Edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 912 pp.
- Houston A. H., McCullough C. A. M., Keen J., Maddalena C., Edwards J. 1985. Rainbow trout red cells *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 81:55-565.
- Ingermann, R. L. Bissonette, J. M., Hall, R. E. 1985. Sugar uptake by red blood cells. In *Circulation, Respiration and Metabolism* (Gilles, R. ed.), pp. 290-300. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Ingermann, R. L., Hall, R. E., Bissonette, J. M., Terwilliger R. C. 1984. Monosaccharide transport in erythrocytes of the Pacific hagfish (*Eptatretus stouti*) *Molecular Physiology* 6:311-320.
- Iwama, G. K., Afonso, L. O. B., Vijayan, M. M. 2006. Stress in fish. In *The Physiology of Fishes*, 3rd ed. (Evans, D. H. & Claiborne, J. B., eds), pp. 319-342. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Iwama, G. K., Vijayan, M. M., Forsyth, R. B., Ackerman P. A. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist* 39:901-909.
- Momoda, T. S., Schwindt, A. R., Feist, G. W., Gerwick, L., Bayne C.J., Schreck, C.B. 2007. Gene expression in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during the stress response. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 2:303-315.
- Ojima, N. Yamashita, M., Watabe S. 2005. Quantative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329:51-57.
- Pemmasani, J. K., Pottinger, T. G., Cairns, M. T. 2011. Analysis of stress-induced hepatic gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high- and low-responsiveness to stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 6:406-419.
- Pesquero, J., Albi, J. L., Gallardo, M. A. Planas, J., Sanchez J. 1992. Glucose metabolism by trout (*Salmo trutta*) red blood cells. *Journal of Comparative Physiology, Part B* 162:448-454.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., Moon, T. W. 2012. Glucose metabolism in fish. *Journal of Comparative Physiology, Part B* 182:1015-1045.

- Powell, M. S., Plant, K., Rodnick K., Hardy, R. Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* erythrocytes respond to thermal stress *in vitro*. Annual Meeting of the World Aquaculture Society, Las Vegas, NV. Feb. 2012.
- Rehulka, J., Minarik, B., Rehulkova, E. 2004. Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquaculture Research* 35:529-546.
- Santin, A. E., Searle, A. J., Winston, V. D., Powell, M. S., Hardy, R. W., Rodnick, K. J. 2013. Glycated hemoglobin is not an accurate indicator of glycemia in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 165: 343-352.
- Septon, D., Driedzic, W. Glucose metabolism by searaven (*Hemipterus americanus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Journal of Experimental Biology* 194:167-180.
- Soengas J. L., Moon, T. W. 1995. uptake and metabolism of glucose, alanine and lactate by red blood cells of the American eel *Anguilla rostrata*. *Journal of Experimental Biology* 198:877-888.
- Tiihonen K., Nikinmaa M. 1991a. Substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Journal of Experimental Biology* 161:509-514.
- Tiihonen K., Nikinmaa M. 1991b. d-Glucose permeability in river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) and carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100A:581-584.
- Wacyk, J., Powell, M., Rodnick, K., Overturf, K., Hill, R. A., Hardy, R. 2012. Dietary protein source significantly alters growth performance, plasma variables and hepatic gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amino acid balanced diets. *Aquaculture* 356-357: 223-234.
- Walsh, P. J., Wood, C. M., Thomas, S., Perry S. F. 1990. Characterization of red blood cell metabolism in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 154:475-489.
- Watson, L., Milani, A., Hedrick, R. 1998. Effects of water temperature on experimentally-induced infections of juvenile white sturgeon (*acipenser transmontanus*) with the white sturgeon iridovirus (WSIV). *Aquaculture* 166:213-228.
- Wendelaar Bonga, S. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77:591-625.
- Wertheimer, E., Sasson, S., Cerasi, E., Ben-Neriah, Y. 1991. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proceedings of the National Academy of Science* 88:2525-2529.
- Zhou, Q., Yue, Y. 2008. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization and hematological values for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture* 284:185-189.

Avances en el Estudio de la Maduración y Reproducción de Curvina Golfina en el Estado de Sonora, México

Martin Perez-Velazquez^{a*}, Mayra L. González-Félix^a, Germán Emilio Ibarra-Garciaparra^b, Leobardo Borbón Quijano^b, José Luis Niebla Larreta^b

^aDepartamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Edificio 7-G, Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n, e/Sahuaripa y Reforma, Col. Centro, C.P.

83000, Hermosillo, Sonora, México. E-mail: mperezv@dictus.uson.mx.

^bInstituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O.P.D. Comonfort y Paseo del Canal. Centro de Gobierno. Edif. Sonora 2do. Piso ala sur. C.P. 83000, Hermosillo, Son., México

Resumen

La curvina golfina, *Cynoscion othonopterus*, es una especie de importancia comercial que pertenece a la familia Scianidae; ocupa el segundo lugar en producción entre las pesquerías de escama en el Golfo de California. Debido a la calidad y buena aceptación de su carne, así como a algunos estudios que sugieren que podría alcanzar la madurez sexual a una talla moderada y a una edad relativamente temprana, esta especie ha llamado recientemente la atención de acuicultores, investigadores y productores de alimentos, como una especie candidata para la acuicultura. En respuesta a esta inquietud, el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora y el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O.P.D., han realizado estudios con la finalidad de elucidar aspectos zootécnicos de su maduración y reproducción. En su mayor parte, estos son estudios pioneros y representan la primera evidencia documentada de diversos aspectos concernientes a la reproducción de esta especie. Entre los avances más significativos destacan la obtención de desoves *in situ* y el éxito tanto en la incubación como en la crianza de larvas y de juveniles hasta alcanzar tallas comercializables. Sin embargo, es preciso continuar con el refinamiento de los protocolos de alimentación larvaria y abordar otros aspectos relevantes para lograr la reproducción de esta especie bajo condiciones de cautiverio, como lo son el desarrollo de alimentos balanceados de destete, pre-engorda y maduración, así como la inducción al desove mediante la manipulación de factores físico-químicos y mediante la administración de hormonas. El presente trabajo describe los avances hasta ahora logrados.

Palabras clave: Curvina golfina; *Cynoscion othonopterus*; reproducción.

I-Introducción

Debido a la aparición de enfermedades, la producción de camarón de cultivo en el estado de Sonora, México, se ha reducido progresiva y dramáticamente de 81,422.8 millones de toneladas (MT) obtenidas en 2009, a 35,305.5 MT en el año 2012 (COSAES, 2013) y se espera tener una producción aún menor en 2013. El colapso de esta industria ha despertado cada vez más el interés local en el cultivo comercial de especies de peces marinos. Como actividad económica, el cultivo de peces marinos en gran escala ya se realiza exitosamente desde hace varias décadas para especies tales como el salmón (*Salmo salar*), la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Psetta máxima*), principalmente en Europa, en donde el cultivo de peces marinos está bien desarrollado (FAO, 2012). En México, el cultivo de peces marinos es incipiente, pero tiene un gran potencial, pudiendo contribuir a la diversificación de especies cultivadas comercialmente y también puede representar una opción rentable para los productores.

Entre las diversas especies de peces marinos disponibles en el noroeste de nuestro país destacan aquellas pertenecientes a la familia Sciaenidae, un grupo de organismos conocidos comúnmente como roncadore, nombre que reciben por el sonido característico que producen con su vejiga natatoria (Nelson, 1994). Este grupo está bien representado en el Golfo de California, con al menos 30 especies conocidas (van der Heiden, 1985), de las cuales tres son consideradas especies nativas: el chano norteño, *Micropogonias megalops*, la totoaba, *Totoaba macdonaldi* y la curvina golfina, *Cynoscion othonopterus* (Thompson y McKibbin, 1978). Esta última destaca por ser una especie de alto valor pesquero en la reserva de la biosfera Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado, Sonora-Baja California. La pesquería de curvina golfina resurgió en los años 90 y actualmente ostenta el segundo lugar en producción entre las pesquerías de escama en el Golfo de California, con 3,727 toneladas registradas en el año 2010 (Carta Nacional Pesquera, 2012). Así como otras especies de curvinas, la curvina golfina es apreciada por la calidad de su carne. Debido al actual interés regional en su cultivo, en la Universidad de Sonora se han realizado estudios

recientes que abordan, entre otros aspectos, los requerimientos nutricionales de la especie (Maldonado-Othón, 2013; Urquidez-Bejarano, 2013). Así mismo, las experiencias recientes en el mantenimiento de individuos de esta especie en cautiverio sugieren que, a diferencia de otras especies de peces marinos para los que es necesario esperar varios años hasta que alcanzan un peso corporal considerable, (e.g., 10 kg de peso o más) antes de ser aptos para la reproducción, la curvina golfina podría alcanzar la madurez sexual a una talla moderada y a una edad relativamente temprana, aproximadamente 2 años o menos. Las implicaciones de estas características incluyen la posibilidad, por una parte, de obtener organismos reproductores en un menor tiempo y costo, y por consiguiente, un menor costo en la obtención de críos. Y por otra, la de realizar la reproducción de esta especie en infraestructura de menores dimensiones y menor costo, en comparación con especies de gran talla. Es por ello que en el estado de Sonora recientemente se ha iniciado una colaboración entre el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O.P.D. (IAES), con la finalidad de elucidar aspectos zootécnicos de la maduración y reproducción de esta especie. En su mayor parte, estos son estudios pioneros y representan la primera evidencia documentada de aspectos tales como la obtención e incubación de desoves originados a partir de reproductores silvestres, la cría de larvas y obtención de juveniles hasta talla de engorda, entre otros. El presente trabajo describe los avances hasta ahora logrados.

II-Especies de curvinas cultivadas en el mundo

Reciben el nombre de curvinas gran parte de las especies pertenecientes a los géneros *Cynoscion*, *Sciaenops*, *Atractoscion*, y otros más de la familia Sciaenidae. Proveniente del latín “*curvinus*”, que significa parecido al cuervo, estos organismos deben su nombre a la similitud morfológica de su boca con el pico de aquellas aves, ya que poseen una boca grande, oblicua y prognata (Álvarez-Castillo, 2000). En general, las curvinas poseen interesantes características biológicas que las hacen buenos prospectos de cultivo, tales como altas tasas de crecimiento, índices adecuados de conversión alimenticia, además de

contar, como se mencionó anteriormente, con una buena calidad de carne muy apreciada por parte de los consumidores (Cárdenas, 2011).

La producción mundial total de curvinas cultivadas fue de 124,000 toneladas en el año 2008, con un valor que ascendió a los 168 millones de dólares (FAO, 2012). Las principales especies cultivadas comercialmente a nivel mundial son la curvina amarilla *Pseudosciana crocea* y la curvina roja *S. ocellatus*. La primera es nativa del este de Asia, su distribución abarca desde China hasta Corea, donde habita aguas costeras hasta los 100 m de profundidad. La segunda comenzó a ser cultivada en la década de los 70 cuando se lograron los primeros desoves en cautiverio y se desarrollaron técnicas para su cultivo larvario (Arnold *et al.* 1977). Se trata de una especie interesante porque se adapta bien al cautiverio, aceptando bien el alimento artificial y pudiendo alcanzar 500 g de peso en 9 meses (Holt, 2000). Por ello, esta especie se produce a gran escala en las costas norteamericanas del Golfo de México y del sureste Atlántico (Cárdenas, 2011).

Otras curvinas que figuran entre las especies cultivadas son el verrugato del sur, *Argyrosomus japonicus* y la curvina *A. regius*. La distribución natural del verrugato del sur abarca Australia, Sudáfrica, Madagascar e incluso la India (Cárdenas, 2011), aunque su cultivo se realiza principalmente en Australia. Se han reportado crecimientos de *A. japonicus* que varían de 800 hasta 1,200 g en 16 a 26 meses en varios tipos de infraestructura tales como estanques, tanques y jaulas flotantes (PIRSA, 2001; Love y Langenkamp, 2003). Por su parte, la producción de *A. regius*, especie habitante del mar Mediterráneo, es relativamente reciente, siendo España el mayor productor en 2010 con 3,250 toneladas (Cárdenas, 2012). Adicionalmente, las siguientes especies de curvinas han sido cultivadas en menor magnitud, ya sea con fines comerciales, experimentales o de repoblamiento: *Atractoscion nobilis* (curvina blanca), *C. nebulosus* (curvina pinta), *C. xanthulus* (curvina boquinaranja), *C. regalis* (curvina real), *Pogonias cromis* (curvina negra) y *Micropogonias undulatus* (curvina roncadina) en los Estados Unidos de América, *A. amoyensis* (curvina de Amoy) y *Larimichthys crocea* (curvina azafrán) en China, *A. inodorus* (curvina plateada) en Sudáfrica, *Cilus gilberti* (curvina pampera) en Chile, *Micropogonias furnieri* (curvina rubia) en Uruguay, *Totoaba macdonaldi* (totoaba) en

México, *Sciaena umbra* (corvallo) en Turquía y Grecia, así como *Umbrina cirrosa* (verrugato) en varios países de Europa (Chatzifotis *et al.*, 2006; Cárdenas, 2011, 2012; Martínez-Llorens *et al.*, 2011; Rueda-López *et al.*, 2011; Minjarez-Osorio *et al.*, 2012).

III-La curvina golfina (*C. othonopterus*)

La clasificación taxonómica de la curvina golfina (*C. othonopterus*), descrita por Jordan y Gilbert en 1881, se resume de la siguiente manera:

- Reino: Animalia
- Filo: Chordata
- Clase: Actinopterygii
- Superorden: Acanthopterygii
- Orden: Perciformes
- Suborden: Percoidei
- Familia: Sciaenidae
- Género: *Cynoscion*
- Especie: *C. othonopterus*

Es una especie que se distribuye desde La Paz, Baja California Sur, hasta el Delta del Río Colorado (Chao, 1995). Migra hacia áreas de desove en el alto Golfo de California y Delta del Río Colorado una vez al año. La longitud máxima registrada para un organismo de esta especie es de 920 mm (Román-Rodríguez, 2000). Se conoce que la base de su dieta está constituida por la sardina bocona (*Cetengraulis mysticetus*) (Román-Rodríguez, 1990). Esta especie posee una aleta dorsal larga y continua, con una escotadura entre las posiciones posterior y anterior; la anterior compuesta por nueve o diez espinas y la posterior por radios suaves. A la aleta anal le preceden dos espinas, siendo su base más corta que la base suave

dorsal; la aleta caudal es homocerca semilunada. Con excepción del hocico, el cuerpo de la curvina golfina está casi totalmente cubierto por escamas y presenta una coloración plateado brillante (Álvarez-Castillo, 2000).

IV-Aspectos reproductivos de la curvina golfina

Como se ha mencionado anteriormente, la curvina golfina migra anualmente con fines reproductivos al alto Golfo de California, adentrándose en las áreas de desove, mismas que se localizan en la zona conocida como la “Y”, que abarca dos canales alrededor de la Isla Montague en la desembocadura del Río Colorado, donde se lleva a cabo el desove de huevos, la fecundación y la crianza de los alevines. La llegada de la curvina golfina al alto Golfo de California inicia en el mes de octubre y concluye en el mes de mayo, pero se conoce que durante los meses de febrero y marzo ocurre la mayor actividad de desoves (Erisman *et al.*, 2012). Después de su primer año de vida en dicha área, los juveniles migran hacia el sur pero manteniéndose cerca de la costa del estado de Baja California, en busca de áreas de protección en zonas rocosas (Román-Rodríguez, 2000; Erisman *et al.*, 2012). La curvina es una especie iterópara y gonocórica, sin dimorfismo sexual evidente entre machos y hembras, excepto durante etapas de maduración gonádica avanzadas donde las hembras se caracterizan por tener el vientre muy abultado (Román-Rodríguez, 2000). De acuerdo con un estudio donde se colectaron 530 especímenes silvestres de esta especie y a través del análisis de cortes histológicos de gónadas de hembras, se ha determinado que la curvina golfina es un desovador múltiple, cuya gónadas tienen un desarrollo asincrónico, ya que presentan ovocitos en distintas fases de desarrollo cuando los ovarios están maduros, con una fecundidad que varió de 240,394 a 1,219,342 huevos, con un promedio de 684,293 huevos, observándose una correlación positiva de este parámetro con la longitud total y con el peso corporal (Gherard *et al.*, 2013).

V-Avances realizados en la Universidad de Sonora y el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O.P.D.

A continuación se describen los avances realizados por la Universidad de Sonora y el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O.P.D. en el estudio de la maduración y reproducción de la curvina golfina, que incluyen aspectos tales como la obtención e incubación de desoves originados a partir de reproductores silvestres, la cría de larvas y obtención de juveniles hasta talla de engorda, entre otros.

V.1-Obtención de desoves de curvina golfina originados a partir de reproductores silvestres

Uno de los primeros aspectos que se han abordado, y en el que se han logrado avances significativos, es la obtención de desoves de curvina golfina a partir de reproductores silvestres. Con base en el conocimiento de la migración reproductiva que realiza esta especie al alto Golfo de California, se ha aprovechado la abundancia de organismos silvestres maduros para extraer los gametos de especímenes recién capturados en su medio natural y llevar a cabo la fecundación, técnica denominada fecundación *in situ*.

Desde el año 2010 a la fecha, el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), ubicado en Bahía Kino, Sonora, y que pertenece al Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O.P.D., ha realizado cinco expediciones al Golfo de Santa Clara, en el municipio de San Luis Río Colorado, con el fin de obtener desoves para realizar la fecundación *in situ* de curvina golfina. La primera de ellas se realizó en el año 2010, la segunda en 2011, la tercera en 2012 y la cuarta y quinta en 2013.

La captura de organismos se ha realizado utilizando embarcaciones comerciales para pesca de escama (Figura 1), que utilizan como arte de pesca chinchorros curvineros de 100 a 150 brazas de longitud y con luz de malla de 5-6". Para la captura se ha contado con el apoyo de pescadores locales, quienes tienen plenamente identificadas las zonas de arribo de cardúmenes.



Figura 1. Embarcación utilizada para la captura de curvina golfina

Entre los organismos capturados, las hembras cuyas gónadas se encuentran en estadios de desarrollo gonadal avanzados pueden identificarse con relativa facilidad por su vientre abultado. Estos organismos han sido seleccionados para extraerles manualmente los gametos mediante la técnica conocida como ordeña o “stripping”, que consiste en presionar el abdomen en dirección anteroposterior para forzar la expulsión de los gametos (Figura 2).



Figura 2. Obtención de huevos de curvina golfina mediante la técnica de ordeña o stripping.

Pérez *et al.* 2013. Avances en el Estudio de la Maduración y Reproducción de Curvina Golfina en el Estado de Sonora, México
 En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C.
 (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León,
 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.271-293.

A través de la experiencia en campo se ha determinado que deben preferirse aquellos peces cuyos ovocitos son expulsados con facilidad, o casi espontáneamente, ante una presión ligera del abdomen, ya que con ellos se han obtenido los mejores resultados de fecundación *in situ* por tratarse de hembras cuyas gónadas contienen ovocitos con un avanzado grado de hidratación. En este tipo de organismos puede apreciarse que el tejido ovárico es relativamente hialino, a través del cual pueden verse los ovocitos que tienen color un tanto anaranjado y que han alcanzado su máximo tamaño (Figura 3). En contraste, las hembras que tienen el abdomen abultado pero cuyos gametos no son expulsados con facilidad, generalmente poseen ovocitos aún no listos para ser desovados y por consiguiente el éxito en la fecundación es menor. En estos organismos la gónada es más bien opaca y aún posee un característico color amarillo (Figura 4).

A)



B)



Figura 3. Gónadas con ovocitos en avanzado estado de hidratación: A) Disección del abdomen de un organismo recién capturado; B) gónada separada sostenida en la mano para mostrar su dimensión



Figura 4. Gónada de curvina golfina en estado avanzado de desarrollo pero con ovocitos aún no completamente hidratados. Nótese el color amarillento de la gónada (flecha).

Una vez seleccionadas las hembras, los ovocitos extraídos son colocados en contenedores de plástico con capacidad de 4 L, como puede observarse en la Figura 2. Enseguida, se selecciona un macho con gónada madura, aplicando el mismo criterio, prefiriendo aquellos organismos cuyo esperma es liberado fácilmente al aplicar presión sobre el abdomen (Figura 5) y esparciendo el esperma sobre los ovocitos.

Es conveniente resaltar que el agua del Golfo de Santa Clara es bastante turbia. Sin embargo, esto no parece afectar la fecundación y viabilidad de los embriones de esta especie, ya que aquí es donde se llevan a cabo los desoves naturales. Tomando esto en consideración, para realizar las fecundaciones *in situ* en las primeras expediciones se utilizó agua tomada directamente de esa zona. Aunque se tuvo éxito en la fertilización de huevos, como pudo constatarse una vez que fueron transportados al laboratorio en el CREMES



Foto: IAES

Figura 5. Fecundación *in situ*: extracción y adición de esperma de un macho a ovocitos recién obtenidos. Puede apreciarse el color blanco del esperma sobre los ovocitos en la charola.

en Bahía Kino, fue notorio el deterioro progresivo de la calidad de agua a lo largo del transporte, mismo que suele durar alrededor de 8 a 10 horas, lo que sin duda afectó la supervivencia de los embriones. Por ello, en las expediciones del año 2012 y 2013 se llevó del CREMES agua de mar limpia y filtrada para llevar a cabo la fecundación y el transporte

de los huevos con el fin de mejorar la supervivencia de las larvas, procedimiento que ha sido de gran utilidad. Los desoves *in situ* recién obtenidos son colocados individualmente en bolsas de plástico a las que se les provee de aireación moderada por medio de una bomba de aire o un compresor y piedras difusoras. Es impráctico el transporte y manejo de un tanque de oxígeno en la embarcación, por lo que se depende exclusivamente de la aireación. Una vez en tierra, las bolsas son colocadas para su transporte dentro de hieleras de plástico y son provistas de oxigenación y aireación moderadas. A este respecto, se ha ensayado el transporte con varios tipos de hielera, prefiriéndose aquellas fabricadas en plástico resistente y con un dren lateral, ya que ese orificio permite introducir la mangueras para la aireación y oxigenación, al mismo tiempo que permite mantenerlas cerradas a lo largo del trayecto.

V.2-Incubación de desoves de curvina golfina

Una vez en las instalaciones del CREMES, las bolsas con los desoves son colocadas en contenedores de incubación previamente preparados con agua limpia, filtrada y con aireación suave, colocando una bolsa o desove en cada incubadora y liberándolo en la incubadora una vez que ha alcanzado su aclimatación térmica. La incubadora recibe agua de mar limpia y filtrada a un flujo constante de entre 3 y 5 L por minuto. Transcurridas aproximadamente ocho horas después de la fecundación, es decir, al momento de la recepción de los desoves en el CREMES, son visibles los avances en el desarrollo embrionario, pudiendo apreciarse la fase de mórula (Figura 6), siendo este un indicativo del

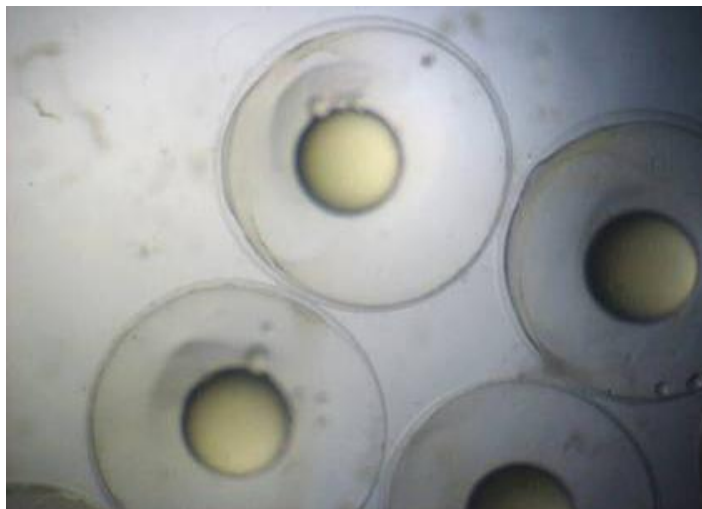


Figura 6. Embriones de curvina golfina en fase de mórula.

éxito en las fecundaciones realizadas. La cantidad de huevos viables y el éxito de las fecundaciones *in situ* ha sido variable. Por ejemplo, en una de las expediciones de marzo de 2013 se obtuvieron 6 desoves, observándose huevos fecundados en cuatro de éstos, en tanto que no hubo huevos viables en dos desoves. De los desoves en los que se obtuvieron huevos viables, el mayor número de éstos correspondió a 169,411 huevos, que representó un porcentaje de fertilización de 77%, mientras que el desove con el número menor de huevos viables fue de 12,307 huevos, correspondientes a un porcentaje de fertilización de 10%. Después de 24 horas de realizada la fecundación, el desarrollo del embrión es muy evidente. Después de 30 horas post-fecundación, la aleta primordial de los organismos está bien definida (Figura 7). La eclosión de los primeros huevecillos se ha observado generalmente entre 36 y 40 horas post-fecundación (Figura 8).



Figura 7. Embrión de curvina golfinia en avanzado estado de desarrollo. Puede apreciarse con claridad la aleta primordial.

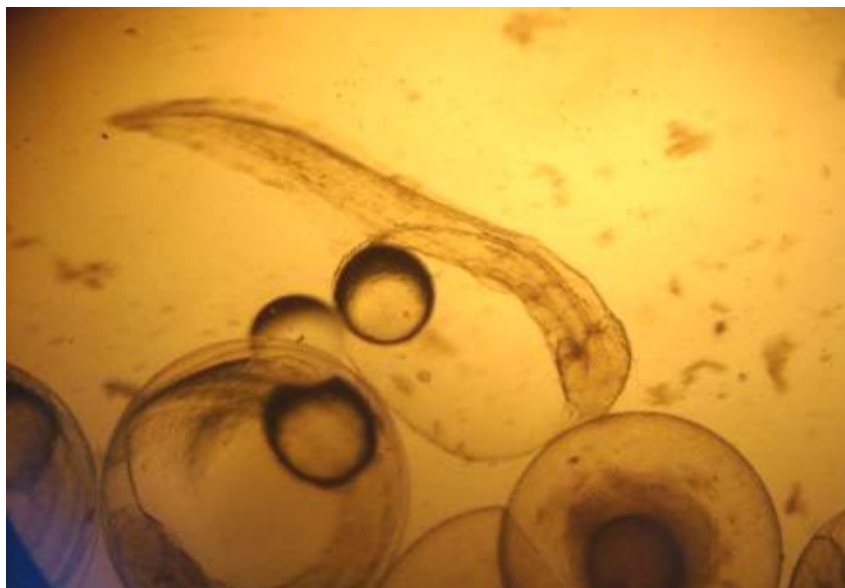


Figura 8. Embrión de curvina golfinia recién eclosionado, rodeado de otros cuya eclosión está muy cercana.

V.3-Desarrollo larvario

El desarrollo de los ovocitos se inspecciona periódicamente. Cuando un porcentaje mayor del 70% de los huevos de un desove ha eclosionado en las incubadoras, éstos se transfieren

Pérez *et al.* 2013. Avances en el Estudio de la Maduración y Reproducción de Curvina Golfinia en el Estado de Sonora, México
En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C.
(Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León,
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.271-293.

a tanques de cultivo larvario de 4,000 L de capacidad con agua limpia, filtrada y aireación suave. Transcurrido un día después de la eclosión (DDE), las larvas se caracterizan por poseer abundante vitelo y la gota o glóbulo de aceite, así como las manchas oculares. Dos días DDE, es notable el desarrollo de las larvas, que tienden a nadar contra la suave corriente provocada por la aireación. La longitud promedio de estas larvas es de 4.0 mm y 1.3 mm de ancho (Figura 9). Tres DDE, un cambio notorio de las larvas es el inicio de la formación de las aletas pectorales. En este momento el tracto digestivo se encuentra definido y por experiencia se ha observado que inicia la alimentación exógena.



Figura 9. Larva de curvina golfina 2 días después de la eclosión.

Se ha ensayado la alimentación con alimento balanceado comercial para larvas de peces con alto contenido de proteína, así como con alimento vivo. Aunque se ha observado que las larvas pueden consumir el alimento balanceado como primer alimento, actualmente se prefiere dar inicio a la alimentación exógena utilizando rotíferos, suministrados a una densidad de entre 5 y 10 rotíferos por mililitro. A los cuatro DDE, se ofrece a las larvas alimento balanceado comercial (Figura 10), pero se continúa el suministro de rotíferos hasta el día 13 o 15 DDE, momento en que dejan de ser aceptados por las larvas. Los nauplios de *Artemia* (instar I; Figura 11) forman parte importante del protocolo de alimentación, que pueden suministrarse a partir del día 7 DDE, a una concentración de 5 nauplios por mililitro y utilizándose en combinación con los rotíferos y con el alimento

balanceado. Las larvas dejan de aceptar los nauplios de *Artemia* entre el día 28 a 31 DDE. Con respecto al alimento balanceado, el alimento inicial debe de tener un tamaño de 50-100 μm y puede suministrarse desde el día 3 hasta el día 18 DDE. A partir del día 12 DDE, esta talla de alimento se mezcla progresivamente con otra mayor, de 150-200 μm , hasta que la más



Figura 10. Larva de curvina golfincha de cuatro días de edad con partículas de alimento en el estómago.

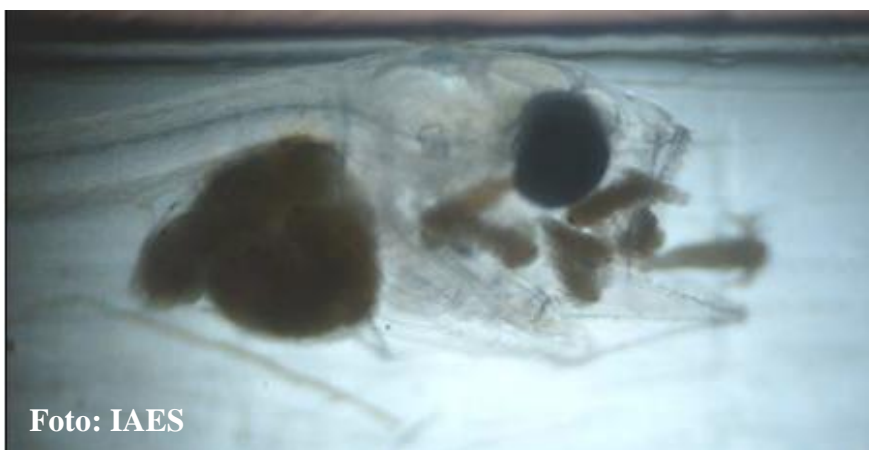


Figura 11. Alevín de curvina golfincha ingiriendo nauplios de *Artemia* sp.

pequeña se suspende al día 18 DDE y es reemplazada por completo por la de 150-200 μm . Este mismo procedimiento se realiza con una siguiente talla de alimento, de 300-500 μm , que puede incorporarse a partir del día 19, dejando de suministrarse la talla de 150-200 el día 37 DDE. Entre los días 37 a 40 DEE, se incluye un tamaño de partícula de 1 mm y el día 65 DDE se suministra uno de 2 mm. El día 75 DDE, los organismos pueden consumir un alimento de 3 mm. De acuerdo a la experiencia hasta ahora adquirida, los alevines pueden considerarse como juveniles entre los días 35 y 40 DDE.

V.4-Cría de juveniles hasta talla de engorda

Los registros de crecimiento de la curvina golfina en el CREMES indican que bajo condiciones de cultivo en tanques de concreto al interior, los organismos pueden alcanzar 40 g de peso promedio en 110 días.

A través de estudios de entre 6 y 8 semanas de duración realizados bajo condiciones de laboratorio en el DICTUS, Universidad de Sonora, y utilizando organismos con tallas iniciales desde 17.2 a 102.6 g, las tasas de crecimiento específico (TCE) observadas para esta especie han variado de 0.9 a 1.3%/día (Maldonado-Othón, 2013; Urquidez-Bejarano). En comparación con la magnitud de crecimiento de otras especies que también pertenecen a la familia Scianidae, el crecimiento de la curvina es comparable al de *A. regius* (0.5-1.2%/día), reportado por Martínez-Llorens *et al.* (2011), pero menor al de la totoaba (1.7-1.8%/día: Minjarez-Osorio *et al.*, 2012; 1.2-2.5%/día: Rueda-López *et al.*, 2011) o a los de la curvina roja (*S. ocellatus*) o el verrugato del sur (*A. japonicus*), con valores de TCE de 3.32 y 3.25%/día, respectivamente (Battaglione y Talbot, 1994; Alo, 2008).

Además de lo anterior, tanto en el DICTUS como en el CREMES se han mantenido organismos en cautiverio (no como parte de estudios formales) en diversos tipos de infraestructura tales como raceways y tanques, con el fin de alcanzar mayores tallas, las cuales en algunos casos han superado los 500 g de peso individual.

En el año 2012 en el CREMES se ensayó el cultivo de curvina en jaulas marinas flotantes, mientras que en el DICTUS se intentó su cultivo en estanques de tierra. Lamentablemente, en ambos casos ocurrieron mortalidades que no permitieron concluir estos estudios. Sin embargo, en ambas instituciones se coincide en que el crecimiento de la curvina golfina aparentemente no es muy acelerado durante las etapas juveniles y hasta los 80 a 100 g de peso, pero una vez que alcanza estas tallas su crecimiento parece transcurrir con mucha mayor rapidez.

V.5-Desarrollo de dietas de maduración

En el año 2012 se dio inicio a un estudio para desarrollar alimentos balanceados para la maduración de reproductores de curvina golfina en el DICTUS, Universidad de Sonora. Se utilizaron organismos obtenidos de los desoves *in situ* que fueron mantenidos en raceways de 10 m³ de capacidad hasta que alcanzaron un peso individual entre 400 y 500 g. Se formularon 4 alimentos balanceados de maduración con altos niveles de proteína y de ácidos grasos altamente insaturados como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA). Los pellets fueron elaborados con un extrusor Hobart (Modelo A-200, Hobart, Troy, Ohio, EUA) y se secaron durante 24 horas a una temperatura de 40°C, para posteriormente mantenerse en congelación hasta el momento de su administración. Se planeó evaluar el suministro de los alimentos balanceados por si solos y en distintas combinaciones con alimentos naturales (proporciones iguales de sardina y calamar), como se muestra en la Tabla 1, ya que la combinación de alimento balanceado + alimento natural

Tabla 1. Niveles de inclusión de alimentos balanceados y de alimento natural (sardina y calamar en iguales proporciones) para maduración de curvina golfina

Tratamiento	Alimento balanceado (%)	Alimento natural (%)
1	100	0
2	75	25
3	50	50

4	25	75
5	0	100

ha probado ser exitosa para la maduración de otras especies de peces pertenecientes a la familia Scianidae (Cárdenas, 2012). A pesar de que el estudio tuvo un inicio adecuado, ya que los organismos aceptaron muy bien los alimentos balanceados (Figura 12), el lote



Figura 12. Reproductores de curvina golfina en un raceway en el DICTUS, Universidad de Sonora.

completo de organismos se perdió por la infestación de un agente patógeno, presuntamente *Amyloodinium* sp. Coincidentemente, un lote de organismos de la misma cohorte mantenidos en el CREMES también se perdió por completo, aparentemente por la misma causa.

VI-Aspectos por abordar o reevaluar

Sin duda, como resultado del trabajo realizado por el DICTUS de la Universidad de Sonora y el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O.P.D., se han logrado avances significativos en el estudio de la maduración y reproducción de la curvina golfina. Entre ellos destacan la obtención de desoves *in situ* y el éxito tanto en la incubación como en la

crianza de larvas, juveniles y hasta tallas comercializables. Sin embargo, es preciso avanzar aún más en el conocimiento de aspectos relevantes para lograr la reproducción de esta especie bajo condiciones de cautiverio. Estos aspectos se describen a continuación.

Es necesario optimizar aún más el protocolo de alimentación durante el desarrollo larvario. Detalles de aspectos zootécnicos del cultivo larvario, tales como la densidad de siembra óptima, la concentración y enriquecimiento nutricional del alimento vivo (rotíferos y *Artemia*), tasas de alimentación óptimas con alimento balanceado, así como la optimización del destete, quedan pendientes de ser establecidos de manera reproducible.

Por otra parte, es necesario el desarrollo de alimentos balanceados de destete y de pre-engorda para esta especie. La disponibilidad de estos alimentos y su fabricación a nivel local o regional permitirá un mejor y más rápido desarrollo del cultivo comercial de esta interesante especie.

Así mismo, es necesario insistir en el desarrollo de alimentos balanceados de maduración. La experiencia del año anterior fue desafortunada debido a la mortalidad de los reproductores. A este respecto, cabe mencionar que en otros lotes de organismos jóvenes que posteriormente mostraron signos de infección por el mismo parásito, en el DICTUS se aplicó una disminución paulatina de la salinidad del agua de cultivo hasta 5 partes por mil, misma que se restituyó a la salinidad normal después de 4 días, resultando esta medida tan sencilla como efectiva para eliminar por entero el problema. A partir de los organismos obtenidos de los desoves *in situ* realizados en 2013 y una vez que hayan alcanzado tallas mayores, se espera repetir en 2014 los experimentos de desarrollo de dietas de maduración.

De manera conjunta con el desarrollo de dietas de maduración, la inducción al desove será un importante aspecto a evaluar en 2014. Por una parte, se ensayará la inducción al desove mediante la manipulación de factores físico-químicos como la temperatura y el fotoperiodo. Y por otra, se harán pruebas de inducción al desove mediante la administración de hormonas y otros compuestos que inciden sobre el eje hipotálamo-pituitaria-gónada.

VII-Conclusiones

Debido a que ostenta el segundo lugar en producción entre las pesquerías de escama en el Golfo de California, a la calidad y buena aceptación de su carne entre los consumidores, así como a que estudios recientes sugieren que la curvina golfina podría alcanzar la madurez sexual a una talla moderada y a una edad relativamente temprana, el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora y el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O.P.D., han realizado estudios con la finalidad de elucidar aspectos zootécnicos de la maduración y reproducción de esta especie. En su mayor parte, estos son estudios pioneros y representan la primera evidencia documentada de aspectos de la reproducción de esta especie. Entre los avances más significativos destacan la obtención de desoves *in situ* y el éxito tanto en la incubación como en la crianza de larvas y de juveniles hasta alcanzar tallas comercializables. Sin embargo, es preciso continuar con el refinamiento de los protocolos de alimentación larvaria y abordar otros aspectos relevantes para lograr la reproducción de esta especie bajo condiciones de cautiverio, como lo son el desarrollo de alimentos balanceados de destete, pre-engorda y maduración, así como la inducción al desove mediante la manipulación de factores físico-químicos y mediante la administración de hormonas.

Literatura citada

- Alo, M. 2008. Florida researchers test prototype recirc system to rear Red Drum juveniles. *Hatchery International* 9: 46-47.
- Arnold, C.R., Bailey, W.H., Williams, T.D., Johnson, A. y J.L. Laswell. 1977. Laboratory spawning and larval rearing of red drum and southern flounder. *Proceedings of the Annual Conference of the Southern Association of Game and Fish Commissioners*.
- Battaglione, S.C. y R.B. Talbot. 1994. Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces. Sciaenidae). *Aquaculture* 126: 73-81.
- Cárdenas, S. 2011. Acuicultura de corvinas en el mundo. En: Lira-Valenzuela M., Lodeiros-Seijo C., González-Henríquez N., Rey-Méndez M., Guerra-Díaz A. & Fernández-Casal J. (Eds.). *Memorias del III Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura*, 10-12 de Noviembre, 2010, Hermosillo, Sonora, México, p. 25-45.
- Cárdenas, S. 2012. Biología y acuicultura de corvinas en el mundo. *Revista AquaTIC* 37, 1-13.
- Chatzifotis S., Villamor A., Limberis N., Papandroulakis N. y P. Divanach. 2006. First data on growth of culture brown meagre *Sciaena umbra* using diets with different protein and fat contents. *Fisheries Science* 72: 83-88.
- COSAES (Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora). Resultados 2009-2012. <http://www.cosaes.com>.
- Erisman, B., O. Aburto-Oropeza, C. González-Abraham, I. Mascareñas-Osorio, M. Moreno-Báez y P. A. Hastings. 2012. Spatio-temporal dynamics of a fish spawning aggregation and its fishery in the Gulf of California. *Scientific Reports* 2: 284, 1-11.
- Love G. y D. Langenkamp. 2003. Australian Aquaculture: Industry Profiles for Related Species, ABARE eReport 03.8, Prepared for the Fisheries Resources Research Fund, Canberra.
- Maldonado-Othón, C.A. 2013. Efecto del nivel dietario de proteína y energía sobre el desempeño biológico de la curvina golfina (*Cynoscion othonopterus*). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Sonora.
- Martínez Llorens, S., Espert Moya, J., Jover, C.M. y A. Tomás-Vidal. 2011. Growth and nutrient efficiency of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fed extruded diets with different protein and lipid levels *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 3: 195-203.
- Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M.L. y M. Perez-Velazquez. 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture* 362-363: 50-54.
- PIRSA. 2001. Mullet aquaculture in South Australia. *Aquaculture SA Fact Sheet*, Adelaide, Australia.
- Román-Rodríguez, M.J. 1990. Alimentación de *Totoaba macdonaldi* (Pisces Sciaenidae) en la parte norte del Alto Golfo de California. *Ecologica* 1: 1-9.
- Román-Rodríguez, M.J. 2000. Estudio poblacional del chano nortero, *Micropongius megalops* y la curvina golfina *Cynoscion othonopterus* (Gilbert) (Pisces: Sciaenidae), especies endémicas del alto Golfo de México *et al.* 2013. Avances en el Estudio de la Maduración y Reproducción de Curvina Golfina en el Estado de Sonora, México En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds). *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.271-293.

- California, México. Instituto del Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora. Informe final SNIB-CONABIO proyecto N. L298. Mexico D.F.
- Rueda-López, S., Lazo, J.P., Correa-Reyes, G. y M.T. Viana. 2011. Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 319: 385–390.
- Thompson, D.A. y N. McKibbin. 1976. Gulf of California fishwatcher's guide. Golden Puffer Press. Tucson, Az. 75 pp.
- Van der Heiden, A. 1985. Taxonomía, Biología y evaluación de la ictiofauna demersal del Golfo de California, Cap. 4: 149-200.
- Urquidez-Bejarano, P. 2013. Efecto de la salinidad sobre la supervivencia, crecimiento y osmolalidad plasmática de juveniles de curvina golfina, *Cynoscion othonopterus*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora.

Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces

María Teresa Viana^a y Daniel Badillo Zapata^b

^aInstituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC),
Km 107 Autopista Tj-Ens, C.P. 22760, Ensenada, BC México

^b Programa de Doctorado en Ecología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Marinas,
UABC, México

Phone +52 646 1744601, E-mail: viana@uabc.edu.mx

Resumen

La asimilación de macromoléculas (en este caso proteína), pueden ser evaluada a través de marcadores internos como los isótopos estables. El ^{15}N y ^{14}N , son los isótopos estables del nitrógeno que son utilizados comúnmente en ecología para dilucidar los patrones tróficos, de las fuentes de producción. Esto se basa en la presunción fundamental de que los isótopos son integrados a un organismo de acuerdo a la fuente de su alimentación en un determinado tiempo y por tanto, cada ingrediente tendrá una relación isotópica muy particular. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la substitución en cuatro niveles (0, 33,67 y 100%) de la harina de pescado (FM) por la de subproducto de ave (PBM) para estimar la asimilación de estas dos fuentes principales de N y que a través de un modelo de mezcla con un sistema isotópico (N) y dos fuentes poder discernir el grado de asimilación. A partir de un mismo diseño experimental se trabajó con dos especies dulceacuícolas: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), lobina rayada (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) y tres de origen marino: totoaba (*Totoaba macdonaldi*), curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*) y lenguado de California (*Paralichthys californicus*). En todos los ensayos se hicieron cuatro tratamientos con tres repeticiones con un nivel de proteína y lípidos de acuerdo a las necesidades de cada especie respetando que las dietas fuesen isoproteicas e isoenergéticas. Se colectaron muestras al inicio y al final del experimento de las dietas, músculo e hígado. Se realizó una caracterización isotópica de los ingredientes, dietas y muestras del tejido (músculo e hígado) desengrasadas para determinar la composición relativa de $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$. Para

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

el modelo de mezcla se utilizaron los valores obtenidos de los tratamientos 33 y 67 PBM contrastados con aquellos en las que tienen como principal fuente de proteína la harina de pescado y harina de subproducto de ave. Los valores isotópicos obtenidos en cada dieta experimental para cada uno de los ensayos mostró ser distinto permitiéndonos una clara diferencia isotópica entre las dietas. De acuerdo al modelo de mezcla fue posible observar que las combinaciones entre las dos harinas (33 y 67% de remplazo) la contribución de N fue mayor a partir de la harina de subproducto de ave al 33% de la proporción que se había establecido inicialmente, esto nos indica que los organismos están asimilando de mejor manera el N proporcionado por la harina de subproducto de ave que la de pescado. Sin embargo, cuando se aumentó la sustitución en el tratamiento 67% la contribución de nitrógeno fue ligeramente menor que la proporcionada inicialmente, dándonos una mejor aceptación por la harina de pescado que la harina de subproducto de ave, sin embargo la trucha arcoíris fue la única especie que obtuvo mayores proporciones de asimilación de N proveniente de la harina de PBM incluso en la sustitución de un 67%. Como conclusión, se estima que la utilización de la técnica de isótopos estables representa una buena herramienta para poder estimar el nivel de asimilación de distintas fuentes de proteína que son incorporadas en la formulación de alimentos balanceados. En nuestros ensayos se pudo observar que los organismos marinos tienden a poder asimilar de mejor manera la FM que la PBM, sin embargo la asimilación de estas dos fuentes de proteína dependerá también de la especie con la que se esté trabajando.

Palabras clave: *isótopos estables, dietas, peces*

Introducción

Dentro de la nutrición acuícola existen dos grandes retos, uno el conocer los requerimientos nutricionales exactos de las distintas especies acuícolas que nos permitan diseñar dietas con un mínimo de pérdida al medio ambiente maximizando la eficiencia de conversión. Y otro, buscar un sustituto de las harinas de pescado ya que están llegando a su límite de producción.

Con relación a los requerimientos nutricionales, un hecho es que se sigan formulando dietas muy parecidas para las distintas especies en cuanto al nivel de proteína. A excepción de tilapia, trucha y salmón, el resto se formulan para contener entre un 50 y 55% de proteína. Considerando que las dietas de salmón iniciaron a un nivel similar, hoy en día han logrado reducir el nivel de proteína en más del 10%. Por esto resulta de gran importancia investigar de manera precisa el destino que lleva la incorporación de la proteína ingerida en el alimento. Por otro lado, el uso de harinas de pescado elaboradas a partir de pelágicos menores es uno de los temas que preocupa a un gran número de sectores tanto de investigación, producción y sociedad en general, no sólo por la inminente reducción de las pesquerías, sino también por las fuertes presiones que existen hoy en día en utilizar los pelágicos menores para alimentar a la población en vez de ser industrializada para su uso en la alimentación animal.

No obstante de esta presión, existe el argumento de que la industrialización de los pelágicos menores da también origen a la producción de aceites de pescado. Ya sea como producto de su extracción durante el proceso, así como también el constituir una fuente importante de lípidos dentro de la harina de pescado, cantidad que suele estar entre el 8 y 12% (FAO, 2006). El hecho de que la producción mundial de harina y aceite de pescado se haya conservado relativamente constante en los últimos 20 años, mientras que el porcentaje consumido por la acuicultura se ha elevado, (60-70% de la harina, y 80-90% del aceite de pescado; Tacon y Metian, 2008) se debe a

que su uso en la producción de otros organismos como aves, cerdos y mascotas han logrado independizarse de su utilización, precisamente gracias a estudios finos de nutrición.

Dentro de las propiedades que presenta la harina de pescado es su alta digestibilidad, un balance casi perfecto de aminoácidos, y el promover un buen crecimiento. Dentro de los aciertos más importantes para la sustitución de harina de pescado, aparte del uso de harina de soya, es el uso de las harinas de subproducto de animales terrestres en donde se ha logrado encontrar una harina de calidad que en gran medida ha logrado sustituir la fuente proteica (NRC, 2011; Hernández *et al.*, 2009). Una de ellas es la harina de subproducto de ave la cual se ha venido usando desde la década de los 80's aún cuando no en todos los casos con el éxito deseado ya que no se había podido substituir al 100% por harina de pescado. Sin embargo, debido a la mejora tecnológica en la separación de grasa, secado y el poder mantener una calidad constante, el subproducto de ave a la fecha se ha podido substituir en su totalidad por harina de pescado en algunas especies (Sealey *et al.*, 2011). La NRC (2011) hace referencia que el nivel de proteína y el perfil de aminoácidos de la harina de subproducto de ave es muy similar al de la harina de pescado.

El haber logrado sustituir la harina de pescado por harina de subproducto de ave no implica que conozcamos el nivel preciso de los requerimientos de las especies, sino que en términos generales hayamos encontrado una fuente proteica que pueda en términos generales, cumplir su función. Es así que el reto en la búsqueda de los requerimientos nutricionales precisos para las distintas especies siga siendo de gran importancia.

La calidad de la proteína generalmente se evalúa de acuerdo a su contenido de aminoácidos, que a menudo se prueba con base a la capacidad de digestión por enzimas como tripsina o extractos digestivos de peces a través de un análisis de digestibilidad *in vitro* con el pH-Stat. Como extractos digestivos se utilizan comúnmente homogenados crudos del hepatopáncreas o páncreas de las especies de interés o incluso utilizando un coctel de enzimas comerciales (Esquerra *et al.*,

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

1997; Cheng *et al.*, 2002). Aunque estos experimentos *in vitro* proporcionan información sobre la calidad de las fuentes proteicas con relación al potencial digestivo de las especies estudiadas, esta información sólo servirá para predecir el posible aprovechamiento de los distintos ingredientes y no da información con relación a la incorporación de los nutrientes en los tejidos (asimilación) para maximizar el crecimiento.

Las metodologías tradicionales empleadas en el estudio de la utilización de proteína, incluyendo la ingestión de alimento, el crecimiento, y la digestibilidad aparente se basan en experimentos *in vivo* bajo condiciones controladas de laboratorio. En algunos casos incluso es posible medir el gasto de energía y la producción de amonio para estimar la cantidad de proteína utilizada en funciones metabólicas y como fuente de energía (Gnaiger *et al.*, 1983).

Los resultados de los experimentos *in vitro* han sido criticados por no ser reproducibles en condiciones comerciales (NRC, 2011), además de que gran parte de los experimentos se realizan sólo por períodos cortos de tiempo y por lo general se centran en etapas de la vida temprana que en muchas ocasiones no se reflejan durante el proceso hasta la talla comercial (NRC, 2011).

Otro método novedoso dentro del área de nutrición acuícola es la utilización de isótopos estables. Este método si bien ha sido ampliamente utilizado dentro de la ecología para dar seguimiento a las poblaciones para el estudio de interacciones entre depredador y presa, recientemente se han estado aplicando dentro de la nutrición acuícola con gran precisión para rastrear el nivel de asimilación de las fuentes proteicas. Esta técnica se basa en que cada ingrediente contiene un sello único en la relación de masa de sus componentes de C:N los cuales varían de acuerdo a la cadena trófica en que se encuentran (Fry y Sherr, 1984; Focken, 2005). La técnica de isótopos estables representa una herramienta útil para poder estimar la dinámica de los nutrientes que son proporcionados por las distintas fuentes proteicas. Esto, ya que debido a la abundancia natural de la masa atómica y como se componen dentro de los distintos tejidos de plantas y animales,

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

constituyen un reflejo en la alimentación en los animales (Fry y Sherr, 1984; Focken y Becker, 1998). Es así que a través del crecimiento y/o incorporación de los isótopos estables con mayor masa dentro de los distintos tejidos, resulte factible el poder determinar el impacto de su alimentación. Entre los componentes principales que integran la materia orgánica (CHON), son el carbono (C) y nitrógeno (N) los elementos que se utilizan y determinan la abundancia relativa de sus isótopos ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$). El análisis de los isótopos estables también se ha utilizado para distinguir entre fuentes de proteínas y estimar su contribución relativa a la biomasa de un animal y para inferir el grado de participación entre fuentes alimenticias (Gaye-Siessegger *et al.*, 2004a, b; Karasov y Martínez del Río, 2007). Los diversos componentes y/o ingredientes con los cuales son elaboradas las dietas podrán presentar firmas isotópicas distintas, esta característica única de cada ingrediente podrá ser integrada en un modelo de mezcla isotópico (Lochman y Phillips, 1996; Martínez del Río *et al.*, 2009; Le Vay y Gamboa-Delgado, 2010). Permitiendo estimar la contribución relativa de cada ingrediente. El uso de modelos de mezcla isotópica requiere de que ciertos requisitos sean satisfechos en el diseño experimental (Martínez del Río *et al.*, 2009). Una de estas condiciones es que el consumidor esté en equilibrio isotópico con su dieta, es decir, que ambas señales isotópicas sean similares por haber estado ingiriendo un tiempo definido. Sin embargo, a pesar de que un organismo pudiera estar en equilibrio isotópico con su alimento (dinámica de transferencias isotópicas), existe un efecto fisiológico llamado enrutamiento isotópico (Gannes *et al.*, 1997) en el cual se observa que los elementos dietarios y sus isótopos no son homogéneamente mezclados en los tejidos de los organismos. Es decir que son selectivamente metabolizados e incorporados respondiendo a estados metabólicos distintos entre los distintos tejidos. Es así que un hígado podrá presentar una dinámica distinta a la del músculo en cuanto a la velocidad de incorporación de los isótopos estables.

Los experimentos realizados en nuestro laboratorio han involucrado en una primera fase, el efecto de la asimilación en un diseño de sustitución de harina de pescado por harina de subproducto de ave, calidad “*Pet food grade*” donada por la NRA (National Renderers

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

Association) y procedente de los Estados Unidos. Misma que posee un marcaje isotópico muy distinto a la harina de pescado por proceder de ambientes lejanos dentro de la cadena trófica.

Materiales y métodos

A partir de un mismo diseño experimental para distintas especies, se estudiaron en experimentos independientes, evaluando la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), lobina rayada (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*), curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*) y lenguado de California (*Paralichthys californicus*). Entre estas especies, todas ellas carnívoras, se encuentra uno de agua dulce, otro de agua dulce pero adaptado al ambiente marino y tres netamente marinos.

Con tal fin, el diseño experimental consistió en 4 niveles de sustitución proporcional de la harina de pescado (HP) por harina de subproducto de ave (HA). La dieta 0HA constituida con 100% harina de pescado, dieta 33HA, 33% harina de ave (HA) con 67 de harina de pescado (HP), dieta 67HA, 67/33 de HA y HP y la dieta 100HA, con el 100% de HA (Cuadro 1). Las dietas se formularon de acuerdo a los requerimientos de cada especie y para cada diseño las dietas fueron isoproteicas e isoenergéticas. Antes de su elaboración se realizó un mapeo isotópico de los ingredientes con contenido proteico (harinas de pescado, subproducto de ave y gelatina) conteniendo valores isotópicos distintos (14.1, 3.4 y 7.8‰, respectivamente).

En todos los casos juveniles de las especies a experimentar se mantuvieron en un sistema de recirculación ya sea con agua dulce y/o con agua de mar (33‰) utilizando un biofiltro conectado a un reservorio manteniendo las condiciones constantes de temperatura. Los peces se alimentaron a saciedad con tres raciones (0800, 1300 y 1900 hrs). Muestras de tejido de músculo e hígado fueron tomadas al inicio (6 peces) y al final del experimento (3 peces por estanque).

Cuadro 1. Ingredientes (g kg^{-1} peso seco) de cuatro dietas experimentales conteniendo 4 niveles de sustitución de harina de ave (0, 33, 67 y 100 %) por harina de pescado para cada uno de los experimentos (5) por especie

Especies	Ingredientes	Tratamientos			
		0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Harina de ave ^a	0.0	23.5	44.0	59.0
	Harina de pescado ^b	66.0	40.0	17.5	0.0
	Aceite de pollo	0.0	0.5	1.7	3.5
	Aceite de Pescado	7.2	5.2	2.8	0.0
	Maizena	9.1	13.1	16.6	20.1
Lobina rayada (<i>Morone saxatilis x M. chrysops</i>)	Harina de ave ^a	0.0	21.2	43.0	64.3
	Harina de pescado ^b	63.2	42.3	21.7	0.0
	Aceite de pollo	0.0	3.2	6.7	10.5
	Aceite de pescado	12.9	8.8	4.4	0.0
	Maizena	8.7	9.2	9.2	10.3
Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	Harina de ave ^a	0.0	22.5	45.0	67.0
	Harina de pescado ^b	65.2	43.3	21.5	0.0
	Aceite de pollo	0.0	0.0	0.0	0.0
	Aceite de pescado	2.9	1.9	0.9	0.0
	Maizena	16.7	16.9	17.6	17.9
Curvina golfina (<i>Cynoscion Othonopterus</i>)	Harina de ave ^a	0.0	23.5	44.0	59.0
	Harina de pescado ^b	66.0	40.0	17.5	0.0
	Aceite de pollo	0.0	0.5	1.7	3.5
	Aceite de pescado	7.2	5.2	2.8	0.0
	Maizena	9.1	13.1	16.6	20.1
Lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>)	Harina de ave ^a	0.0	21.0	43.5	65.0
	Harina de pescado ^b	63.0	42.5	21.0	0.0
	Aceite de pollo	0.0	0.0	0.0	0.0
	Aceite de pescado	2.9	2.0	0.97	0.0
	Maizena	18.8	19.2	19.6	20.7

Ingredientes comunes en todas las dietas: Harina de maíz 5.5; gelatina 6; mezcla de vitaminas y minerales 3; stay C 0.4; benzoato de sodio 0.23; cloruro de colina 0.09; tocopherol 0.01.

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

^a“Pet food grade” procedente de los Estados Unidos y donada por la “National Renderers Association”

^bHarina de pescado de Proteínas Marinas y Agropecuarios de Guadalajara Jalisco, México.

^c Mezcla de vitaminas rovimix; Stay-C y mezcla de minerales, generosamente donados por DSM, Guadalajara, México.

Cuadro 2. Composición proximal en cuanto a proteína cruda y grasa cruda para cada una de las especies a experimentar

Especie	Composición Proximal	
	Proteína Cruda %	Grasa cruda %
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	43.1	12.5
Lobina rayada (<i>Morone saxatilis x M. chrysops</i>)	51.5	18.5
Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	54.1	8.0
Curvina golfina (<i>Cynoscion othonopterus</i>)	54.3	9.0
Lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>)	50.0	9.0

Análisis proximales

El análisis proximal de las dietas y tejido fue medido por triplicado y expresado en materia seca de acuerdo a los estándares propuestos por AOAC (1995). Las muestras de músculo de los peces fueron colectadas a partir de la aleta dorsal y el hígado. Cada muestra por separado fue llevada a peso seco constante (100°C). El contenido de proteína cruda (PC) se determinó estimando el nitrógeno total por el método de micro-kjeldahl utilizando %N x 6.25. La concentración de lípidos se determinó por gravimetría después de la extracción por el método de Soxhlet utilizando como solvente éter de petróleo. El contenido de cenizas se determinó después de haber incinerado las muestras a 550°C durante 6hrs. El Extracto Libre de Nitrógeno se determinó por diferencia (% ELN = 100 – (% de proteína cruda + % de lípidos + % de cenizas).

Análisis Isotópico

La determinación del isótopo estable $\delta^{15}\text{N}$ se realizó a partir de muestras desengrasadas de las muestras iniciales y finales de músculo e hígado, así como de los ingredientes y dietas. Con los valores de dichas muestras se determinó la composición relativa de $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$. En resumen, muestras de 1.5 mg pesados en una ultra balanza ($\pm 0.1\mu\text{g}$) se guardaron en cápsulas de estaño para su envío y análisis al laboratorio de isótopos estables de la Universidad de California Davis (USA). Dichos análisis se llevaron a cabo utilizando un analizador elemental de interfaz con un espectrómetro de flujo continuo de masas de relación isotópica (IRMS) con una precisión de 0.3‰ para $\delta^{15}\text{N}$. El valor isotópico de la muestra fue expresado con la connotación delta (δ) en partes por (‰) relativo al nitrógeno atmosférico siguiendo la siguiente fórmula:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [(\text{R muestra} - \text{R estándar}) / \text{R estándar}] \times 1000$$

donde R de la muestra y R del estándar representan la relación del isótopo pesado al isótopo ligero ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). La discriminación Isotópica del tejido del músculo (Δ) relativo a cada una de las dietas experimentales que se encuentran en equilibrio isotópico se calculó con la siguiente ecuación:

$$\Delta = (\delta_{\text{tejido}} - \delta_{\text{dieta}})$$

Para los tratamientos 33 y 67 PBM se utilizó el modelo de mezcla isotópico con dos fuentes principales de proteína (harina de pescado y harina de subproducto de ave) para poder estimar las diferencias entre la contribución de nitrógeno que fue asimilada en el músculo de los peces por alimento, asumiendo que el organismo consumidor ya se encuentre en equilibrio con la dieta (Phillips and Koch 2002):

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{músculo}} (\text{‰}) = f_{\text{harina de pescado}} (\delta^{15}\text{N}_{\text{harina de pescado}} + \Delta) + f_{\text{HA}} (\delta^{15}\text{N}_{\text{HA}} + \Delta)$$

$$1 = f_{\text{harina de pescado}} + f_{\text{HA}}$$

Los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{músculo}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{harina de pescado}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{harina de subproducto de ave}}$, representan la composición isotópica del músculo del pez, la harina de pescado y la harina de subproducto de ave. El valor $\delta^{15}\text{N}_{\text{músculo}}$ son corregidos por el factor de discriminación trófica. Para el 0% y el 100% de harina de subproducto de ave, la composición isotópica del músculo de las distintas especies a experimental se considera que reflejan el equilibrio con la harina de pescado o la harina de subproducto de ave según sea el caso.

Análisis estadístico

Para observar posibles diferencias entre los índices biológicos y los valores de discriminación trófica de tejido del músculo y/o hígado de cada unidad experimental según sea el caso, fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (n=3). Para aquellos en donde se hayan detectado diferencias estadísticas, se utilizó la prueba a posteriori de Tukey utilizando SigmaStat para Windows 3.5.

Resultados y Discusión

Los valores isotópicos ($\delta^{15}\text{N}$ (‰)) de cada una de las dietas experimentales que contenían 4 niveles de sustitución de harina de ave (0, 33, 67 y 100 %) por harina de pescado se muestran en el Cuadro 2. Como se puede observar, los valores isotópicos de las dietas en todos los casos reflejan el contenido de las distintas fuentes de nitrógeno. Por ejemplo, la gelatina que fue utilizada como enlazante con un contenido de 84% de proteína cruda representa el 10% del contenido de proteína en el caso de la trucha y en menor medida para las otras especies con mayor requerimiento proteico. Sin embargo, la HP y HA como principales fuentes de proteína representan el 88% del nitrógeno presente asumiendo que el N de la harina de maíz correspondió al 0.1%. Es así que tanto la HP como la HA muestran un valor isotópico distinto lo cual es ideal para permitir una clara diferencia isotópica (Karasov *et al.*, 2011).

Cuadro 3. Valor isotópico $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de las distintas dietas experimentales para las distintas especies con diferentes niveles de sustitución de HP por HA.

Especie	Tratamientos			
	0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	12.7	9.0	6.1	4.2
Lobina rayada (<i>Morone saxatilis</i> x <i>M. chrysops</i>)	14.5	11.2	8.5	4.6
Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	15.3	11.5	7.7	4.7
Curvina golfina (<i>Cynoscion othonoptera</i>).	14.6	11.3	8.5	4.8
Lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>)	15.0	11.4	8.1	4.8

Es también importante resaltar la variación que pueden sufrir los distintos lotes de ingredientes. Por ejemplo, la dieta 0HA presenta valores desde 12.7 hasta 15.3 dependiendo del lote mismo de HP así como la influencia de la gelatina, la cual fue mayor en la dieta para trucha y menor para la totoaba y curvina. Estas últimas formuladas con un mayor contenido relativo de proteína (54 contra 43 % de proteína para la trucha), mientras que la gelatina permaneció constante al 6%.

En el cuadro 4 se muestran los valores obtenidos en las muestras de hígado y músculo (según sea el caso) de los distintos tratamientos contrastándolos con su valor inicial y entre los distintos experimentos realizados. Una vez realizados los ensayos se tomaron las muestras individuales de tejido (músculo e hígado en la mayoría de los casos), y al igual que las muestras de las dietas se desengrasaron para evitar cualquier error o alteración de la muestra debido al incremento en grasa de cada individuo. Como se puede observar en dicho cuadro, existe una tendencia a lo que fue el valor isotópico de la dieta que se le estaba suministrando a cada especie.

En el caso de la trucha no se cuenta con el valor inicial, sin embargo, las muestras de músculo lograron llegar a un equilibrio isotópico con los valores de sus respectivos alimentos como se muestra en el cuadro 3. En general el valor isotópico en el músculo es ligeramente superior al de los alimentos salvo en del tratamiento 100HA. Se sabe que la incorporación isotópica no es

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

homogénea a lo largo de todos los tejidos así como tampoco es igual entre las distintas especies (Martínez del río y Carleton, 2012). Esto se debe a las distintas adaptaciones en el aparato digestivo y fisiología, o bien a una serie de interacciones dentro de los organismos como la actividad metabólica del individuo. En este caso se trabajó con especies carnívoros aunque trucha ha sido descrito con una cierta omnivoría o al menos adaptable a distintos tipos de alimentación lo cual sugiere que la trucha sea capaz de aprovechar mayormente sus alimentos.

Mientras que con trucha se observa claramente el efecto de la dieta en la composición isotópica del músculo, no ocurre así en las otras especies. Si bien en todos los casos los valores isotópicos decrecieron conforme se fue agregando la harina de ave, la diferencia fue haciéndose más marcada en aquellos tratamientos alimentados con una mayor cantidad de HA. Entre los experimentos en donde se evaluó el hígado, éste logró contener un fraccionamiento isotópico menor que lo que se observó en el músculo. La razón por la que puede deberse dicha diferencia entre el músculo y el hígado es que éste último es uno de los órganos con mayor tasa de recambio. En vertebrados se sabe que los tejidos del plasma e hígado son los de mayor tasa de recambio y por tanto, el recambio isotópico refleja de mayor manera la reintegración de la comida reciente, a diferencia del hueso o colágeno (Martínez del Río *et al.*, 2009). No obstante las cifras mostradas para el músculo se encuentran dentro del rango esperado para poder establecer un equilibrio con su dieta.

El fraccionamiento isotópico se refiere al cambio isotópico de un elemento con relación a otro. De esta manera se establece el tiempo requerido para que un tejido cambie con relación a su dieta. Como se mencionó con anterioridad el fraccionamiento isotópico difiere entre tejidos. Sin embargo, también existe una marcada diferencia entre las especies. No sólo por la edad y/o tamaño como podría esperarse, sino también debido a la tasa de crecimiento que pueda caracterizar a las distintas especies y claro, a la manera como aprovechas sus alimentos. Si existe una tasa catabólica diferencial entre las especies esto podría dar diferencias. El hecho de o

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

dar las raciones adecuadas durante el día podría ser otra razón que altere la tasa de incorporación del alimento.

Cuadro 4. Valor isotópico $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de hígado y músculo tomado al inicio del experimento y el valor isotópico al final de cada experimento con diferentes niveles de sustitución de Harina de pescado por Harina de subproducto de ave

Especies / tiempo de experimentación (días)		Tratamientos				
		Inicial	0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (80d)	músculo	Nd	14.7±0.9 ^a	10.1±0.1 ^b	7.1±0.11 ^c	4.1±0.05 ^d
	hígado	Nd	Nd	nd	Nd	nd
Lobina rayada (197d)	músculo	14.7	17.2±0.2 ^a	15.7±0.1 ^b	14.3±0.2 ^c	13.1±0.2 ^d
	hígado	13.4	17.1±0.3 ^a	15.5±0.1 ^b	12.9±0.4 ^c	11.9±0.5 ^d
Totoaba (86d)	músculo	13.8	18.1±0.0 ^a	16.3±1.4 ^b	11.9±0.2 ^c	9.64±0.3 ^d
	hígado	Nd	16.5±1.2 ^a	12.8±2.3 ^b	9.9±0.3 ^c	9.1±0.6 ^c
Curvina golfina (137d)	músculo	12.7	16.3±0.8 ^a	14.5±0.6 ^b	13.0±0.3 ^c	10.7±0.2 ^d
	hígado	11.1	15.3±0.5 ^a	12.7±0.9 ^b	8.8±0.3 ^c	6.8±0.5 ^d

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

Lenguado de California (120d)	músculo	10.7	16.7±0.3 ^a	14.5±0.4 ^b	11.7±0.3 ^c	9.8±0.3 ^d
	hígado	9.5	16.1±0.4 ^a	13.2±0.3 ^b	10.5±0.6 ^c	7.5±0.4 ^d

Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); lobina rayada (*Morone saxatilis x M. chrysops*); totoaba (*Totoaba macdonaldi*); curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*); lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

En el cuadro 5 se presenta el factor de discriminación isotópica que existe entre el tipo de tejido que se está analizando y su dieta, como podemos ver los valores en el hígado son relativamente menores a los observados en el músculo. Sólo en la trucha no se determinó el valor isotópico, pero como se puede ver, hay una tendencia en la gran mayoría de los tratamientos al incrementar la inclusión de harina de ave el fraccionamiento aumenta tanto en el hígado como en el músculo. De acuerdo a Martínez del Río *et al.* (2009) la partición entre crecimiento y catabolismo es complicada si el organismo no está creciendo exponencialmente. Las diferencias más marcadas se registraron con la lobina rayada, experimento en donde se registró un bajo crecimiento debido a la baja temperatura. Esto pudo ser un factor que hiciera que el catabolismo fuera mayor al crecimiento y por tanto menor el fraccionamiento isotópico. No obstante, es de llamar la atención que la diferencia se acentúa con la utilización de la harina de subproducto de ave, a pesar de que los tratamientos con 67HA fueran en donde se obtuvo la mayor tasa de crecimiento en la mayoría de los casos.

Cuadro 5. Factor de discriminación isotópico $\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) en muestras de músculo e hígado con diferentes niveles de sustitución de HP por HA ($\Delta = \delta_{\text{tejido}} - \delta_{\text{dieta}}$)

Especies/Tiempo de experimentación	Tejido	Tratamientos			
		0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (80d)	músculo	2.0	1.1	1.0	-0.1
	hígado	nd	nd	nd	nd
Lobina rayada (197d)	músculo	2.7	4.6	5.9	8.6
	hígado	2.5	4.3	4.4	7.3
Totoaba (86d)	músculo	2.8	4.8	4.2	4.9
	hígado	1.2	1.3	2.2	4.4
Curvina golfina (136)	músculo	1.7	3.2	4.5	5.9
	hígado	0.7	1.5	0.2	2.0

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

Lenguado de California (120d)	músculo	1.7	3.2	3.6	5.0
	hígado	1.1	1.9	2.4	2.7

Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); lobina rayada (*Morone saxatilis x M. chrysops*); totoaba (*Totoaba macdonaldi*); curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*); lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

Cuadro 6. Modelo de mezcla estimado al utilizar dos fuentes isotópicas (0HA y 100HA) y muestra el porcentaje de asimilación de nitrógeno para las distintas especies a partir de dietas que contenían dos niveles de inclusión 33 y 67% de remplazo de harina de pescado (HP) por harina de subproducto de ave (HA)

Especie / días de ensayo		Tratamientos	
		33HA	67HA
Trucha arcoíris (80d)	HP (%)	53	26
	HA(%)	47	74
Totoaba (86d)	HP (%)	64	36
	HA(%)	34	66
Lobina rayada (197d)	HP (%)	62	38
	HA(%)	40	60
Curvina golfina (136d)	HP (%)	62	38
	HA(%)	40	60
Lenguado de California (120d)	HP (%)	74	26
	HA(%)	43	57

Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*); lobina rayada (*Morone saxatilis x M. chrysops*); totoaba (*Totoaba macdonaldi*); curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*); lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

En el cuadro 6 se muestra el porcentaje de asimilación de nitrógeno utilizando un modelo de mezcla en donde se asume que las mezclas deberían asimilar proporcionalmente la misma cantidad del ingrediente de lo que se obtuvo entre el 0 y el 100HA, cuyas diferencias podrán resaltar a los ingredientes que se asimilan con mayor facilidad. Es así que el 33HA se espera que

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

asimile proporcionalmente las mismas cantidades de ambos, es decir 33 de HA y 67 de HP. De todas las especies experimentadas es la trucha quien mejor parece aceptar la harina de subproducto de ave ya que la HA se asimila en mayor proporción que lo que existía en la dieta. Es necesario resaltar que en todos los casos en donde la HA se ofreció en un 33% el porcentaje de asimilación de la HA fue mayor que cuando se ofreció en un 67%. Esto pudiera indicar que existe algún aminoácido limitante en la HA que al ser suministrada en mayores proporciones refleja una disminución en la asimilación. Si se observa el crecimiento en todos los casos, esto no afecta pues aún mostrando un mayor crecimiento con los tratamientos de 67HA se refleja una menor proporcionalidad en la asimilación de la HA. Lo anterior puede ser un reflejo de que las dietas están sobradas en proteína y que existe aún espacio para poder balancear mejor las dietas y obtener un ahorro proteico.

Cuadro 7. Tasa específica de crecimiento (SGR) de los distintos tratamientos para cada uno de los experimentos realizados utilizando diferentes niveles de sustitución de HP por HA. Las distintas letras como superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos para cada uno de los experimentos

Especie/ Tiempo de experimentación	Tratamientos			
	0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (80d)	3.4±0.1	3.4±0.1	3.5±0.0	3.4±0.2
Lobina rayada (197d)	0.3±0.2 ^a	0.2±0.1 ^a	0.2±0.0 ^b	0.1±0.2 ^c
Totoaba (86d)	2.6±0.1 ^b	2.9±0.2 ^b	3.5±0.0 ^a	1.6±0.5 ^c
Curvina golfina (136d)	0.8±0.1 ^a	0.8±0.0 ^a	0.5±0.0 ^b	0.3±0.0 ^c
Lenguado de California (120d)	0.8±0.1 ^a	0.7±0.2 ^b	0.4±0.0 ^c	0.2±0.5 ^d

Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); lobina rayada (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*); totoaba (*Totoaba macdonaldi*); curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*); lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

Conclusiones

El uso de los isótopos estables constituye una poderosa herramienta para conocer no sólo el porcentaje de asimilación de los distintos ingredientes y/o dietas, sino también nos puede llevar a definir de mejor manera la calidad y tipo de las fuentes proteicas utilizadas, así como el uso y destino de los aminoácidos contenidos en dichas fuentes proteicas.

La harina de pescado puede ser reemplazada por harina de subproducto de ave en un 67%, lo cual constituye una ventaja para el desarrollo de la acuicultura al no contar con suficiente abasto de harina de pescado.

Se presume que la mayor limitante para el reemplazo total de la harina de pescado está en el contenido de los LC-PUFAs.

Referencias

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Bowyer JN, Qin JG, Smullen RP, Stone DAJ (2012) Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture* 357:211-222.
- Cheng ZJ, Hardy RW (2002) Apparent digestibility coefficients of nutrients and nutritional value of poultry by-product meals for rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* measured in vivo using settlement. *J World Aquacul Soc* 33:458-465.
- Cruz-Suárez E, Nieto-López M, Guajardo-Barbosa C, Tapia-Salazar M, Scholz U, Ricque-Marie D (2007) Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture* 272:466-476.
- EL-Haroun ER, Azevedo PA, Bureau DP (2009) High dietary incorporation levels of rendered animal protein ingredients on performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972). *Aquaculture* 290:269-274
- Ezquerria JM, Garcia-Carreño FL, Civera R, Haard NF (1997) pH-stat method to predict protein digestibility in White shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157:251-262.
- FAO (2006) State of world Aquaculture. FAO Fisheries Tesheries Technical Paper No. 500, Rome.
- Focken, U (2005) Stable isotopes as tracers for the metabolic routing of individual dietary components. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 14:37.
- Focken U, Becker K (1998) Metabolic fractionation of stable carbon isotopes: Implications of different proximate compositions for studies of the aquatic food webs using delta-C13 data. *Oecologia* 115:337-343
- Fry B, Arnold C (1982) Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia* 54:200-204.
- Fry B, Sherr EB (1984) $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow on marine and freshwater ecosystems. *Contrib in Mar Sci* 27:13-47.
- Gamboa-Delgado J, Cañavate JP, Zerolo R, Le Vay L (2008) Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 280:190-197.

- Gamboa-Delgado J, Le Vay L (2009) Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets, *Aquaculture* 291:115-123.
- Gannes LZ, O'Brien DM, Martinez del Rio C (1997) Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78:1271- 1276
- Gaye-Siessegger J, Focken U, Muetzel S, Abel H, Becker K (2004a) Feeding level and individual metabolic rate affect $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* 138:175–183.
- Gaye-Siessegger J, Focken U, Abel HR, Becker K (2004b) Individual protein balance strongly influences $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften* 91:90–93.
- Gnaiger E, Forstner H (1983) Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, p. 370.
- Halver JE (2002) The Vitamins. In: Halver JE, Hardy RW (ed), *Fish Nutrition*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, pp. 61–141.
- Herzka SZ (2005) Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ration analysis. *Estuar Coast Shelf S* 64:58-69
- Hesslein R, Hallard K, Ramlal P (1993) Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$. *Can J Fish Aquat Sci* 50:2071–2076.
- Karasov WH, Martínez del Rio C (2007) *Physiological Ecology: How Animals Process Energy, Nutrients, and Toxins*. Book for Princeton University Press, Princeton, NJ, pp 724
- Karasov, W.H., Martínez del Río, C., Caviedes-Vidal, E. (2011) *Ecological Physiology of Diet and Digestive System*. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 69-93.
- Lochman R, Phillips H (1996) Stable isotopic evaluation of the relative assimilation of natural and artificial foods by golden shiners *Notemigonus crysoleucas* in ponds. *J World Aquacult Soc* 27:168-177
- Le Vay L, Gamboa-Delgado J (2010) Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture* 315:95-103
- MacAvoy SE, Macko SA, Arneson LS (2005) Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Can J Zool* 83:631–641.
- Macko SA, Estep ML F (1984) Microbial alteration of stable nitrogen and carbon isotopic composition of organic matter. *Org Geochem* 6:787-790.
- Martínez del Rio, C, Carleton SA (2012) How fast and how faithful –the dynamics of isotopic incorporation into

- animal tissues. *J. Mammal.* 93: 353-359
- Martínez del Río C, Wolf BO (2005) Mass-balance models for animal isotopic ecology. In: *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates.* (Starck, J.M., Wang, T. Eds.). Science Publishers, Enfield, NH, pp. 141-174.
- Martínez del Río C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev* 84:91-111.
- McCutchan Jr JH, Lewis Jr WM, Kendall C, McGrath CC, (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ration of carbon, nitrogen, and sulfur. *OIKOS* 102:378-390.
- National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.* National Academies Press, Washington, DC, p 376
- Parés-Sierra G, Durazo E, Ponce MA, Badillo D, Correa-Reyes G, Viana MT (2012) Partial to total replacement of fishmeal by poultry by-product meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effect on fatty acids from muscle tissue and the time required to retrieve the effect. *Aquacult Res* doi:10.1111/are.12092
- Phillips DL, Koch PL(2002) Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130:114-125.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83:703–718
- Rawles SD, Riche M, Gaylord TG, Webb J, Freeman DW, Davis M (2006) Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂) in recirculate tank production. *Aquaculture* 259: 377-389.
- Rawles SD, Gaylord TG, McEntire ME, Freeman DW (2009) Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for hybrid striped bass, *Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂ in pond production. *J World Aquacult Soc* 40:141-156.
- Robbins CT, Felicetti LA, Sponheimer M (2005) The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* 144:534–540.
- Robbins CT, Felicetti LA, Florin ST (2010) The impact of protein quality on stable nitrogen isotope ration discrimination and assimilate diet estimation. *Oecologia* 162:257-579.
- Rossi Jr W, Davis DA (2012). Replacement of fishmeal with poultry by-product meal in the diet of Florida pompano *Trachinotus carolinus* L. *Aquaculture* 338-341:160-166

- Sargent JR, Tocher DR, Bell JG (2002) The lipids, In: Halver, JE, Hardy, RW (ed), Fish Nutrition, 3rd edn. Academic Press, San Diego, pp. 181–257.
- Sakano H, Fujiwara E, Nohara S, Ueda H (2005) Estimation of nitrogen stable isotope turnover rate of *Oncorhynchus nerka*. Environ Biol Fishes 72:13–18.
- Sealey WM, Hardy RW, Barrows FT, Pan Q, Stone DA, (2011) Evaluation of 100% fish meal substitution with chicken concentrate, protein poultry by-product blend, and chicken and egg concentrate on growth and disease resistance of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J World Aquacult Soc 42:46-55
- Schlechtriem C, Focken U, Becker K (2004) Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. Aquat Ecol 38:93–100
- Subhadra B, Lochman R, Rawles S, Chen R (2006) Effect of fish-meal replacement whit poultry by-product meal on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed diets containing different lipids. Aquaculture 260:221-231
- Tacon AGJ, Metian M (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture 285:146-158.
- Zhou Q, Zhao J, Li P, Wang H, Wang L (2011) Evaluation of poultry by- product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture 323:122-127.

Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación

S. Valverde-Chavarría, ^{1*}, C.A. Álvarez-González, ², J.B. Ulloa-Rojas, ¹, C.A. Frías-Quintana, ², R. Guerrero-Zárate, ², J.R. Quirós-Orlich, ¹, M. Brais-Medina, ¹, E. Calvo-Elizondo, ¹ y L. Alvarado-Guzmán ³

¹ Laboratorio de Acuicultura Continental, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Costa Rica. Calle 9, Avenidas 0 y 1, Heredia 86-3000, Costa Rica. Tel/Fax: +506-2237-5230 *E-mail: silvia.valverde.chavarría@una.cr

² Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa Cárdenas Km 0.5, 86139, Villahermosa, Tabasco, México. ³ Laboratorio de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Costa Rica

Resumen

El guapote lagunero, *Parachromis dovii*, es un cíclido nativo de Costa Rica muy apreciado por su tamaño y calidad de su carne. Esta especie posee la ventaja de aceptar el alimento formulado desde el inicio de la alimentación exógena; sin embargo, su uso exclusivo produce un crecimiento muy lento. Debido a lo anterior, surgió la necesidad de investigar la ontogenia del sistema digestivo y sus enzimas y la evaluación *in vitro* de ingredientes dietarios; con el fin de generar información que permita formular alimentos inertes que mejoren el crecimiento larval. Se encontró que esta especie tiene un patrón de desarrollo similar al de otros cíclidos neotropicales, con la aparición muy precoz del estómago y las enzimas digestivas. Además, el crecimiento de las larvas alimentadas inicialmente con nauplios de *Artemia* fue de 12.25% PCd⁻¹, mientras que en las alimentadas con una dieta formulada fue de 6.53% PCd⁻¹. De las 7 harinas de origen vegetal evaluadas, las que produjeron la menor inhibición de las proteasas digestivas fueron la harina de trigo (59.08%) y puntilla de arroz (58.21%). Con respecto a los ensayos de digestibilidad alcalina *in vitro*, de las 6 harinas evaluadas, las que presentaron los valores más altos fueron la de carne y hueso (113.92%) y la de pescado (74.92%).

Palabras clave: *ontogenia, sistema digestivo, guapote lagunero*

1. Introducción

El conocimiento de los cambios temporales que experimenta el sistema digestivo durante el desarrollo larval de los peces es esencial para comprender su fisiología digestiva y requerimientos nutricionales, y para desarrollar protocolos de alimentación y de cultivo adecuados para cada estadio del desarrollo fisiológico (Lazo *et al.* 2011).

Existen diferencias interespecíficas considerables en el tiempo que tardan en diferenciarse las estructuras del sistema digestivo, desarrollarse y volverse funcionales. Ese tiempo depende tanto de factores genéticos como de factores externos, dentro de los cuales la calidad del agua (principalmente la temperatura) y la disponibilidad y composición del alimento juegan un rol importante (Lazo *et al.* 2011). Por lo tanto, es necesario evaluar el desarrollo temporal de esas estructuras y sus funciones para cada especie, considerando dichos factores externos.

En la alimentación de las larvas de peces es común el uso de organismos vivos, tales como la *Artemia*, a los cuales se les atribuyen ventajas como el estímulo visual y químico, poseer buena digestibilidad y enzimas que la mejoran, una mejor distribución en la columna de agua y mantener la calidad nutricional por más tiempo (Beux y Zaniboni-Filho 2008). Sin embargo, su producción es costosa y su calidad nutricional suele variar, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de dietas formuladas capaces de reemplazar al alimento vivo (Drossou *et al.* 2006).

En algunas especies de peces de agua dulce, que ponen huevos grandes, el estómago se desarrolla más temprano que en la mayoría de especies marinas, durante la etapa de transición a la alimentación exógena (Lazo *et al.* 2011); lo que facilita su alimentación con dietas formuladas. Sin embargo, el desarrollo de dietas formuladas para los estadios larvales de peces presenta retos y dificultades, tales como el proveer nutrientes altamente digestibles para estos organismos, los que aún no poseen un sistema digestivo completamente desarrollado (Lazo 2000). De ahí la importancia de una selección adecuada de los ingredientes a utilizar en el alimento, especialmente en el caso de las fuentes de

proteína, ya que las larvas de peces tienen un requerimiento proteico alto (Martínez-Montaña y Lazo 2012).

Desde hace varios años surgió la necesidad de buscar fuentes de proteína alternativas que reemplacen, al menos parcialmente, las harinas de pescado, debido a su alto costo. En este sentido, los estudios se han enfocado sobre todo en fuentes de origen vegetal. Sin embargo, éstas presentan factores antinutricionales, dentro de los cuales destacan los inhibidores de las proteasas digestivas, los que desfavorecen el proceso digestivo de los organismos. Por lo tanto, en la selección de ingredientes de origen vegetal es importante evaluar su efecto sobre las enzimas de los peces (Alarcón *et al.* 2001).

Los ensayos *in vitro*, de digestibilidad y de inhibición enzimática, permiten evaluar los ingredientes de una forma rápida y sencilla (Alarcón *et al.* 2001; Alarcón *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002). Debido a que durante el desarrollo larval de los peces cambia su capacidad digestiva, resulta necesario realizar estos ensayos para cada estadio de desarrollo de la especie en estudio (Martínez-Montaña y Lazo 2012).

El guapote lagunero es un cíclido endémico de Costa Rica, en donde se distribuye en ambas Vertientes (Atlántica y Pacífica). Es un pez piscívoro, aunque también ingiere crustáceos e insectos en menor cantidad. Además, alcanza un gran tamaño (más de 45 cm de longitud), lo que unido a su fuerza y buen sabor, le confieren gran popularidad tanto en la pesca deportiva así como fuente de alimento (Bussing 2002).

La Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) ha realizado varios estudios enfocados en el cultivo de esta especie, y desde hace varios años completó su ciclo de vida y lo produce a escala experimental. Cabrera *et al.* (1998) describieron el desarrollo embrionario y larval de estos organismos, en condiciones de laboratorio, obtenidos de una pareja de reproductores silvestres. Günther y Ulloa (1995) estudiaron el crecimiento de las larvas alimentadas con diferentes raciones de nauplios de *Artemia*, el crecimiento de los juveniles en regímenes de cultivo en dependencia de la densidad (Günther, 1996) y la utilización de la dieta respecto al contenido proteico (Ulloa

Valverde *et al.* 2013. Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 320-355.

1997). Sevilla (comunicación personal, 20 de Agosto, 2013) registró el crecimiento de esta especie en tanques de tierra durante 10 ciclos de cultivo, que fue en promedio de 250 g en 15 meses.

De manera que, aunque *P. dovii* presenta una serie de ventajas para el cultivo, tiene un crecimiento relativamente lento, por lo que resulta necesario formular alimentos que permitan optimizarlo. Para lograr esto, es necesario evaluar la capacidad digestiva en diferentes periodos del ciclo de vida, así como determinar sus requerimientos nutricionales (Álvarez-González *et al.* 2008). Este trabajo se enfoca en los estudios que la UNA ha realizado en los últimos años, en colaboración con la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (México), acerca del desarrollo del sistema digestivo y sus enzimas, y la selección de ingredientes, mediante ensayos *in vitro*, para la formulación de dietas adecuadas para las larvas de esta especie.

2. Metodología

2.1. Reproducción y cultivo larvario

La producción y cultivo larval se realizó en el Laboratorio Húmedo de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Costa Rica. Los padrotes de *P. dovii* se mantuvieron en tanques de fibra de vidrio de 2 ton, con un sistema de recirculación del agua por sifoneo, en una relación hembra:macho de 1:1. La temperatura se mantuvo alrededor de los 25 °C y el fotoperiodo en 9 horas luz y 15 horas oscuridad. La alimentación consistió en un alimento comercial para trucha, que se suministró 3 veces al día. Los desoves de cada pareja, de entre 500 a 1000 huevos, fueron espontáneos.

Las larvas recién eclosionadas se extrajeron del tanque de reproductores por sifoneo y se distribuyeron en acuarios de 10 l, en un sistema recirculado, a una densidad de 23 ind/l. La temperatura del agua en el sistema se mantuvo entre 25.2 °C y 29.4 °C, el oxígeno disuelto entre 6.0 ppm y 6.8 ppm y el nivel de amoníaco se mantuvo inferior a 0.05 ppm. El fotoperiodo fue el mismo que en los tanques de reproductores.

Las larvas se alimentaron en exceso con nauplios y metanauplios de *Artemia* (aprox. 250/ml) no enriquecidos, desde los 5 DDE y hasta los 30 DDE. Posteriormente, los alevines se alimentaron con una dieta formulada (cuadro 2) a saciedad. La alimentación se realizó 4 veces al día: a las 8:00, 11:00, 14:00 y a las 17:00 horas; durante la misma se suspendió el flujo de agua por 30 min.

Cuadro 1. Composición del alimento formulado.

Ingredientes	Porcentaje (%)
Harina de pescado	48
Harina de soya	21
Harina de trigo	15
Harina de carne y hueso	9
Aceite de soya	2
Aceite de pescado	2
Mezcla vitamínica	2
Sal	1

Composición proximal: 45% de proteína y 10% lípidos.

2.2. Toma de muestras y mediciones biométricas

Para los diferentes estudios realizados, las muestras de larvas se tomaron de distintos desoves. Los muestreos se realizaron antes de la primera alimentación del día y las larvas se mantuvieron durante una hora en agua libre de alimento, con el fin de que evacuaran cualquier remanente de alimento presente en el tracto digestivo. Posteriormente, se sacrificaron con una sobredosis de metansulfonato de triclaína (MS-222), se midieron bajo un estereoscopio con micrómetro ocular (± 0.07 mm), o con un vernier (± 0.01 mm), dependiendo del tamaño, y se determinó el peso húmedo con una balanza analítica (± 0.01 mg). Finalmente, las larvas se lavaron con agua destilada y se fijaron con formalina tamponada al 10% para los análisis histológicos, o se congelaron a -20 °C para los ensayos bioquímicos.

2.3. Desarrollo histológico del sistema digestivo

Los muestreos se realizaron diariamente iniciando el día de la eclosión y hasta los 30 DDE. Las larvas fijadas se deshidrataron en soluciones sucesivas de etanol y benceno y finalmente se incluyeron en parafina. Los bloques de parafina se cortaron sagitalmente con un micrótopo en láminas de 3 μm de diámetro. Las láminas se desparafinaron y rehidrataron al colocarlas en soluciones sucesivas de xileno, etanol y agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y se fotografiaron.

2.4. Ontogenia enzimática

Los muestreos se realizaron los días 6, 14, 22, 30 y 41 DDE. Las larvas congeladas se liofilizaron y posteriormente se les separó la sección visceral. Las muestras se dividieron en dos grupos, con el fin de realizar a un grupo el análisis de proteasas ácidas y al otro el de enzimas alcalinas. El primer grupo se homogenizó en buffer 100 mM Glicina-HCl, pH 2.0 y el segundo grupo en buffer 50 mM Tris-HCl, CaCl_2 20 mM, pH 7.5 (35 mg/ml). Todas las muestras se manipularon en frío (hielo) para evitar la desnaturalización enzimática. Los homogenizados se centrifugaron a 14,000 g por 30 min a 4 °C para obtener el sobrenadante (extracto enzimático), y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su análisis.

La concentración de proteína soluble se cuantificó por la técnica de Bradford (1976) usando como estándar una curva patrón de albúmina bovina sérica. La actividad de proteasas alcalinas se evaluó por el método de Walter (1984), usando caseína a pH 9.0. La actividad de proteasas ácidas se determinó por la técnica de Anson (1938), usando hemoglobina a pH 2.0. La mezcla de reacción en ambas técnicas fue incubada a 37 °C. Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1 μg de tirosina liberada por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 0.005.

La actividad tipo tripsina se determinó con la técnica de Erlanger *et al.* (1961) usando el sustrato BAPNA a pH 8.2. La actividad tipo quimotripsina se cuantificó siguiendo el protocolo de DelMar *et al.* (1979) con el sustrato SAAPNA a pH 7.8. La actividad de la

leucina-aminopeptidasa se evaluó de acuerdo al protocolo de Maraux *et al.* (1973) usando el sustrato leucina *p*-nitroanilida a pH 7.2. La actividad de carboxipeptidasa A se cuantificó siguiendo el método descrito por Folk y Schirmer (1963), usando el sustrato Hipuril-L-fenilalanina a pH 7.5. Para estas 4 proteasas, la mezcla de reacción fue incubada a 25 °C. Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1 µg de nitroanilida liberada por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 8.8.

El ensayo de α-amilasa fue realizado siguiendo el protocolo de Somoyi-Nelson descrito por Robyt y Whelan (1968) usando almidón como sustrato a pH 7.5 y 25 °C. Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima que libera 1 µg de maltosa por minuto. La actividad de la lipasa fue cuantificada de acuerdo a Versaw *et al.* (1989), usando como sustrato el β-naftil caprilato a pH 7.2 y 25 °C. Una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1 µg de naftol por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 0.02. Las actividades de la fosfatasa ácida y alcalina fueron medidas de acuerdo a la metodología de Begmeyer (1974) incubando los extractos en una solución al 2% de 4-nitrofenil fosfato a pH 5.5 y a 25 °C. Una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1 µg de naftil por minuto, utilizando el coeficiente de extinción molar de 0.0185.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y la actividad enzimática se calculó empleando las siguientes ecuaciones:

Actividad por ml:

$$U/ml = \frac{\Delta \text{absorbancia} \times \text{FD}(ml)}{\text{CEM tirosina} \times T(\text{min})}$$

Actividad total (por individuo):

$$U/larva = (U/ml)/N$$

Actividad específica:

$$U/mg P = \frac{U/ml}{mg P/ml}$$

En donde, U: unidades de actividad enzimática, Δ absorbancia: incremento en la absorbancia con respecto al blanco; FD: volumen final de la reacción/volumen del extracto

enzimático; CEM: coeficiente de extinción molar; T: tiempo de incubación en minutos; N: número de larvas por ml de extracto enzimático y mg P: miligramos de proteína soluble en el extracto.

2.5. Efecto del alimento en el crecimiento y la actividad de proteasas digestivas

Las larvas se obtuvieron de acuerdo a la sección 2.1 y se dividieron de manera aleatoria en 6 peceras de 10 l de un sistema recirculado, a una densidad de 11.3 larvas/l. Se utilizaron dos protocolos de alimentación, en ambos se alimentó en exceso y con la misma frecuencia (4 veces/día). Los protocolos de alimentación fueron:

A) Destete temprano. Se alimentó con nauplios de *Artemia*, iniciando a los 8 DDE y hasta los 15 DDE. A partir del día 16 se inició la transición del alimento vivo al formulado, con un cambio del 20% diario, de modo que a partir del día 20 se alimentó exclusivamente con un alimento peletizado (45% proteína, cuadro 1), formulado y fabricado en el Laboratorio de Nutrición de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional.

B) Alimento formulado. Se alimentó desde los 8 DDE hasta el final del experimento, el día 28, con la misma dieta usada en A) a una ración diaria del 100% de la masa corporal.

C)

Los muestreos se realizaron a los 8, 12, 16, 20, 24 y 28 DDE. El crecimiento se calculó como la tasa específica de crecimiento (TEC), tanto en periodos como para el periodo total.

$$TEC = (\ln Pf - \ln Pi / t2-t1) * 100$$

En donde, Pf: peso o longitud final; Pi: peso o longitud inicial; t2: día final y t1: día inicial. Para realizar los análisis bioquímicos, los extractos se prepararon como en la sección 2.4.1, excepto que en vez de buffer, se utilizó agua desionizada. La concentración de proteína soluble en los extractos se cuantificó como en 2.4.2. Se evaluaron los niveles de proteasas alcalinas y ácidas totales empleando la metodología de Sarath *et al.* (1989). En la determinación de las proteasas alcalinas se utilizó azocaseína al 2% a pH 9.0 como sustrato

y para las proteasas ácidas (tipo pepsina) se utilizó hemoglobina al 2% a pH 2.0. En ambos casos, las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C. Una unidad de actividad enzimática se definió como el incremento en 1 unidad de absorbancia por minuto.

2.6. Evaluación del efecto inhibitorio de harinas vegetales sobre las proteasas digestivas alcalinas

En este estudio se utilizaron larvas obtenidas a partir de desoves naturales del cruce de hembras híbridas (♂ *P. dovii* X ♀ *Parachromis managuensis*) con machos de *P. dovii*, ya que no se contó con desoves de hembras puras de *P. dovii* durante el período de la investigación. Estas hembras híbridas fueron fenotípicamente idénticas a las hembras de *P. dovii*. La reproducción y el cultivo larval se realizaron como en la sección 2.1. y las larvas obtenidas mostraron una talla similar a las larvas de *P. dovii*. Los muestreos se realizaron a los 15, 22 y 30 DDE y los extractos enzimáticos se prepararon como en el punto 2.4., excepto que se utilizó agua desionizada en vez de buffer para realizar el homogenizado. La actividad proteolítica alcalina total de los extractos se cuantificó como en 2.4.

Se evaluaron siete harinas de origen vegetal: soya, acemite de trigo, maíz, puntilla de arroz, coquito de palma africana, semolina de arroz y harina de trigo; seleccionadas de acuerdo a su valor nutricional para peces y su disponibilidad en el mercado nacional. La composición proximal de las harinas se muestra en el cuadro 2.

Las disoluciones de las harinas se prepararon siguiendo la metodología de Alarcón *et al.* (2001). El porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica alcalina producido por las harinas vegetales se cuantificó siguiendo el procedimiento descrito por García-Carreño *et al.* (1996). En breve, se añadieron 500 µg del extracto vegetal por cada UA de proteasas alcalinas totales presentes en 20 µl de extracto enzimático, y buffer pH 9.0. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego se cuantificó la actividad proteolítica residual, para esto se utilizó caseína al 0.5% y se incubó la reacción por 45 minutos a 37°C. Al terminar el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con ácido tricloroacético (TCA) 20%, se centrifugó a 16 000 x g durante 5 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. En los blancos de actividad el TCA se añadió junto

con la caseína. En los controles de actividad se sustituyó la harina vegetal por agua desionizada. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición (%I) se definió como la reducción porcentual de la actividad enzimática (calculada como en 2.4) con respecto al control de actividad.

2.7. Evaluación de la digestibilidad alcalina *in vitro* de la proteína de ingredientes dietarios

Para este ensayo se utilizaron únicamente organismos de 30 DDE, obtenidos del mismo desove que en 2.4. Los extractos enzimáticos se prepararon utilizando una relación de 1:5 P:V (peso de los paquetes viscerales: volumen de agua desionizada) y la actividad proteolítica alcalina total de los extractos se cuantificó como en 2.4.

Se evaluaron seis ingredientes, uno importado: harina de pescado de Panamá, y cinco de origen local: harina de pescado (de subproductos de atún), harina de soya, harina de Tortave (sub-productos del procesamiento de pollos), harina de sangre y harina de carne y hueso; los cuales fueron seleccionados en base a su contenido de proteína (Cuadro 2), precio y disponibilidad en el mercado local. Todos los ingredientes fueron finamente macerados y tamizados para obtener un mismo tamaño de partícula (75 μm).

La digestibilidad proteica *in vitro* de los ingredientes se evaluó empleando la técnica del pH-STAT, según la metodología descrita por Dimes y Haard (1994). Brevemente, 40 mg de proteína de cada ingrediente proteico se disolvieron en agua destilada y el pH se ajustó a 8.0 durante 15 min. Se adicionó una cantidad de extracto enzimático equivalente a 12 UA de proteasas alcalinas totales, al cual previamente se le ajustó el pH a 8.0. El volumen final de la mezcla de reacción se ajustó a 5 ml con agua destilada. La titulación se realizó durante 45 min, con agitación continua y a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), utilizando un titulador automático.

El porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados conocido como grado de hidrólisis proteica (GH) del sustrato (ingrediente) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

Valverde *et al.* 2013. Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 320-355.

$$GH = B \times N_B \times 1/\alpha \times 1/M_p \times 1/h_{tot} \times 100\%$$

En donde, B: volumen (mL) del NaOH usado para mantener el pH en 8.0 durante el tiempo de reacción determinado; N_B : normalidad de la base (0.1 N); α : grado promedio de disociación de los grupos α -aminoácidos liberados durante la hidrólisis, determinado por la ecuación $\alpha = (10^{\text{pH} - \text{pK}}) / (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}})$ donde los valores de pK son dependientes de la temperatura y tamaño del péptido. Por lo tanto, el valor de $1/\alpha$ es el factor de calibración de α para el pH-STAT, que de acuerdo a Adler-Nissen (1986), a un pH de 8.0 y una temperatura de reacción cercana a 25 °C, $1/\alpha = 1.5$; M_p : masa de proteína cruda en la mezcla de reacción, estimada al multiplicar la concentración de nitrógeno (N) obtenido por el método Kjeldahl (1883) por un factor de conversión adecuado (f_N); y h_{tot} : contenido total de enlaces peptídicos en la proteína, el cual es expresado como equivalentes de enlaces peptídicos por kilogramo (o miliequivalente por gramo), siendo 8.0 meq/g una buena aproximación (Adler-Nissen, 1986).

Cada determinación fue realizada por triplicado para cada ingrediente, las líneas base se realizaron por duplicado. Los valores de autohidrólisis se obtuvieron de las líneas base y se expresaron como un porcentaje de aquellos obtenidos al emplear los extractos enzimáticos digestivos (Alarcón *et al* 2002).

Se utilizó la caseína como proteína de referencia, asignándole a su GH un valor de 100 y asignándole a cada ingrediente probado un valor porcentual de digestibilidad con respecto a la caseína.

Cuadro 2. Composición proximal (% base seca) de los ingredientes evaluados en las secciones 2.6 y 2.7. Promedios \pm desviación estándar, n=2. ELN: extracto libre de nitrógeno.

Ingrediente	Proteína %	Lípidos %	ELN %	Ceniza %
Harina de pescado de Panamá	64.83 \pm 1.85	14.13 \pm 0.01	0.26	20.78 \pm 0.01
H. de pescado local	58.83 \pm 0.12	10.51 \pm 0.16	6.25	24.41 \pm 0.10
H. Tortave	51.51 \pm 0.44	35.28 \pm 0.52	0.9	12.31 \pm 0.11
H. de carne y hueso	39.48 \pm 1.20	19.67 \pm 0.52	4.74	36.11 \pm 0.67
H. de sangre	89.60 \pm 0.60	1.29 \pm 0.11	0.04	9.07 \pm 0.11
H. de soya	55.10 \pm 0.01	3.96 \pm 0.10	33.82	7.12 \pm 0.03
H. de acemite de trigo	19.38 \pm 0.75	7.78 \pm 0.53	67.26	5.58 \pm 0.01
H. de maíz	11.65 \pm 0.32	9.11 \pm 0.42	76.07	3.17 \pm 0.02
H. de puntilla de arroz	9.76 \pm 0.13	4.32 \pm 0.09	84.96	0.97 \pm 0.02
H. de coquito de palma	15.28 \pm 0.48	10.33 \pm 0.37	70.17	4.23 \pm 0.05
H. de semolina de arroz	13.86 \pm 0.27	12.05 \pm 0.40	62.26	11.83 \pm 0.52
H. de trigo	12.50 \pm 0.61	6.88 \pm 0.32	79.55	1.06 \pm 0.01

2.8. Análisis estadístico

Para determinar si hubo diferencias en el crecimiento, sobrevivencia y en la actividad enzimática, entre los protocolos de alimentación utilizados en el apartado 2.5, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los resultados del porcentaje de inhibición enzimática de cada ingrediente (2.6) se compararon mediante un ANOVA y una prueba de rangos múltiples, al igual que los resultados de digestibilidad *in vitro* (2.7). Todas las pruebas se realizaron a un nivel de significancia de 0.05, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

3. Resultados

3.1. Desarrollo histológico del sistema digestivo

Las larvas de guapote lagunero recién eclosionadas (0 DDE, 6.43 ± 0.13 mm) presentaron un tubo digestivo recto e indiferenciado, cerrado en la parte anterior y posterior, en posición dorsal al saco vitelino. El saco vitelino fue largo y de forma ovoide, con varias gotas de aceite. Las glándulas digestivas accesorias, como el hígado y el páncreas no se visualizaron en ese momento. La pigmentación de los ojos inició algunas horas después de la eclosión. Dos DDE (7.66 ± 0.12) empezó a formarse la vejiga gaseosa, en posición dorsal al intestino. El hígado aumentó bastante de tamaño y se observaron acumulaciones lipídicas en los hepatocitos. Las larvas abrieron la boca a los 3 DDE (7.95 ± 0.24 mm), lo cual coincidió con el inicio de la diferenciación del tubo digestivo en: buco-faringe, esófago, estómago incipiente, el cual consistió en un ensanchamiento al final del esófago presentando células en acino (futuras glándulas gástricas), el intestino anterior y posterior, cuya mucosa empezaba a formar pliegues. Además, el esófago presentó células globet y el páncreas presentó gránulos acidofílicos (zimógenos) (Fig. 1a-c).

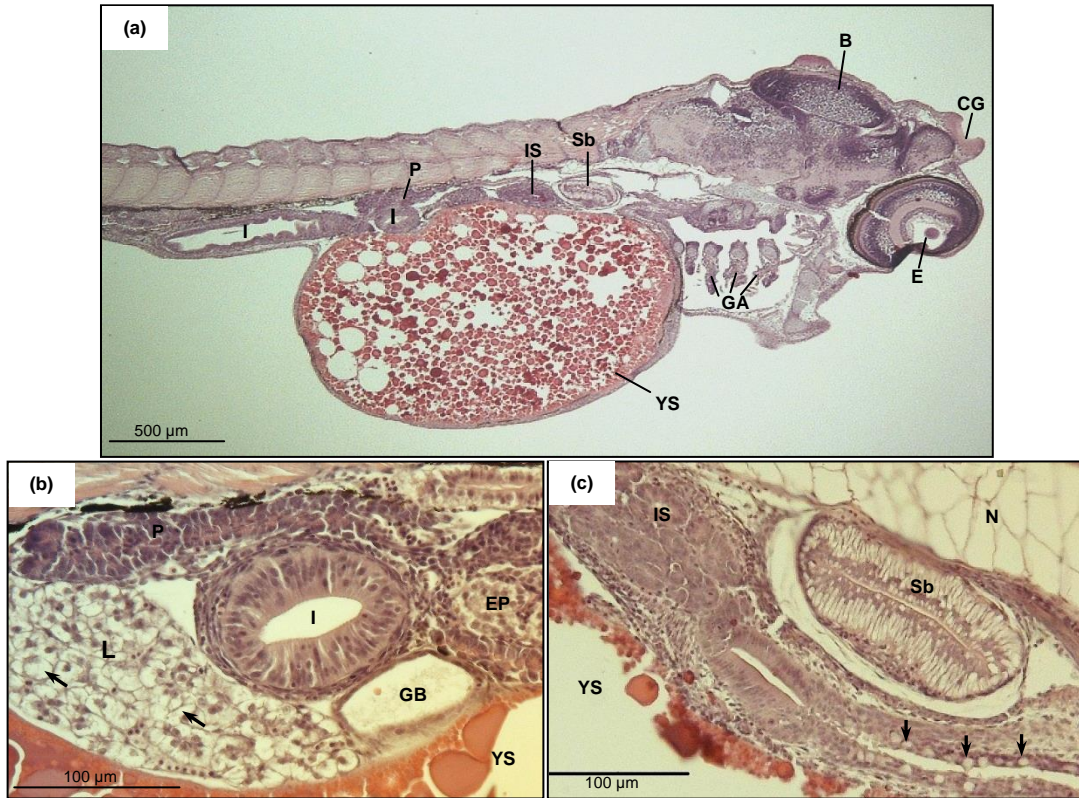


Figura 1. Cortes longitudinales de larvas tres DDE. (a) Vista general. (b) Páncreas e hígado, las flechas señalan las vacuolas lipídicas de los hepatocitos. (c) Estómago y vejiga natatoria incipientes, las flechas señalan las células globet en el esófago. B: cerebro, CG: glándula adhesiva, E: ojo, EP: páncreas endocrino, GA: arcos branquiales, I: intestino, IS: estómago incipiente, L: hígado, N: notocordio, P: páncreas exocrino, Sb: vejiga natatoria, YS: saco vitelino.

A los 5 DDE (8.31 ± 0.14 mm) se empezó a inflar la vejiga natatoria y se abrió el ano. A los 6 DDE (8.58 ± 12 mm) las larvas nadaban libremente en la columna de agua e iniciaron el periodo de alimentación mixta: exógena y endógena. Estas larvas presentaron un estómago con glándulas gástricas, dentro del cual había quistes de *Artemia* (Fig. 2a-b). Además, se completó la torsión del intestino, el cual presentaba una mucosa con más pliegues y células globet (Fig. 2c).

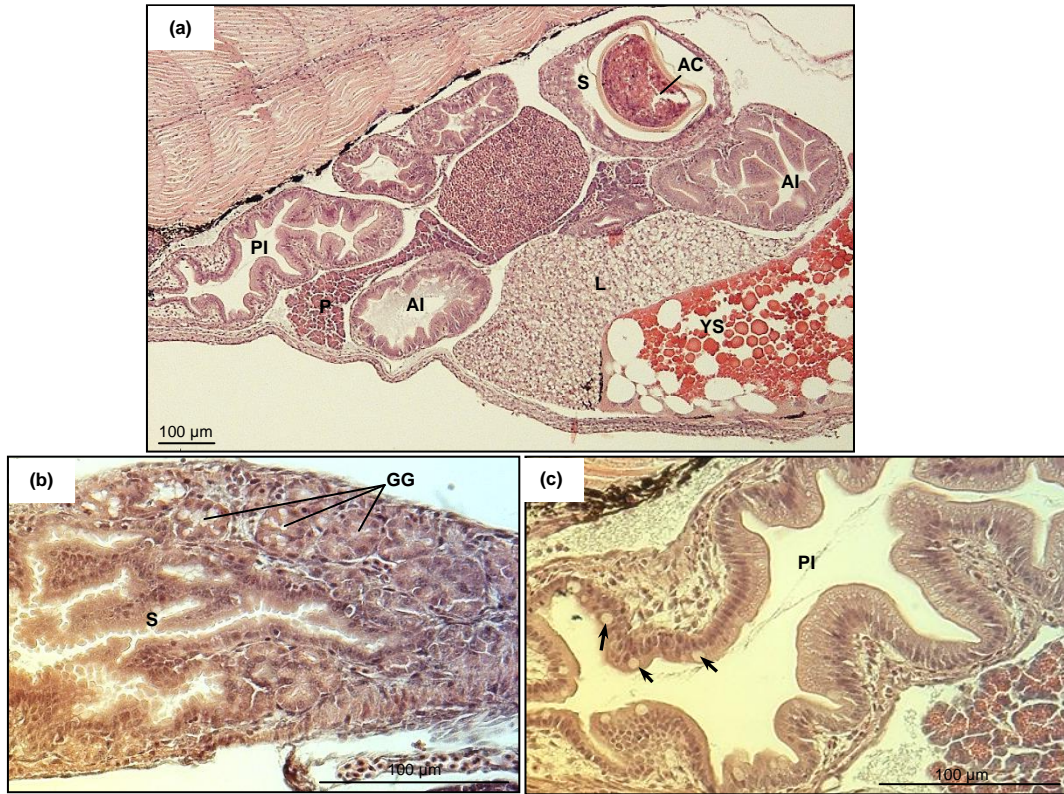


Figura 2. Cortes longitudinales de larvas 6 DDE. (a) Vista general mostrando la presencia de un quiste de *Artemia* en el estómago. (b) Intestino posterior, las flechas señalan las células globet. (c) Estómago con glándulas gástricas. AC: quiste de *Artemia*, GG: glándulas gástricas, IA: intestino anterior, IP: intestino posterior, L: hígado, P: páncreas exocrino, S: estómago, YS: saco vitelino.

A los 9 DDE (10.20 ± 0.24 mm) aparecieron vacuolas lipídicas supranucleares en las células del epitelio intestinal, las cuales ocupan la mayor parte del citoplasma (Fig. 3b). El estómago parece bien desarrollado, con muchos pliegues y glándulas gástricas (Fig. 3a). Casi todas las reservas vitelinas se han consumido, principalmente quedaban gotas de aceite que se terminaron de consumir aproximadamente 15 DDE (14.61 ± 0.23 mm). Posteriormente, no se observaron cambios en las estructuras del sistema digestivo, excepto por la formación de depósitos de grasa (adipocitos) en el páncreas y el aumento en volumen de todos los órganos digestivos (Fig. 3c).

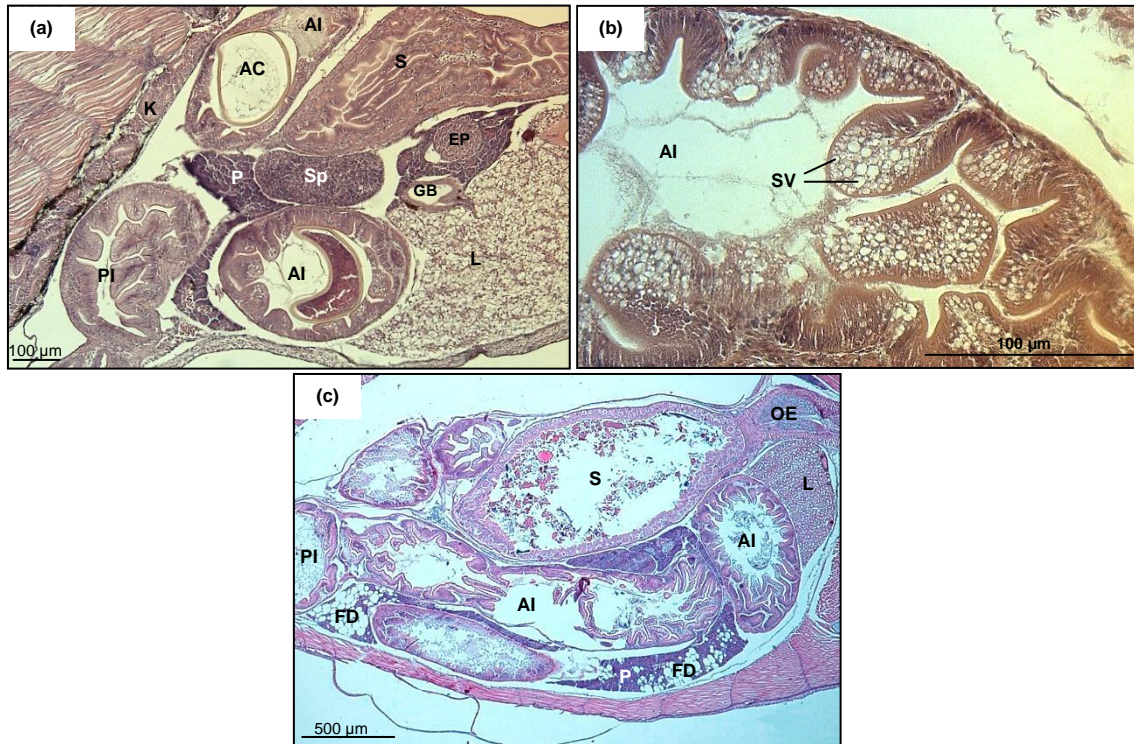


Figura 3. Cortes longitudinales de larvas de 9 y 25 DDE. (a) Vista general a los 9 DDE mostrando la presencia de quistes de *Artemia* en el intestino anterior. (b) Intestino posterior, los enterocitos presentan inclusiones lipídicas supranucleares. (c) Vista general a los 25 DDE (final del periodo larval) mostrando depósitos de grasa (adipocitos) en el páncreas.

AC: quiste de *Artemia*, EP: páncreas endocrino, FD: depósitos de grasa, GB: vesícula biliar, IA: intestino anterior, IP: intestino posterior, L: hígado, OE: esófago, P: páncreas exocrino, S: estómago, Sp: bazo, SV: vacuolas lipídicas supranucleares.

3.2. Ontogenia enzimática

Al inicio de la alimentación exógena, el peso húmedo y la longitud total de las larvas utilizadas para la descripción de la ontogenia enzimática fue de 7.56 ± 0.31 mg y 9.49 ± 0.28 mm respectivamente. Al final del periodo de estudio (40 DDE), las larvas pesaron 268.66 ± 25.44 mg y midieron 27.66 ± 1.06 mm (Fig. 4).

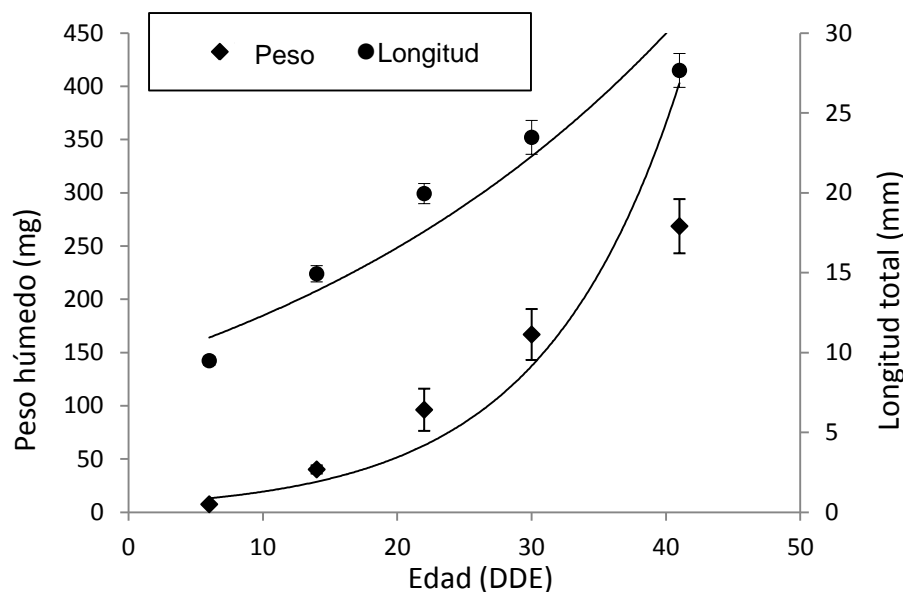


Figura 4. Peso húmedo y longitud total de larvas de *P. dovii* (promedio \pm DE, n=30).

Todas las enzimas evaluadas se detectaron desde el primer día de muestreo. La actividad específica de proteasas ácidas mostró los niveles más altos al inicio y al final del periodo de muestreo (6 y 41 DDE), mostrando fluctuaciones entre esos días (Fig. 5a). La actividad específica de proteasas alcalinas presentó los mayores niveles a los 14 y 41 DDE (Fig. 5b). La actividad específica de la tripsina se incrementó ligeramente a los 14 DDE, para disminuir paulatinamente hasta los 41 DDE (Fig. 5c). Por el contrario, la actividad específica de la quimotripsina fue incrementando paulatinamente hasta los 41 DDE (Fig. 5d). La actividad específica de leucina-aminopeptidasa mostró un patrón de variación temporal similar a las proteasas alcalinas, con un pico a los 14 DDE y un máximo a los 41 (Fig. 5e). Finalmente, la actividad específica de la carboxipeptidasa A disminuyó de los 6 a los 14 DDE, para luego incrementarse hasta un máximo a los 30 DDE y volver a disminuir a los 41 días (Fig. 5f).

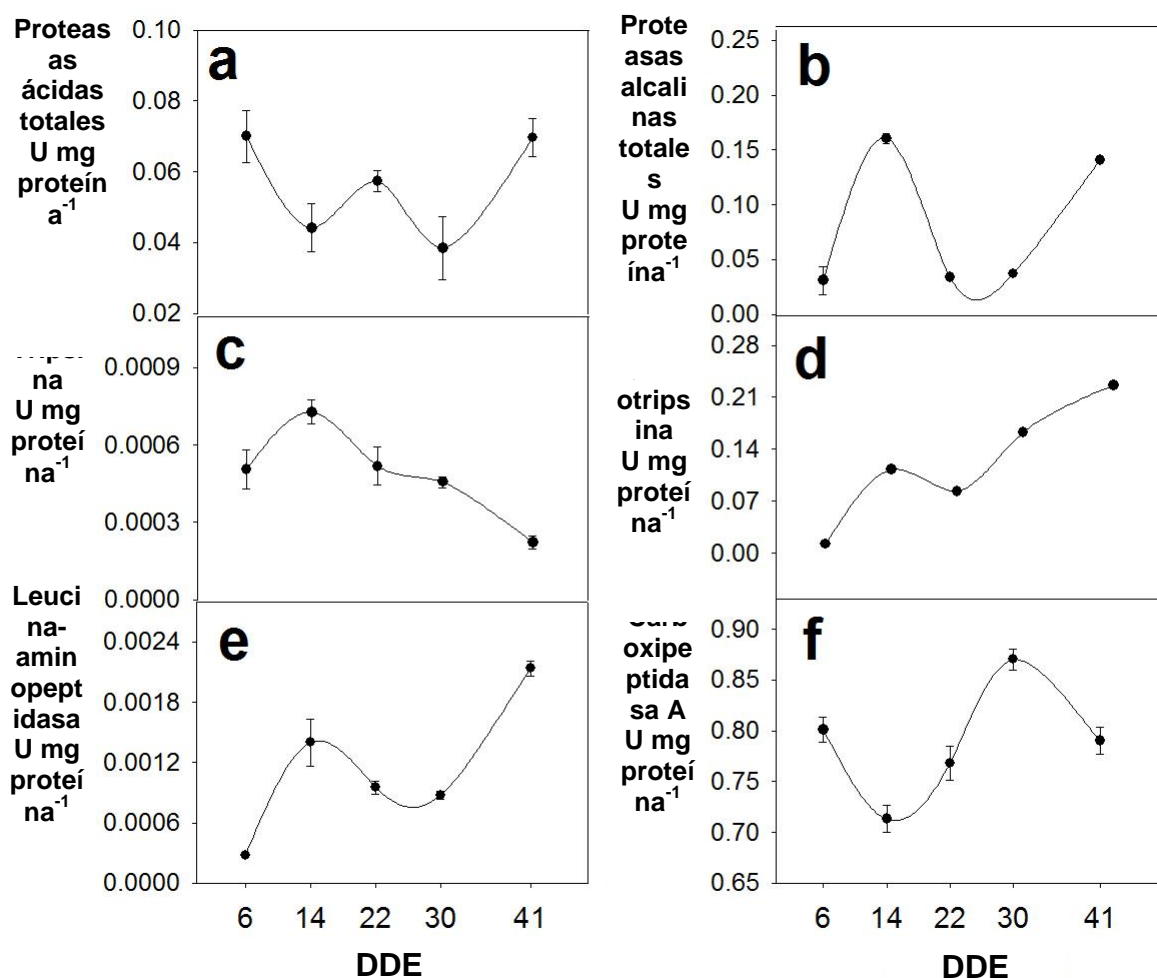


Figura 5. Actividad específica de proteasas digestivas durante la ontogenia inicial de *P. dovii* (promedio \pm DE). (a) Proteasas ácidas, (b) proteasas alcalinas, (c) tripsina, (d) quimotripsina, (e) leucina-aminopeptidasa y (f) carboxipeptidasa A.

La actividad específica de la lipasas (Fig. 6a) presentó un pico a los 14 DDE y después alcanzó un máximo a los 41 DDE. La actividad específica de la α -amilasa fue fluctuante, con un pico a los 22 DDE y un máximo a los 41 DDE (Fig. 6b). La actividad específica de la fosfatasa ácida, presentó su mínima actividad a los 6 DDE, luego alcanzó su valor mayor a los 14 DDE, para disminuir gradualmente hasta los 41 DDE (Fig. 6c). Finalmente, la actividad específica de fosfatasa alcalina mostró un pico de máxima actividad a los 22 DDE (Fig. 6d).

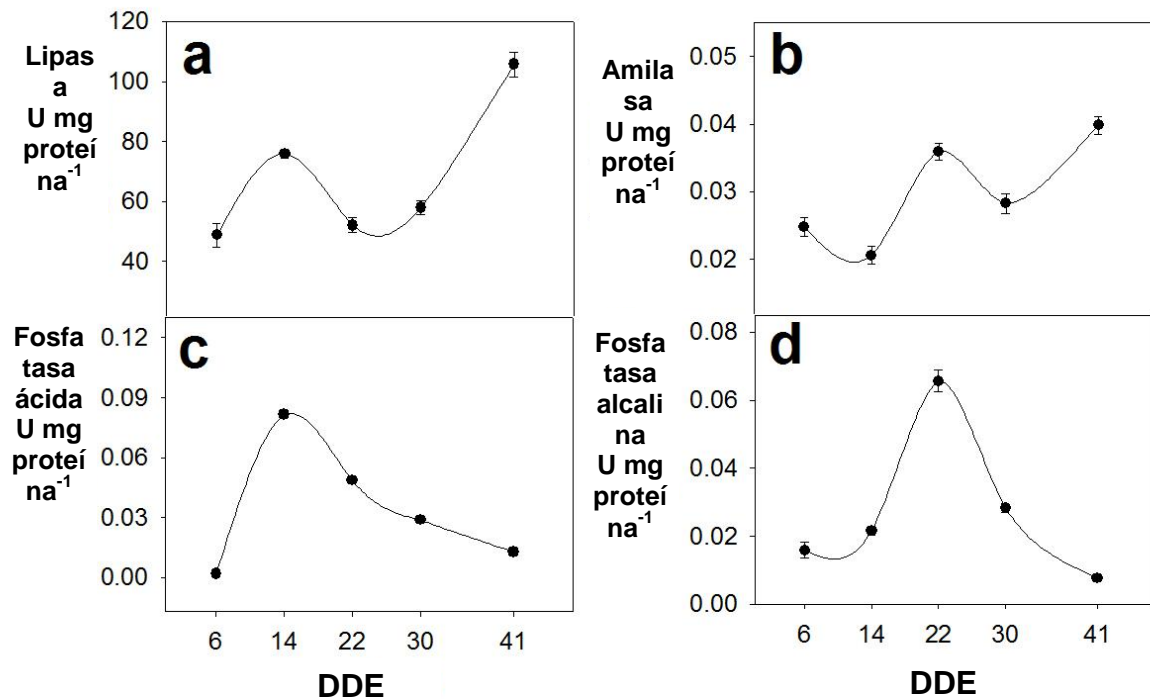


Figura 6. Actividad específica de diferentes enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *P. dovii* (promedio \pm DE, n=3). (a) Lipasa, (b) α -amilasa, (c) fosfatasa ácida y (d) fosfatasa alcalina.

3.3. Efecto del alimento en el crecimiento y la actividad de proteasas digestivas

La supervivencia fue de 99.1% para el protocolo A (destete temprano) y de 97.9% para el protocolo B (uso exclusivo de alimento formulado), no encontrándose diferencia significativa ($P=0.106$).

El incremento en la longitud total al final del periodo experimental fue superior para el protocolo A que con el B, 9.10 ± 0.25 mm vs 3.94 ± 0.09 mm, respectivamente. Este incremento correspondió a una tasa específica de crecimiento en longitud de $3.40 \pm 0.07\%$ diario y $1.77 \pm 0.05\%$ diario. El periodo de mejor crecimiento para el tratamiento A ocurrió al inicio de la alimentación, entre los 8 y 12 DDE y para el tratamiento B, avanzado el periodo larval, entre los 20 y 24 DDE (Cuadro 3).

Se observó la misma tendencia para el peso corporal (PC). El incremento en peso de las larvas para todo el periodo también fue superior y más acelerado en el tratamiento A que en B, 81.31 ± 2.41 mg vs 20.64 ± 0.57 mg, respectivamente. La tasa específica de crecimiento en peso correspondiente fue de 12.25 ± 0.11 % PCd^{-1} para el protocolo A y de 6.53 ± 0.27 % PCd^{-1} para el protocolo B. En el protocolo A, el crecimiento en peso más destacado sucedió entre los 8 y 12 DDE y en el protocolo B entre los 16 y 20 DDE (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tasa específica de crecimiento (TEC, % d^{-1}) en longitud y peso por periodo para larvas de *P. dovii*, según el protocolo de alimentación. Promedio \pm error estándar, $n=3$. Los promedios en la misma fila, con letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

DDE	TEC Longitud total		TEC Peso	
	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo A	Protocolo B
8-12	6.39 ± 0.50^a	1.39 ± 0.34^b	20.67 ± 1.36^a	1.32 ± 1.23^b
13-16	3.92 ± 0.57^a	1.76 ± 0.30^b	18.02 ± 0.93^a	6.93 ± 0.91^b
17-20	3.33 ± 0.02^a	1.95 ± 0.21^b	8.80 ± 0.65^a	8.37 ± 0.53^a
21-24	1.51 ± 0.22^a	2.46 ± 0.42^a	6.21 ± 0.45^a	8.14 ± 1.76^a
25-28	1.85 ± 0.34^a	1.28 ± 0.23^a	7.58 ± 1.50^a	8.01 ± 1.34^a

Con respecto a la actividad individual de proteasas alcalinas totales (U/larva), las larvas alimentadas con el protocolo A presentaron una mayor actividad (Figura 7a), mostrando dos picos, uno 16 DDE y otro mayor a 24 DDE. Con el protocolo B, las larvas aumentaron progresivamente su actividad proteolítica alcalina y el valor máximo se obtuvo al final del experimento. En términos de la actividad específica (U/mg proteína), los resultados fueron similares para ambos protocolos de alimentación (Figura 7b). La única diferencia notable consistió en la mayor actividad presentada por las larvas del protocolo A a los 24 DDE.

Las larvas presentaron actividad de proteasas ácidas (tipo pepsina) desde el inicio de la alimentación exógena. Los cambios temporales en los niveles de actividad de estas enzimas, en ambos protocolos de alimentación, fueron similares a los presentados por las

proteasas alcalinas, tanto para la actividad total como para la actividad específica (Figura 7c y 7d).

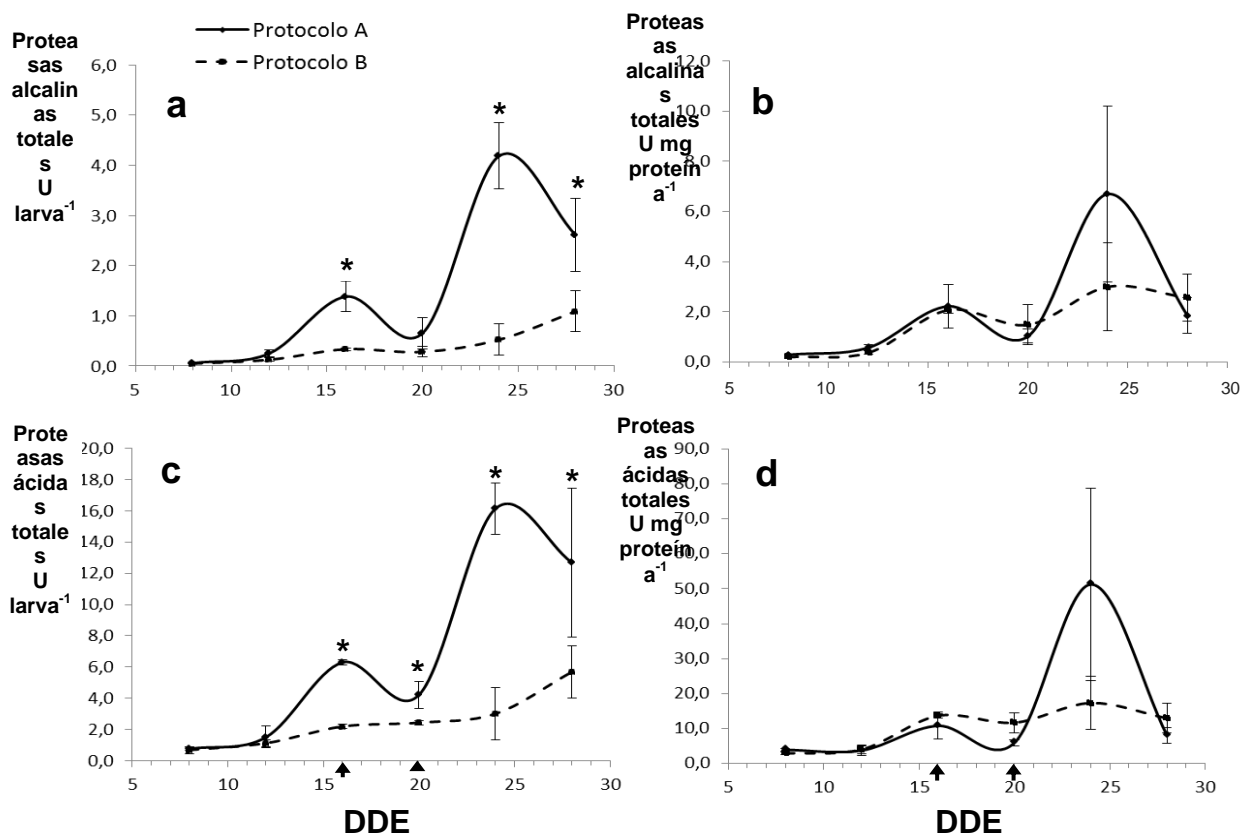


Figura 7. Actividad proteolítica de *P. dovii* durante el periodo larval de acuerdo al protocolo de alimentación (protocolo A= destete temprano, protocolo B= uso exclusivo de alimento formulado). a) Actividad alcalina total; b) actividad alcalina específica; c) actividad ácida total; d) actividad ácida específica. Promedios \pm error estándar, n=3. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre protocolos de alimentación. Las flechas en el eje X indican el inicio y final del destete en el protocolo A.

3.4. Evaluación del efecto inhibitorio de harinas vegetales sobre las proteasas digestivas alcalinas

Todas las harinas vegetales probadas redujeron la actividad proteolítica alcalina de las larvas de *P. dovii*. En general, las harinas de soya y acemite de trigo produjeron los porcentajes mayores de inhibición, mientras que las harinas de trigo y puntilla de arroz produjeron los valores más bajos ($P \leq 0.05$). Sin embargo, se presentaron diferencias entre estadios de desarrollo, larvas de 30 DDE mostraron una sensibilidad mayor a los inhibidores presentes en estas harinas, excepto con las harinas de soya, coquito de palma y acemite de trigo (Fig. 8, $P \leq 0.05$).

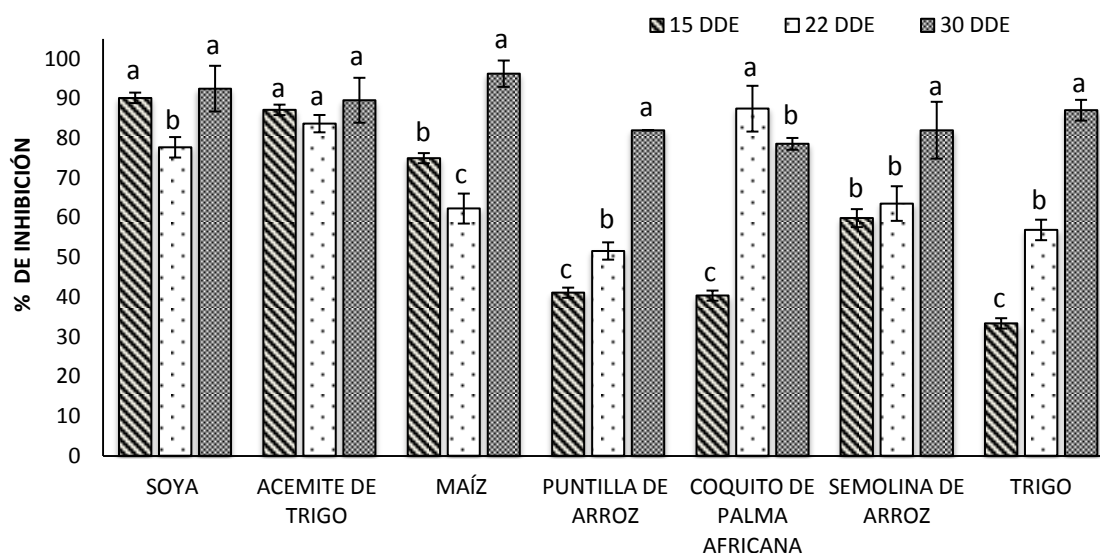


Figura 8. Porcentajes de inhibición de las proteasas digestivas alcalinas en larvas de *P. dovii* de 15, 22 y 30 DDE (promedios \pm DE). Los promedios con letras distintas indican diferencias significativas entre estadios larvales para la misma harina ($P \leq 0.05$).

3.5. Evaluación de la digestibilidad alcalina *in vitro* de la proteína de ingredientes dietarios

El ingrediente que presentó el mayor valor de hidrólisis proteica y de digestibilidad alcalina *in vitro* de la proteína fue la harina de carne y hueso (res), superando incluso a la caseína

(empleada como patrón o control). Por el contrario, la harina que presentó el valor más bajo fue la harina de soya (Cuadro 4 y Fig. 9).

Cuadro 4. Grado de hidrólisis proteica (GH) y porcentaje de digestibilidad alcalina de la proteína utilizando extractos enzimáticos de *P. doyii* de 30 DDE. Promedios \pm DE, n=3. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Harina	GH	Digestibilidad
Caseína	2.67 \pm 0.07	100.00 \pm 2.62 ^a
Harina de carne y hueso	3.04 \pm 0.17	113.92 \pm 6.17 ^b
H. de pescado de Panamá	2.00 \pm 0.09	74.92 \pm 3.4 ^c
H. de Tortave	1.87 \pm 0.08	69.99 \pm 2.68 ^c
H. de pescado local	1.41 \pm 0.13	52.85 \pm 4.72 ^d
H. de sangre	1.01 \pm 0.06	38.07 \pm 2.03 ^e
H. de soya	0.53 \pm 0.00	19.82 \pm 0.00 ^f

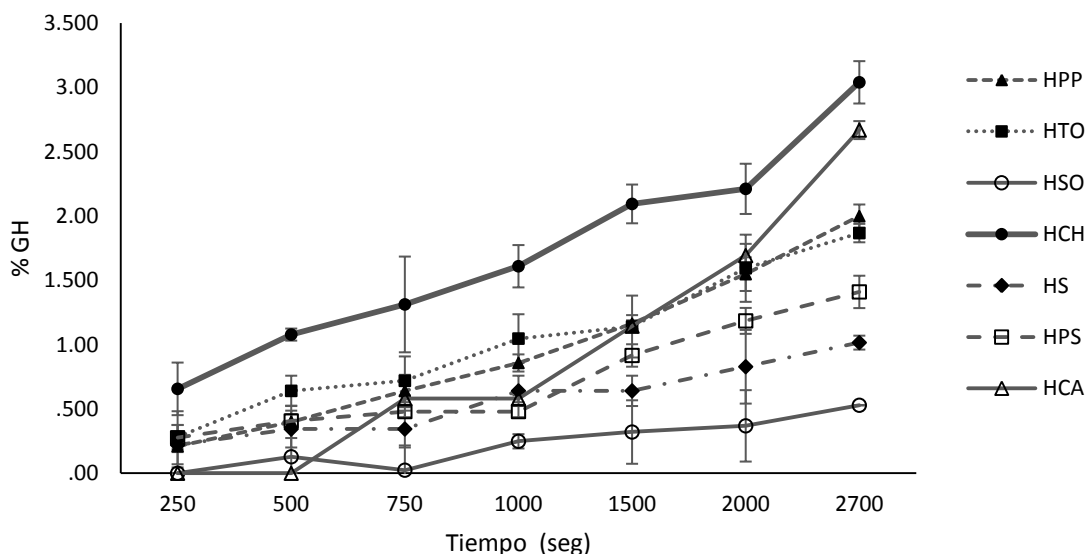


Figura 9. Porcentaje de hidrólisis proteica en condiciones alcalinas, en función del tiempo, utilizando extractos enzimáticos de *P. doyii* de 30 DDE. Promedios \pm DE, n=3. HPP: harina

de pescado Panamá, HTO: harina de tortave, HSO: harina de soya, HCH: harina de carne y hueso, HS: harina de sangre, HPS: harina de pescado local y HCA: caseína.

4. Discusión

El desarrollo macroscópico (boca, ojos, ano, etc.) de las larvas coincidió con lo reportado por Cabrera *et al.* (1988) para esta misma especie, quienes reportaron el final de la etapa larval y el inicio de la fase de alevín a los 20 DDE, cuando aparecen las primeras escamas.

El desarrollo del sistema digestivo de larvas de *P. dovii* fue similar al reportado para otros cíclidos y otras especies de agua dulce (ver revisión en Treviño *et al.* 2011). Sin embargo, el tiempo que tardan en diferenciarse las estructuras digestivas varía entre distintas especies. Estas diferencias temporales se relacionan con las estrategias reproductivas de cada especie (Balon 1975). La ontogenia del sistema digestivo de los cíclidos que desovan sobre un sustrato, como *P. dovii* (presente trabajo), *Cichlasoma dimerus* (Meijide y Guerrero 2000), *Oreochromis niloticus* (Morrison *et al.* 2001), *Petenia splendida* (Treviño *et al.* 2011) y *Cichlasoma urophthalmus* (Cuenca-Soria *et al.* 2013), es más acelerada que en cíclidos que son incubadores bucales, como *Labeotropheus* sp. (Fishelson 1995). Las larvas de los desovadores en sustrato se desarrollan más rápidamente para maximizar sus posibilidades de sobrevivencia; mientras que las larvas que reciben protección parental (incubadores bucales) pueden dirigir su energía al crecimiento u otros propósitos (Lazo *et al.* 2011).

Bajo las condiciones de cultivo empleadas en este estudio, *P. dovii* agotó sus reservas vitelinas 11 días después de haber iniciado la alimentación exógena. Este es un periodo de tiempo bastante largo, similar al encontrado en larvas de *P. splendida* (Treviño *et al.* 2011). Según Gisbert y Williot (1997), la presencia de este alimento endógeno podría facilitar la transición hacia la alimentación exógena y constituye una ventaja en caso de que se retrase su inicio.

El estómago de las larvas de *P. dovii* mostró una morfología uniforme, igual a lo presentado por *P. splendida* (Treviño *et al.* 2011), lo cual indica que realiza principalmente

digestión química, en vez de una combinación de digestión química y mecánica, como en otras especies de peces que presentan una diferenciación del estómago en regiones cardiaca, fúndica o pilórica (Zambonino-Infante *et al.* 2008).

La presencia de vacuolas lipídicas supranucleares en el epitelio intestinal, a partir de los 9 DDE, indica que aunque las larvas pueden digerir y absorber los lípidos del alimento (endógeno y exógeno) y transportarlos hasta el hígado, su habilidad de transporte debe ser limitada (Gisberth *et al.* 2005). Los depósitos de grasas que se presentan posteriormente (a partir de los 15 DDE) en el páncreas, podrían indicar que el tipo de alimento suministrado (*Artemia*) o la cantidad excede el requerimiento lipídico de esta especie.

Con respecto a la ontogenia enzimática, se encontró actividad de las enzimas evaluadas desde antes del inicio de la alimentación exógena, la cual inició a los 6 DDE. Esto concuerda con lo reportado para *O. niloticus* (Tengjaroenkul *et al.* 2002), *Oreochromis mossambicus* (Lo y Weng 2006), *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011) y *P. splendida* (Treviño *et al.*, 2011). Según Zambonino-Infante y Cahu (2001), las larvas de la mayoría de especies de peces cuentan con un amplio espectro de enzimas digestivas desde antes del inicio de la alimentación exógena, por lo que la actividad inicial parece estar genéticamente programada.

La alta actividad de proteasas digestivas ácidas encontrada a los 6 DDE coincide con la presencia de glándulas gástricas en el estómago de las larvas de esta edad, e indica que el estómago es funcional (Fig. 5a y 2b). La determinación del momento en que el estómago es funcional es importante, ya que para muchos autores es cuando se debe iniciar el uso de alimentos formulados (Lazo *et al.* 2007). El que la actividad ácida específica ($U \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$) haya sido mayor al inicio, podría deberse a un menor contenido de otras proteínas solubles en los extractos, debido a que el estómago es muy pequeño a esta edad. Mientras que el incremento en la actividad encontrado a los 41 DDE podría deberse a que esta edad el estómago posee una gran cantidad de glándulas gástricas capaces de secretar proteasas ácidas.

El incremento de la actividad específica de las proteasas alcalinas totales durante los primeros días es indicativo del desarrollo del páncreas y del intestino; mientras que el descenso posterior coincidió con el final de la etapa larval y el inicio de la fase de alevín (alrededor a los 22 DDE). Este patrón ha sido reportado para otras especies y se cree que se relaciona con cambios fisiológicos que suceden durante el desarrollo larval, tales como la reducción en la síntesis de enzimas digestivas, el aumento en otras proteínas solubles en los extractos, la aparición de otras hormonas o enzimas, o podría estar genéticamente programado (Zambonino-Infante y Cahu 2001; Lazo *et al.* 2007). El aumento de la actividad proteolítica de *P. dovii* al final, puede asociarse con el paso de larva a alevín y a la presencia del sistema digestivo completamente desarrollado (Fig. 5b y 3c).

Las fluctuaciones (aumentos y descensos) en la actividad específica de tripsina y quimiotripsina (endo-proteasas) (Fig. 5c y d) también se han reportado en larvas de otras especies, como *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.* 2007), y se ha hipotetizado que se deben a cambios genéticamente programados y a variaciones en el alimento natural de los organismos (Zambonino-Infante y Cahu 2001).

Según Zambonino-Infante y Cahu (1994) la leucina-aminopeptidasa y las fosfatasa ácidas y alcalinas, que son enzimas del epitelio intestinal, son indicadoras de la maduración de los enterocitos y del intestino. De manera que en larvas de *P. dovii* esto sucede entre los 14 y 22 DDE, de acuerdo a los patrones de actividad presentados por esas enzimas.

Los picos de actividad específica de lipasas y amilasas a los 14 y 22 DDE, respectivamente, podrían relacionarse, al igual que en el caso de las proteasas, con el desarrollo y maduración del sistema digestivo, específicamente del páncreas. Luego del periodo de transición de larva a juvenil (22-30 DDE), los niveles de ambas enzimas incrementaron, coincidiendo con lo reportado para *P. splendida*. Según Uscanga-Martínez *et al.* (2011), esto le permite a las larvas un mayor aprovechamiento del alimento natural, debido a que pueden hidrolizar el glucógeno de sus presas, ya que esta es una especie carnívora, con hábitos piscívoros.

La aceptación de alimento formulado en larvas de *P. dovii*, desde el inicio de la alimentación exógena, produjo un incremento en peso y longitud, sin afectar su supervivencia. Esto demuestra que el sistema digestivo de estos organismos se encuentra lo suficientemente desarrollado para digerir y asimilar dietas formuladas desde el inicio de la alimentación exógena. Sin embargo, el alimento formulado empleado produjo una tasa específica de crecimiento muy baja (cuadro 3). Según Lazo (2000) entre las razones que se han postulado sobre el pobre desempeño de las dietas formuladas destacan: carecer de sustancias que estimulen su ingestión; no estimular la secreción de zimógenos hacia el tubo digestivo, o inhibir ciertas enzimas digestivas ya presentes; ser deficientes en nutrientes esenciales (como amino ácidos, ácidos grasos, vitaminas, etc.); proveer nutrientes esenciales pero, con una estructura química inadecuada para su digestión, absorción y eficiente utilización, o en un proporciones inadecuadas.

Los estudios de crecimiento en larvas de peces de agua dulce muestran resultados variables al emplear diferentes alimentos. En carpas, Rottman *et al.* (1991) obtuvieron mayor crecimiento con *Artemia* en *Ctenopharyngodon idella* y con una dieta formulada en *Hypophthalmichthys nobilis*. Las larvas del gaspar *Atractosteus spatula* tuvieron un mejor crecimiento al alimentarse con dietas formuladas (Mendoza *et al.* 2008). Drossou *et al.* (2006) no encontraron diferencia en el crecimiento de larvas de la tilapia *O. niloticus* alimentadas con *Artemia* o una dieta para alevines de trucha. Pareciera que, además de la especie, el adecuado crecimiento de las larvas está ligado al suministro de dietas adecuadas a la capacidad digestiva de los organismos en cultivo, sus requerimientos nutricionales y las condiciones de crianza.

Con respecto al efecto del alimento en la actividad enzimática, según Zambonino-Infante y Cahu (2001), la composición de la dieta puede modular (disminuir o incrementar) la actividad de ciertas enzimas digestivas. De acuerdo con Hofer y Wee (citados por Drossou *et al.* 2006), la producción de enzimas proteolíticas aumenta con el uso de alimentos inadecuados, ya que las larvas intentan compensar la mala calidad del alimento produciendo más enzimas. Además, el tiempo de tránsito intestinal en las larvas es menor que en los juveniles, a causa de una menor longitud intestinal, por lo que tienen menos

tiempo para la digestión y absorción. Una mayor producción enzimática requiere de un gasto energético considerable, lo cual produce un menor crecimiento. Esto concuerda con los resultados obtenidos en términos de actividad proteolítica específica, para ambos grupos de proteasas, ya que sus niveles fueron muy semejantes entre ambos protocolos (A: *Artemia* y B: alimento inerte), incluso llegando a ser menores para el protocolo A en determinados momentos (Fig. 7b y d).

Los niveles de actividad específica de las proteasas ácidas y alcalinas mostraron el mismo patrón de variación temporal dentro de cada tratamiento. Con el protocolo B, la actividad de ambas enzimas mostró un aumento progresivo a lo largo del periodo larval, lo que indica que hubo cierta compensación debida al alimento formulado. Con el protocolo A, los niveles de actividad proteolítica disminuyeron ligeramente durante el periodo de destete, lo que sugiere que hubo un efecto por el cambio de alimento. Sin embargo, estas fluctuaciones también se presentaron al alimentar las larvas exclusivamente con *Artemia* (Fig. 5). De manera que, como se mencionó antes, podrían deberse a cambios fisiológicos o a programas genéticos innatos (Zambonino-Infante y Cahu 2001; Lazo *et al.* 2007). El aumento en la actividad enzimática luego del destete, cuando las larvas se alimentaban exclusivamente con la dieta formulada, podría deberse a una compensación fisiológica. Por el contrario, el descenso en la actividad específica al final del periodo larval podría indicar que el sistema digestivo es entonces capaz de digerir y asimilar adecuadamente el alimento formulado.

La menor actividad de proteasas ácidas determinada en este ensayo (efecto del alimento en la actividad proteolítica), en comparación con lo reportado para la ontogenia enzimática (Fig. 7d y 5a, respectivamente), pudo ser influenciada por la forma de preparar los extractos enzimáticos, ya que en el primer caso se prepararon en agua destilada y no en buffer a pH 2.0, lo cual pudo causar cierto grado de inactivación de estas enzimas.

Además del conocimiento de la ontogenia digestiva y el efecto del alimento sobre esta, la selección de ingredientes adecuados es fundamental para la formulación de dietas capaces de maximizar el crecimiento de las larvas. Por esta razón, en este trabajo se realizó la

evaluación *in vitro* de varios ingredientes, por medio de ensayos de inhibición de la actividad proteolítica alcalina para valorar ingredientes de origen vegetal, y usando el método de pH-Stat, para evaluar la digestibilidad proteica alcalina de ingredientes ricos en proteína, tanto de origen animal como vegetal.

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de diferentes ingredientes de origen vegetal en la actividad proteolítica alcalina de las larvas de *P. dovii*, indican que la susceptibilidad a los inhibidores está influenciada por el estadio de desarrollo larval (Fig. 8). Esto podría deberse a los cambios temporales en los niveles de las diferentes proteasas digestivas durante el periodo larval (Fig. 5). Debido a lo anterior, se recomienda la formulación de dietas específicas para cada estadio del desarrollo larval, que incluyan los ingredientes que presenten la menor inhibición de las proteasas y la mayor digestibilidad.

En otros estudios realizados en peces marinos y dulceacuícolas, se ha reportado que el efecto de los inhibidores presentes en las harinas vegetales varía en dependencia del ingrediente, la cantidad suministrada y la especie (El-Sayed *et al.* 2000; Alarcón *et al.* 2001; Chong *et al.* 2002; Pérez *et al.* 2003; Santiagosa *et al.* 2008; Rodiles *et al.* 2012).

Al comparar los ingredientes evaluados, independientemente del estadio de desarrollo, se determinó que la harina de soya y el acemite de trigo produjeron la mayor inhibición ($p \leq 0.05$). El efecto de la soya coincide con los resultados obtenidos por Pérez *et al.* (2003) con *Piaractus mesopotamicus*, así como por Alarcón *et al.* (2001) en *Lutjanus argentiventris* y *Lutjanus novemfasciatus*. Además, El-Sayed *et al.* (2000) reportan una disminución del crecimiento y aprovechamiento del alimento en *O. niloticus*, al utilizar la soya como sustituto de la harina de pescado. Por el contrario, Chong *et al.* (2002) encontraron poca inhibición enzimática en *Symphysodon spp.*, sugiriendo la inclusión de esta fuente proteica en la dieta.

Existen dos grupos de inhibidores de proteasas en la soya: el inhibidor Kunitz y el inhibidor Bowman-Birt, que inhiben tanto a la tripsina como a la quimiotripsina. Además, la soya presenta otros factores antinutricionales (FANs) como los fitatos, los cuales no actúan directamente sobre las proteasas, pero pueden formar complejos fitato-proteína que disminuyen la acción de las proteasas digestivas de las larvas sobre la proteína (National

Research Council 2011). En el caso de los inhibidores de proteasas, estos se pueden inactivar en cierto grado con tratamientos térmicos (Alarcón *et al.* 2001).

Con respecto a la harina de trigo, Moyano *et al.* (1999) determinaron su efecto en adultos de *O. niloticus*, *Sparus aurata* y *Solea senegalensis*, encontrando mayor inhibición en las proteasas de *S. senegalensis*, mientras que sus derivados, como el salvado de trigo (en concentraciones bajas), mostraron porcentajes de inhibición menores que con derivados del arroz (afrechillo de arroz) en adultos de *P. mesopotamicus* y *Odontesthes bonaeriensis* (Pérez *et al.* 2003).

De igual forma, con la harina maíz se ha determinado un efecto inhibitor sobre la enzima tripsina (Jamal *et al.* 2012). En el caso de la harina de coquito de palma africana, su inclusión en niveles mayores al 10% produjo una reducción en el crecimiento de *O. aureus* (Iluyemi *et al.* 2010), la cual pudo ser causada, en parte, por la presencia de inhibidores de proteasas y otros FANs. Sin embargo, procesos de biocoversión, como la fermentación con *Trichoderma koningii*, han mejorado la digestibilidad de la proteína en híbridos de tilapia (Ng *et al.* 2002; Hem *et al.* 2008).

Los valores de digestibilidad alcalina obtenidos en este trabajo con alevines de *P. dovii* de 30 DDE son similares a los reportados por Álvarez-González *et al.* (2008) para juveniles de *P. splendida*, otro cíclido carnívoro, quienes obtuvieron valores bajos de digestibilidad alcalina para la harina de soya y para la harina de sangre de res y valores altos para la caseína, la harina de vísceras de pollo y la harina de pescado. De igual manera, con *Centropomus undecimalis*, otra especie carnívora, se obtuvo resultados similares (Concha-Frías 2008).

Según Uscanga-Martínez *et al.* (2011), el comportamiento de la digestibilidad de las diferentes fuentes de proteínas se relaciona con los hábitos alimenticios, por lo que al ser estas especies carnívoras tendrán mayor capacidad de hidrolizar las harinas de origen animal. Además, el bajo valor de digestibilidad alcalina *in vitro* obtenido para la harina de soya se relaciona también con la presencia de inhibidores de proteasas (Fig. 9 y 8).

Valverde *et al.* 2013. Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 320-355.

Con base en los resultados de digestibilidad *in vitro*, se podrían iniciar ensayos para sustituir en algún porcentaje la harina de pescado, ya sea por harina de tortave o harina de carne y hueso, tomando también en consideración su perfil de aminoácidos.

En conclusión, las larvas de *P. dovii* cuentan con un sistema digestivo lo suficientemente desarrollado, con las estructuras y las enzimas digestivas necesarias para digerir y asimilar el alimento formulado, desde el inicio de la alimentación exógena. Sin embargo, el alimento formulado debe diseñarse con base en los requerimientos nutricionales y en la capacidad digestiva en cada fase del desarrollo larval. De manera que todavía falta por determinar los requerimientos nutricionales, así como cuantificar la digestibilidad *in vitro* de otros ingredientes y para diferentes estadios del desarrollo larval, con el fin de formular una dieta adecuada para las larvas de esta especie.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Juan Alberto Morales del Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA), por su colaboración con la histología de las larvas y al Lic. Cristian Fonseca, del Laboratorio de Calidad de Productos Pesqueros de la Estación de Biología Marina de la UNA, por la realización de los análisis proximales de las harinas evaluadas.

Referencias bibliográficas

- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK.
- Alarcón, F.J., F.L. García-Carreño & M.A. Navarrete del Toro (2001) Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. Fish Physiology and Biochemistry 24, 179-189.
- Alarcón, F.J., F.J. Moyano & M. Díaz (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. J. of the Sci. of Food and Agric. 82, 1-8.
- Álvarez-González, C.A, G. Márquez-Couturier, L. Arias-Rodríguez, W.M Contreras-Sánchez, A. Uscanga-Martínez, N. Perales-García, F.J Moyano-López, R. Civera-Cerecedo, E. Goytuotua-Bores, L. Isidro-Olán, J.A Almeida-Madrigal, D. Tovar-Ramírez, J.N Gutiérrez-Rivera, L.M. Arévalo-Galán, E. Gisbert, L. Treviño & B. Morles-Sánchez (2008) Avances en la fisiología digestiva y nutrición de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. En: L.E. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar, M. G. Nieto López, D.A. Villarreal Cavazos, J.P. Lazo Corvea y M.T. Viana (ed). Avances en Nutrición Acuícola IX. Memorias del Noveno Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México, pp. 135-235.
- Anson, M.L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. The Journal of General Physiology 22, 79-89.
- Balon, E. K. (1975) Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. J. Fish. Res. Board Can. 32, 1663-1670.
- Bergmeyer, H.U. (1974) Phosphatases: Methods of enzymatic analysis, Vol 2. Academic Press, New York.
- Beux, L.F. & E. Zaniboni-Filho (2008) *Artemia* sp. Proportions and Effects on Survival and Growth of Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* Larvae. J. Appl. Aqua. 20, 184-199.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-25
- Bussing, W.A. (2002) Peces de las Aguas Continentales de Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Cabrera, J., R. Murillo & M. Mora (1988) Desarrollo embrionario, larval y del alevín de *Cichlasoma dovii* (Günther, 1864) (Pisces: Cichlidae). Rev. Biol. Trop. 36, 417- 422.
- Chong, A., R. Hashim & A.B. Ali (2002) Inhibition of protease activities in discus *Symphysodon spp.* by three plant meals. Aquaculture International 10, 433-441.
- Concha-Frías, B. (2008) Evaluación de la capacidad digestiva de juveniles de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792), sobre diferentes ingredientes proteínicos. Tesis de Maestría. Universidad Católica del Norte, Chile.

- Cuenca-Soria, C.A., C.A. Álvarez-González, J.L. Ortiz-Galindo, D. Tovar-Ramírez, R. Guerrero-Zárate, S. Aguilar-Hernández, M.A. Perera-García, R. Hernández-Gómez, & E. Gisbert (2013) Histological development of the digestive system of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther 1862). *J. Appl. Ichthyol.* doi: 10.1111/jai.12307.
- DelMar, E.G., C. Largman, J. Brodrick & M. Geokas (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* 99, 316-20.
- Dimes, L.E. & N. Haard (1994) Estimation of protein digestibility: Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 349-362.
- Drossou, A., B. Ueberschär, H. Rosenthal & K.H. Herzig (2006) Ontogenic development of the proteolytic digestion activities in larvae of *Oreochromis niloticus* fed with different diets. *Aquaculture* 256, 479-488.
- El-Sayed, A.-F.M., I. Martínez & F.J. Moyano (2000) Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using *in vitro* assays. *Aquaculture International* 8, 403-415.
- Erlanger, B., N. Kokowsky & W. Cohen (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95, 271-278.
- Fishelson, L. (1995) Ontogenesis of cytological structures around the yolk sac during embryologic and early larval development of some cichlid fishes. *J. Fish Biol.* 47, 479-491.
- Folk, J.E. & E.W. Schirmer (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase A system. *J Biol Chem* 238, 3884-3894.
- Francis, G., H.P.S. Makkar & K. Becker (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227.
- García-Carreño, F.L., M.A. Navarrete del Toro, M. Díaz-López, M.P. Hernández-Cortes & J.M. Ezquerro (1996) Proteinase inhibition of fish muscle enzymes using legume seed extracts. *J Food Protec* 59, 312-8.
- Gisbert, E. & P. Williot (1997) Larval behaviour and effect of the timing of initial feeding on growth and survival of Siberian sturgeon larvae under small scale hatchery production. *Aquaculture* 156, 63-76.
- Gisbert, E., L. Villeneuve, J.L. Zambonino-Infante, P. Quazuguel & C.L. Cahu (2005) Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids* 40, 609-618.
- Günther, J. (1996) Crecimiento del guapote lagunero (*Cichlasoma dovii*) en régimen de cultivo intensivo en estanques y su dependencia de la densidad. *UNICIENCIA* 13: 13-19.
- Günther, J. & J. Ulloa (1995) Growth and feed utilization of dow cichild (*Cichlasoma dovii*) larvae fed *Artemia* naupli. *Rev. Biol. Trop.* 43, 272-282.
- Hem, S., S. Toure, C. Sagbla & M. Legendre (2008) Bioconversion of palm kernel meal for aquaculture. Experiences from the forest region (Republic of Guinea). *African Journal of Biotechnology* 7, 1192-1198.

- Iluyemi, F.B., M.M. Hanafi, O. Radziah & M.S. Kamarudin (2010) Nutritional evaluation of fermented palm kernel cake using red tilapia. *African Journal of Biotechnology* 9, 502-507.
- Jamal, F., P.K. Pandey, D. Singh & M.Y. Khan (2012) Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Rev*, 12, 1-34.
- Kjeldahl, C. (1883) New method for determination of nitrogen in organic materials. *Z. Analyt. Chem.* 22, 366-382.
- Lazo, J.P. (2000) Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. En: L.E. Cruz -Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (ed.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán, México, pp. 300-312.
- Lazo, J.P., G.J. Holt & C.R. Arnold (2002) Towards the development of suitable microdiets for substitution of live prey in the rearing of red drum larvae: applications of studies on the digestive physiology. *Fisheries Science* 68, 888-891.
- Lazo, J.P., R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera & C.R. Arnold (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265, 194-205.
- Lazo, J.P., M.J. Darias & E. Gisbert (2011) Ontogeny of the digestive tract. In: *Larval Fish Nutrition*. G.J. Holt (ed.), pp. 1-46. John Wiley & Sons, UK.
- Lo, M.-J. & C.-F. Weng (2006) Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 261, 1403-1412.
- López-Ramírez, G., C.A. Cuenca-Soria, C.A. Alvarez-González, D. Tovar-Ramírez, J.L. Ortiz-Galindo, N. Perales-García, G. Márquez-Couturier G, L. Arias-Rodríguez, J.R. Indy, W.M. Contreras-Sánchez, E. Gisbert & F.J. Moyano (2011) Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem.* 37, 197-208.
- Maraux, S., D. Louvard & J. Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Acta Biochim Biophys* 321, 282-295.
- Martínez-Montaña, E. & J.P. Lazo (2012) *In vitro* protein digestibility of dietary ingredients throughout ontogeny of California halibut, *Paralichthys californicus*, larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 43, 51-62.
- Meijide, F. J. & G.A. Guerrero (2000) Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1940) under laboratory conditions. *J. Zool.* 252, 481-493.
- Mendoza, R., C. Aguilera, L. Carreón, J. Montemayor & M. González (2008) Weaning of alligator gar (*Atractosteus spatula*) larvae to artificial diets. *Aquaculture Nutrition* 1, 223-231.
- Morrison, C.M., T. Miyake & J.R. Wrigh Jr (2001) Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *J. Morphol.* 247, 172-195.
- Moyano, F.J. (2006) Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: aplicaciones en Nutrición. En: L.E. Cruz Suárez, D.R. Marie, M. Tapia Salazar, M.G. Nieto López, D.A. Villarreal Cavazos, A.C. Puello Cruz y A. García Ortega (ed.). *Avances de Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional*
- Valverde *et al.* 2013. Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 320-355.

- de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, pp. 396-409.
- Moyano, F.J., I. Martínez, M. Díaz & F.J. Alarcon (1999) Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122, 327-332.
- National Research Council (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington DC.
- Ng, W.-K., H.-A. Lim, S.-L. Lim & C.-O. Ibrahim (2002) Nutritive value of palm kernel meal pretreated with enzyme or fermented with *Trichodema koningii* (Oudemans) as a dietary ingredient for red hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture Research* 33, 1199-1207.
- Pérez, J.J., G.A. Wicki, F.J. Moyano & F.J. Alarcón (2003) Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaeriensis*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA), 442-454.
- Robynt, J.F. & W.J. Whelan (1968) The α -amylases. In: Starch and its Derivates. J.A. Radley (ed.), pp. 477-497. Chapman and Hall, London, UK.
- Rodiles, A., E. Santigosa, M. Herrera, I. Hachero-Cruzado, M.L. Cordero, S. Martínez-Llorens, S.P. Lall, S. & F.J. Alarcón (2012). Effect of dietary protein level and source on digestive proteolytic enzyme activity in juvenile Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup 1850. *Aquaculture International* 20, 1053-1070.
- Rottmann, R.W., J.V. Shireman & E.P. Lincoln (1991) Comparison of three live foods and two dry diets for intensive culture of grass carp and bighead carp. *Aquaculture* 96, 269-280.
- Santigosa, E., J. Sánchez, F. Médale, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez & M.A. Gallardo (2008) Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282, 68-74.
- Sarath, G., R.S. De la Motte & F.W. Wagner (1989) Protease assay methods. In: Proteolytic enzymes: a practical approach. R.J. Beynon and J.S. Bond (ed.), pp. 25-55. Oxford University Press, New York. USA.
- Tacon, A. (1990) Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Argent Laboratories Press, USA.
- Tengjaroenkul, B., B.J. Smith, S.A. Smith & U. Chatreewongsin (2002) Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211, 241-251.
- Treviño, L., C.A. Álvarez-González, N. Perales-García, L. Arévalo-Galán, A. Uscanga-Martínez, G. Márquez-Couturier, I. Fernández & E. Gisbert (2011) A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther (1862), from hatching to the juvenile stage. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 73-82.

- Ulloa, J.B. (1997) Growth and feed utilization of *Cichlasoma dovii* juveniles fed practical diets containing different protein levels. *J. Aqua. Trop.* 12, 89-96.
- Uscanga-Martínez, A., F.J. Moyano-López, C.A. Álvarez-González & N. Perales-García. (2011) Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Nieto-López, D.A. Villarreal-Cavazo, J. Gamboa-Delgado y L. Hernández-Hernández. (ed.). *Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.
- Versaw, W., S.L. Cuppett, D.D. Winters & L.E. Williams (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J Food Sci* 54, 232-254.
- Walter, H.E. (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V. H.U. Bergmeyer (ed.), pp. 270-277. Verlag Chemic Weinheim, Germany.
- Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu (1994) Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 209-212.
- Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130, 477-487.
- Zambonino-Infante, J.L., E. Gisbert, C. Sarasquete, I. Navarro, J. Gutiérrez, J. & C.L. Cahu (2008) Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: *Feeding and digestive functions of fishes*. J. E. O. Cyrino, D. Bureau and B. G. Kapoor (ed.), pp. 277-344. Science Publishers Inc., Enfield, UK.

Modelizando el Biorreactor; o cómo Conocer Mejor el Digestivo de sus Peces

Fco. Javier Moyano

Dpto. Biología y Geología. Esc. Sup. Ingeniería. Univ. Almería.

Cañada S. Urbano s/n. 04120. Almería. España

E-mail: fjmoyano@ual.es

Resumen

El aparato digestivo de cualquier animal no es sino un biorreactor de complejidad variable en el que tienen lugar las reacciones de hidrólisis de los productos que constituyen el alimento. Su funcionamiento está en buena medida controlado por los mismos factores y leyes que los reactores químicos. El conocimiento de dichos factores y el modo en que afectan a la hidrólisis de los alimentos es la base para desarrollar modelos tanto teóricos como prácticos del aparato digestivo. Este último tipo de modelos es lo que se conoce como modelos de digestión *in vitro*, los cuales son cada vez más utilizados para comprender el funcionamiento del aparato digestivo en diferentes especies y como herramienta para evaluar la calidad nutritiva de los piensos. Se hace un repaso general de la modelización del aparato digestivo en especies acuáticas, así como de sus limitaciones y potencialidades.

Palabras clave: digestión, *in vitro*, modelos, acuicultura

El aparato digestivo como biorreactor

La producción de animales acuáticos es simplemente un proceso de transformación de la energía y la proteína contenida en una serie de materias primas e ingredientes que constituyen los piensos, en proteína y grasa animal de elevado valor nutritivo e interesantes cualidades organolépticas. En dicha transformación el aparato digestivo juega un papel primordial, dado que es en esencia un biorreactor complejo en el que tienen lugar los procesos de transformación mediante hidrólisis y la absorción de los mencionados ingredientes. Además, el aparato digestivo se constituye en la interfase entre el medio acuático externo y el organismo del animal y es el hábitat natural de la microbiota simbiote que también lleva a cabo significativas transformaciones de algunos nutrientes.

Un enfoque interesante para comprender mejor el funcionamiento del digestivo de los peces es considerar sus similitudes con los biorreactores artificiales. Al igual que estos, está formado por una serie de compartimentos en los cuales tienen lugar diferentes reacciones y procesos, está sujeto a un flujo constante de sustratos y genera productos de manera continuada (Figura 1). Además, su funcionamiento está afectado por una multitud de factores (temperatura, pH, relaciones enzima:sustrato, inhibidores enzimáticos, etc.) que modifican de manera muy significativa el resultado neto de los procesos que tienen lugar en su interior.

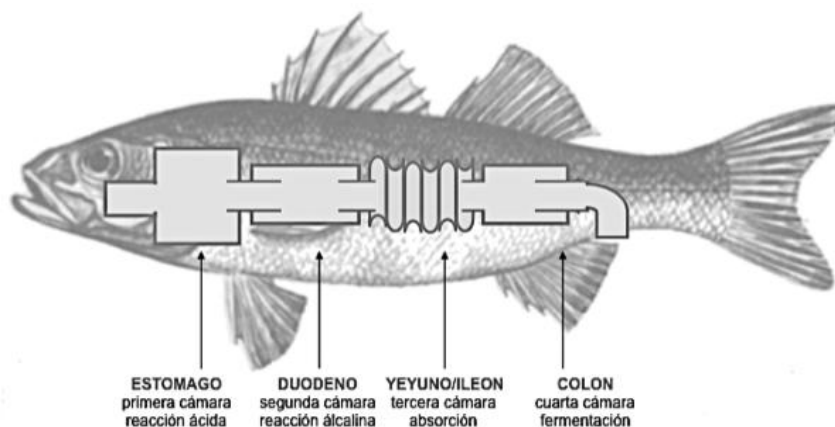


Figura 1. El digestivo de un pez como biorreactor complejo

La modelización del aparato digestivo como un biorreactor se puede plantear tanto desde una perspectiva teórica como práctica. La primera suele ser utilizada por los *ecólogos nutricionales* con objeto de investigar de qué modo las configuraciones de los aparatos digestivos existentes en distintas especies ayudan a maximizar la ganancia de energía y nutrientes. Este enfoque se fundamenta en la clasificación de los distintos tipos de reactores químicos realizada por Levenspiel (1999) que considera tanto su ritmo de funcionamiento (continuo o discontinuo) como la forma en que los reactivos y productos de la reacción se ponen en contacto (con o sin mezcla de ambos). Esto hace que en términos prácticos se distinguan 3 tipos básicos de reactores (Figura 2). De este modo, el funcionamiento del aparato digestivo de cualquier animal puede asimilarse a uno de estos modelos o a una combinación en serie de varios de ellos, de forma que los animales que se alimentan de manera discontinua presentarían aparatos digestivos asimilables a un reactor por lotes o intermitente, en tanto que los que se alimentan de manera continuada poseerían aparatos digestivos asimilables a un reactor de flujo. Esta teoría de los reactores químicos, desarrollada de manera muy completa por Penry y Jumars (1987) ha sido utilizada por diferentes autores para analizar las relaciones existente entre la composición de la dieta, el procesado del alimento y la morfología del aparato digestivo, permitiendo obtener interesantes conclusiones respecto al modo en que la digestión se relaciona con las pautas de obtención de alimento en diferentes grupos de animales (Karasov y Diamond, 1988; Whelan y Schmidt, 2007) incluidos los peces (Horn y Messer, 1992; German, 2009).

El otro enfoque es el del *nutricionista animal*, que intentaría descubrir, mediante la utilización de *modelos físicos* de una parte concreta del aparato digestivo, qué características del funcionamiento del aparato digestivo en especies concretas le permiten optimizar la ganancia de nutrientes. Estos modelos, empleados para llevar a cabo lo que comúnmente se ha dado en llamar ensayos de “digestibilidad *in vitro*”, se vienen utilizando desde hace más de 60 años de manera rutinaria y con protocolos bien establecidos en el campo de la nutrición humana y de animales terrestres.


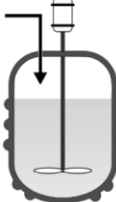

Tipo de reactor	Esquema	Pauta de funcionamiento	Pauta de mezcla	Parte del digestivo asimilable
Reactor por lotes (Batch reactor o BR)		Todos los reactivos se añaden a la vez. La reacción se produce durante un cierto tiempo tras el cual todos los productos y los reactivos remanentes son vaciados	Mezcla homogénea y continua. Las concentraciones son uniformes en todo el reactor y sólo varían con el tiempo	Estómago
Reactor de flujo continuo con agitación (continuous-flow stirred-tank reactor o CSTR)		Los reactivos y productos se introducen y retiran intermitentemente	Mezcla homogénea. No hay diferencias espaciales ni temporales	Estómago y ciego
Reactor de flujo continuo (plug-flow reactor o PFR)		Los reactivos y productos se introducen y retiran continuamente	No hay mezcla a lo largo del eje principal. Las concentraciones varían desde la entrada a la salida del reactor	Intestino

Figura 2. Tipos de reactores y su asimilación con distintas partes del aparato digestivo, según Penry y Jumars (1987)

En estos ámbitos se han realizado multitud de trabajos y existen muy buenas revisiones sobre el tema, tanto en la vertiente de su aplicación a la nutrición de rumiantes (Kitessa *et al.*, 1999; Mabweesh *et al.* 2000) como de monogástricos (Boisen y Eggum, 1991; Swaisgood y Catignani, 1991; Savoie, 1994; Boisen, 2000) y por supuesto en humanos (Woolnough *et al.* 2008; Hur *et al.*, 2011; Butts *et al.* 2012; Guerra *et al.* 2012). En los organismos acuáticos los modelos digestivos *in vitro* son de desarrollo más reciente y tienen dos aplicaciones principales: obtener una mejor comprensión de los diferentes factores que afectan la funcionalidad del digestivo con objeto de optimizar su funcionamiento y evaluar ingredientes y piensos de un modo más rápido y sencillo que mediante ensayos *in vivo*.

capacidad tampón de los ingredientes utilizados habitualmente en los piensos o la producción total de HCl. Por otra parte, el tiempo de reacción depende de factores intrínsecos (anatomía del digestivo, temperatura del agua) y extrínsecos (frecuencia de alimentación), pero tampoco hay muchos datos respecto a las tasas de tránsito digestivo bajo distintas condiciones y cómo afectan a la eficiencia neta del proceso de digestión.

En definitiva, la modelización precisa apoyarse en una serie de datos que pueden obtenerse mediante: a) ensayos biológicos sencillos (producción de HCl, cambios de pH tras ingesta, volumen estomacal, etc.); b) ensayos biológicos más complejos (tasas de tránsito digestivo, parámetros catalíticos de las principales enzimas, etc.) y d) ensayos *in vitro* (interacciones entre enzimas y productos, efecto de factores como el pH y la temperatura sobre las tasas de hidrólisis, etc.).

Bioaccesibilidad, biodisponibilidad y digestibilidad. ¿Cuál se puede realmente modelizar en un biorreactor?

Prácticamente la totalidad de investigadores que utiliza modelos de biorreactores para simular el funcionamiento de los digestivos animales indica que su objetivo es medir la **digestibilidad *in vitro***. Sin embargo, esta afirmación no resulta correcta si se tienen en cuenta tanto la definición de digestibilidad, como lo que realmente se puede medir con un biorreactor.

La digestión y la absorción de nutrientes son procesos fisiológicos complejos que resulta prácticamente imposible reproducir de manera ajustada *in vitro*. En un biorreactor se pueden modelizar para un determinado sustrato tanto las transformaciones físicas resultantes de los movimientos de disgregación y mezcla, como las químicas resultantes de su interacción con el medio acuoso (solubilización), el efecto del pH, los iones y de algunos factores antinutritivos, así como los procesos de hidrólisis llevados a cabo por enzimas concretas. Por el contrario, los efectos de la fibra, las secreciones proteicas endógenas, la actividad de las enzimas microbianas, etc., difícilmente pueden ser simulados. Bajo estas premisas se concluye que los ensayos *in vitro* son capaces de reproducir en cierta medida lo

que ocurre en el digestivo de un animal, pero están lejos de poder ofrecer una medida de la digestibilidad del ingrediente estudiado.

Desde una perspectiva más amplia, se podría decir que en última instancia, los ensayos nutricionales pretenden medir la biodisponibilidad de un nutriente. La *biodisponibilidad* de los nutrientes es un concepto asociado a la eficacia con la absorción y utilización metabólica de un nutriente ingerido (Gregory *et al.* 2005) que podría definirse como la fracción de dicho nutriente que resulta disponible para su utilización en las funciones fisiológicas o el almacenamiento tras todos los procesos pre-ingestivos (procesado) y post-ingestivos (hidrólisis y absorción). La biodisponibilidad real sólo podría ser medida evaluando por ejemplo los niveles de nutrientes en sangre o su posterior acumulación en los tejidos, es decir, una vez superada la barrera intestinal.

La medida de la digestibilidad *in vivo* no es más que un modo indirecto de estimar la biodisponibilidad potencial de un nutriente. Puede decirse que es un **método post-absortivo**, ya que asume que todo lo que no está en las heces es porque ha sido absorbido. El cálculo de la digestibilidad implica por tanto realizar un balance de masas entre la cantidad de nutrientes que ingresan en el aparato digestivo y los que son eliminados sin transformación posible; para ello es necesario medir tanto la cantidad de nutriente o compuesto suministrado como alimento como la remanente en las heces. No obstante, dado que la composición de estas últimas puede verse notablemente modificada por muchos factores (secreciones internas, biomasa bacteriana o productos derivados de su metabolismo) se asume que esta medida proporciona datos de *digestibilidad aparente*.

Una forma de obviar este error y proporcionar una medida más precisa de la digestibilidad es recurrir a la toma de muestras del contenido de la digesta antes de su entrada al intestino grueso, recurriendo para ello a la canulación; este procedimiento permite evaluar lo que se conoce como *digestibilidad ileal*, y resulta habitual en el estudio de este parámetro en algunos animales como los cerdos (Boisen y Moughan, 1996). Aparte de lo engorroso de su determinación, resulta evidente que se trata de una aproximación que a veces puede resultar

bastante inexacta, ya que la presencia de un nutriente en las heces puede estar bastante influenciada por la acción microbiana intestinal que tiene lugar durante y después del proceso de absorción.

Los métodos de simulación de la hidrólisis *in vitro* son una forma indirecta de estimar la biodisponibilidad potencial de los nutrientes. En este caso se trataría de **métodos pre-absortivos**, que en realidad estiman la fracción de nutrientes potencialmente disponible para absorción intestinal. En estos casos se asume que todo lo que se libere por la acción enzimática estará disponible para absorción intestinal (por eso es más correcto decir que son una medida de la *biodisponibilidad potencial*). En estrecha relación con la estimación de la biodisponibilidad potencial en los métodos *in vitro* (pre-absortivos) se encuentra el concepto de bioaccesibilidad, parámetro que mide la susceptibilidad de un nutriente para ser liberado de la matriz del alimento por acción de las enzimas (Hedrén *et al.*, 2002). La biodisponibilidad potencial dependerá estrechamente de la bioaccesibilidad, al menos para los macronutrientes, aunque no tanto para los micronutrientes (en los minerales depende más del pH de la digesta).

A su vez, la bioaccesibilidad está condicionada por numerosos factores; algunos de ellos están vinculados al sustrato (solubilidad de proteínas o carbohidratos, capacidad tampón, contenido en factores antinutritivos como inhibidores o quelantes) y otros al tratamiento físico-químico del alimento previo a la ingesta (calentamiento, tamaño de partícula). En cualquier caso resulta evidente que, con escasas excepciones (Martínez-Montaña *et al.*, 2010, 2011) la mayor parte de los modelos de digestibilidad *in vitro* sólo simula la etapa de hidrólisis y no la de absorción, y por lo tanto no pueden adoptar en propiedad ese nombre. No obstante, es en la posibilidad de evaluar mejor el posible efecto de todos estos factores sobre la biodisponibilidad donde radica el interés de los ensayos *in vitro*.

Modelización de la hidrólisis digestiva en organismos acuáticos

Los diferentes modelos de simulación de la digestión utilizados en animales acuáticos se pueden agrupar en las siguientes categorías:

Digestores simples (una etapa)

De **vaso cerrado** (no hay retirada de productos)

- Con medida de producto de hidrólisis
- Con medida de cambios de pH (pH-drop; pH-stat)

De **membrana** (permite retirada de productos)

Digestores compuestos (dos etapas)

Las configuraciones utilizadas para la modelización han sido preferentemente los digestores simples, bien orientados a la medida de los productos de hidrólisis o a los cambios de pH, tanto con la técnica de pH-stat como con pH-drop. En menor medida se han utilizado sistemas algo más complejos, como los digestores compuestos dotados de membrana. Las configuraciones y condiciones operativas utilizadas en una buena parte de los estudios analizados no parecen cumplir de manera adecuada con los requisitos antes mencionados. Así por ejemplo, bastantes de ellos simulan únicamente la etapa intestinal de la digestión, pero no la gástrica, algo que resulta llamativo considerando que la mayoría de las especies cuya digestión se pretende modelizar presenta un estómago claramente funcional. Aunque se ha demostrado que la etapa intestinal de la hidrólisis enzimática es la más importante tanto por su duración como por el número de enzimas implicadas, en el caso concreto de las proteínas se ha demostrado que la digestión gástrica tiene un profundo efecto sobre las etapas posteriores de hidrólisis, debido tanto a la acción del pH ácido como de la pepsina que modifican la accesibilidad posterior de las proteasas intestinales (Alarcón *et al.* 2002). Igualmente, se ha demostrado que el paso por el estómago inactiva parcialmente a algunos inhibidores de tripsina presentes en ingredientes vegetales (Krogdahl y Holm, 1981; Alarcón *et al.* 2001). Adicionalmente, en los casos en los que se pretende evaluar la biodisponibilidad de minerales como el fósforo, resulta crucial simular el paso por el

ambiente ácido estomacal si se pretende obtener una visión más realista de la fracción potencialmente disponible para absorción intestinal (Morales y Moyano, 2010). Cabe deducir por tanto que los resultados cuantitativos y cualitativos de hidrólisis proteica obtenidos con los modelos simples pueden estar bastante alejados de lo que ocurre en el pez vivo y que en este sentido, los modelos gastrointestinales que simulan las dos etapas de hidrólisis (Moyano y Savoie, 2001; Morales y Moyano, 2010) resultarían bastante más adecuados.

El tipo de enzimas utilizadas es un aspecto que resulta clave y condiciona enormemente los resultados obtenidos. Diferentes autores han demostrado que las enzimas digestivas de peces, y particularmente las proteasas, poseen características notablemente diferentes a las de otros vertebrados respecto a su afinidad por los sustratos, velocidad de reacción, óptimo térmico o sensibilidad frente a inhibidores (Díaz-López *et al.* 1998). Aunque en una gran mayoría de los modelos de simulación se han empleado extractos más o menos purificados obtenidos de distintas partes del digestivo de las especies estudiadas (Tibbetts *et al.* 2011) o incluso la propia digesta como fuente de enzimas, en otros se emplearon enzimas comerciales obtenidas a partir de vertebrados terrestres o microorganismos, lo que previsiblemente aleja bastante los resultados obtenidos de los potencialmente producidos en el animal vivo.

Tan importante como una configuración adecuada resulta la adaptación de los modelos a las condiciones existentes en el aparato digestivo de la especie cuyo funcionamiento se pretende simular. En este sentido hay varios parámetros fundamentales a considerar: pH, temperatura, duración de la reacción y relación enzima:sustrato utilizada. Sólo algunos estudios justifican los pH utilizados basándose en mediciones realizadas *in vivo* (Grabner y Hofer, 1985; Morken *et al.* 2012), en tanto que en la mayoría la hidrólisis se lleva a cabo dentro de valores de pH que se consideran óptimos para la actividad de las enzimas empleadas, en un rango que va de 7,5 a 9,0 para las hidrólisis alcalinas y generalmente a pH 2,0 en las ácidas. En este último caso, sin embargo, los resultados obtenidos pueden estar bastante alejados de la realidad dado que los pH existentes en el estómago de los peces

suelen ser considerablemente más elevados, lo que claramente afectaría a la funcionalidad de la pepsina (Márquez *et al.* 2012). Por otro lado, las temperaturas utilizadas varían entre los 15 y los 37 °C; las primeras tienen una base fisiológica ya que intentan reproducir la temperatura corporal en especies acuáticas, pero inevitablemente conllevan un enlentecimiento de las reacciones. Las temperaturas más elevadas aunque no tienen justificación fisiológica permiten obtener resultados analíticos en un tiempo menor.

Evidentemente no parece tener sentido intentar reproducir los tiempos de digestión existentes en animales vivos, los cuales en el caso de los peces y crustáceos están muy afectados por una gran diversidad de factores (edad, composición del alimento, temperatura, etc.) y presentan por tanto una gran variabilidad. En consecuencia, el tiempo de reacción utilizado debería ser un compromiso entre la necesidad de obtener resultados significativos y fiables y la de no prolongar excesivamente la duración de los ensayos, algo que iría en contra de una de las ventajas de los experimentos *in vitro*. Los tiempos de reacción empleados en los ensayos son enormemente variables y van desde los 10 min establecidos en los experimentos con pH-drop (Lazo *et al.* 1998; Fenerci y Erdal, 2005; Sultana *et al.* 2010) hasta las 24 h en algunos ensayos realizados con digestores simples (Bassompierre *et al.* 1998; Supannapong *et al.* 2008). El tiempo excesivamente corto utilizado en los primeros parece venir condicionado por la propia naturaleza del ensayo, que no permite observar grandes variaciones en este parámetro más allá de las producidas en los primeros minutos y evidencia las limitaciones de los modelos realizados en reactores cerrados y de pequeño volumen. Por otra parte, los tiempos de ensayos excesivamente prolongados no parecen adecuados principalmente por los problemas derivados de la contaminación bacteriana y la saturación por productos de reacción.

Un aspecto que se considera fundamental al intentar simular la hidrólisis que tiene lugar en el digestivo es la utilización de relaciones Enzima:Sustrato similares a las existentes en el animal vivo, algo a lo que se ha prestado especial atención en los estudios de simulación digestiva en animales terrestres y humanos (Smeets-Peeters *et al.* 1998; Ulleberg *et al.* 2011). Curiosamente, este es un aspecto mal explicado en la gran mayoría de los estudios,

en los cuales, salvo excepciones (Grabner y Hofer, 1985; Morales y Moyano, 2010; Morken *et al.* 2012) se utilizan cantidades de enzimas que no se justifican sobre una base fisiológica y únicamente parecen responder a la necesidad de obtener resultados fáciles de cuantificar. Nuevamente este aspecto hace pensar que los datos obtenidos en experimentos realizados en tales condiciones se alejarán mucho de los obtenidos *in vivo* y permite concluir que el objetivo final de la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento ha sido realizar aproximaciones sencillas con un grado razonable de fidelidad y orientadas a evaluar diferencias en la calidad nutritiva de ingredientes, pero no simulaciones más ajustadas que además permitan entender el motivo de esas diferencias.

Los parámetros utilizados para evaluar la proteólisis son también muy variados. Grabner (1985) desarrolló una metodología en la cual la digestión se determinaba mediante el análisis detallado de las fracciones proteicas liberadas, un enfoque que permite aceptables estimaciones pero resulta algo lento y costoso. La mayor parte de los estudios se decanta por cuantificar de un modo u otro los productos nitrogenados solubles y en algunos casos los azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de carbohidratos (Supannapong *et al.*, 2008).

Un enfoque alternativo es la metodología pH-drop en la cual el grado de proteólisis se evalúa mediante la caída del pH del sistema a lo largo del periodo de reacción y que ha sido utilizada en numerosos ensayos. No obstante, esta caída del pH puede modificar la actuación del enzima en ensayos prolongados, determinando una hidrólisis sólo parcial y subestimando los coeficientes de digestibilidad. El pH-stat (Pedersen y Eggum, 1983) evita este problema ya que el grado de digestión se relaciona con el volumen de alcalina necesario para mantener un pH constante a lo largo de la reacción. A pesar de sus ventajas, este sistema sigue presentando el inconveniente de realizarse en un reactor cerrado en el que los productos finales de la reacción se acumulan y acaban por detener y/o modificar la reacción, además de ser difíciles de separar de los sustratos iniciales para su medición. Por otra parte, en ensayos con sustratos complejos y extractos enzimáticos semipurificados, la presencia de lípidos y lipasas determina la liberación de ácidos grasos que también modifican el pH, lo que conlleva un error inherente ya que la valoración realizada no

permite distinguir qué cantidad de la variación en el pH se debe a hidrólisis proteica y cual no. En buena medida muchos de estos inconvenientes son eliminados al separar físicamente los productos de reacción del resto de la mezcla reactiva conforme aquellos se van liberando, algo que se consigue al emplear los reactores basados en el uso de membranas con distintos tamaños de exclusión molecular (Moyano y Savoie, 2001; Morales y Moyano, 2010; Perera *et al.*, 2010).

Correlación ensayos *in vivo-in vitro*

A pesar de que, como se ha indicado resulta claramente inapropiado hablar de ensayos de digestibilidad *in vitro*, considerando la diferencia entre los parámetros que es posible medir mediante ensayos con estas técnicas y los que se pueden evaluar en los ensayos *in vivo*, es necesario establecer correlaciones entre ambos tipos de parámetros para determinar en qué medida los resultados obtenidos con el primer tipo de métodos pueden ser predictores de los que se obtendrían *in vivo*. Las limitaciones que presentan los diferentes modelos para representar la verdadera digestión, y por tanto para correlacionar los parámetros con resultados obtenidos *in vivo* se entienden mejor al observar la Figura 3. Dado que la transformación de la digesta progresa desde el estómago (quimo) hasta el colon (heces), el grado de concordancia entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* aumentará en la medida en que se simulen etapas que generen productos parecidos al producto final de la digestión, algo que se consigue mejor con modelos que reproducen etapas avanzadas de dicho procesos o bien utilizan varias fases. Como se aprecia en dicha Figura los ensayos basados en el uso de digestores simples que únicamente simulan la digestión ácida producirán resultados notablemente alejados de la realidad, teniendo en cuenta que la fase gástrica de la digestión no presenta en la mayor parte de los peces una importancia equivalente a la que tiene en vertebrados terrestres (Márquez *et al.*, 2012). Esto explicaría por qué tales ensayos presentan correlaciones pobres con los resultados finales de digestibilidad *in vivo* (Nengas *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1998). Los modelos que simulan etapas intermedias de la digestión (producción del quilo) consiguen buenos ajustes y estos

serán tanto mejores cuanto más importante sea la etapa de digestión alcalina en el conjunto del proceso (máxima en peces carentes de estómago como ciprínidos o tilapias).

Por otra parte, la naturaleza de los ingredientes influirá de manera muy significativa en las correlaciones. Los ingredientes de origen animal, salvo excepciones (colágeno) son sencillos de digerir y sufren pocas transformaciones tras la hidrólisis y la absorción, por lo que la composición de la digesta ileal resulta muy similar a la de las heces. Los de origen vegetal, por el contrario, presentan compuestos (principalmente carbohidratos de difícil digestión como celulosas o pectinas) que, además de condicionar la acción de las enzimas, son sustrato de fermentaciones importantes en el colon. Además, la acción mecánica durante su paso por el aparato digestivo determina una mayor pérdida de componentes endógenos. Todo ello hace que la composición de la digesta ileal se aleje bastante de la de las heces y por tanto la posibilidad de establecer correlaciones razonables. Estas diferencias se ponen claramente de manifiesto en diferentes estudios en los que las correlaciones se deben estimar de manera separada para cada tipo de ingredientes (Tibbetts *et al.* 2011b).

No obstante, para obtener correlaciones robustas son necesarios un gran número de datos y salvo excepciones, la mayor parte de los estudios realizados carece de ellos y sólo algunos evalúan más de 10 ingredientes (Gomes *et al.* 1998; Shipton y Britz, 2002; Lemos *et al.* 2009; Tibbetts *et al.* 2011b). Aunque algunos autores encuentran buenas correlaciones entre los valores *in vitro-in vivo* (Chong *et al.* 2002; Shipton y Britz, 2002; Lemos *et al.* 2009; Márquez *et al.* 2013), en la mayoría de ellos dicha correlación no existe o bien hacen falta modelos no lineales para describirla (Dimes *et al.* 1994; Fenerci y Erdal, 2005)

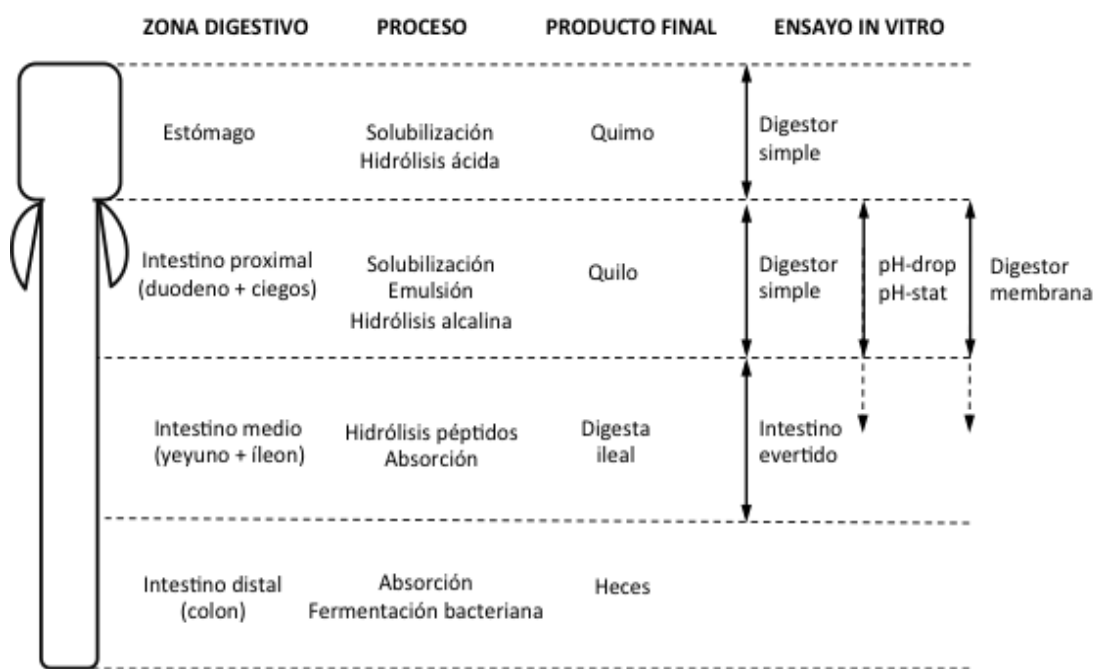


Figura 3. Correspondencia entre los procesos que tienen lugar en la digestión *in vivo* y los simulados mediante sistemas *in vitro*

Como conclusión final cabría destacar que aunque existe la necesidad de desarrollar correlaciones fiables entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* para la biodisponibilidad de nutrientes, resulta evidente que ambas aproximaciones pueden suministrar distintos tipos de información contribuyendo de este modo a obtener una visión más completa del objetivo principal; la calidad nutricional de la proteína la cual se verá finalmente reflejada en un mejor crecimiento del pez. Considerando esto, lo importante no es tanto si los ensayos se correlacionan entre sí, sino en qué medida se complementan para predecir el crecimiento observable *in vivo*, por lo que realmente los resultados de las evaluaciones de biodisponibilidad potencial *in vitro* deberían correlacionarse con otros indicadores de eficiencia, tales como el Índice de Conversión o la Tasa Específica de Crecimiento, tal y como proponen Dimes *et al.* (1994) o Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2002).

Por último, cabe señalar que el enfoque de modelizar los aparatos digestivos de peces o crustáceos considerándolos como biorreactores presenta un amplio potencial de desarrollo futuro que se irá concretando a medida que se disponga de más datos objetivos sobre la fisiología y bioquímica de los mismos.

Referencias

- Alarcón, F. J., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A. (2001). Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiol Biochem* 24: 179-189
- Alarcón, F. J., Moyano, F. J., Díaz, M. (2002). Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *J Sci Food Agric* 82: 697-704
- Bassompierre, M., Kristiansen, H. R., McLean, E. (1998). Influence of weight upon *in vitro* protein digestion in rainbow trout. *J Fish Biol* 52: 213-216
- Boisen, S. (2000). *In vitro* digestibility methods: history and specific approaches. In *Feed evaluation: principles and practice*: 153-168. Moughan, P. J., Verstegen, M. W. A., Visser-Reyneveld, M. I. (Eds.). Wageningen: Wageningen Pers
- Boisen, S., Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutr Res Rev* 4: 141-162
- Boisen, S., Moughan, P. J. (1996). Dietary influences on endogenous ileal protein and amino acid loss in the pig. *Acta Agricult Scand Sect A-Anim Sci* 46: 154-164
- Butts, C. A., Monro, J. A., Moughan, P. J. (2012). *In vitro* determination of dietary protein and amino acid digestibility for humans. *Br J Nutr* 108: 282-287
- Chong, A. S. C., Hasnim, R., Ali, A. B. (2002). Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using *in vivo* and *in vitro* methods. *Aquacult Nutr* 8: 229-238
- Díaz-López, M., Moyano-López, F. J., Alarcón-López, F. J., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A. (1998). Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 121: 369-377.
- Dimes, L. E., Haard, N. F., Dong, F. M., Rasco, B. A., Forster, I. P., Fairgrieve, W. T., Arndt, R., Hardy, R. W., Barrows, F. T., Higgs, D. A. (1994). Estimation of protein digestibility--II. *In vitro* assay of protein in salmonid feeds. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 108: 363 – 370
- Fenerci, S., Erdal, S. (2005). *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) fed steam pressured or extruded feeds. *Turk J Fish Aquat Sci* 5: 17-22
- German, D. P. (2009). Do herbivorous minnows have "plug-flow reactor" guts? Evidence from digestive enzyme activities, gastrointestinal fermentation, and luminal nutrient concentrations. *J Comp Physiol B* 179: 759-771
- Gomes, E. F., Teles, A. O., Gouveia, A., Rema, P. (1998). *In vivo* and *in vitro* digestibility of diets and feedstuffs for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Ichthyol* 14: 109-111
- Grabner, M. (1985). An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture* 48: 97-110

- Grabner, M., Hofer, R. (1985). The digestibility of the proteins of broad bean (*Vicia faba*) and soya bean (*Glycine max*) under *in vitro* conditions simulating the alimentary tracts of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 48: 111-122
- Gregory, J. F., Quinlivan, E. P., Davis, S. R. (2005). Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends Food Sci Tech* 16: 229-240
- Hedrén, E., Mulokozi, G., Svanberg, U. (2002). *In vitro* accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil. *Int J Food Sci Nutr* 53: 445-453
- Horn, M. H., Messer, K. S. (1992). Fish guts as chemical reactors: a model of the alimentary canals of marine herbivorous fishes. *Mar Biol* 113: 527-535
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem* 125: 1-12
- Karasov, W. H., Diamond, J. M. (1988). Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience* 38: 602-611.
- Kitessa, S., Irish, G. G., Flinn, P. C. (1999). Comparison of methods used to predict the *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. *Aust J Agr Res* 50: 825-842
- Krogdahl, A., Holm, H. (1981). Soybean proteinase inhibitors and human proteolytic enzymes: selective inactivation of inhibitors by treatment with human gastric juice. *J Nutr* 111: 2045-2051
- Lazo, J. P., Romaine, R. P., Reigh, R. C. (1998). Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *J World Aquaculture Soc* 29: 441-450
- Lemos, D., Lawrence, A. L., III, A. J. S. (2009). Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by *in vitro* pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 295: 89-98
- Levenspiel, O. (1999). *Chemical reaction engineering*. New York: Wiley.
- Mabjeesh, S. J., Cohen, M., Arieli, A. (2000). *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *J Dairy Sci* 83: 2289-2294
- Márquez, L., Øverland, M., Martínez-Llorens, S., Morken, T., Moyano, F. J. (2013). Use of a gastrointestinal model to assess potential amino acid bioavailability in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 384–387: 46-55
- Márquez, L., Robles, R., Morales, G. A., Moyano, F. J. (2012). Gut pH as a limiting factor for digestive proteolysis in cultured juveniles of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 38: 859-869.
- Martínez-Montañón, E., Peña, E., Focken, U., Viana, M. T. (2010). Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): *In vitro* uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture* 299: 134-139

- Morales, G. A., Moyano, F. J. (2010). Application of an *in vitro* gastrointestinal model to evaluate nitrogen and phosphorus bioaccessibility and bioavailability in fish feed ingredients. *Aquaculture* 306: 244 – 251
- Morken, T., Moyano, F. J., Márquez, L., Sørensen, M., Mydland, L. T., Øverland, M. (2012). Effects of autoclaving and sodium diformate supplementation to diets on amino acid composition, *in vivo* digestibility in mink (*Neovison vison*) and *in vitro* bioavailability using digestive enzymes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Anim Feed Sci Technol* 178: 84-94
- Moyano, F. J., Savoie, L. (2001). Comparison of *in vitro* systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128: 359-36
- Nengas, I., Alexis, M. N., Davies, S. J., Petichakis, G. (1995). Investigation to determine digestibility coefficients of various raw materials in diets for gilthead sea bream, *Sparus auratus* L. *Aquacult Res* 26: 185-194
- Pedersen, B., Eggum, B. O. (1983). Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. *J Anim Physiol Anim Nutr* 49: 265-277
- Penry, D. L., Jumars, P. A. (1987). Modeling animal guts as chemical reactors. *Am Nat* 129: 69-96
- Perera, E., Moyano, F. J., Rodríguez-Viera, L., Cervantes, A., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M. (2010). *In vitro* digestion of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different trypsin isoenzyme patterns. *Aquaculture* 310: 178-185
- Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S., Jensen, H., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T., Mundheim, H., Luzzana, U., Venturini, G. (2002). *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *J Sci Food Agric* 82: 644-654
- Shipton, T. A., Britz, P. J. (2002). Evaluation of an *in vitro* digestibility technique for the prediction of protein digestibility in the South African abalone, *Haliotis midae* L. *Aquacult Nutr* 8: 15-21
- Smeets-Peeters, M., Watson, T., Minekus, M., Havenaar, R. (1998). A review of the physiology of the canine digestive tract related to the development of *in vitro* systems. *Nutr Res Rev* 11: 45-69
- Sultana, Z., Ahmed, S., Iqbal, S., Chisty, A. H. (2010). Determination of *in vitro* protein digestibility of different feed ingredients for *Nilotica* (*Oreochromis nilotica*). *Bangladesh Res Publ J* 4: 87-94
- Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Rungruangsak-Torrissen, K. (2008). Digestive enzymes and *in-vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*. *Aquacult Int* 16: 437-453
- Swaigood, H. E., Catignani, G. L. (1991). Protein Digestibility: *In Vitro* Methods of Assessment. *Adv Food Nutr Res* 35: 185-236
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., Ross, N. W., Verreth, J. A. J., Lall, S. P. (2011a). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 1. Development of the method. *Aquaculture* 319: 398-406.
- Moyano, F. 2013. Modelizando el Biorreactor; o cómo Conocer Mejor el Digestivo de sus Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds). *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.356-375.

- Tibbetts, S. M., Verreth, J. A. J., Lall, S. P. (2011b). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 2. *In vitro* protein digestibility of common and alternative feed ingredients. *Aquaculture* 319: 407-416
- Ulleberg, E. K., Comi, I., Holm, H., Herud, E. B., Jacobsen, M., Vegarud, G. E. (2011). Human gastrointestinal juices intended for use in *in vitro* digestion models. *Food Dig* 2: 52-61
- Whelan, C. J., Schmidt, K. A. (2007). Food acquisition, processing, and digestions. In *Foraging: behavior and ecology*: 141-174. Stephens, D. W., Brown, J. S., Ydenberg, R. C. (Eds.). Chicago: University of Chicago Press
- Woolnough, J. W., Monro, J. A., Brennan, C. S., Bird, A. R. (2008). Simulating human carbohydrate digestion *in vitro*: a review of methods and the need for standardisation. *Int J Food Sci Tech* 43: 2245-2256

Indicadores del Desarrollo Morfofuncional durante la Ontogenia Inicial de Peces Teleósteos: una Revisión

Carlos Alberto Cuenca-Soria^{1,3}, José Luis Ortíz-Galindo¹, Dariel Tovar-Ramírez*⁴, Carlos Alfonso Álvarez-González², Rosa Isabel Ochoa-Báez¹,
Jesús Iván Murillo-Álvarez¹

¹ Instituto Politécnico Nacional CICIMAR, Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Col. Playa Palo de Sta. Rita, Apdo. Postal 592, La Paz B.C.S. 23096, México.

² Laboratorio de Acuicultura Tropical UJAT-DACBIOL. Carretera Villahermosa-Cárdenas km. 0.5, Villahermosa Tabasco 86139, México.

³ Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. UJAT-DAMR. Carretera Tenosique-Estapilla km 1, Tenosique, Tabasco 86901, México.

⁴ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Apdo. Postal 128; La Paz, BCS 23090, México e-mail: dtovar04@cibnor.mx

Resumen

Para optimizar los protocolos de alimentación en peces teleósteos cultivables, en los últimos 30 años, los estudios se han dirigido a optimizar el uso del alimento vivo, durante la primera alimentación en el periodo larvario, que es el más crítico del cultivo de peces, hasta su transformación al juvenil. No obstante que esto ha significado avances innegables en el cultivo de peces marinos y aún dulceacuícolas, los altos costos que implican el establecimiento de infraestructura para los cultivos secundarios, han menguado seriamente la rentabilidad de la acuicultura. Más aún, la calidad nutricional del alimento vivo no siempre es garantía de cubrir los requerimientos nutricionales de los organismos de cultivo. Los indicadores (del tipo morfofuncional, bioquímico, histoquímico, inmunológico, molecular, entre otros), que se han empleado hasta ahora en la investigación de la ontogenia inicial (embrión, larva y juvenil) de peces cultivados, son de importancia crucial, pues contribuyen a proporcionar un mayor número de elementos, que permitirán prescindir cada vez más del alimento vivo con el diseño de alimentos inertes, acordes con la fisiología y capacidad digestivas de los peces cultivados y que a la postre, redundará en hacer más rentable la actividad acuícola. La presente revisión pretende describir los cambios que se suscitan a nivel morfofuncional y a la par, explorar los indicadores que hasta ahora han sido validados como herramientas e incluso los potenciales, con el objeto de conocer el grado de maduración de la morfología y función digestivas, durante la ontogenia inicial de peces teleósteos de importancia comercial.

Palabras clave: Indicadores, desarrollo, morfofuncional, ontogenia, peces teleósteos

Abstract

In the last 30 years, the researching has been leading to the employing of the live food, to improve of feeding protocols in the fish hatcheries, towards the consolidation of those critical steps. Despite continue improving of the fed practices on marine and freshwater fish hatcheries, the big cost to produce live food, has been decrementing seriously the aquaculture profitability. Moreover, the nutritional quality of the live food not always is warranty to cover the nutritional demand of fish larvae. The morphological, biochemical, histochemical, immunological, molecular (between others) indicators that have been employed in the investigation of the early ontogeny (embryo, larvae, juvenile) on the researching of the morphological changes on fish farmers, have a crucial importance, since it have contributed to have more technical and scientist elements, to reduce the dependence of the live food in the hatcheries, according to the digestive physiology and capacity of the fish which, could improve the feeding protocols and the profitability. The aim of the present review was to describe the morphological and physiology changes concurrently used to explore the indicators that now have been validated as tools to know the level of morphofunctional development during the early ontogeny on teleost fishes of commercial importance.

Key words: Indicators, development, morphofunctional, ontogeny, teleost

1. Introducción

Cuenca *et al.*. 2013. Indicadores del Desarrollo Morfofuncional durante la Ontogenia Inicial de Peces Teleósteos: una Revisión. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.376-404.

Hoy en día, la optimización de la calidad nutricional de los alimentos en peces teleósteos cultivables, ha dirigido la investigación hacia el empleo del alimento vivo, con miras a resolver la primera alimentación y a completar el periodo larvario hasta su transformación al juvenil, evento que se vuelve el más crítico del cultivo de peces y que son la limitante para cerrar ciclos de producción en especies potencialmente importantes, comercialmente hablando. No obstante que esto ha significado avances innegables en el cultivo de peces marinos y aún dulceacuícolas, los altos costos que implican el establecimiento de la infraestructura para los cultivos secundarios, han menguado seriamente la rentabilidad de la acuicultura. Excepto para la modalidad de engorde sobre jaulas flotantes, que ha tenido un repunte en la industria con diferentes especies a lo largo de todo el mundo dado que las pesquerías han alcanzado su límite máximo sostenible.

Por otro lado, la calidad nutricional del alimento vivo (fitoplancton y zooplancton), no siempre es garantía de cubrir los requerimientos nutricionales de los organismos de cultivo. Durante la producción masiva del alimento vivo se pueden enfrentar dificultades tales, como una provisión y calidad nutricional variables a lo largo de varios ciclos de producción (Sorgeloos, 1980; Watanabe *et al.*, 1983). Desde hace algunas décadas, los trabajos de investigación han intentado dilucidar la habilidad fisiológica propia del pez, para degradar los ingredientes presentes en la dieta, desde la óptica de su maquinaria enzimática, con resultados cada vez más alentadores (Kolkovski, 2001). De acuerdo con Rosenlund *et al.*, (1997), las dietas inertes ofrecen la oportunidad de introducir nutrientes no disponibles en el alimento vivo y nos permiten conocer la capacidad del organismo de digerir ingredientes en particular. Esto lo hemos observado con aquellas especies dulceacuícolas y marinas que al ser alimentadas con dietas inertes desde la apertura de la boca (p.e. la carpa, *Cyprinus carpio*, lubina Europea, *Dicentrarchus labrax*, dorada *Sparus aurata*) han generado un gran conocimiento no sólo de la fisiología digestiva, sino que también han permitido grandes avances en la generación de alimentos microparticulados de pequeño tamaño, apto para lograr destetar especies que generan larvas pequeñas.

La finalidad de tales estudios, que han revolucionado la arista desde donde se observan los procesos de ingestión, asimilación y digestión del alimento, que experimentan los peces

cultivados durante su ontogenia inicial, ha sido profundizar en el conocimiento de los acontecimientos morfológicos más relevantes a lo largo de este período crítico, a la par de los acontecimientos funcionales (puesto que la evidencia de laboratorio y de campo ha demostrado que la morfología y la función, no son eventos de naturaleza mutuamente excluyente). La secuencia de eventos que marcan la pauta de los cambios importantes, a través del desarrollo morfológico y funcional del tracto alimentario incipiente en los peces, son claros indicadores de que el proceso que inicia con la fecundación y con el desarrollo embrionario, culminarán finalmente en la maduración morfológico-estructural del sistema digestivo y con ello, la funcionalidad del mismo. Tales indicadores, que pueden ser reflejo inequívoco de la capacidad los peces de experimentar la transformación (el cambio del período larvario al juvenil), en un período relativamente corto de tiempo, han resultado en ser herramientas sumamente útiles, para comprender mejor el proceso de maduración de la función digestiva y con ello, la posibilidad invaluable de determinar el instante propicio y preciso, del cambio de régimen alimenticio (de alimento vivo al alimento inerte), y del comienzo de la transformación misma. Los indicadores, como señalan Gisbert *et al.* (2008), pueden ser igualmente, herramientas de diagnóstico de la condición nutricional de los peces cultivados. Los indicadores empleados hasta ahora en la investigación de la ontogenia inicial de peces de importancia comercial, han sido principalmente del tipo morfofuncional, bioquímico, histoquímico, inmunológico y molecular. Estos indicadores son de importancia crucial, pues contribuyen a proporcionar un mayor número de elementos, que permitirán prescindir cada vez más del alimento vivo con el diseño de alimentos inertes, acordes con la fisiología y capacidad digestivas de los peces cultivados y que a la postre, redundará significativamente, en hacer más rentable la actividad piscícola. La presente revisión pretende describir los cambios que se suscitan a nivel morfofuncional y explorar a la par, los indicadores que hasta ahora han sido validados como herramientas y aquellos reconocidos como potenciales, con el objeto de explorar el grado de desarrollo de la morfología y función digestiva, durante la ontogenia inicial (embrión, larva y juvenil) de peces teleósteos de importancia comercial.

1.1 Tipos de ontogenia e indicadores

La ontogenia es toda la serie de cambios morfológicos y funcionales que experimentan los peces, a lo largo de su vida. El desarrollo exitoso del sistema digestivo es esencial para la supervivencia y el crecimiento de las larvas de peces, pues les permiten ser capaces de capturar, ingerir, digerir y absorber el alimento (Kjorsvik *et al.* 2004) al igual que los adultos de su especie. Aunque las larvas de peces pueden ser morfológicamente capaces de capturar elementos alimentarios al instante de su primera alimentación exógena (Segner *et al.* 1994; Bisbal y Bengtson, 1995), el sistema digestivo requiere una serie de cambios estructurales antes de ser totalmente funcional (Canino y Bailey, 1995). El esquema general de la secuencia de eventos durante la ontogenia de los peces teleósteos fue descrita en el trabajo de Govoni *et al.* (1986), donde propone que a partir de un intestino incipiente (primitivo), se derivan el intestino anterior, medio y posterior, producto de su segmentación en estas tres regiones. A su vez, el intestino anterior da origen al esófago y estómago, el intestino medio al intestino delgado y grueso, y el intestino posterior al recto y ano. Con lo que respecta a los tipos de ontogenia de peces teleósteos Balon (2002) establece tres tipos de ontogenia: indirecta, de transición y directa y propone que la ontogenia es un modelo jerárquico de la historia de vida de los peces. Por tanto, la ontogenia se puede desglosar en períodos secuenciales de embrión, larva, juvenil, adulto y senectud, y embrión, juvenil, adulto y senectud, para el caso de la ontogenia indirecta (nótese la ausencia del período de larva). Para el caso de la ontogenia de transición, el modelo propone los períodos embrión, alevín, juvenil, adulto y senectud (nótese el período alevín, una especie de vestigio larvario). Cada período se encuentra separado por fronteras naturales, y comprenden una secuencia de intervalos de organización en “saltos”, o estados “homeoréticos” denominados pasos (la unidad básica en la escala ontogénica), separados por umbrales estabilizados. Por consiguiente, el período es el más largo intervalo, separados uno de otro por umbrales. La fase la define como el siguiente intervalo en el cual, los períodos son divididos por unidades morfológicas, principalmente para propuestas de identificación, de menor significancia ontogénica. El paso es el intervalo natural más corto, separado por umbrales y el concepto de estadio, es un estado instantáneo de ontogenia. A continuación, se abordan aspectos de los tipos de ontogenia referidos.

1.1.1 *Ontogenia indirecta*

El primer período, el embrionario, es caracterizado por la alimentación endógena es decir, por la adquisición de nutrientes a partir de fuentes parentales (Balon, 1999). El tiempo desde la eclosión, hasta la pigmentación de los ojos representa presumiblemente el tiempo en el cual los embriones pueden nutrirse sólo de sus reservas vitelinas y no de fuentes exógenas (Houde, 1974). La alimentación endógena presenta un intervalo que tiende a ser muy estrecho de tiempo y un período larvario largo (dependiente de alimento exógeno), lo que hace a la larva sumamente vulnerable y proclive a altas mortalidades. Numerosas especies producen una fase de embrión libre con órganos y tejidos presumiblemente inmaduros al momento de la eclosión (Falk-Petersen, 2005). Sin embargo, los peces de ontogenia indirecta producen una gran cantidad de embriones y larvas, para compensar tal vulnerabilidad. Adicionalmente, las larvas, pueden ocupar numerosos nichos (plancton en teleósteos), por lo que no compiten por el alimento (Holcík, 1986). De acuerdo con (Gisbert *et al.* 2008), los embriones libres de peces generalmente eclosionan más prematuramente en su desarrollo, que en otros vertebrados, sugiriendo que las secuencias espacio-temporales en embriones libres de teleósteos son muy diferentes al de los vertebrados superiores. Consecuentemente, durante las primeras semanas de vida, una vez que concluye el periodo embrionario, las apterolarvas en peces sufren cambios morfo-estructurales y fisiológicos significativos hasta su paso a la pterolarva y el asentamiento del juvenil, así como la adquisición de características funcionales como los adultos de su especie, con excepción de la reproducción. Muchas investigaciones han sido conducidas en las últimas dos décadas para estudiar la habilidad digestiva y requerimientos nutricionales de larvas de peces y juveniles (Cahu y Zambonino-Infante, 2001). La organogénesis de enzimas digestivas y características de desarrollo del tracto digestivo han sido bien documentadas en varias especies, tales como *D. labrax* (Zambonino-Infante y Cahu, 1994), *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.* 1999a), *Sciaenops ocellatus* (Buchet *et al.* 2000) y *Salmo gairdneri* (*Oncorhynchus mykiss*) (Hoehne-Reitany Kjoersvik, 2004). Los indicadores morfofuncionales, bioquímicos y moleculares, se abordan siguiendo la ontogenia digestiva del modelo de Balon, (2002), acotando también en función de los hábitos alimentarios de las especies descritos por Rust (2002) y a los trabajos hasta ahora realizados en cada caso.

1.1.1.1 Peces *eurifagos* carnívoros

Desde el punto de vista morfológico y cuando ocurre la eclosión, la boca y ano están cerrados en algunas especies (Tanaka, 1969a; Govoni 1980). Esta y otras características más fueron observadas por Gisbert *et al.* (2004) en el lenguado *P. californicus*, además de que el tubo recto estaba cerrado (bucofaringe y ano no diferenciados). Entre los 1 y 2 días después de la eclosión (dde), la bucofaringe presenta rasgos morfohistológicos tales como algunas capas de células escamosas y pocas papilas gustativas. En estos días, el intestino es rudimentario, conformado por epitelio columnar ciliado simple. Durante la presencia del saco vitelino, la región posterior del intestino sufre una curvatura de 90° y se forma una válvula intestinal, dividiendo al intestino en dos regiones, el intestino prevalvular y el postvalvular. Ambas regiones presentan citoplasma basofílico y prominentes microvellosidades eosinofílicas (Gisbert *et al.* 2004). El intestino postvalvular está desprovisto de células caliciformes (Govoni, 1980), mientras tiene lugar la aparición de las glándulas gástricas (lo cual es un indicador de inmadurez digestiva). Sin embargo, es necesaria la actividad de ciertas enzimas para que tenga lugar la digestión en el embrión libre inmediatamente después de la eclosión. A este respecto, Alliot *et al.* (1977) detectaron tripsina y quimiotripsina (enzimas pancreáticas) por técnicas bioquímicas, inmediatamente después de la eclosión en *D. labrax*. García-Gasca *et al.* (2006) detectaron expresión del gen codificante para el tripsinógeno a partir de muestras de RNA de embriones (75 horas después de la fertilización (hdf) de *Sphoeroides annulatus*. Gisbert *et al.* (2004) indicaron que gránulos de zimógeno acidofílicos (precursoras de enzimas pancreáticas), fueron detectados en el páncreas exócrino al 1 dde, antes del inicio de la alimentación exógena, y su número se incrementa con el comienzo de la alimentación exógena en *P. californicus*. Lo anterior confirma la importancia de las secreciones pancreáticas para el desarrollo larvario durante el período agástrico (Ribeiro *et al.*, 1999b; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Durante el período larvario, el intestino prevalvular ha sido descrito también como el sitio principal del tracto digestivo para la digestión extracelular, debido a su pH alcalino y a la presencia de tripsina, secretada en el páncreas exócrino (Walford y Lam, 1993; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Poco después, tiene lugar la diferenciación del canal alimentario en bucofaringe, esófago, intestino pre y postvalvular y recto, coincidiendo con la primera alimentación exógena. Los autores refieren que esto ha sido observado para otras especies carnívoras como *S. senegalensis* (Ribeiro *et al.* 1999a) y *Limanda ferruginea* (Baglolle *et al.*

1997). A los 4 dde, un pliegue formado por células mucosas ciliadas, comienza a diferenciarse en la región terminal del esófago, a partir del intestino prealvular anterior en *P. californicus* (Gisbert *et al.* 2004). Alrededor de los 10 dde, el número de células caliciformes aumenta. Dichas células, secretan glicoproteínas y mucinas, las sustancias que componen la mucosa lubricante, a nivel de la bucofaringe anterior y en esófago, órgano en el que no se observaron cambios histológicos hasta la metamorfosis, como en *P. californicus*. A esta edad se logra apreciar también un diente canino en la parte posterior de esta cavidad y la mucosa del intestino es mayormente rectilínea con varios pliegues cortos. Las primeras células caliciformes, son visibles en ambas regiones del intestino. A los 13 dde, *S. annulatus* presenta un cambio prominente en la expresión de tripsinógeno (García-Gasca *et al.* 2006). Las células caliciformes se incrementan en número con la diferenciación de la mucosa intestinal, siendo más abundantes en el intestino prealvular. Histológicamente, estas células se tiñen de azul oscuro, lo cual se relaciona a la presencia de mezcla de glicoproteínas carboxiladas y sulfatadas y glicoproteínas neutrales. Entre los 19 y 23 dde, el plegamiento del intestino prealvular se incrementa, ocupando la mayor parte del lumen intestinal; en tanto que el intestino postalvular muestra pocos pliegues en una mucosa que se muestra rectilínea (Gisbert *et al.* 2004). Cuando *P. californicus* experimenta la migración del ojo (27-30 dde), coincide con la diferenciación de las glándulas gástricas y el decaimiento de los cuerpos supranucleares a nivel del intestino postalvular (Gisbert *et al.* (2004), indicando la presencia de absorción pinocítica y digestión proteolítica en el medio intracelular, mediante un proceso de cinco etapas: pinocitosis, transporte, acumulación, digestión y extinción (Watanabe, 1984a). En peces con ontogenia indirecta, la digestión intracelular es la predominante en el periodo larvario (Govoni, 1989), que después se volverá extracelular cuando tiene lugar la transformación del juvenil. La digestión intracelular compensa la digestión incompleta que se da a nivel del intestino medio primitivo, que va decayendo su aporte digestivo, a medida que tiene lugar la maduración del canal alimentario, sobre todo con la aparición de un estómago funcional, que posiblemente sea el indicador más trascendente, de la maduración digestiva en peces eurípagos carnívoros. A su vez, está ampliamente documentado que un indicador morfofuncional de la madurez plena del estómago, es la presencia de glándulas gástricas a nivel del estómago fúndico; en tanto que un indicador enzimático significativo, de la

madurez estomacal son los altos niveles de pepsina, precisamente secretada a partir de las glándulas gástricas. El acontecimiento de estos tres cambios son indicadores del umbral de un tracto digestivo en estado avanzado de madurez. Govoni *et al.*, (1986) señalaron que la presencia de inclusiones supranucleares y vacuolas son indicadores de un canal alimentario funcional. Por otro lado, García-Gasca *et al.* (2006) reportaron un sensible decremento de los niveles de mRNA codificante para el tripsinógeno mRNA, a partir de los 28 dde en *S. annulatus*, coincidiendo con el cambio de dieta de nauplios de *Artemia* a microdieta formulada. Darias *et al.* (2006) revelaron una expresión de tripsinógeno relativamente constante en el primer mes de vida de *Pagrus pagrus*, decreciendo hasta los 50 dde, sugiriéndose un papel secundario de tripsinógeno en la digestión proteínica. El mismo comportamiento sincrónico (de decaimiento de la actividad de tripsina como indicador de diferenciación estomacal) fue determinado en *Oplegnathus fasciatus* (He *et al.* 2011), aunque la disminución en la actividad de tripsina resultó más prematura (a partir de un pico a los 19 dde). Sin embargo, el cambio más notable de diferenciación del estómago y más aún, del comienzo del período juvenil; es el desarrollo de las glándulas gástricas, como anotan Pradhan *et al.* (2012). Tales cambios pueden ser indicadores útiles, que marcan la pauta del proceso de maduración digestiva.

1.1.1.2 Peces eurípagos omnívoros con énfasis en fuente alimentaria animal

A la fecha, pocos estudios sobre la dinámica ontogénica han sido llevados a cabo en peces eurípagos omnívoros con énfasis en fuente alimentaria animal. En su trabajo del desarrollo de enzimas digestivas en la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus*, López-Ramírez *et al.* (2010) revelaron que la tripsina y la quimiotripsina muestran actividad antes de la eclosión. Esto también ha sido resaltado en el ciprínido *Labeo rohita* ya que a los 4 dde muestra actividad de enzimas como amilasa, proteasa, lipasa y fosfatasa alcalina (Mitra *et al.* 2008). La presencia de las enzimas digestivas más importantes ha sido demostrada al momento de la apertura de la boca en la dorada, *S. aurata* y el sargo, *Diplodus sargus* (Moyano *et al.* 1996; Cara *et al.* 2003). Siguiendo con *C. urophthalmus*, a los 13 dde, las larvas presentan fuerte actividad de varias enzimas digestivas, que han sido reportadas también para especies como *P. californicus* (Álvarez-González *et al.* 2006). Los resultados

de caracterización bioquímica, en larvas de *C. urophthalmus* indican que es justamente a los 13 dde, el mejor momento para sustituir el alimento vivo por alimento artificial, que coincide con un aumento visible de la actividad de las enzimas tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasa, carboxipeptidasa y fosfatasas ácida y alcalina (López-Ramírez *et al.* 2010). La aminopeptidasa y fosfatasa alcalina son enzimas intestinales que participan en la digestión de pequeños péptidos y asimilación de nutrientes, respectivamente. Sus incrementos sostenidos a lo largo de la ontogenia inicial son indicadores de mejoramiento de la capacidad digestiva intestinal (Guerreiro *et al.* 2010). La tripsina ha sido reportada como la enzima más importante en la proteólisis alcalina en larvas de *P. maculofasciatus* (Álvarez-González *et al.* 2008); mientras que para *C. urophthalmus* la mayor actividad proteolítica, está representada por la quimiotripsina. Esto explica el por qué la quimiotripsina ha sido reportada como parte de la maquinaria enzimática de peces omnívoros con énfasis en fuente alimentaria animal y en herbívoros, más que tripsina que ha sido detectada en peces eurípagos carnívoros (Jonas *et al.* 1983). Por otra parte, los mismo autores sugirieron la presencia de tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasa y catepsina (indicador de la proteólisis intracelular y por tanto de un tubo alimentario primitivo o inmaduro) antes de la eclosión (0 dde) y a los 3 dde, respectivamente. En larvas de otros peces omnívoros con énfasis en fuente alimentaria animal, *Pagellus erythrinus* y *C. urophthalmus*, la diferenciación del tracto digestivo tiene lugar en bucofaringe, esófago, un estómago presuntivo e intestino a los 3 dde (Micale *et al.* 2006), lo que los constituye como indicadores morfofuncionales y que además coincidieron con la primera alimentación exógena. A partir de estos hallazgos se deduce cierta capacidad funcional del tracto digestivo a esta edad. Los indicadores que pueden ser meritorios de cambios del inicio de la alimentación exógena en peces omnívoros con énfasis en fuente alimentaria animal, son incrementos de la actividad de la tripsina, y el inicio de la actividad de la quimiotripsina como indicador de un posible inicio de alimentación mixta (mezcla de suministros alimenticios endógenos con exógenos). La actividad enzimática por consiguiente, puede ser un indicador verosímil de la habilidad digestiva en peces omnívoros como la carpa común *Cyprinus carpio* variedad Jian, como aseveran Yan y Qiu-Zhou, (2006). A pesar de que la mayor parte de los estudios acerca de la ontogenia inicial en peces, han sido enfocados a especies carnívoras del Mar Mediterráneo y del Atlántico Norte, es posible resumir los

cambios relevantes utilizados como indicadores del grado de maduración en que se encuentra el pez, en la escala ontogénica. Yan y Qiu-Zhou, (2006) señalan que la función digestiva está correlacionada con el desarrollo intestinal en peces sin estómago como *C. carpio*, variedad Jian.

Finalmente en el trabajo de Micale *et al.* (2006) señalaron indicadores que son cruciales en el desarrollo larvario de *P. erythrinus* tales como: tiempo de apertura de la boca, absorción del saco vitelino, formación de las glándulas gástricas, acompañada de la secreción de la pepsina. La apertura de la boca, y por consiguiente, el comienzo de la alimentación exógena, determina la diferenciación regional del intestino en muchas especies de teleósteos (Iwai y Tanaka, 1968; Stroband *et al.* 1979; Stroband y Kroon, 1981; Boulhic y Gabaudan 1992; Sarasquete *et al.* 1995; Gisbert *et al.* 2004).

Una característica evidente en cuanto a los hábitos alimenticios de los peces omnívoros y carnívoros, es que consumen menos alimento por día que los peces herbívoros (Al-Hussaini, 1949; Kapoor *et al.*, 1976). La familia Atherinopsidae se caracteriza por tener un tracto digestivo corto y carecen de un estómago funcional (Horn *et al.*, 2006). Durante su ontogenia, los patrones enzimáticos coinciden con otras larvas de peces incluyendo aquellas que carecen de estómago. Existe un gran número de literatura que describe la biología de esta familia, que por su gran diversidad de hábitats posee hábitos alimenticios variados, encontramos zooplanctófagos, ictiófagos ocasionales, con énfasis a la carnivoría, pero también los hay omnívoros. Específicamente, el pescado blanco (*Chirostoma estor*) es un pez zooplanctófago, ocasionalmente piscívoro oportunista (Ross *et al.*, 2006), el cual posee actividad lipasa justo 1 día después de la eclosión y un pico importante de tripsina a las dos semanas después. Se ha reportado que los peces carnívoros poseen actividad lipasa más alta que los omnívoros o herbívoros la cual está correlacionada con la cantidad consumida de alimento por el pez (Chakrabarti *et al.*, 1995).

En cuanto a las enzimas intestinales por su parte, la fosfatasa alcalina comienza a mostrar un incremento constante después del día 30; y a diferencia de lo que sucede en los peces marinos estudiados hasta la fecha y de naturaleza carnívora, la enzima citosólica leucina

alanina peptidasa, muestra valores ascendentes después del día 10 después de la eclosión (Toledo Cuevas *et al.*, 20011),

1.1.1.3 Peces eurípagos omnívoros con énfasis en fuente alimentaria vegetal

La eclosión en ciprínidos herbívoros como *Ctenopharyngodon idella*, deriva en organismos con desarrollo incompletos, ya que la diferenciación de órganos continúa durante el período postembrionario (Stroband y Dabrowsky, 1979), particularmente el tracto digestivo (Dabrowsky, 1984; Govoni, 1986). Por otro lado, cuando la tasas de crecimiento alcanzan hasta el 30% d⁻¹, (Bryant y Matty, 1980), la actividad enzimática digestiva alcanza valores extremadamente pronunciadas. La alimentación exógena comienza aún antes de la absorción del saco vitelino y en este período el tubo alimentario es corto y recto (Hofer, 1991), pudiendo llegar a medir un 50% de la longitud corporal (Stroband y Dabrowsky, 1979). El intestino larvario corto tiene capacidad de desdoblar y asimilar elementos fácilmente digeribles, principalmente componentes del zooplancton (Mark *et al.*, 1987). El intestino crece lentamente durante el período larvario (Hoffer y Nassin-Uddin, 1985) y el tiempo de tránsito intestinal, está positivamente correlacionado con la longitud relativa intestinal (Hoffer y Nassin-Uddin, 1985). El tiempo disponible para los procesos de digestión y absorción es gradualmente extendido, hasta que finalmente el pez es capaz de cambiar al período adulto (Hofer, 1991). Por consiguiente, tanto el tiempo de tránsito, como la longitud intestinal pueden ser considerados como elementos indicadores, de la madurez digestiva en ciprínidos, principalmente herbívoros. En otro orden de ideas, la actividad de enzimas digestivas es baja en el primer período de alimentación, aunque se incrementa durante el desarrollo larvario (Stroband y Dabrowsky, 1979). Las enzimas digestivas de las presas naturales del zooplancton, sobreviven al tubo digestivo del predador y logran contribuir en un mínimo a la actividad enzimática del hospedero (Hofer, 1991). Por otro lado, la actividad de tripsina en adultos es significativa en el intestino anterior y medio, no así en el posterior, donde la actividad de las enzimas prácticamente desaparece (Hofer *et al.* 1982). En larvas sin embargo, la hidrólisis continúa en el intestino posterior (Hofer, 1991). A este respecto, Guo-Liang *et al.* (2010) estudiaron la expresión molecular de tripsinógeno; así como la actividad específica de tripsina, a lo largo de la

ontogenia de *C. idella*, sugiriéndose una importante actividad de tripsina en larvas. La disminución de la actividad de esta enzima endoproteasa en el intestino posterior, conforme tiene lugar la ontogenia inicial, puede ser un buen indicador de desarrollo digestivo, al menos durante el período larvario. Por otra parte, *C. idella*, es un pez carente de estómago, lo cual implica que todo el proceso digestivo se efectúa a lo largo de su intestino (principalmente anterior y medio), el cual está diseñado para optimizar al máximo la digestión y asimilación de nutrientes. La maquinaria enzimática intestinal de *C. idella*, compuesta por proteasas, lipasas, celulasas y amilasas ha sido abordada por Das y Tripathi (1991), así como por Wu y Zhu (1994). A este respecto, Horn *et al.* (2006), detectaron una actividad prominente de amilasa y maltasa en *Atherinops affinis* (pez herbívoro estuarino), enzimas que degradan azúcares presentes en la dieta. A su vez, los peces herbívoros adultos deben su alta eficiencia digestiva a la enorme área superficial intestinal para los procesos digestivos y de asimilación, producto de un intestino sumamente elongado. Con relación a esto último, Horn *et al.* (2006) concluyeron que, presenta no solo un intestino más largo, sino también una superficie intestinal mayor en *A. affinis* que *Atherinopsis californiensis* y *Leuresthes tenuis*, peces omnívoro y carnívoro, respectivamente. No obstante, en peces sin estómago y por tanto con mecanismos de digestión estomacal ausente, es necesario recurrir en parte, a la digestión intracelular que comúnmente tiene lugar en estadios de la ontogenia inicial de peces teleósteos (hasta que ocurre la formación de las glándulas gástricas, indicadores de la diferenciación desarrollada de un estómago funcional). Liu *et al.* (2008) demostraron la presencia de catepsina D, principalmente involucrada en la digestión proteica de *C. idellus*, enzima indicadora de la digestión intracelular como la leucín alanín peptidasa (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

1.1.2 Ontogenia de transición

Durante el período embrionario, el vitelo en peces de ontogenia de transición es abundante y denso, lo que da las condiciones para el paso al período juvenil en un lapso de tiempo relativamente corto (al menos en comparación con los peces de ontogenia indirecta, de período larvario más largo). Las especies más representativas de este grupo son los peces de la familia Salmonidae, quienes producen grandes huevos demersales y alevines bien

desarrollados (Pavlov y Moksness, 1994). Los huevos de los salmónidos muestran que a las 6 h después de la fertilización tienen pequeños blastodiscos, estrechos espacios perivitelinos, mientras que los glóbulos de lípidos se sitúan alrededor del polo animal y se conectan a la región citoplasmática, en tanto que el embrión y la gota de aceite se encuentran dispuestos en la parte superior del vitelo (Pavlov y Moksness, 1994). Uno de los indicadores más emblemáticos en peces de este grupo, es la presencia de pepsina y tripsina, después de la eclosión de *S. gairdneri* (*O. mykiss*) (Dabrowsky, 1982). Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006), estudiaron la expresión de tripsina y quimiotripsina y su efecto en el crecimiento de *S. salar*, determinando que la primera ve afectada su actividad cuando se promueve el crecimiento, por factores externos (temperatura y la composición de la dieta); e internos (fase de vida), mientras que la actividad de la segunda aumenta en condiciones de limitación del crecimiento (ayuno). Por consiguiente, la actividad enzimática al menos en los salmónidos, es un indicador de la manera en que actúan e interactúan factores internos y externos del cultivo. En otro orden, técnicas histológicas e histoquímicas han revelado escasa acumulación de cuerpos de inclusión proteínicos a nivel de las células epiteliales del intestino medio larvario en salmónidos, haciendo de la digestión intracelular, menos importante en peces de ontogenia de transición, pues ya disponen de un estómago funcional, antes de la absorción del saco vitelino y al instante de la primera alimentación exógena, cuya función no será muy diferente del estómago del pez adulto (Govoni, 1986). Por consiguiente, el alevín (período exclusivo de peces de ontogenia de transición) presenta la mayor parte de las características de un juvenil poco después de la eclosión, puesto que también eclosiona como eleuteroembrión, lo que lo hace un vestigio de larva muy desarrollada. A este respecto, Sarieyyüpoğlu *et al.* (2000) reportaron el comienzo de la formación del estómago, a partir de la mucosa del esófago de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, a los 2 dde. Lo anterior ofrece ventajas al alevín, puesto que en este estado de escala ontogénica, presenta un tracto digestivo estructural y funcionalmente más avanzado en la eclosión, que con relación a los peces de ontogenia indirecta. En el salmón *Hucho taimen*, Guan *et al.* (2010), estudiaron los cambios morfológicos del sistema digestivo durante el desarrollo postembrionario. Encontraron a los 30 días postfertilización, que las aletas están formadas, las branquias están completamente formadas, se da la apertura de la boca y el tracto digestivo es un tubo recto compuesto de una capa de epitelio

columnar. Además, presenta un gran saco vitelino con un grupo celular hepático sobre el costado lateral del vitelo. Posteriormente a los 40 días postfertilización, se ha formado la cavidad orofaríngea, el esófago, el estómago tipo-U y el intestino. Más adelante, a los 50 días postfertilización, se ha absorbido el saco vitelino y el embrión libre es capaz de ingerir alimento del exterior, los órganos digestivos están aun en desarrollo inicial y tampoco se ha completado el desarrollo de los órganos glandulares, se aparece una elevación en el esófago, el estómago se divide en dos porciones: porción cardíaca, corpus gastricum y porción pilórica, aparecen las glándulas en el estómago, presenta un tipo de alimentación mixta, endógena y exógena. Finalmente, a los 60 días postferlización, en el alevín se ha consumido completamente el vitelo, se observa el esfínter bien desarrollado y forma una porción cardíaca y una porción pilórica, con numerosas células globet en la porción cardíaca y un gran número de glándulas gástricas distribuidas en el estómago tipo-U, gran número de ciegos pilóricos en la porción pilórica, el hígado no se divide en mala, solo presenta tres pliegues en el extremo y tiene forma de hoja de maple, el páncreas es un órgano independiente. Su alimentación es totalmente exógena. A partir de este momento se considera que el tracto digestivo está completamente maduro.

1.1.3 Ontogenia directa

Son pocos los estudios realizados concernientes a los cambios morfofuncionales en especies que obedecen al tipo de desarrollo por ontogenia directa (y más las susceptibles de cultivo). El desarrollo embrionario para este grupo, sigue la misma pauta general que para los peces teleósteos, aunque hay diferencias notables. Se ha demostrado que el pez lobo *Anarhichas lupus* presenta fertilización tipo interna (Pavlov, 1993) En algunas especies como *Xenomelaniris brasiliensis*, (un pez aterínido de aguas salobres, cuyo período embrionario dura 143 h aproximadamente, instante en que ocurre la eclosión), los ojos pueden estar bien pigmentados y además presenta los primeros esbozos de las aletas pectorales aún antes de que la eclosión tenga lugar (del Río *et al.* 2005), siendo éstos indicadores típicos de los peces de ontogenia directa. Por otro lado, las larvas de la mayoría de los peces marinos, no poseen la capacidad de alimentarse inmediatamente después de su eclosión, sino que dependen del saco vitelino (poco denso) hasta que sus ojos y boca son

funcionales. Por otra parte, al momento de la eclosión de *A. lupus* es un embrión libre con las características de un juvenil prematuro, que lo hace adaptarse inmediatamente al medio pelágico (Pavlov, 1994a). Al comienzo de la primera alimentación exógena, *A. lupus* se caracteriza por tener un alto grado morfológico, especialmente el sistema digestivo (Pavlov, 1994a), lo que confiere una mayor probabilidad de supervivencia, haciendo a estos peces mucho menos vulnerables en su ontogenia inicial. Hellberg y Bjerkås, (2005) sugieren que un incremento en la cantidad de lípidos en *A. lupus*, estuvo asociado a la maduración de células epiteliales en intestino. La capacidad de absorción de lípidos en intestino entonces, puede constituir un claro indicador de diferenciación intestinal durante la ontogenia en los peces de ontogenia directa, especialmente en el período larvario.

1.2 Indicadores morfofuncionales de maduración

De acuerdo con Ma *et al.* (2005), existen dos etapas que son consideradas de importancia capital en el proceso de maduración de la función digestiva en larvas de peces. Primero, la funcionalidad de la secreción pancreática y segundo, la formación del epitelio con las membranas de borde en cepillo del intestino. Estas fueron descritas en *D. labrax* (Cahu y Zambonino-Infante, 1995), en *S. senegalensis* (Ribeiro *et al.* 1999b) y *S. ocellatus* (Buchet *et al.* 2000, Lazo *et al.*, 2000). La transición del período larvario hasta su transformación a juvenil, implica también profundas modificaciones en estructuras y sistemas del organismo incluyendo, la diferenciación funcional de los órganos sensoriales, el sistema neuroendocrino y el locomotor, así como el sistema digestivo. A pesar de que estos procesos de cambio están completos para la mayoría de las especies, al instante de la primera alimentación exógena, ocurren cambios fisiológicos hasta la transformación a período juvenil, los cuales incluyen la reorganización del tronco muscular (diferenciación de fibras aeróbicas a anaeróbicas), diferenciación de las branquias (transición de respiración cutánea a branquial) y tejido esquelético, desarrollo de un estómago funcional y el establecimiento de la digestión ácida (Sarasquete *et al.* 1995; Segner *et al.* 1994; Ribeiro *et al.* 1999b; Ortíz-Delgado *et al.* 2006; Santamaría *et al.* 2004; Falk-Petersen, 2005; Zambonino *et al.* 2008). Estos últimos cambios mencionados, son indicadores de que el individuo se encuentra en condiciones de maduración digestiva suficiente para realizar de

manera más eficiente la ingesta, digestión y asimilación de los nutrientes. Como señala Gisbert *et al.* (2008), los indicadores (histológicos, son una herramienta útil y precisa para ayudar a la comprensión de los cambios trascendentales que ocurren durante la ontogenia inicial en peces teleósteos, con todo y sus limitaciones en el estudio de poblaciones silvestres. Por otro lado, el perfil de enzimas digestivas, es un indicador de la digestibilidad y utilización de los nutrientes (Mitra *et al.* 2008). Por ejemplo, se ha documentado que las larvas de peces omnívoros y herbívoros muestran alta actividad de pepsina, tripsina y amilasa. En tanto que en las larvas de peces carnívoros, se observa alta actividad de pepsina, tripsina, quimiotripsina y aminopeptidasa, con ínfima actividad de amilasa, salvo excepciones como *S. gairdneri*. La presencia o ausencia de actividad amilásica es un una herramienta útil como indicador del hábito alimentario de la especie, pero también es un buen indicador de maduración digestiva, pues se ha observado que su actividad es alta en estadios larvales tempranos de diversas especies, y disminuye cuando se logra la madurez morfofuncional (Zambonino-Infante *et al.* 1996). La alta actividad amilásica en larvas, se considera análogo a la actividad de la lactasa en períodos postnatales de mamíferos y ésta disminuye al lograrse una digestión similar a la de los adultos de la especie. Otro importante indicador de cambios estructurales y funcionales de las etapas de desarrollo de muchas especies, lo constituyen la relación entre la digestión extracelular, representada por enzimas del borde de cepillo (aminopeptidasa N, fosfatasa alcalina y maltasa), y la digestión intracelular mediada por las enzima citosólica (leucina alanina peptidasa). Mientras la actividad citosólica predomina durante los primeros días después de la eclosión, ésta va disminuyendo, a la vez que las enzimas del borde de cepillo aumentan en actividad junto con el desarrollo de éste, y el establecimiento de la mucosa intestinal. Desde un punto de vista funcional, la actividad digestiva es mediada por diversos factores, entre los cuales destacan los hormonales. Un indicador importante lo constituye la colecistoquinina (CCK), hormona que se produce en el intestino anterior y es responsable de la secreción enzimática proveniente del páncreas, de la liberación de la bilis, de la contracción intestinal y del llenado y vaciado intestinal (Liddle, 1997). A pesar de los pocos estudios en este tópico, se ha detectado CCK al 1 dde, en el lengudo japonés *Paralichthys olivaceus* (Kurokawa *et al.* 2000), en el atún *Thunnus thynnus* (Kamisaka *et al.* 2002) y el ayu *Plecoglossus altivelis* (Kamisaka *et al.* 2003), sin embargo la CCK no fue detectada en el tracto intestinal del

lenguado del Atlántico *H. hippoglossus* (Kamisaka *et al.* 2001; Rojas-García y Rønnestad, 2002), indicando que la aparición de esta hormona puede estar sujeta a cambios en los niveles de expresión producto de factores genéticos y/o nutricionales.

1.3. Indicadores moleculares

Hasta el momento existen pocos trabajos relacionados a la transcriptómica que comprende el desarrollo de los primeros días en peces; sin embargo, los estudios de genómica funcional han abarcado a un gran número de especies modelo y comerciales tanto marinas como dulceacuícolas, y éstos comprenden el estudio de diferentes aspectos de la fisiología del pez (Mazurais *et al.*, 2011). Podemos citar los estudios con el pez cebra, *Danio rerio* (Zeng y Gong, 2002), medaka, *Orzias latipes* (Kimura *et al.*, 2004); botete, Fugu rubripes (Clark *et al.*, 2003), bagre de canal *Ictalurus punctatus* (Ju *et al.*, 2000), salmón del Atlántico, *Salmo salar* (Hagen Larsen *et al.*, 2005); rodaballo, *Scophthalmus maximus*, (Pardo *et al.*, 2008), lubina Europea, *D. labrax*, (Darias *et al.*, 2008).

Cualquiera que sea la especie, los peces sufren cambios muy importantes a lo largo de sus primeras fases de vida, todos ellos regulados genéticamente, y éstos están representados por modificaciones morfológicas, por una diferenciación y proliferación celular, crecimiento y maduración de sus funciones hasta adquirir la forma de vida como los adultos de su especie. Como se ha descrito anteriormente, y a pesar de que existen peces de ontogenia indirecta, de transición y directa, los cambios después de la eclosión hasta llegar a un fenotipo definitivo, son drásticos y requieren de un alto grado de regulación en cada uno de los pasos requeridos en su maduración. Hasta hace poco tiempo, la mayoría de los estudios relacionados a los cambios ontológicos que suceden en el pez, habían sido estudiados usando algunos genes blanco en particular mediante RT-qPCR o hibridación *in situ*, sin embargo, a través de la generación de librerías de cDNA obtenidas por hibridación sustractiva (SSH) y posteriormente a través de los análisis de expresión masiva de genes (microarreglos, p.e.), se han podido complementar y elucidar los mecanismos relacionados a los cambios morfológicos, estructurales y funcionales relacionados al proceso digestivo en peces, mediante la descripción de las rutas metabólicas y procesos biológicos donde

interactúan los genes relacionados al metabolismo, crecimiento, diferenciación, absorción, transporte, entre otros, a través de la identificación de genes marcadores de los diversos procesos clave de los cambios ontogénicos que suceden en el pez.

Con el trabajo de Darías *et al.* (2008) se comenzaron a analizar simultáneamente, miles de genes (6,626) en la lubina Europea *D. labrax*, utilizando un microarreglo heterólogo de trucha arcoíris *O. mykiss*. A lo largo del desarrollo larvario, se sobreexpresaron 485 genes, los cuales estuvieron relacionados con la organogénesis (39 genes), rutas energéticas (29 genes), biosíntesis (67 genes) y digestión (5 genes).

Mediante la técnica de microarreglos, y la qPCR, se pudo determinar que durante la ontogenia molecular de la lubina Europea, el sistema digestivo sufre cambios importantes, por ejemplo la amilasa presenta niveles altos de expresión (7 días post eclosión) al inicio del periodo larvario y disminuye paulatinamente (17 días post eclosión) una vez que se alcanza la madurez. Por el contrario, la tripsina (digestión alcalina), aumenta constantemente (del día 7 al 17 post eclosión), y es reemplazada o complementada, por la expresión de la pepsina (digestión ácida) en el día 25 post eclosión; de la misma manera se observan niveles altos de expresión de su precursor, gastricsina (pepsinógeno) acompañado del desarrollo de las glándulas gástricas. Estas observaciones ya habían sido hechas previamente usando sustratos específicos para cada enzima así como la RT-PCR.

Uno de los factores importantes en la obtención de larvas de buena calidad es la nutrición. Previos estudios han demostrado que existe una cercana relación entre la nutrición de las primeras fases de vida del pez con el crecimiento y su desarrollo (Zambonino-Infante y Cahu, 2007). En este sentido, se ha estudiado la relación entre la expresión de la colecistoquinina (CCK) principal hormona reguladora de la digestión, el neuropéptido Y (NPY) y la hormona del crecimiento (GH) con diversos protocolos de nutrición (a) rotíferos, b) rotíferos+microalga, c) copépodos+rotíferos) en larvas del bacalao (*Gadus morhua*). En este trabajo se encontró que los transcritos involucrados en la regulación del apetito y digestión fueron expresados diferencialmente con cada uno de los protocolos de alimentación probados; se encontró también que los perfiles de expresión de algunas

enzimas (tripsina y amilasa) y hormonas digestivas (CCK) son similares y parcialmente demostradas con los niveles del NPY (Kortner *et al.*, 2011). Por lo que la combinación de estos indicadores moleculares que participan en la digestión, regulación del apetito, crecimiento y desarrollo se perfilan como buenos indicadores de dietas en las fases iniciales del desarrollo en peces (Kortner *et al.*, 2011).

2. Discusión

El conocimiento de la dinámica ontogénica en peces teleósteos, es fundamental para seleccionar los indicadores de los eventos cruciales del proceso de maduración digestiva, que pueden constituir un referente para el diseño de alimentos inertes, especialmente en los períodos iniciales de vida de las especies con valor comercial y de aquellas con potencial de cultivo. Es menester comprender los cambios morfofuncionales de manera integral, ya que muy pocos estudios hasta ahora, han profundizado en relacionar los indicadores abordados en la presente revisión, con el desarrollo morfofuncional del pez. Más aún, poco se ha hecho en establecer posibles sinergias entre los indicadores mencionados, que pudieran realizar una descripción más fidedigna de los cambios relevantes y distintivos, durante la ontogenia inicial en peces teleósteos. El predominio de un tipo de enzima dentro de la maquinaria enzimática de un pez (así como la de su expresión de genes u hormonas detonadoras de su actividad), pueden ser indicadores de importancia capital de maduración digestiva y por tanto, la composición del alimento que se pretende administrar, y el tiempo al menos aproximado, a lo largo de la ontogenia inicial de la especie objeto de estudio. Paralelamente, hoy en día las herramientas histológicas, bioquímicas, moleculares han sido ampliamente utilizadas, ya que son en extremo útiles pues también permiten un conocimiento más profundo y preciso de los tiempos en que tienen lugar los eventos relevantes a lo largo de la ontogenia inicial de peces teleósteos, pues la toma de muestras a lo largo de la serie ontogénica pueden registrar tales cambios, mediante la determinación de los cambios morfológicos y estructurales, la dinámica de la actividad enzimática, la detección de los genes responsables de la expresión molecular de enzimas digestivas en el tiempo, y de este modo complementar la información generada por otras técnicas. El destacar los tiempos más o menos exactos de la expresión enzimática, así como comprender

los procesos endócrinos, nerviosos y los factores luminales que regulan la digestión, pueden resultar ser los indicadores de los sucesos más importantes a lo largo de la histogénesis y organogénesis del canal alimentario, así como su funcionalidad.

No obstante la alta relevancia de los indicadores bioquímicos y moleculares, es necesario atender en primera instancia, la estructura (inherente a los indicadores morfológicos), antes que los aspectos funcionales de desarrollo del pez. Finalmente, es menester considerar más eventos bioquímicos, génicos, inmunológicos, endócrinos, hematológicos(entre otros), donde se involucren disciplinas complementarias como la genómica funcional, que permitan disponer de un mayor número de indicadores, hacia un mayor entendimiento del proceso de maduración digestiva de los peces teleósteos, sobre todo las especies con valor comercial y aquellas potenciales de cultivo.

Finalmente hay que hacer notar que no solamente es importante tener en cuenta una lista de marcadores moleculares funcionales o aquellos eventos involucrados en la organogénesis, para describir los cambios que suceden en la ontogenia inicial de los peces, sino que también es importante su correlación con aquellas factores externos que regulan la expresión de los genes responsable del fenotipo del organismo en cuestión. Uno de estos factores es la nutrición, y ésta es determinante en la regulación de enzimas y hormonas implicadas en cambios que son fundamentales para la obtención de juveniles de calidad.

3. Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, por el otorgamiento de la beca para el primer autor, con número de registro 1100006. A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por el otorgamiento de la beca, mediante el de convenio DAMR-02 UJAT-PROFESOR/2010. Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas para la realización del presente trabajo.

4. Literatura citada

- Alliot, E., Pastoureaud, A., Trelleur, J., 1977. Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*), variations des proteinogrammes et des zymogrammes. Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci. 4, 85-91.
- Álvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E., Piedrahita, R., 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish. Physiol. Biochem. 3, 83-93.
- Álvarez-González, C.A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J., Dumas, S., 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*). I. Biochemistry analysis. Fish. Physiol. Biochem. 34, 373-384.
- Baglolle, C.J., Murray, H.M., Goff, G.P. & Wright, G.M. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. Journal of Fish Biology 51, 120-134.
- Balon, E.K., 1999. Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses). Env. Biol. Fish. 56, 17-38.
- Balon, E.K., 2002. Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. Env. Biol. Fishes 65, 1-35.
- Bergot, P. 1986. Elevage larvaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): Alimentation artificielle. R. Billard at J. Marcel, Ed. Aquaculture of Cyprinids, INRA, Paris pp. 505.
- Bisbal, G.A. & Bengtson, D.A., 1995. Development of digestive tract in larval summer flounder. J. Fish Biol. 47, 277-291.
- Boulhic, M. & Gabaudan, J. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of Dover sole, *Solea solea* L. Aquaculture 102, 373-396.
- Bryant, P.L. & Matty, A.J. 1980. Optimisation of Artemia feeding rate for carp larvae *Cyprinus carpio* L.). Aquaculture 21, 203-212.
- Buchet, V., Zambonino-Infante, J.L. & Cahu, C.L., 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum *Sciaenops ocellatus* larvae. Aquaculture 184, 339-347.
- Cahu, C.L. & Zambonino-Infante, J.L., 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. Fish Physiol. Biochem. 14, 431-437.
- Cahu, C.L. & Zambonino-Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200, 161-180.
- Canino, M.F. & Bailey, K.M., 1995. Gut evacuation of walleye pollock larvae in response to feeding conditions. J. Fish. Biol. 46(3), 389-403.
- Cara, J.B., Moyano, F.J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, C., Yufera, M., 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. J. Fish. Biol. 63, 48-58.

- Chakrabarti, I., Gani, M.A., Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Physiology* 112, 167–177.
- Clark, M.S., Edwards, Y.J., Peterson, D., Clifton, S.W., Thompson, A.J., Sasaki, M., Suzuki, Y., Kikuchi, K., Watabe, S., Kawakami, K., Sugano, S., Elgar, G., and Johnson, S.L. 2003. Fugu ESTs: new resources for transcription analysis and genome annotation. *Genome Res.* 12: 2747-2753.
- Dabrowski, K., 1982. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Env. Biol. Fish.* 7, 73-76.
- Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: “present state of the art” and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24: 807-833.
- Dahl, J., Pettersson, E., Dannewitz, J., Jarvi, T., Lof, A.C., 2006. No difference in survival, growth and morphology between offspring of wild-born, hatchery and hybrid brown trout *Salmo trutta*. *Ecology of Freshwater Fisheries* 15, 388-397.
- Darias M. J., Zambonino, J. L., Hugot K, Cahu, C., Mazurais, D. 2008. Gene expression patterns during the larval development of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by microarray analysis. *Marine Biotechnology*, 10(4), 416-428.
- Das, K.M. & Tripathi, S.D. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp *Ctenopharyngodon idella* (VAL). *Aquaculture* 92, 21-32.
- Del Río, V., Rosas, J., Velásquez, A., Cabrera, T., 2005. Desarrollo embrionario-larval y tiempo de metamorfosis del pez tropical *Xenomelaniris brasiliensis* (Pisces: Atherinidae). *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* 53(4), 503-513.
- Falk-Petersen, I.B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 397-412.
- García-Gasca, A., Galaviz, M.A., Gutiérrez, J.N., García-Ortega, A., 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 251, 366-376.
- Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 23, 455-470.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histol. Histopathol.* 23, 1525-1539.
- Gorodilov, Y.N., 1996. Description of the early ontogeny of the Atlantic salmon, *Salmo salar*, with a novel system of interval (state) identification. *Environmental Biology of fishes* 47(2), 109-127. DOI: 10.1007/BF00005034.
- Govoni, J.J., 1980. Morphological, histological, and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiosromus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.* 39, 69-80.

- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes* 16, 59-77.
- Guerreiro, I., de Vareilles, M., Pousão-Ferreira, P., Vera-Rodrigues, M.T.D., Ribeiro, L., 2010. Effect of age at weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture* 300, 194-205.
- Guan, H-h, Xu, Q-y, Zhi., B-j., Kuang, Y-y. Xu, W. & Yin, J-s. 2010. The post-embryonic development of digestive system and the demand of energy of Hucho taimen. *Agr. Sci. China* 9(2), 286-293.
- Guo-Liang, R., Yang, L., Ze-Xia, G., Huan-Ling, W., Wei-Min., 2010. Molecular characterization of trypsinogens and development of *trypsinogen* gene expression and tryptic activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and top mouth culter (*Culter alburnus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 155(1), 77-85.
- Falk-Petersen, I.B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 397-412.
- Hagen-Larsen, H., Laerdahl, J.K., Panitz, F., Adzhubei, A., and Høyheim, B. 2005. An ESTbased approach for identifying genes expressed in the intestine and gills of pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 6: 171.
- He, T., Xiao Z., Liu, Q., Ma, D., Xu, S., Xiao, Y., Li, J., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymes in rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel 1844) larvae. *Fish Physiol. Biochem* DOI 10.1007/s10695-011-9507-y.
- Hellberg, H. & Bjerkås, I. 2005. Intestinal epithelium in *Anarhichas lupus* L, with emphasis on cell renewal. *Journal of Fish Biology* 66, 1342-1356.
- Hoehne-Reitan, K. & Kjoersvik, E. 2004. Functional development of the liver and exocrine pancreas in teleost fish. *American Fisheries Society Symposium* 40, 47-83.
- Hofer, R., Via, D., Troppmair, J., Giussani, G., 1982. Differences in digestive enzymes between cyprinid and non-cyprinid fish, in: Marco De Marchi (Ed.). *Mem.Ist. Ital. Idrobiol.*, pp. 201-208.
- Hofer, R. & Nassin-Uddin, A. 1985. Digestive processes during the development of the roach (*Rutilus rutilus* L.). *J. Fish. Biol.* 26, 53-59.
- Hofer, R., 1991. *Cyprinid fishes, systematic, biology and exploitation*. Chapman and Hall, Fish and fisheries, pp. 413-421.
- Holcík, J., 1986. *The freshwater fishes of Europe*. AULA-Verlag, Wiesbaden. 1(1), pp.313.
- Horn, M. H., Gawlicka, A. K., German, D. P., 2006. Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory and carnivory. *Marine Biology* 149, 1237-1245.
- Houde, E., 1974. Effects of temperature and delayed feeding on growth and survival of larvae of three species of subtropical marine fishes. *Mar. Biol.* 26, 271-285.
- Jonas, E., Ragyansszk, M., Olah, J., Boross, L., 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio*) fishes. *Aquaculture* 30, 145-154.

- Ju, Z., Karsi, A., Kocabas, A., Patterson, A., Li, P., Cao, D., Dunham, R., and Liu, Z. 2000. Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): genes and expression profile from the brain. *Gene*, 261(2): 373-382.
- Kamisaka, Y., Kurokawa, T., Suzuki, T., Tagawa, T., Tanaka, M., Totland, G.K., Rønnestad, I., 2001. Ontogeny of cholecystokinin producing cells in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123, 31-37.
- Kamisaka, Y., Kaji, T.S., Masuma, N., Tezuka, T., Kurokawa, T., Suzuki, T., Totland, G.K., Rønnestad, I., Tagawa M., Tanaka, M., 2002. Ontogeny of cholecystokinin immunoreactive cells in the digestive tract of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, larvae. *Sarsia* 87, 258-262.
- Kamisaka, Y., Yamamoto, S., Kurokawa, T., Rønnestad, I., Totland, G.K., Tagawa, M., Tanaka, M., 2003. Distribution of cholecystokinin immunoreactive cells in the digestive tract of the larvae teleost ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134(2), 116-121.
- Kawai, S. & Ikeda, S., 1973. Studies on digestive enzymes of fishes. III. Development of the digestive enzymes of the rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 39, 819-823.
- Kjørsvik, E., Pittman, K., Pavlov, D., 2004. From Fertilization to the End of Metamorphosis-Functional Development, in: E. Moksness, E. Kjørsvik and Y. Olsen (Eds.), *Culture of cold-water marine fish*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 204-278.
- Kolkovski, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181-201, 2001.
- Kortner, T.M., Overrein, I., Øie, G., Kjørsvik, E. and A. Arukwe. 2010. The influence of dietary constituents on the molecular ontogeny of digestive capability and effects on growth and appetite in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Aquaculture* ,315:114-120.
- Kurokawa, T., Suzuki, T., Andoh, T., 2000. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 8-16.
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C., Arnold, R.A. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 188, 339-351.
- Liu, Z. Y., Wang, Z., Zhang, J., 2008. An acidic protease from the grass carp intestine *Ctenopharyngodon idellus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 149 (B), 83-90.
- López-Ramírez, G., Cuenca-Soria, C. A., Álvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Ortiz-Galindo J. L., Perales-García, N., Márquez-Couturier, G., Arias-Rodríguez, L., Indy, J.R., Contreras-Sánchez, W.M., Gisbert, E., Moyano, F.J., 2011. Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 37(1), 197-208.

- Ma, H., Cahu, C., Zambonino, J., Yu, H., Duan, Q., Le Gall, M.M., Mai, K., 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 245(1-4), 239-248.
- Mark, W., Hofer, R., Wieser, W., 1987. Diet spectra and resource partitioning in the larvae and juveniles of three species and six cohorts of cyprinids from a subalpine lake. *Oecologia* 71, 388-396.
- Micale, V., Garaffo, M., Genovese, L., Spedicato, M.T., Muglia U., 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common Pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture* 251, 354-365.
- Mitra, G., Mukhopadhyay, P.K., Ayyappan, S., 2008. Modulation of digestive enzyme activities during ontogeny of *Labeo rohita* larvae fed ascorbic acid enriched zooplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology* 149(A), 341-350.
- Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C., 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15, 121-130.
- Ortiz-Delgado, J. B., Ruane, N. M., Pousão-Ferreira, P., Dinis, M. T., Sarasquete, C., 2006. Thyroid gland development in Senegales sole, *Solea senegalensis* (Kaup 1858) during early life stages: a histochemical and immunohistochemical approach. *Aquaculture* 260, 536-561.
- Pardo, B.G., Fernández, C., Millán, A., Bouza, C., Vázquez-López, A., Vera, M., AlvarezDios, J.A., Calaza, M., Gómez-Tato, A., Vázquez, M., Cabaleiro, S., Magariños, B., Lemos, M.L., Leiro, J.M., and Martínez, P. 2008. Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) challenged with pathogens. *BMC Vet. Res.* 4: 37.
- Pavlov, D.A., 1993. Fertilization in wolffish, *Anarhichas lupus*: external or internal?. *Voprosy Ikhtiologii* 33(5), 664-670.
- Pavlov, D.A., 1994a. Maturation and artificial fertilization of the eggs of captive common wolffish *Anarhichas lupus* L. from the White Sea. *Aquaculture Research* 25:891-902
- Pavlov, D.A. & Moksness, E. 1994. Reproductive biology, early ontogeny, and effect of temperature on development in wolffish: comparison with salmon. *Aquaculture International* 2, 133-153.
- Pradhan, P. K.; Jena, J. K.; Mitra, G.; Sood, N.; Gisbert, E., 2012: Ontogeny of the digestive tract in butter catfish *Ompok bimaculatus* (Bloch) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* DOI: 10.1007/s10695-012-9655-8.
- Ribeiro, L., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 1999a. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup 1858) larvae. *Aquaculture* 171, 293-308.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T., 1999b. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179, 465-473.
- Rojas-García, C.R., Rønnestad, I., 2002. Cholecystokinin and tryptic activity in the gut of developing Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): evidence for participation in the regulation of protein digestion. *J. Fish Biol.* 61, 973-986.

- Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C., 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diet. *Aquaculture* 155, 183-191.
- Ross, L.G., Martínez-Palacios, C.A, Aguilar Valdez, Ma. del C., Beveridge, M.C.M. and Chávez Sánchez, Ma. C. 2006. Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. *Journal of Fish Biology*. 68: 1782-1794.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L. H., Berg, A., Waagbø R., 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 32, 7-23.
- Rust, M. B. Nutritional physiology. In: Halver, J. E. & Hardy, R. W. (Eds.). *Fish Nutrition*, 3rd. Ed., pp. 367-452.
- Santamaría, C.A., Marín-de Mateo, M., Traveset, R., Sala, R., Grau, A., Pastor, E., Sarasquete, C., Crespo, S., 2004. Larval organogenesis in common dentex, *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture* 237, 207-228.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yufera, M., 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* (130), 79-92.
- Sarieyyüpoğlu, M., Girgin, A., Köprücü, S., 2000. Histological study in the digestive tract on larval development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Ealbaum, 1972). *Turk. J. Zool.* 24, 199-205.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* 119, 471-486.
- Sorgeloos, P., 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture, in: Persoone, G., Sorgeloos, P., Ž. Roels, O., Jaspers, E. (Eds.). *The brine shrimp Artemia. Ecology, culturing and use in aquaculture*, vol. 3. Universal Press, Wetteren, pp. 25-46.
- Stroband, H.W.J. & Dabrowski, K.R. 1979. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in freshwater fish larvae, in: M. Fontaine (ed.) *La Nutrition des Poissons*, CNERNA, Paris, pp. 355-376.
- Stroband, H.W.J., Meer, H.V.D., Timmermans, L.P.M., 1979. Regional functional differentiation in the gut of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Histochemistry* 64, 235-249.
- Tanaka, M., 1969a. Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae development of the digestive system during prelarval stage. *Jap. J. Ichthyol.* 16, 1-9.
- Toledo-Cuevas, E. M., Moyano López, F. J., Tovar-Ramírez, D., Strüssmann, C. A., Álvarez-González, C. A., Martínez-Chávez, C. C. and Martínez-Palacios, C. A. 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, 42: 776-786.
- Yan, L. & Qiu-Zhou, X. 2006. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 256, 389-394.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional value of live organism used in Japan for mass propagation for fish: A review. *Aquaculture* 34, 115-143.

- Watanabe, Y., 1984a. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cortus nozawae*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 50, 409-416.
- Wu, T.T. & Zhu, X.M. 1994. Study on the activity of digestive enzymes in mandarin fish, black carp, grass carp, common carp, crucian carp and silver carp. J. Fish. Sci. China (in Chinese) 12, 10-17.
- Zambonino-Infante, J.L. & Cahu, C.L. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol. Biochem. 12, 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. Peres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. Aquaculture 139: 129-138.
- Zambonino-Infante, J. L. & Cahu, C.L. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 130(4), 477-487.
- Zambonino J. L. & Cahu C. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268(1-4), 98-105
- Zambonino-Infante, J., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C. L., 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae, in: Cyrino, J.E.O., Bureau, D., Kapoor C. (Eds.), Feeding and Digestive Functions of Fish. B.G. Science Publishers, Inc, Enfield, pp. 277-344.
- Zeng, S. & Gong, Z.Y. 2002. Expressed sequence tag analysis of expression profiles of zebrafish testis and ovary. Gene, 294(1-2): 45-53.

Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Tahuina

Cichlasoma trimaculatum

F.J. Toledo-Solís,¹ A. Uscanga-Martínez^{1*}, G. Marquez-Couturier², C.A. Álvarez-González³, R. Guerrero-Zárate², N. Perales-García¹, W.M. Contreras-Sánchez², R. Martínez-García²

¹ Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola, Campus del Mar, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tonalá, Chiapas. México. *arkady.uscanga@unicach.mx

² Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km 0.5, C.P. 86039 Villahermosa, Tabasco, México.

Resumen

La tahuina es uno de los ciclidos más apreciados en el Sureste mexicano por lo que se ha venido desarrollando en el Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Campus del Mar-UNICACH una serie de investigaciones que ha permitido desarrollar el cultivo de esta especie. Sin embargo, el desarrollo de estos estudios es solamente la plataforma de una serie de trabajo que permitirá que se comience a explotar el cultivo de esta especie. Es así que en este trabajo se presentan los avances sobre la fisiología digestiva del *Cichlasoma trimaculatum*. Para ello se realizó el desarrollo de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial. Los resultados mostraron que la actividad de las proteasas alcalinas, tripsina y quimotripsina están presentes a partir del día 6 después de la eclosión (dde), durante la alimentación exógena con nauplios de *Artemia*. Las actividades de carboxipeptidasa A y leucina-aminopeptidasa están presentes desde los primeros días, incrementándose para los días 6 y 9 dde. En cambio la actividad de proteasa ácida está presente a partir del 9 dde. La electroforesis SDS-PAGE reveló seis tipos de bandas en las proteasas alcalinas, con peso molecular entre 113.4 y 20.4 kDa. Las primeras tres bandas aparecen en el día 6 dde, pero es hasta el día 11 dde cuando aparecen todas las isoformas. En base a estos resultados, se considera que esta especie completa su maquinaria enzimática digestiva a partir del día 9 después de eclosión. Así mismo, se realizó la caracterización de las proteasas digestivas en juveniles. En donde, se encontró que existe una mayor actividad de las proteasas alcalinas (3.95 ± 0.32 U/mg proteína) en relación a las proteasas ácidas (2.01 ± 0.57 U/mg proteína). La temperatura óptima de las proteasas alcalinas es de 60°C y son más termoestables a los cambios de temperatura, y las proteasa acidas a 50 °C. El pH óptimo de las proteasas ácidas resultó de pH 2, y en las

proteasas alcalinas de pH 10. El uso de los inhibidores específicos y el análisis de electroforesis SDS-PAGE revelaron siete tipos de bandas para las proteasas alcalinas y ponen en manifiesto la presencia mayoritaria de serina-proteasas; en las proteasas ácidas se inhibió más del 98% de la actividad con el inhibidor pepsina A. Por lo tanto, se pone en manifiesto que la digestión de *C. trimaculatum* está compuesta tanto de proteasas ácidas como de alcalinas, y desde el punto de vista enzimático apunta a ser considerada de hábitos omnívoros con tendencia a la carnívora.

Palabras clave: *Cichlasoma trimaculatum*; Enzimas digestivas; Inhibidor.

Introducción

La acuicultura a nivel mundial se basa en el cultivo de un número muy restringido de especies, en relación al total de especies acuáticas que se consumen en los mercados internacionales por captura. La razón de esto es la falta de estudios para determinar el potencial de cultivo de las especies, ya que implica la intervención de investigadores especializados en diversas disciplinas (Rojas y Mendoza, 2000). El objetivo principal de la acuicultura con fines comerciales es la obtención y producción de peces de tamaño adecuado para el consumo, en el menor tiempo posible y a bajo costo; uno de los requisitos para lograr este fin es cubrir satisfactoriamente todas sus necesidades tanto biológicas como ecológicas mediante la creación de condiciones ambientales óptimas (Steffens, 1987).

Los cíclidos han tenido una gran importancia en acuicultura a nivel mundial y las especies africanas han sido esparcidas en la mayor parte de los trópicos y subtrópicos. Estos organismos han sido un gran éxito en pesquerías y en acuicultura en muchos países (Martínez-Palacios y Ross, 1994). En México el desarrollo de la acuicultura se ha apoyado en métodos y técnicas de cultivo que fueron diseñadas para especies exóticas; estas condiciones favorecieron la introducción de varias especies como: la carpa, la tilapia, el bagre y la trucha (Rojas y Mendoza, 2000).

Chiapas es el estado con mayor riqueza de peces continentales en México y el único con la influencia de dos vertientes de América (separadas por la Sierra Madre); además, forma parte de dos grandes provincias ictiolimnológicas tropicales, Chiapas-Nicaragua y Usumacinta (Miller, 1966; Nelson, 2004 *et al*; Rodiles-Hernández, *et al*, 2005). La vertiente del Pacífico tiene forma de una franja angosta (de 30 a 55 km) con una extensión de más de 260 km, por lo que la presencia de peces marinos que penetran a los sistemas estuarino-lagunares es considerable. La vertiente hidrológica del Atlántico es mucho más amplia y extensa (300 km en promedio, entre la sierra madre y la costa del Golfo de México) y está marcada por la influencia de dos importantes redes hidrológicas: la del río Grijalva y la del río Usumacinta, proveniente de Guatemala, que se unen en Frontera, Tabasco, menos de 20 km antes de desembocar al Golfo de México.

La seguridad alimentaria es considerada como uno de los principales problemas de la sociedad moderna. Esto es aun más preocupante en los países en vías de desarrollo (FAO, 2006). Una de las alternativas como fuente importante de alimento es la acuicultura con el cultivo de organismos acuáticos como: peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas (Hepher, 2001; FAO, 2004).

El desarrollo y crecimiento de la piscicultura en México se ha basado en la introducción de especies exóticas. Las cuales se han domesticado para fines comerciales, principalmente tilapias, bagres, carpas y truchas, entre otras. Importando las técnicas de cultivo y adecuándolas a las condiciones de nuestro país (Baltazar, 2007). En consecuencia, los estudios sobre la biología básica de peces nativos con potencial para ser incorporados a la acuicultura local han sido escasos (Mendoza *et al.*, 1993; Martínez-Palacios y Ross, 1994; Rojas y Mendoza, 2000). El desarrollo de las técnicas de cultivo para estas especies, han avanzado conforme a los impactos ambientales generados por las diversas actividades humanas como pesca excesiva, contaminación, introducción de especies exóticas a ríos y lagunas, modificaciones al hábitat, etc. Así como también, al observar disminución en las poblaciones silvestres y cambios en las preferencias de consumos en las nuevas generaciones perdiendo identidad cultural y conocimiento empírico de los recursos naturales (Márquez, 2011).

La mojarra tahuina (*Cichlasoma trimaculatum*) es un cíclido nativo con potencial para el cultivo. Esta especie en México se distribuye en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas; habita preferentemente en aguas tranquilas como ríos, lagunas y en ambientes salobres como esteros con fondos arenosos o lodosos, y entre las raíces de los manglares (Orellana-Amador, 1992). Es de hábitos alimenticios omnívoros, pero con tendencia a la carnivoría durante algunos meses del año; se considera que presenta un rápido crecimiento, resistencia al manejo y acepta con facilidad alimentos balanceados (Violante, 1995). Además, de ser una especie con preferencia en el consumo sobre otras especies en los mercados locales; motivo por el cual presenta un elevado valor económico. Por lo tanto, es necesario continuar en la generación de conocimientos científicos que permitan establecer las bases metodológicas para el cultivo de esta especie, en áreas de investigación como fisiología reproductiva, fisiología digestiva y nutrición.

La alimentación en los sistemas de cultivo acuícolas es fundamental en el desarrollo de los organismos (Carrillo *et al.* 1987; Barletta, 2001). Por lo tanto, las dietas comerciales o formuladas deben de proporcionar los requerimientos nutricionales en cada etapa de desarrollo (D´Abramo y Lovell, 1991; Kim *et al.* 2002). Sin embargo, para la formulación de los alimentos balanceados es necesario conocer la participación de las enzimas digestivas debido a que estas son un reflejo de la capacidad digestiva de cada organismo; al estar directamente relacionada con la cantidad de enzimas digestivas disponible para el rompimiento de los alimentos (Pedersen y Eggum, 1983, Kendall *et al.* 1984).

En un sistema digestivo desarrollado las enzimas digestivas son las encargadas de llevar a cabo el proceso de digestión. El cual, se realiza mediante la hidrólisis enzimática, en donde los alimentos son transformados a nutrientes o moléculas más simples, que son fácilmente asimilables por las células del intestino (Chong-Carrillo y Vega-Villanasante, 2004). En los peces el proceso de digestión puede estar constituido por una fase ácida y una fase alcalina. Cuando existe una fase ácida se lleva a cabo en el estómago actuando principalmente la enzima pepsina y la secreción de HCl. La fase alcalina se realiza en el intestino, con ayuda de las proteasas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y aminopeptidasas), lipasas, amilasas y fosfatasas (Alarcón, 1997). Por lo que es importante estudiarlas en cada fase del desarrollo, para saber desde cuando están presentes y son funcionales para iniciar el proceso de digestión

En peces con ontogenia indirecta (los cuales tienen un proceso de etapas durante el desarrollo como embrionaria, larvaria, juvenil, adulta y senectud), las larvas al momento de la eclosión cuentan con un sistema digestivo rudimentario, complementándose durante el desarrollo larval. El sistema digestivo es un simple tubo recto y corto sin diferenciación (Lazo, 2000). Este se comienza a diferenciar al finalizar la absorción del saco vitelino, segmentando para dar paso a la aparición de válvulas musculares, bucofaringe, porciones anterior, media y posterior del intestino (Govoni, 1980). Pero es hasta finalizar el periodo larvario, cuando la larva cuenta con el tracto digestivo completo al contar con el estómago y sus glándulas gástricas, intestino, ciegos pilóricos y demás órganos que participan en el proceso de digestión (Cousin *et al.* 1987; Lazo, 2000). Desde el punto de vista nutricional el desarrollo del estómago, indica la transformación a la etapa juvenil; en donde cuenta con un sistema digestivo completamente formado y puede alimentarse de forma óptima

(Tanaka, 1973; Govoni *et al.* 1986; Lazo, 1999; Álvarez-González, 2003). Este proceso de larva a juvenil es muy variado, por lo general tardar de 15 a 60 días después de la eclosión, pero en otras especies tarda más tiempo (Cousin *et al.* , 1987; Álvarez-González, 2003).

Los estudios de ontogenia enzimática determinan en qué momento los organismos disponen de todas las enzimas digestivas para llevar a cabo la digestión. Con técnicas bioquímicas y electroforéticas se puede hacer un seguimiento de las enzimas digestivas a lo largo del desarrollo larvario de especies cultivadas (Alarcón y Martínez, 1998). Mediante los niveles de actividad enzimática se puede estimar o inferir el grado de madurez y funcionalidad del aparato digestivo (Moyano, 2006). Además, este tipo de estudios brinda información para establecer esquemas de alimentación, sugiriendo cuando realizar los cambios de alimentación y el momento más adecuado para el suministro de alimentos inertes “destete” (Ueberschär, 1993; Alarcón y Martínez, 1998; Moyano, 2006). También para la formulación de alimentos balanceados con las características de la especie.

En cambio, los estudios de caracterización enzimática describen las condiciones óptimas en donde las enzimas digestivas alcanzan su máxima actividad. Este tipo de estudios son esenciales cuando se quiere entender sus tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que presentan las enzimas digestivas (Moyano, 2006). Además, determinan las condiciones óptimas y estabilidad de factores como pH y temperatura; en el cual las enzimas alcanzan la mayor actividad y como son afectadas a lo largo del tiempo (Moyano, 2006; Álvarez-González, *et al.* , 2008). Una de las herramientas utilizadas en los estudios de caracterización enzimática es el uso de inhibidores específicos, los cuales se complementan con técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida (García-Carreño *et al.* , 1993; Álvarez-González *et al.* , 2010b). En donde, los inhibidores afectan los centros activos y disminuyen la actividad enzimática, permitiendo con ello conocer la sensibilidad y los mecanismos de acción de las enzimas digestivas (Salvensen y Nagase, 1989; Moyano, 2006). Esta información permite delimitar el uso de harinas o nutrientes en la formulación de alimentos balanceados debido a que algunos ingredientes pueden contener sustancias que afecten totalmente o parcialmente la actividad enzimática, y por consiguiente el proceso de digestión del organismo.

Por lo tanto, en el presente trabajo se determinará el desarrollo ontogénico enzimático en larvas y la caracterización de las proteasas digestivas en juveniles de *C. trimaculatum*. Esto

permitirá conocer en qué momento aparecen y cuando son funcionales las enzimas digestivas durante el desarrollo larval; así como las condiciones óptimas y la estabilidad a factores como pH y temperatura; y los mecanismos de acción de las proteasas digestivas de *C. trimaculatum*. Con ello, se aportara información básica en la fisiología digestiva, formulación y diseño de dietas balanceadas con las características digestivas de la especie; así como también en el establecimiento de los esquemas de alimentación de esta especie.

Antecedentes

Enzimas digestivas

Las enzimas son catalizadores biológicos que incrementan la rapidez o la velocidad de una reacción, sin verse alteradas ellas mismas en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas, las cuales se han clasificado por parte de la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos (Lehninger, 1984; Mathews y Van Holde, 1998).

- 1) Óxido reductasas: catalizan reacciones de oxidación-reducción.
- 2) Transferasas: catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
- 3) Lipasas: catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones de un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
- 4) Isomerasas: catalizan reordenamientos intermoleculares.
- 5) Ligasas: catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.
- 6) Hidrolasas: catalizan rupturas hidrolíticas.

En el caso particular de los peces, muchas de las enzimas digestivas pertenecen al grupo 6, y se han clasificado en los siguientes grupos en función del tipo de nutriente que hidrolizan.

Proteasas

Las *proteasas* (EC 3.4) son enzimas de gran importancia debido a que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas y están presentes en muchos organismos (Dixon y Webb, 1979). Algunas proteasas están

implicadas en procesos como la digestión de proteínas, la actividad de proenzimas y prehormonas, y muchos otros (Stroud, 1975). Dentro de ellas, existen dos subgrupos: las endopeptidasas, hidrolizan enlaces peptídicos internos que pertenecen a la categoría EC 3.4.21-24. Dentro de estas tenemos a: Las proteasas ácidas como la *pepsina* (EC 3.4.23.1), gástrica (EC 3.4.23.3) y *quimosina* o *renina* (EC 3.4.23.4) presentes en el jugo gástrico de mamíferos, aves, anfibios y peces. En los peces la pepsina es de gran importancia para la digestión ácida, mostrando mayor actividad a pH 2 y es fácilmente inactivada por el inhibidor específico pepstatin A (Alarcón, 1997).

La *tripsina* (EC 3.4.21.4) la cual hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por arginina o lisina. Es de origen pancreático y muestra mayor actividad alrededor del pH 8 (Alarcón, 1997).

La *quimotripsina* (EC 3.4.21.1) que hidroliza enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptófano; también actúa sobre amidas y ésteres (Whitaker, 1994). También es de origen pancreático.

Las *catepsinas* están relacionadas con los procesos de digestión intracelular.

Las exopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína), y se agrupan bajo la categoría EC 3.4.11-19. Siendo las más importantes: Las *aminopeptidasas* (EC 3.4.11) que catalizan la hidrólisis de los restos aminoácidos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos ((Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ o Co²⁺) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal *et al.*, 1965).

Las *carboxipeptidasas* liberan residuos aminoácidos del extremo carboxiterminal de los péptidos y proteínas. Se conocen dos familias de carboxipeptidasas: las serina carboxipeptidasas (EC 3.4.16) que contienen un residuo de serina en su centro activo. Y las metalo carboxipeptidasas (EC. 3.4.17) que requieren de iones de Zn para ser activas (Alarcón, 1997).

También se clasifican en 4 grupos de acuerdo a sus mecanismos de acción, el cual depende en buena medida de los residuos aminoacídicos que constituyen su centro activo: 1. *Serina-proteasas* (EC 3.4.21): tienen un grupo serina en el centro activo, así como histidina y aspártico.

2. *Cisteina-proteasas* (EC 3.4.22): se caracterizan por la presencia del grupo cisteína (-SH) en su centro catalítico.

3. *Proteasas ácidas o aspárticas* (EC 3.4.23): se caracterizan por la presencia de ácido aspártico en el centro activo y poseen máxima actividad a pH ácido.

4. *Metal-proteasas* (EC 3.4.24): poseen un resto de ácido glutámico en el centro activo y requieren de un catión divalente (Zn, Ca o Mg) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.

Amilasas

Las *amilasas* catalizan la hidrólisis del enlace α 1-4 del almidón y glucógeno. Se dividen en alfa (α) y beta (β), o endo y exo amilasas. La α -amilasa (EC 3.2.1.1.) está presente en el jugo pancreático de gran cantidad de animales (Archibal, 1987), ya que hidroliza indistintamente enlaces a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de glucosa y maltosa. Por su parte la β -amilasa hidroliza a los carbohidratos por el extremo no reductor, y se restringen exclusivamente al reino vegetal (Hirikado *et al.* , 1994).

Lipasas

Las *lipasas* son enzimas que han sido clasificadas en dos tipos principales: 1) las esterasas (EC 3.1.1.1), que preferentemente actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular que tienen una cierta capacidad de solubilizarse. 2) las lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3), que se distinguen porque hidrolizan sustratos poco solubles; estas se han descrito en varios tejidos animales (páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático).

Fosfatasas

Las *fosfatasas ácida y alcalina* (EC 3.1.3.2 y 3.1.3.1) catalizan la separación de fósforo inorgánico a partir de fosfato orgánico. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes capas tisulares del estómago. Su papel fisiológico en los vertebrados superiores está relacionado con los procesos de mineralización de los huesos (Harris, 1989), así como en procesos de transporte de nutrientes a través de membrana. Tales fosfatasas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteínas y lípidos, e incluso de agua e iones en el caso de la fosfatasa alcalina (Dupuis *et al.* , 1991).

Estudios de enzimas digestivas en peces

En los primeros estudios donde se implementaron las herramientas bioquímicas fueron para determinar la capacidad digestiva de animales en campo en función de sus hábitos alimenticios. Sarbahi (1951), realizó estudios en *Carassius auratus* y *Micropterus salmoides* donde encontró que existe una diferenciación de las enzimas en función a la región del tracto digestivo. Esto permitió continuar con estudios que han servido de base para el desarrollo de micrométodos en la detección, caracterización y purificación de las enzimas digestivas en los diferentes estadios de peces.

La mayor parte de estudios en enzimas digestivas se ha realizado en especies marinas con potencial para el cultivo o de interés comercial. En juveniles de robalo (*Centropomus undecimalis*) se han realizado estudios de caracterización y ontogenia enzimática. Donde se encontró que las proteasas ácidas de esta especie muestran una alta actividad a pH 2 y son inestables a pH alcalinos a partir de pH 8. Las proteasas alcalinas mostraron dos picos de actividad enzimática de pH 7 y 11, estas resultaron estables a los diferentes pH viéndose afectada la actividad a pH extremos como pH 2 y 12. La temperatura óptima de las proteasas ácidas y alcalinas resulto de 75°C y 65°C respectivamente; y en ambos casos son estables a temperaturas altas (Álvarez-González *et al.* 2010a). En la etapa inicial de larvas se ha estudiado el desarrollo ontogénico enzimático, donde a partir del día 34 ddf el

mecanismo enzimático se considera completo (Jiménez-Martínez *et al.* 2012); ambos autores consideran a esta especie como un carnívoro estricto.

En atunes se cuenta con el estudio realizado por Essed *et al.* (2002) en *Thunnus thynnus* y el de Matus *et al.* (2007) en *Thunnus orientalis*. En donde estudiaron la actividad de las proteasas digestivas del estómago e intestino. En *T. thynnus* se encontró una mayor actividad en el estómago, y los óptimos de temperatura y pH para la actividad de las proteasas ácidas se determinó en 50°C y a pH's de 2 y 3.5. Mientras que en proteasas alcalinas resultó de 60°C y de pH's 10 y 12. En cambio en *T. orientalis*, la máxima actividad de las proteasas alcalinas y lipasas se alcanza a un pH 9, menor al determinado en *T. thynnus*. El pH óptimo de las proteasas ácidas se determinó en pH 3, mientras que la temperatura óptima para la actividad enzimática se encuentre en un rango de 35 a 60°C.

En lenguados, como *Solea senegalensis* se ha determinado que existe mayor actividad enzimática en el intestino en relación al estómago y a temperaturas mayores a los 50°C, la actividad de las proteasas ácidas y alcalinas son inestables. Pero a diferentes pH's las proteasas ácidas resultaron ser más estables a las proteasas alcalinas (Sáenz *et al.*, 2005). En salmones (*Brycon orbignyanus*), se tiene el realizado por García-Carreño *et al.* (2002). En donde, el pH óptimo para el estómago resultó de valor 2.5 y la actividad de estas enzimas es estable a pH ácidos. Al igual, las enzimas del intestino son estables a pH alcalinos y el pH óptimo resultó de 10. La temperatura óptima del intestino resultó 10°C más elevada a la temperatura óptima del estómago que fue de 50°C, y la actividad en los dos órganos disminuye a partir de los 60°C. En las proteasas ácidas el inhibidor pepstatin A afectó la actividad en un 90%; en las proteasas alcalinas la mayor inhibición se obtuvo con SBT1 y TLCK en un 85 y 52%.

En cambio en otros trabajos se ha optado primeramente por la purificación de las enzimas digestivas para después ser analizadas, siendo la pepsina y tripsina las más estudiadas. En *Scophthalmus maximus* y en *Katsuwonus pelamis* se estudio la pepsina de forma purificada por Hai-ying *et al.* (2006) y Nalinanon *et al.* (2010) respectivamente. Para las dos especies se encontrando un pH óptimo de 2 y una temperatura óptima alrededor de los 45°C, siendo inestable y perdiendo actividad totalmente a partir de los 60 °C. También se encontró una inhibición de 100% por el inhibidor pepstatin A específico de pepsina. Los estudios de tripsina purificada se tiene los realizados en *Sardinops sagax caerulea*, *Balistes capriscus* y

Sardinella aurita por Castillo-Yáñez *et al.* (2005); Jellouli *et al.* (2009) y Ben *et al.* (2011) respectivamente. En donde se encontró un pH óptimo en un rango de pH de 8 a 10, en donde también resultaron ser más estables; fuera de este rango muestran inactividad o inestabilidad de la actividad coincidiendo con lo descrito por Simpson (2000). Con respecto a la temperatura mostraron más actividad alrededor de los 50°C y por arriba de los 60°C pierden actividad y son inestables.

En larvas de *Paralichthys californicus* se estudió el desarrollo de la actividad enzimática. En donde, se determinó las enzimas de pepsina, tripsina, quimotripsina, L-aminopentidasa, lipasa, α -amilasa y fosfatasa ácida y alcalina; observando actividad de algunas enzimas en el día 4 dde, mientras que para el día 18 dde se inicia una baja actividad de la pepsina. Por lo tanto, el mecanismo enzimático podría estar completo del día 18 al 30 dde, donde se podría alimentar con dietas inertes (Álvarez-González *et al.* 2006). En dorada *Sparus aurata* se determinó que a partir del día 3 dde, existe actividad de las proteasas alcalinas considerándose completo y desarrollado esta parte del mecanismo enzimático después de este día. Esta actividad se conserva durante el desarrollo larval hasta los 30 dde, después disminuye hasta ser diferente entre peces adultos y larvas (Díaz *et al.* 1997). En otras especies como *Chelon labrosus* y *Pagrus auriga* el desarrollo del mecanismo enzimático es más tardado, completándose a partir de la segunda semana después de eclosión y a los 35 dde respectivamente (Moyano *et al.* 2005; Zouiten *et al.* 2008). En el caso de *C. labrosus*, se podría suministrar una dieta con ingredientes vegetales, debido a que presenta una secreción de amilasa desde los primeros días (Zouiten *et al.* 2008). En cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* también se han estudiado las enzimas digestivas, encontrándose presencia de proteasas alcalinas en el día 2 dde. Considerando que el mecanismo enzimático podría estar completo a partir del día 12 al 18 dde donde se podría suministrar dietas artificiales, pero éste será totalmente eficiente después del día 25 dde (Álvarez-González *et al.* 2008; Álvarez-González *et al.* 2010b).

En peces dulceacuícolas los estudios realizados han sido menos en comparación con especies marinas. Iracheta (2006), estudió las enzimas digestivas en larvas de pejelagarto *Atractosteus trópicos* del día 4 al 34 dde, las cuales fueron alimentadas exógenamente a partir del día 5 dde con diferentes dietas. Encontrando que a partir de la alimentación exógena existe secreción de las principales enzimas como pepsina, tripsina, quimotripsina,

aminopeptidasa, lipasa y fosfatasa ácida y alcalina. Considerando que a partir del 5 dde las larvas cuenta con un estómago funcional y se podría alimentar con dietas artificiales, con características particulares para la especie. Guerrero-Zarate (2010), caracterizó las proteasas y lipasas en juveniles de la misma especie, encontrando un pH óptimo de proteasas ácidas de 2, pero en proteasas alcalinas existen diferentes puntos óptimos (pH de 6 a 8 y pH 10). Las proteínas ácidas y alcalinas tienen una temperatura óptima de actividad a 65°C y además, las proteasas presentan una acción conjunta en la digestión debido a que las proteasas ácidas y alcalinas, son ligeramente resistentes a pH alcalinos y ácidos respectivamente.

En especies de acuafilia también se han realizados estudios sobre las enzimas digestivas, evaluando el efecto del pH y de inhibidores específicos. En *Symphysodon aequitasciata* (Chong *et al.*, 2002) y en *Scleropages formosus* (Natalia *et al.*, 2004), el pH óptimo de las proteasas ácidas resultó de valor 2 para las dos especies, mientras que en las proteasas alcalinas resultaron varios puntos óptimos en un rango de 8 a 11. También se encontró para las dos especies una mayor actividad de tipo tripsina en relación a la quimotripsina, y por lo consiguiente una mayor inhibición del TLCK inhibidor específico de tripsina.

En cíclidos también se ha determinado el desarrollo enzimático digestivo y la estabilidad de las enzimas bajo diferentes condiciones. Chakrabarti *et al.* (2006), estudió las enzimas digestivas y realizó la caracterización parcial con el uso de inhibidores de proteasas en el tracto digestivo durante la ontogenia inicial de un híbrido de carpa (*Hypophthalmichthys molitrix* ♀) × (*Aristichthys nobilis* ♂). Donde encontró que a partir del día 4 dde existe actividad de amilasa y lipasa, y que tripsina y quimotripsina están presentes en más de una isoforma.

Existen solamente dos estudios sobre el desarrollo de enzimas digestivas en larvas de cíclidos nativos para el estado de Tabasco; uno de la mojarra castarica (*Cichlasoma urophthalmus*) y otro de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*). López-Ramírez *et al.* (2011), reportan que para *C. urophthalmus* el mecanismo enzimático digestivo se considera plenamente formado para el día 11 ddf. Esto es similar a lo reportado por Perales-García (2009) en *P. splendida*, donde se encuentra una completa acción de las enzimas digestivas a partir del día 9 ddf, incrementándose para el día 12 ddf. Estos autores consideran esta última fecha como la terminación de la formación del mecanismo enzimático. Los dos

autores recomiendan que a partir de estos días se puede sustituir el alimento vivo por alimento inerte. El cual, deberá ser el adecuado en requerimiento nutricional y asimilación de nutrientes para la etapa larval de cada especie. En *P. splendida* se caracterizó parcialmente las proteasas digestivas, donde las proteasas alcalinas presentaron pH's óptimos entre 9 y 10, mientras que las proteasas ácidas el pH óptimo resultó de 5. La temperatura óptima en la actividad de proteasas ácidas y alcalinas en ambos caso se determino a 55°C.

Estudios realizados en *Cichlasoma trimaculatum*

Entre los cíclidos nativos de México, se encuentra los géneros *Cichlasoma* y *Petenia* el primero con numerosas especies y el segundo con una sola (Álvarez del Villar, 1970). La falta de conocimientos básicos sobre la biología, ecología y comportamiento de estas especies, así como la falta de experiencias sobre adaptación al cautiverio, manejo, aceptación de alimentos balanceados y requerimientos nutricionales ha detenido por mucho tiempo la selección de las especies más adecuadas a la acuicultura

Los estudios que se han reportado para *C. trimaculatum* son pocos. En ellos se ha determinado parte de su alimentación, distribución y abundancia, ciclo de vida, asociación a parásitos, desarrollo gonádico, reproducción y crecimiento en cautiverio. Primeramente Yáñez-Arancibia (1978), realizó un estudio de la ictiofauna en las lagunas costeras del estado de Guerrero, México; en donde señala la tendencia de alimentación de esta especie y la cataloga como un consumidor primario de tipo omnívoro. Esto coincide a lo reportado por Violante (1995), pero además menciona que esta especie tiende a ser carnívora durante algunos meses del año. Gil (1991), Díaz-Ruiz (2006) y Miller (2009), clasificaron a *C. trimaculatum* con una especie dulceacuícola, pero que puede tolerar bajas salinidades. Debido a que en una parte de su ciclo de vida, utiliza la vegetación sumergida y emergente de lagunas estuarianas para realizar el desove, entre los meses de junio-noviembre, cuando la salinidad disminuye (Violante, 1995; Díaz-Ruiz, 2006). Opuesto a lo descrito por Gómez-González (2005), quien menciona que esta especie tienen una amplia tolerancia a la salinidad de 0 a 34‰ al encontrarse ampliamente distribuida durante todo el año en el sistema lagunar-estuarino eurihalino de Carretas-Pereyra, Chiapas.

En cuestiones de fisiología reproductiva las hembras alcanza primero la madurez sexual. Violante (1995), reportó que la maduración sexual de las hembras lo alcanzan a los 14 cm de longitud total, mientras que en los machos es a los 14.92 cm. Las hembras llegan a desovar un promedio de huevos de $3,082.42 + 1,060.52$, a una temperatura promedio de $27.8 + 0.2$ °C, a un pH de $7.6 + 0.1$ y a una concentración de oxígeno de 6.13 mg/L. Los huevos tienen una forma alargada con una longitud de $1.86 + 0.10$ mm y un ancho de $1.25 + 0.06$ mm, con un tiempo de eclosión de 55 a 58 hrs post-desove y la reabsorción del saco vitelino ocurre aproximadamente a los 7 días post-eclosión. En Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Campus del Mar-UNICACH, en sistemas controlados de recirculación se ha logrado la producción masiva de larvas, al utilizar una proporción de sexo 2:1 (hembras-machos) y emplear alimento balanceado diseñado para peces carnívoros como trucha (Silver Cup® Pedregal con 45% de proteína y 16% de lípidos). Las larvas producidas han sido destinadas al repoblamiento de los sistemas lagunares-estuarios del estado Chiapas, y una mínima parte a cuestiones de investigación (Uscanga-Martínez *et al.* 2012). Con respecto a la abundancia de esta especie en el estado de Guerrero en la laguna de Tres Palos, la abundancia relativa es menor al 1% (Gil, 1991). Este mismo patrón de abundancia se encontró en el estado de Chiapas, en el sistema lagunar-estuarino Chantuto-Panzacola, en donde se encontró una baja abundancia con respecto a otras especies de la zona (Díaz-Ruiz, 2006). Pero en el sistema lagunar-estuarino de Carretas-Pereyra, *C. trimaculatum* se encuentra entre las especies que representan el 86% de la captura en distribución y abundancia numérica (Velázquez-Velázquez *et al.* 2005). En estudios de parasitología se tiene el de Violante-González (2008), donde menciona que *C. trimaculatum*, presenta mayormente parásitos de tipo generalistas y pocos que son especialistas de cíclidos.

Por otra parte, en condiciones de cautiverio *C. trimaculatum* demostró tener una rápida adaptación, resistente al manejo, muy voraz y además acepta con facilidad dietas secas. En la etapa inicial del cultivo, se determinó que las crías requieren de niveles altos de proteína alrededor del 45% (Violante, 1995). Sin embargo, se necesita generar mucha información en fisiología digestiva y en nutrición para poder diseñar un alimento específico para la especie.

Ontogenia de las enzimas digestivas en larvas

Materiales y métodos

Obtención y preparación de las muestras

Las muestras de larvas del día 0 (eleuteroembrión) hasta al día 60 después de eclosión (dde) de *C. trimaculatum* se obtuvieron de seis desoves simultáneos; del lote de reproductores cultivados en el Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Campus del Mar de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Las larvas después de 1 dde se colocaron en un sistema de recirculación con oxigenación continua, con temperatura promedio de 30.6 ± 2.5 °C. Las larvas se alimentaron tres veces al día (08:00, 13:00 y 18:00 hrs) a saciedad aparente; del día 4 al 10 dde se alimentó con alimento vivo (nauplio de *Artemia*), enseguida se inició una coalimentación de alimento vivo y alimento balanceado Silver Cup® (45% de proteína y 16% de lípidos) durante los días 11 y 12 dde. Para el día 13 dde hasta finalizar el muestreo, se suministró únicamente alimento balanceado. Un día antes de cada muestreo se suspendió la última alimentación. La toma de muestras se realizó a las 08:00 hrs de forma manual con una red de 500 µm de luz de malla, de acuerdo a lo descrito en la tabla 1.

Tabla 1. Días de muestreo y número de larvas muestreadas de *C. trimaculatum* durante el experimento.

Numero de larvas colectadas	Días después de eclosión (dde)
1000	0, 1, 3
500	6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21
300	24, 27, 30, 33, 36
200	39, 42, 45
100	60

Enseguida las larvas se sacrificaron por shock térmico y se almacenaron en congelación hasta su procesamiento. Adicionalmente, se tomaron 35 organismos en cada muestreo para evaluar el crecimiento en peso y longitud total. Las muestras de larvas del día cero hasta el día 11 dde se procesaron enteras, del día 13 al 60 dde se les cortó la cabeza y la cola con el fin de aislar el paquete visceral. Para la preparación de los extractos, las muestras se homogenizaron en una proporción de 200 mg/ml (p/v) en solución glicina-HCl 100 mM a

pH 2 para los extractos enzimáticos de estómago y en tris-HCl 50 mM + CaCl₂ 25 mM pH 7.5 para los extractos enzimáticos de intestino. El homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C; después, se recuperó el sobrenadante y se almacenó en congelación hasta la aplicación de las pruebas bioquímicas.

Análisis bioquímicos

La concentración de proteína soluble en los extractos multienzimáticos de estómago e intestino, se midió por la técnica de Bradford (1976), usando como estándar una curva patrón de albúmina bovina sérica. La actividad de proteasas ácidas (pepsina) se midió con la técnica de Anson (1938), usando como sustrato hemoglobina al 1%, en una solución glicina-HCl 100 mM pH 2.0. La actividad de proteasas alcalinas se midió con la técnica descrita por Kunitz (1947) modificada por Walter (1984), usando como sustrato caseína al 1% en solución tris-HCl 100 mM + CaCl₂ pH 9.0. En ambas técnicas, la reacción se detuvo con 0.5 ml de ácido tricloroacético al 20%. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de tirosina liberada por minuto, en base al coeficiente de extinción molar de 0.0008 a 280 nm. La actividad de tripsina se midió con la técnica de Erlanger *et al.* (1961) usando como sustrato BAPNA (N- α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide) al 3.5 mM, en solución de tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM pH 8. La actividad de quimotripsina se midió por la técnica de DelMar *et al.* (1979) usando como sustrato SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilide) al 0.1 mM en solución tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM pH 7.8. La actividad de leucina-aminopeptidasa se midió con la técnica descrita por Maraux *et al.* (1973), usando como sustrato leucina p-nitroanilida al 1 mM, en solución fosfato sódico monobásico 50 mM pH 7.2. Las reacciones de las técnicas descritas anteriormente se detuvieron con ácido acético al 30%; una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de nitroanilida liberada por minuto, usando los coeficientes de extinción molar de 8.8 para la tripsina a 410 nm, 9.64 para la quimotripsina a 405 nm y 8.2 leucina aminopeptidasa a 410 nm. La actividad de carboxipeptidasa A se midió con la técnica descrita por Folk y Schirmer (1963), usando como sustrato hipuryl-L-fenil-alanina al 1mM en solución tris-HCl 25 mM + NaCl 50 mM pH 7.5. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de hipuryl liberado por minuto, usando como coeficiente de extinción molar 0.36 a 254

nm. La actividad de α -amilasa se midió usando la técnica de Somoyi-Nelson descrito por Robyt y Whelan (1968) usando como sustrato almidón al 2% en solución fosfato de sodio y citrato de sodio 100 mM + NaCl 50 mM pH 7.5. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 μ g de maltosa liberada por minuto, usando como coeficiente de excitación molar 0.0034 a 600 nm. La actividad de lipasa se midió con la técnica descrita por Versaw *et al.* (1989), usando como sustrato β -naftil caprilato a 100 mM. Una unidad de actividad se definió como 1 μ g de naftol liberado por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 0.02 a 540 nm. Las actividades fosfatasa ácida y alcalina se midieron de acuerdo a la técnica de Bergmeyer (1974), usando como sustrato 4-nitrofenilfosfato 2% en una solución de ácido cítrico/citrato a pH 5.5 para condiciones ácidas y en solución glicina-NaOH 100 mM a pH 10.1 para condiciones alcalinas. Una unidad de actividad se definió como 1 μ g de nitrofenol liberado por minuto utilizando el coeficiente de extinción molar de 0.0185 a 405 nm. La actividad de los extractos se expresó empleando las siguientes ecuaciones: 1) Unidad por ml = (Δ abs x volumen final de la reacción (ml)) x (CEM x tiempo (min) x volumen del extracto (ml)); 2) Unidades por mg de proteína = Unidades por ml / mg de proteína soluble; 3) Unidades por larva = Unidades por ml / número de larvas por ml. La actividad enzimática se expresó de acuerdo a las ecuaciones 2) U mg de proteína⁻¹ y 3) U larva⁻¹ usando el total de larvas en cada homogenizado por extracto.

Análisis electroforético

La clasificación de proteasas alcalinas se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE en gel discontinuo en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970; García-Carreño, 1993). La electroforesis se realizaron en una cubeta Mini PROTEAN® III (Bio-Rad) de dos placas de geles verticales de 8×10×0.075 cm, con capacidad de 10 muestras por gel. Los extractos enzimáticos se mezclaron con el tampón de muestra (tris-HCl 0.5 M pH 6.8, sacarosa, SDS, azul de bromofenol) a una proporción de 1:1 v/v, se cargaron 20 μ l de muestra en cada pozo de los geles. En las proteasas alcalinas el zimograma discontinuo constó de un gel de almacenamiento al 4% y un gel de separación al 10%; el corrimiento se realizó a 80 V durante 15 min y a 100 V durante 100 min con una resistencia de 24 mA a 4°C, en un buffer de corrimiento a pH 8.3; los geles se enjuagaron con agua destilada y después fueron

sumergidos en una solución de caseína de Hammerstein 2% (en tris-HCl 50mM pH 9) a 4°C durante 45 min para permitir la absorción de caseína por el gel y después una incubación a 37 °C durante 3 horas para que las proteasas hidrolizaran el sustrato. Finalmente, los geles de las electroforesis se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una solución de TCA al 12% por 15 minutos, se tiñeron con solución 0.1% de azul brillante de Coomassie R-250 (0.12g para 100 ml), metanol, ácido acético y agua destilada en proporción de volumen 50:20:50 respectivamente por 1 hora, para después ser desteñidos con solución de metanol-ácido acético-agua destilada (35:10:55). Las zonas claras indicaran la presencia de proteasas después de un periodo de 24 h. Para determinar el peso molecular se colocó 5 µl en un pocillo en cada gel de SDS-PAGE del marcador comercial Bio Basic Inc BM523, el cual está compuesto por las siguientes proteínas de peso molecular: fosforilasa B de conejo 97.4 KD, albúmina bovina sérica 66.2 KD, Ovoalbúmina 42.7 KD, anhidrasa carbónica 31.0 KD y lisozima 14.4 KD. La electromobilidad relativa (Rf) se calculó para todos los zimogramas (Igbokwe y Downe 1978) y el peso molecular (MW) de cada banda con actividad de proteasa alcalina se calculó con el ajuste lineal entre el Rf y el logaritmo decimal de los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores y con ayuda del programa Quantity One 1-D Analisis Software de Bio-Rad®.

Análisis estadístico

Se aplicó una regresión exponencial ($y=a * e^{bx}$) entre el peso húmedo y la talla con respecto a los días de crecimiento para determinar el tipo de crecimiento de *C. trimaculatum*, con el programa estadístico STATISTICA™ v 7.0, donde “a” es la talla o peso inicial y “b” es la tasa de crecimiento específico en mm o g por día.

Resultados

El crecimiento en peso húmedo y longitud de *C. trimaculatum* hasta los 60 dde es de tipo exponencial (Fig. 1a-b). El peso húmedo inicial y la longitud total inicial resultaron de

0.0058 g y 7.1365 mm respectivamente; mientras que la tasa de crecimiento en peso es de 0.0829 g día⁻¹ y para la longitud de 0.0249 mm día⁻¹.

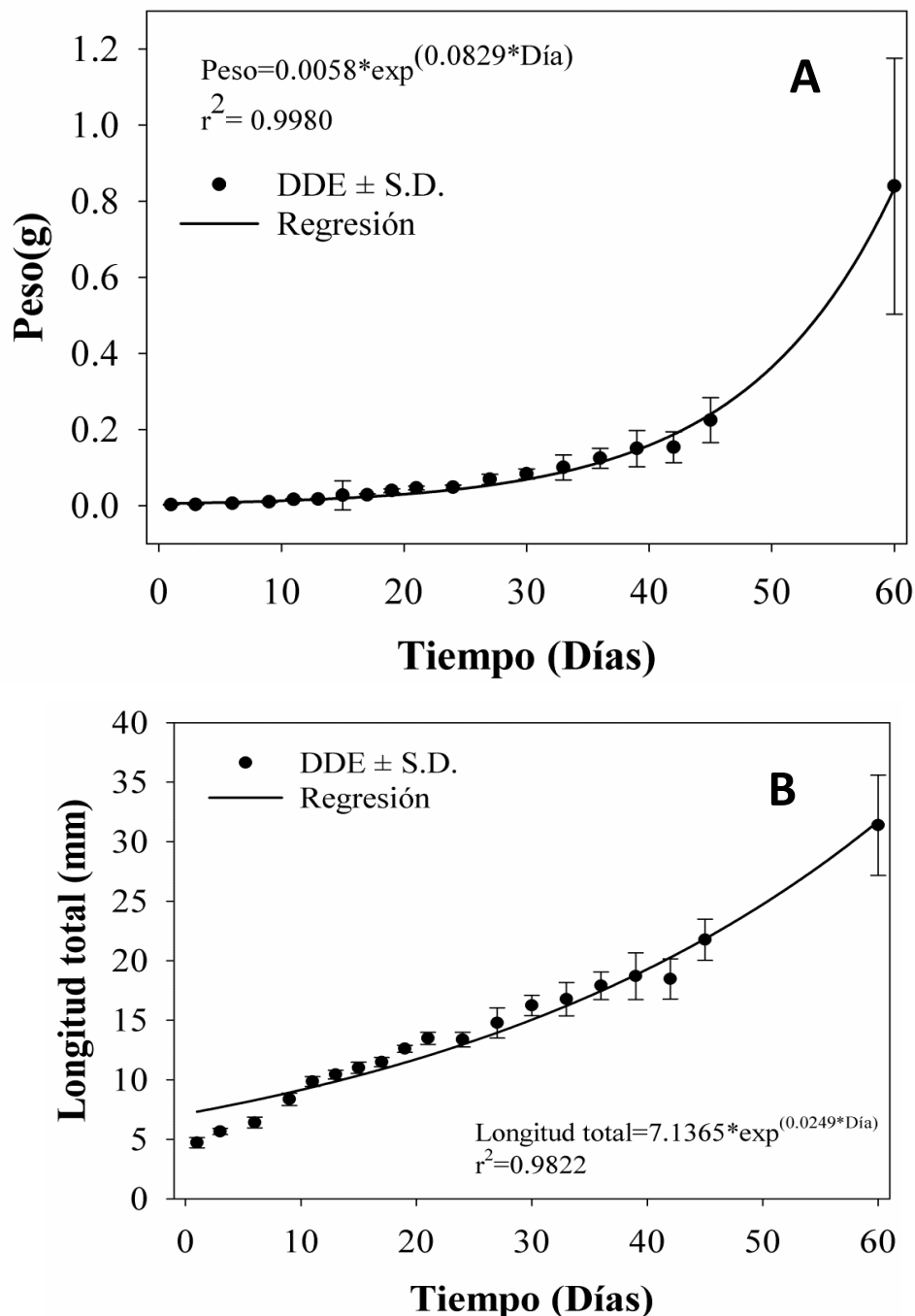


Figura 1. a) Promedio del peso húmedo (g por larva ± S.D. n=30) y b) promedio de la longitud total (mm por larva ± S.D. n=30) de larvas de *C. trimaculatum*.

Por otra parte, la actividad enzimática de las proteasas se muestra en la figura 2a-l. La actividad específica de la proteasa ácida se presentó desde los primeros días en niveles muy bajos, incrementándose para el día 9 dde y decreciendo para el día 13 dde, para después incrementar y mantenerse fluctuante hasta alcanzar una actividad máxima el día 30 dde y decrecer el día 60 dde (Fig. 2a). La proteasa alcalina se detectó a partir del día 6 dde incrementándose para alcanzar su máxima actividad el día 17 dde, decreciendo fluctuantemente hasta el día 60 dde (Fig. 2c). La actividad tripsina se detecta desde el día 6 dde, tiene una máxima actividad para los días 15 y 17 dde, decreciendo hasta el día 60 dde (Fig. 2e). La quimotripsina se detecta el día 6 dde con un incremento hasta alcanzar la máxima actividad el día 13 dde manteniéndose hasta el día 42 dde, para después decrecer el último día de muestreo (Fig. 2g). La carboxipeptidasa A está presente desde los primeros días incrementándose y alcanzado la máxima actividad los días 6 y 9 dde, para disminuir el día 11 dde y mantenerse fluctuante el resto de los días (Fig. 2i). La leucina-aminopeptidasa está presente desde los primeros días incrementándose el día 6 dde, con una actividad máxima para los días 15, 17 y 21 dde; después decrece y se mantiene fluctuante hasta el día 60 dde (Fig. 2k). Las actividades individuales de la proteasa ácida, proteasa alcalina, tripsina, carboxipeptidasa A y leucina-aminopeptidasa presentan el mismo patrón, incrementando con el paso del tiempo y alcanzando su máxima actividad para el día 60 dde (Fig. 2b, d, f, j, l). Para la quimotripsina también presenta el mismo incremento, pero alcanza su máxima actividad el día 42 dde (Fig. 2h).

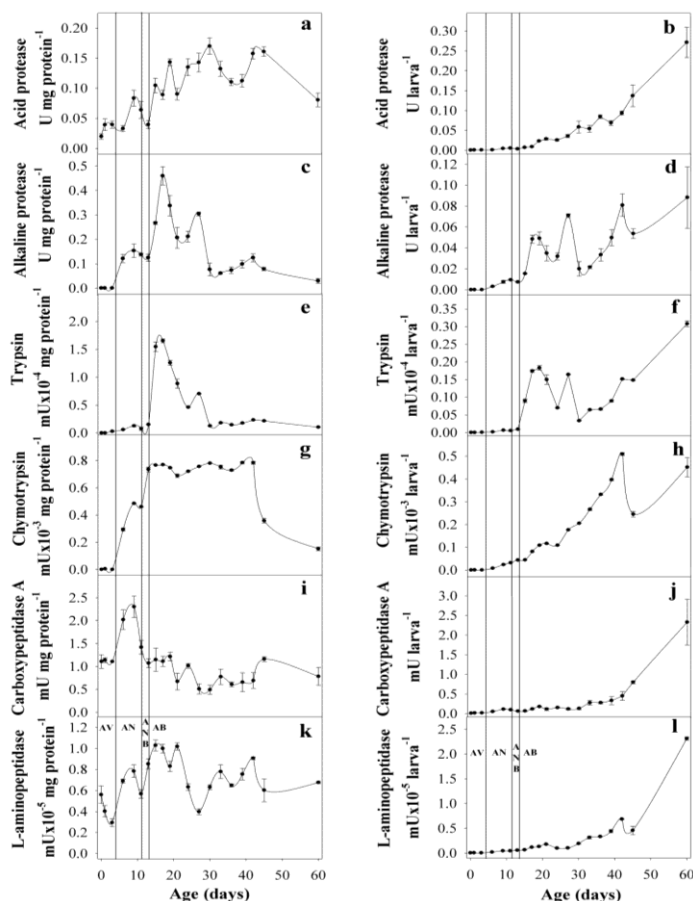


Figura 2. Actividad enzimática digestiva de las proteasas durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum* (promedio \pm S.D. n=3). a) actividad de la proteasa ácida específica, b) actividad individual de las proteasas ácidas, c) actividad de la proteasa alcalina específica, d) actividad individual de las proteasas alcalinas, e) actividad específica de la tripsina, f) actividad individual de la tripsina, g) actividad específica de la quimotripsina, h) actividad individual de la quimotripsina, i) actividad específica de la carboxipeptidasa, j) actividad individual de la carboxipeptidasa, k) actividad específica de la leucina-aminopeptidasa, l) actividad individual de la leucina-aminopeptidasa. AV: Alimentación de vitelo; AN: Alimentación con nauplios; ANB: Alimentación con nauplios y balanceado; AB: Alimentación con balanceado.

La actividad específica lipasa se detecta a partir del día 6 dde incrementándose y decreciendo para el día 17 dde, para después volver a incrementar y alcanzar una actividad máxima el 24 dde, decreciendo hasta el día 60 dde (Fig. 3a). La actividad específica de amilasa es detectable a partir del día 3 dde y se mantienen fluctuante en incremento hasta

alcanzar una actividad máxima el día 45 dde (Fig. 3c). La actividad individual de lipasa se registra en incremento hasta el día 21 dde, para después decrecer hasta el día 33 dde y enseguida vuelve a incrementarse hasta alcanzar una actividad máxima el día 60 dde (Fig. 3b). La actividad individual de amilasa va en incremento y decrece para los días 39 y 42 dde, para después incrementarse nuevamente hasta alcanzar una actividad máxima el día 60 dde (Fig. 3d). La fosfatasa alcalina se detecta en el día 3 dde, incrementándose hasta alcanzar una actividad máxima el día 15 y 19 dde y manteniéndose fluctuante hasta el día 60 dde (Fig. 3e). La fosfatasa ácida se detecta desde los primeros días incrementándose el día 3 dde y alcanzando una actividad máxima el día 13 dde, después decrece y se mantiene fluctuante hasta el día 60 dde (Fig. 3g). La actividad individual de las fosfatasas alcalinas y ácidas presentaron el mismo patrón de incremento hasta alcanzar la actividad máxima el día 60 dde (Fig. 3f-h).

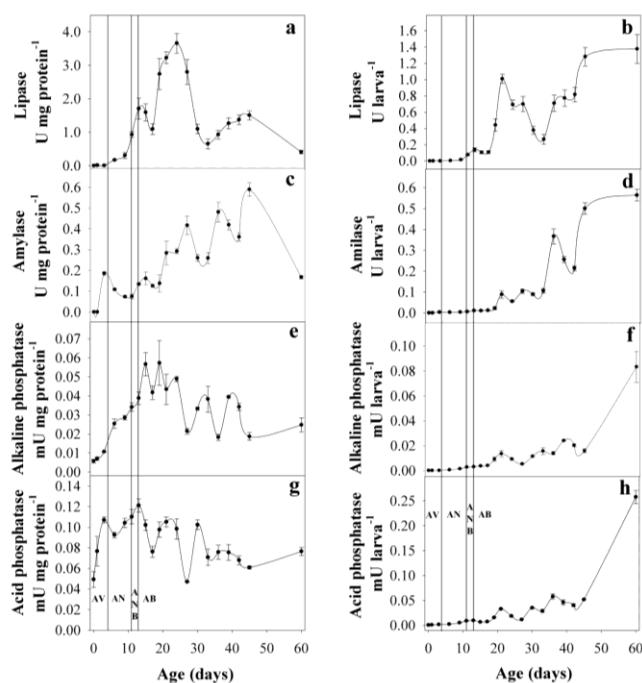


Figura 3. Actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum* (promedio \pm S.D. n=3). a) actividad específica de lipasa, b) actividad individual de la lipasa, c) actividad específica de la amilasa, d) actividad individual de la amilasa, e) actividad específica de la fosfatasa alcalina, f) actividad individual de la fosfatasa alcalina, g) actividad específica de la fosfatasa ácida, h) actividad individual de las fosfatasa ácida.

AV: Alimentación de vitelo; AN: Alimentación con nauplios; ANB: Alimentación con nauplios y balanceado; AB: Alimentación con balanceado.

El zimograma de proteasas alcalinas SDS-PAGE reveló seis tipos de bandas divididas en tres grupos, entre pesos moleculares de 113.4 a 20.4 KDa. Las primeras tres bandas de actividad aparecieron en el día 6 dde con peso molecular de 113.4, 84.5 y 35.4 kDa, respectivamente. El día 9 dde se reveló la cuarta banda de 25.1 kDa y el día 11 dde se pudieron distinguir las últimas dos bandas con pesos moleculares de 38.0 y 20.4 kDa. Es a partir del día 11 dde cuando se completan todas las bandas y se mantienen hasta el día 60 dde (Fig. 4).

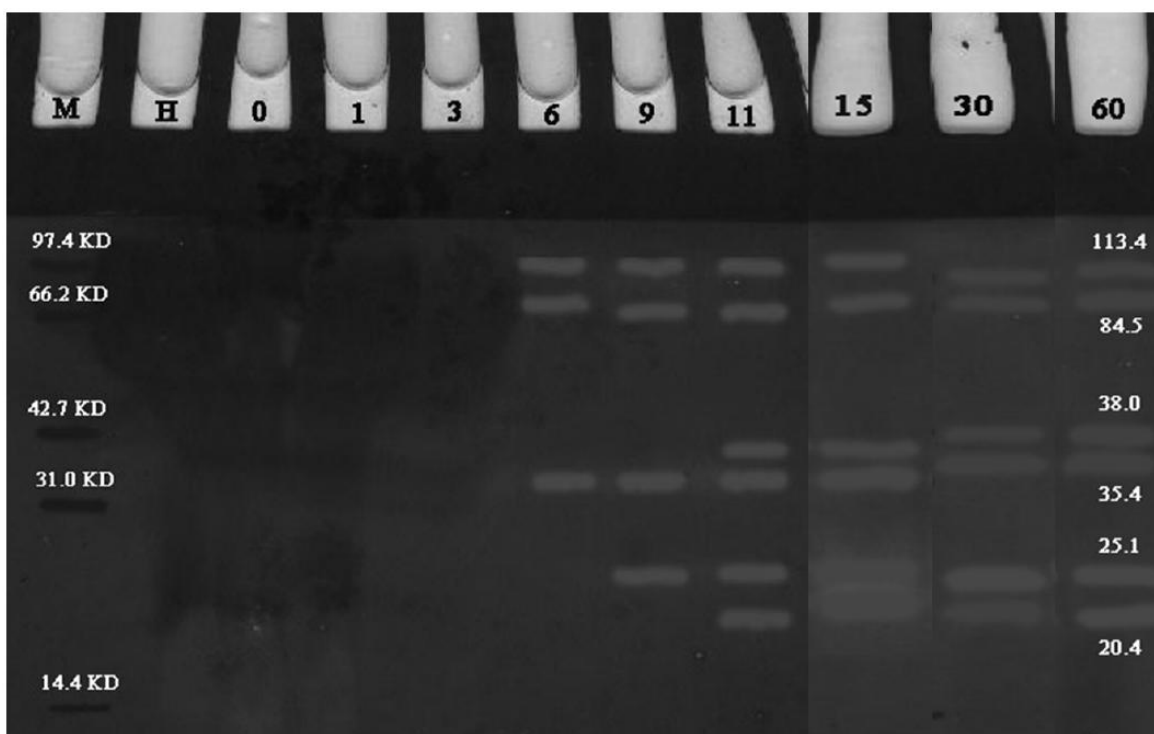


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*. M= Marcador de pesos moleculares: fosforilasa B de conejo 97.4 KD, albúmina bovina sérica 66.2 KD, Ovoalbúmina 42.7 KD, anhidrasa carbónica 31.0 KD y lisozima 14.4 KD; H= Muestra de huevos; Números= Días después de eclosión.

Caracterización de las proteasas digestivas en juveniles

Materiales y métodos

Las muestras se obtuvieron de juveniles cultivados en el Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Campus del Mar de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, con un peso promedio de 29.43 ± 10.85 g. Los cuales, se alimentaron tres veces al día a saciedad aparente con alimento Silvercup Pedregal® (45% de proteína y 16% lípidos). Dejándose en inanición 24 horas antes de ser sacrificados con una sobredosis de metasulfonato de tricaina (MS-222). A cada organismo se le registró el peso y longitud total corporal; también el peso del estómago e intestino y por último la longitud total del intestino. Se determinó el valor promedio del índice de longitud intestinal relativa de 35 organismos de acuerdo a lo descrito por Sáenz *et al.* (2005). La extracción de los estómagos e intestinos se realizó en frío y se homogenizaron en una proporción de 200 mg/ml, con buffer glicina-HCl 100 mM pH 2 y buffer tris-HCl 30 mM + CaCl₂ 12.5 mM pH 7.5 respectivamente. El homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C, se extrajo el extracto multienzimático y se almacenó a -20 °C hasta el análisis. La concentración de proteína soluble en los extractos multienzimáticos de estómago e intestino se determinó con la técnica descrita por Bradford (1976). En la determinación de la actividad enzimática de las proteasas ácidas se aplicó la técnica descrita por Anson (1938), usando como sustrato hemoglobina bovina al 1% con buffer glicina-HCl 100 mM a pH 2. La actividad enzimática de las proteasas alcalinas se determinó con la técnica descrita por Kunitz (1947) modificado por Walter (1984), usando como sustrato caseína al 1% con buffer tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM a pH 9. La actividad de tripsina se determinó con el método descrito por Erlanger *et al.* (1961), usando como sustrato N α -Benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride con buffer tris-HCl 100mM + CaCl₂ 10 mM a pH 8. La actividad de quimotripsina se midió por la técnica de DelMar *et al.* (1979) usando con sustrato SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilide) al 0.1 mM en solución tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM pH 7.8. El pH óptimo de las proteasas ácidas y alcalinas se determinó en rango de pH de 2 al 12 con la solución universal de Stauffer (1989), sustituida en la técnica de Anson (1938) y Walter (1984) respectivamente. Para la estabilidad al pH, se preincubaron los extractos multienzimáticos a los diferentes pH's a un tiempo de 0, 30, 60

y 90 min, la incubación se realizó a temperatura ambiente. La temperatura óptima de las proteasas ácidas y alcalinas se determinó modificando la temperatura de incubación en un rango de 15 a 75 °C con intervalos de 10 °C, en las técnicas descritas por Anson (1938) y Walter (1984) respectivamente. Para determinar la estabilidad de las proteasas a los cambios de temperatura, los extractos multienzimáticos se preincubaron a las diferentes temperaturas antes mencionadas durante 0, 30, 60 y 90 min. Para la estabilidad del pH y la temperatura el tiempo 0 min (sin preincubar) se utilizó como control para determinar la actividad residual expresada en porcentaje.

La sensibilidad de la actividad de las proteasas se determinó utilizando inhibidores específicos, se realizó de la siguiente manera: Para las proteasas ácidas se utilizó el inhibidor Pepstatin A y la actividad residual se determinó con la técnica descrita por Anson (1938). En las proteasas alcalinas se aplicaron los inhibidores específicos descritos por García-Carreño *et al.* (1993) y la actividad residual de las proteasas alcalinas se determinó con la técnica descrita por Kunitz (1947) modificada por Walter (1984). En ambas pruebas se utilizó un control sin inhibir y la actividad residual se expresó en porcentaje, todas las pruebas se realizaron por triplicado. El efecto de los inhibidores en las proteasas alcalinas se acompañó con análisis de electroforesis SDS-PAGE en un gel discontinuo de poliacrilamida. El gel almacenador al 4% y gel de corrimiento al 10% de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970) modificada por García-Carreño *et al.* (2002). En donde, se emplearon los siete inhibidores antes descritos por García-Carreño *et al.* (1993). Los cuales, se preincubaron en una proporción 1:1 (enzima/inhibidor) por 1 hora. También se empleó el marcador de pesos moleculares Bio Basic Inc BM523 y con el programa Quantity One 1-D Analisis Software de Bio-Rad® para el cálculo del peso molecular de cada banda.

Resultados

La actividad de proteasas digestivas de *C. trimaculatum* resultó mayor en los extractos de intestinos, así como la actividad de quimotripsina en relación a la tripsina (Tabla 1). El índice de la longitud intestinal relativa resultó de 1.45 ± 0.33 (n=35). El pH óptimo para la actividad de las proteasas ácidas es de pH 2 (Fig. 1a). En el caso de la estabilidad a cambios

de pH, la actividad enzimática se mantiene por arriba del 70% para los pH del 2 al 4, y en el resto de los valores de pH disminuye en un 50% a partir de los 30 min de preincubación (Fig. 1b). Para la actividad de las proteasas alcalinas el pH óptimo es de 10 (Fig. 1c). Mientras que la mayor estabilidad a los cambios de pH para las proteasas alcalinas se encontró en el pH 9, llegando por arriba del 200% para el tiempo de 30 minutos de preincubación; disminuyendo hasta alcanzar el 100% para el resto de los tiempos de preincubación. Asimismo, para los valores de 8 y 10 se detectó una alta actividad mayor al 100% en diferentes tiempos de preincubación (Fig. 1d).

Tabla 1. Valores promedios (\pm S.D) de tres determinaciones de las actividades de proteasas en los extractos enzimáticos de *C. trimaculatum*.

	Actividad específica		Tripsina	Quimotripsina
	(U/mg proteína)	(U/g tejido)	(mUx10 ⁻⁵ /mg proteína)	(mUx10 ⁻⁵ /mg proteína)
Estómago	2.01 \pm 0.57	1,121.61 \pm 318.38	-	-
Intestino	3.95 \pm 0.32	1,136.34 \pm 91.24	68.17 \pm 1.42	171.48 \pm 1.60

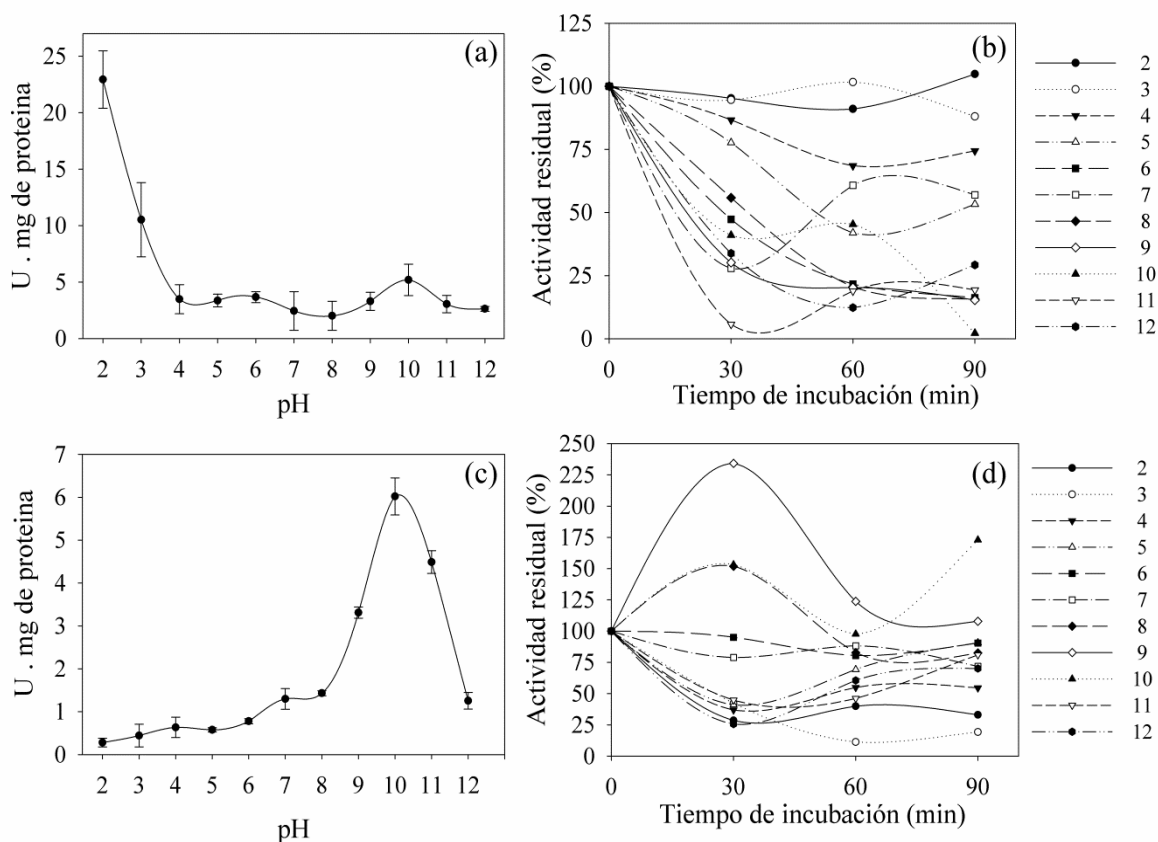


Figura 1. Efecto del pH en las proteasas digestivas de juveniles de *C. trimaculatum*: a) pH óptimo de las proteasas ácidas, b) estabilidad de las proteasas ácidas, c) pH óptimo de las proteasas alcalinas, d) estabilidad de las proteasas alcalinas.

La temperatura óptima de la actividad de las proteasas ácidas es de 55 °C (Fig. 2a). Asimismo, en la estabilidad de la actividad de las proteasas ácidas disminuye en más del 50% desde los 30 minutos de preincubación, a partir de la temperatura de 55 °C en adelante (Fig. 2b). Mientras que la actividad de proteasas alcalinas se incrementa a partir de los 35 °C, alcanzando la máxima actividad a los 65 °C (Fig. 2c). Finalmente, la estabilidad de la actividad de las proteasas alcalinas se reduce en un 40% únicamente para las temperaturas de 65 y 75 °C a partir de los 30 minutos de preincubación (Fig. 2d).

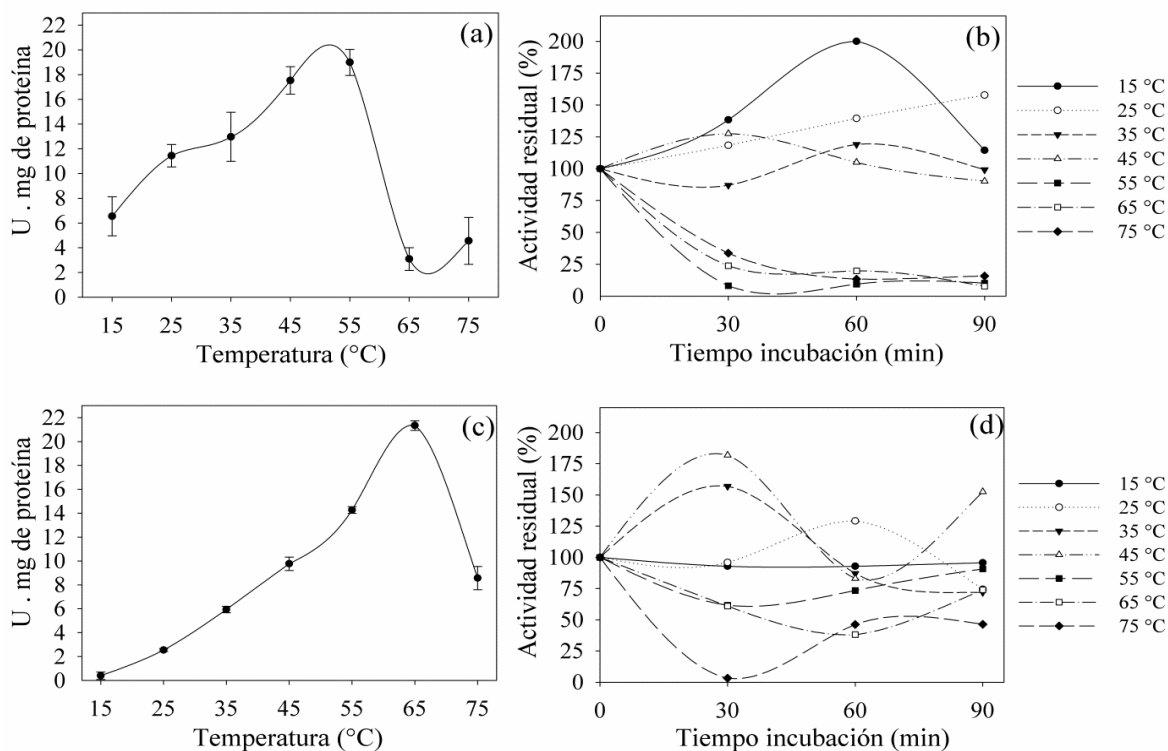


Figura 2. Efecto de la temperatura en las proteasas digestivas de juveniles de *C. trimaculatum*: a) temperatura óptima de las proteasas ácidas, b) estabilidad a la temperatura de las proteasas ácidas, c) temperatura óptima de las proteasas alcalinas, d) estabilidad a la temperatura de las proteasas alcalinas.

El análisis con inhibidores indica que la actividad de las proteasas ácidas es inhibida en más del 98% por el pepstatin A, inhibidor específico de la pepsina tipo A. Los inhibidores para la actividad de las proteasas alcalinas muestran una inhibición mayor al 50% para TPCK, el cual es un inhibidor específico de quimotripsina, para TLCK que es un inhibidor específico de tripsina, para Ovoalbúmina y SBT1 los cuales inhiben serina-proteasas. Mientras que con la Fenantrolina y el EDTA, inhibidores de metal-proteasas, y el PMSF, inhibidor general de serina-proteasa, presentan una inhibición mayor al 75% (Fig. 3).

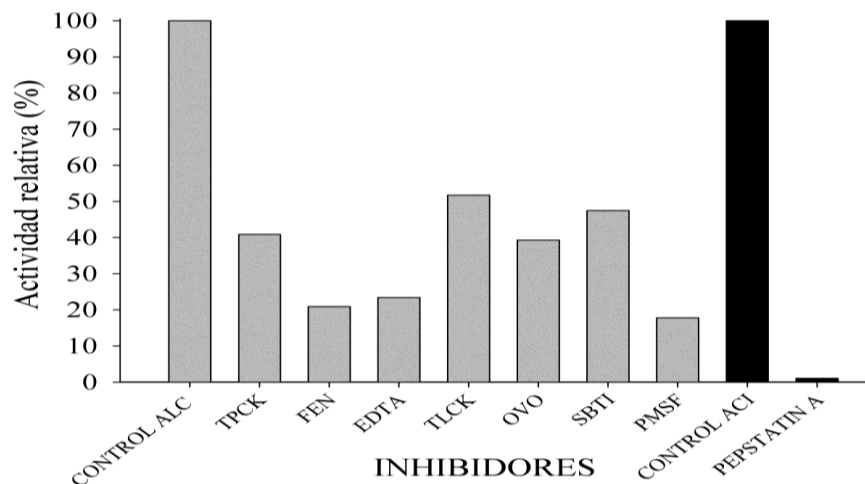


Figura 3. Efecto en la reducción de la actividad de las proteasas digestivas de extractos multienzimáticos de juveniles de *C. trimaculatum* por distintos inhibidores. Alk control (proteasas alcalinas sin inhibidor), TPCK (tosil-fenilalanina-clorometil cetona), FEN (fenantrolina), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), TLCK (tosil-lisina-clorometil cetona), OVO (ovoalbúmina), SBT1 (inhibidor trípico de soya), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Aci control (proteasas ácidas sin inhibidor), Pepstatin A.

El análisis de electroforesis SDS-PAGE para proteasas alcalinas reveló para el control siete bandas con pesos moleculares desde 139.8 hasta 20.4 kDa. La Ovoalbúmina inhibió tres bandas (139.8, 38.0 y 20.4 kDa), mientras que el SBT1 y el PMSF inhiben cuatro bandas (139.8, 84.5, 35.4, 20.4 y 84.5, 38.0, 25.1, 20.4 kDa respectivamente). Los inhibidores TPCK y TLCK únicamente inhiben la primera banda (139.8 kDa). Por su parte, la Fenantrolina inhibe solamente la segunda banda (113.4 kDa) y el EDTA inhibe la primera y segunda banda (Fig. 4a).

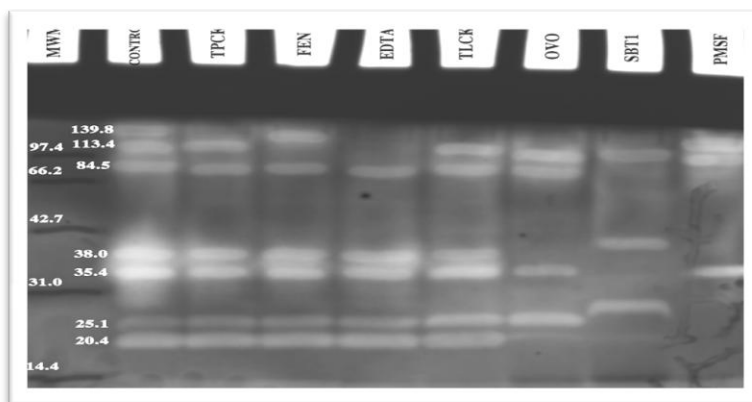


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE de las proteasas digestivas de *C. trimaculatum*: a) proteasas alcalinas; MWM (marcador): fosforilasa B de conejo 97.4 KD, albúmina bovina sérica 66.2 KD, Ovoalbúmina 42.7 KD, anhidrasa carbónica 31.0 KD y lisozima 14.4 KD; Control (sin inhibidor); Inhibidores: TPCK (tosil-fenilalanina-clorometil cetona), FEN (fenantrolina), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), TLCK (tosil-lisina-clorometil cetona), OVO (ovoalbúmina), SBT1 (inhibidor trípico de soya), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo).

Discusión

En *C. trimaculatum* la actividad enzimática de las proteasas ácidas apareció en bajas actividades desde el momento de la eclosión de las larvas (día 0 dde), la cual se incrementó para los días 9 y 15 dde, coincidiendo con los días en que se inicia la alimentación exógena con nauplios de *Artemia* o se cambia a alimento balanceado. Estos resultados son similares a los reportados para otras especies de ambientes tropicales como *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011); *A. tropicus* (Frías-Quintana 2009) y *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011), en las que se describe una pronta detección de la proteasa ácida. Es probable que esta pronta actividad ácida se deba a hidrolasas como las catepsinas, que también actúan en condiciones ácidas (Álvarez-González 2003). Estas no necesariamente son de origen estomacal, pero son detectadas en los ensayos in vitro con extractos enzimáticos debido a que cuando se realizan los homogenizados se procesa todo el cuerpo de la larva, aumentando la posibilidad de contaminación con otras enzimas (Moyano *et al.* 1996). En cambio, la detección de la actividad de la pepsina es considerada como un

Toledo *et al.*, 2013. Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Tahuina *Cichlasoma trimaculatum*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 405-459.

indicativo de la completa formación y funcionalidad del estómago; así como de la transformación de la larva en juvenil (Ueberschäer 1993; Gawlicka *et al.* 2001). Esto se debe a que las células gástricas del estómago son las que secretan el pepsinógeno, que se transformará a su forma activa (pepsina) por las condiciones ácidas generadas por el ácido clorhídrico, producido también por las glándulas gástricas (Gildberg 1988; Kageyama 2002; Yúfera *et al.* 2004; Zaiss *et al.* 2006; Yúfera y Darias 2007). Es por ello, que en años recientes este tipo de trabajos se ha acompañado con estudios de histología y genética, en la detección de las células gástricas y pepsinógenos, como los realizados en *Oplegnathus fasciatus* (He *et al.* 2012) y *L. guttatus* (Galaviz *et al.* 2012). Sin embargo, cuando se detecta la enzima pepsina se relaciona con el comienzo de la digestión ácida, aumentando la capacidad de hidrólisis de las proteínas y mejorando la eficiencia de la digestión extracelular de las proteínas, para dejar al intestino la absorción de nutrientes (Govoni *et al.* 1986; Yúfera y Darias 2007), dando por hecho la funcionalidad del estómago y la posibilidad del comienzo de una alimentación exógena con alimento vivo o bien realizar la sustitución de alimento vivo a dietas inertes (Galaviz *et al.* 2012). La actividad de las proteasas alcalinas se detectó a partir el día 6 dde durante la alimentación exógena con nauplios de *Artemia* y antes del incremento de la proteasas ácidas; lo anterior pone en evidencia que *C. trimaculatum* en primera instancia lleva a cabo el proceso de digestión por las enzimas pancreáticas, debido a que la digestión ácida se inicia con la funcionalidad del estómago ocurriendo días después (Alarcón y Martínez 1998; Zambonino-Infante & Cahu 2001; Kvåle *et al.* 2007). En especies como en *Paralichthys californicus* (Álvarez-González *et al.* 2006); *Seriola lalandi* (Chen *et al.* 2006); *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.* 2007), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.* 2008), *Chelon labrosus* (Zouiten *et al.* 2008) se ha reportado que la actividad proteolítica alcalina es llevada a cabo en primer instancia por las endopeptidasas tripsinas y quimotripsina, siendo la enzima tripsina la primera en mostrar actividad y en realizar la mayor parte de la digestión de proteínas. Lo anterior es opuesto a lo encontrado en *C. trimaculatum* donde se detectó primeramente la actividad de tipo quimotripsina; coincidiendo con lo descrito en *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011), lo que es posible debido a que en especies omnívoras y herbívoras la actividad de la quimotripsina se encuentra en mayor proporción a la tripsina, siendo inverso en especies carnívoras y marinas (Jonas *et al.* 1983). Por lo tanto, en *C. trimaculatum* la

baja cantidad de tripsina en los primeros días es compensada con quimotripsina, mientras que la tripsina muestra una actividad días después; la cual también se ha relacionado con la transformación de larva a juvenil (Kolkovski 2001). También estas dos enzimas se han relacionado con el estado nutricional de las larvas, ya que en condiciones normales la secreción de tripsina va en aumento en demanda a la hidrólisis de proteínas, pero si hay una restricción de alimento en cantidad y calidad, la actividad de la proporción de tripsina-quimotripsina se estanca o disminuye, debido a que se produce relativamente menos tripsina frente a una secreción constante de quimotripsina (Moyano 2006). Este tipo de relación se observó notablemente en las actividades de *C. trimaculatum*, similar a lo encontrado en *Sparus aurata* (Moyano *et al.* 1996) y *Diplodus sargus* (Cara *et al.* 2003) y dando la pauta a pensar que los esquemas de alimentación y el tipo de alimento suministrado para *C. trimaculatum* podría no ser los más adecuados. Por otra parte, se determinaron las exopeptidasas carboxipeptidasa A y leucina-aminopeptidasa, las cuales mostraron actividades desde el momento de la eclosión de las larvas, de forma similar a lo encontrado en *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011); mientras que la pronta actividad de leucina-aminopeptidasa se ha descrito en especies como *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011) y *Oreochromis niloticus* (Tengjaroenkul *et al.* 2002). En cambio en especies como en *S. ocellatus* (Lazo *et al.* 2007); *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.* 2008); *C. undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.* 2012) al inicio se detecta una baja actividad de leucina-aminopeptidasa incrementándose con el transcurso de los días o en los cambios de alimentación. Esta enzima tiene la función de finalizar la digestión a nivel luminal hidrolizando los péptidos para liberar aminoácidos a partir de su lado amino terminal, de la digestión iniciada en primera instancia por las endoproteasas tripsina y quimotripsina (Moyano 2006; Lazo *et al.* 2007; Su-Hua *et al.* 2011). La leucina-aminopeptidasa se encuentra situada en la membrana del borde del cepillo, indicando la maduración de los enterocitos al realizarse el cruce del incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y el descenso de leucina-aminopeptidasa (Ma *et al.* 2005; Moyano 2006; Lazo *et al.* 2007). En *C. trimaculatum* esto se efectúa en el día 15 dde, donde también se registra la mayor actividad de esta enzima. Por otra parte, la carboxipeptidasa A mostró actividad desde el momento de la eclosión, incrementándose al suministrar alimento vivo (nauplios de *Artemia*) teniendo una actividad máxima el día 9 dde. Esta pronta actividad ha

sido detectada en *Paralichthys olivaceus* (Srivastava *et al.* 2002) y *C. undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.* 2012), pero en esta última especie también se incrementó la actividad al momento de suministrar el alimento vivo (nauplios de *Artemia*). Esta enzima es considerada una metaloproteasa al depender de Zn^{+2} para llevar a cabo la catálisis; asimismo, actúa a nivel luminal y su función es hidrolizar los péptidos sobre el lado carboxilo terminal para la liberación de aminoácidos. Además de la importancia en el área nutricional se ha utilizado como indicador en la presencia de posibles enfermedades (Vendrell *et al.* 2000). El zimograma SDS-PAGE de las proteasas alcalinas reveló seis bandas de actividad con un rango de peso molecular de 113.4 a 20.4 kDa. En el día 6 dde aparecen las tres primeras bandas (113.4, 84.5 y 35.4 kDa) las cuales podrían corresponder a las enzimas de tipo exopeptidasas, como la carboxipeptidasa A o la leucina-aminopeptidasa, debido a que muestran actividad primero que las endopeptidasas; y además tienen un incremento considerable en el día 6 dde, cuando se suministra alimento vivo (nauplios de *Artemia*). Asimismo, se ha mencionado que estas enzimas tienen un peso molecular de 25 a 105 kDa, descrito de músculos y enzimas digestivas de algunos peces, así como de forma purificada (Vonk and Western 1984; Liu *et al.* 2008; Li-Gen *et al.* 2010; Su-Hua *et al.* 2011; López-Ramírez *et al.* 2011; Jiménez-Martínez *et al.* 2012). Para el día 9 dde aparece una cuarta banda con peso molecular de 25.1 kDa, la cual podría ser una endopeptidasas de tipo tripsina o quimotripsina, debido a que estas enzimas tienen pesos moleculares de 22 a 28 kDa para tripsina y de 22 a 30 kDa para quimotripsina respectivamente (Simpson, 2000; Castillo-Yáñez *et al.* 2005; Castillo-Yáñez *et al.* 2006; Castillo-Yáñez *et al.* 2009; Ben *et al.* 2011). En este caso, podría ser la quimotripsina debido a que es la primera en mostrar actividad con respecto a la tripsina. Es hasta el día 11 dde cuando se completan las bandas de actividad, con la expresión de las dos últimas bandas con pesos moleculares de 38.0 y 20.4 kDa. El número de isoformas de las enzimas digestivas expresadas en las diferentes especies está relacionado con los hábitos alimenticios de las especies, por lo que al contar con seis bandas de actividad de proteasas, *C. trimaculatum* puede ser considerada como una especie de hábitos omnívoros similar a *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011); además, este tipo y número de isoformas han sido detectadas en otras especies de peces como *Solea senegalensis* con siete tipos de bandas (Sáenz *et al.* , 2005); mientras que en especies carnívoras el número de bandas es

bajo como en *Thunnus thynnus* con tres isoformas (Essed *et al.* 2002); *P. maculatofasciatus* con 2 isoformas (Álvarez-González *et al.* 2010a) y *C. undecimalis* con 2 isoformas (Álvarez-González *et al.* , 2010b).

Por otra parte, la actividad lipasa se registró a partir del día 6 dde posterior a lo descrito en otras especies como *O. niloticus* (Tengjaroenkul *et al.* 2002), *S. ocellatus* (Lazo *et al.* 2007), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.* 2008), *D. dentex* (Gisbert *et al.* 2009) y *C. undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.* 2012), donde se ha mostrado actividad de lipasas desde el momento de la eclosión e incluso se ha registrado una actividad máxima en estos días. Esta primera actividad ha sido relacionada con las esterazas, las cuales llevan a cabo la hidrólisis de lípidos en la absorción del saco vitelino (Díaz *et al.* 2002; Chakrabarti *et al.* 2006; Álvarez-González *et al.* 2008). Pero no en todas las especies se registra esta pronta actividad, como es el caso de nuestro estudio y de *P. californicus* (Álvarez-González *et al.* 2006), en donde la actividad se detectó hasta la apertura de la boca coincidiendo con el inicio de la alimentación exógena. La máxima actividad de la lipasa se registró para el día 24 dde, antes de lo encontrado en otros cíclidos tropicales como *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011) y *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011), los cuales han presentado esta actividad alrededor del día 40 dde. Esta segunda actividad de lipasas la han relacionado con la acción de las lipasas verdaderas dependientes de sales biliares, las cuales llevan a cabo la digestión de lípidos exógenos para la liberación de ácidos grasos altamente poli-insaturados; también sugieren el completo desarrollo y funcionalidad del páncreas exócrino así como la maduración del tracto digestivo (Tengjaroenkul *et al.* 2002; Comabella *et al.* 2006; Álvarez-González *et al.* 2008). Con ello, y tomando en cuenta la capacidad digestiva en las primeras etapas de desarrollo, se pueden suministrar o enriquecer las dietas inertes con lípidos esenciales para favorecer el crecimiento y la supervivencia de las larvas (Díaz *et al.* 2002; Uscanga-Martínez *et al.* 2011). La actividad amilasa se detectó a partir del día 3 dde, antes de la alimentación exógena con nauplios de *Artemia*, y se mantuvo en incremento de manera fluctuante. La pronta actividad durante los primeros días de eclosión también se ha descrito en especies como *C. labrosus* (Zouiten *et al.* 2008) y *Miichthys miuiy* (Xiu-Juan *et al.* 2009), esta temprana actividad la adjudican a que está programada genéticamente para aprovechar los nutrientes del vitelo y no es estimulada por

el suministro de la dieta (Xiu-Juan *et al.* 2009; Jiménez-Martínez *et al.* 2012). Sin embargo, también se ha descrito que el tipo de dieta y los cambios de alimentación, generan cambios o fluctuaciones en la actividad de la amilasa (Xiu-Juan *et al.* 2009). Lo anterior se observó en nuestro estudio, ya que al momento de suministrar el alimento vivo (nauplios de *Artemia*) la actividad amilasa disminuyó, pero se incrementó cuando se comenzó la coalimentación de alimento vivo y alimento balanceado, similar a lo descrito en *M. miiuy* (Xiu-Juan *et al.* 2009). En cambio en otras especies, se ha demostrado una alta actividad en las primeras etapas para después disminuir y mantenerse en bajas concentraciones para el aprovechamiento de carbohidratos (Jiménez-Martínez *et al.* 2012). En peces dulceacuícolas como en lo descrito en los cíclidos tropicales de *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011), *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011) y en nuestro estudio, la cantidad de amilasa no disminuye, sino que muchas veces va en aumento, lo que le permite poder aprovechar los nutrientes del medio. Además, se ha mencionado que en especies herbívoras y omnívoras la cantidad o relación de amilasa es mayor a lo encontrado en especies carnívoras (Hidalgo *et al.* 1999; Fernández *et al.* 2001; Zouiten *et al.* 2008). Por lo que todas estas características deberán ser tomadas en cuenta para la formulación del alimento, debido a que se puede incluir cierta cantidad de carbohidratos para enriquecer el aporte de nutrientes en las primeras etapas de crecimiento de las larvas (Cahu *et al.* 2004). La actividad de las fosfatasas, en particular la fosfatasa alcalina, se ha tomado como un indicador de desarrollo de los enterocitos y por consiguiente la maduración del intestino (Zambonino Infante y Cahu 2001). Con ello, se establece el proceso de absorción y se logra una digestión eficiente a nivel luminal en las membranas del borde del cepillo característico de peces adultos (Zambonino Infante y Cahu 2001, Zamani *et al.* 2009). Este momento es considerado cuando se realiza el cruce de la disminución de la actividad de la alanina-aminopeptidasa y el incremento de la fosfatasa alcalina (Ma *et al.* 2005; Moyano 2006; Lazo *et al.* 2007). Las fosfatasas además de formar parte en el proceso de absorción con el transporte de nutrientes a través de la membrana celular, se ha visto que están involucradas en la hidrólisis de fosfatos inorgánicos que son utilizados para la producción de energía (Álvarez-González *et al.* 2008). La actividad de las fosfatasas se registró desde los primeros días incrementándose hasta alcanzar su actividad máxima en el día 13 dde para la fosfatasa ácida y para el día 15 dde para la fosfatasa alcalina, esta última tuvo una menor actividad.

Los resultados son similares a los de *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011), pero diferentes de lo encontrado en *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011), donde se registra una actividad alta de inicio y disminuye con el transcurso del tiempo. La actividad máxima se alcanzó cuando se suministró la dieta balanceada, sugiriendo la posibilidad del aprovechamiento de los nutrientes. Por lo consiguiente, la detección de la actividad en especial de algunas enzimas digestivas, se ha tomado como un indicativo de la maduración y funcionalidad del aparato digestivo para poder digerir alimento exógeno (Moyano *et al.* 1996). Además, este tipo de estudios en conjunto con otros sobre fisiología digestiva y nutrición, han sido esenciales en el establecimiento de los protocolos de alimentación para lograr una producción constante de larvas (Díaz *et al.* 1997; Gisbert *et al.* 2009; Zambonino-Infante *et al.* 2008). En conclusión, la mayoría de las actividades de las enzimas determinadas en *C. trimaculatum*, se muestran desde los primeros días de eclosión; pero es entre los días 6 y 9 dde cuando se registran el incremento de las actividades coincidiendo con el suministro de la alimentación exógena (nauplios de *Artemia*), y para el 15 dde se registra la mayor actividad de casi todas las enzimas digestivas, coincidiendo con el inicio de la alimentación de la dieta comercial, lo que es similar a lo reportado por Zambonino-Infante y Cahu (2007), quienes mencionan que en las primeras etapas de crecimiento las actividades de las enzimas digestivas suelen ser modificadas por la proporción y el tipo de alimento suministrado, mientras que otras ya se encuentran programadas genéticamente para su expresión (Xiu-Juan *et al.* 2009; Jiménez-Martínez *et al.* 2012), y otras hasta cuando los órganos secretores son completamente funcionales para llevar a cabo la secreción de las enzimas (Álvarez-González *et al.* 2008). Es por ello, *C. trimaculatum* se encuentra equipada enzimáticamente desde el día 9 después de eclosión, pero se recomienda iniciar el proceso de deshabitación con alimento balanceado a partir del día 15 después de eclosión.

La mojarra tahuina (*C. trimaculatum*) es una especie que además de representar un recurso importante desde el punto de vista pesquero y comercial en la región Sur de México, por lo que recientemente está siendo investigada para desarrollar su cultivo a escala comercial; sin embargo, existe el desconocimiento sobre aspectos básicos, incluyendo la capacidad digestiva que permita el desarrollo de alimentos balanceados. Considerando lo anterior,

nuestros resultados demuestran que esta especie tiene una alta actividad de proteasas digestivas, siendo mayor la actividad de proteasas alcalinas en relación a las proteasas ácidas, y también hay una mayor actividad de quimotripsina en relación a la tripsina. Lo que indica que esta especie presenta hábitos omnívoros a diferencia de otros peces como *S. formosus* (Natalia *et al.* , 2004) y *S. maximus* (Hai-ying *et al.* , 2006), las cuales tienen hábitos carnívoros presentando altas actividades de proteasas ácidas en el estómago, siendo este el órgano más importante para la digestión de proteínas y una menor actividad de proteasas alcalinas en el intestino donde se realizan los procesos finos de hidrólisis de proteínas a péptidos y aminoácidos, los cuales son absorbidos por los enterocitos (Yúfera y Darías, 2007). Otro de los aspectos que se toman en cuenta para determinar los hábitos alimenticios en peces, es la longitud intestinal relativa, relación que existe entre la longitud corporal y la longitud del tubo digestivo. Este índice según lo descrito por Elliot y Bellwood (2003), menciona que por lo general peces de hábitos omnívoros y herbívoros poseen índices mayores a los peces carnívoros, ya que estos últimos muestran un índice con valor inferior a 1. En *C. trimaculatum* este valor resultó mayor (1.45 ± 0.33), pero es próximo al valor de 1. Por lo tanto, considerando los aspectos bioquímicos, anatómicos y fisiológicos esta especie apunta a ser considerada de hábitos omnívoros pero próximos a la carnivoría, coincidiendo con Yáñez-Arancibia (1978), quien la describe como una especie omnívora. Sin embargo, Violante (1995) menciona que es una especie omnívora, pero con tendencia a la carnivoría en algunos meses del año dependiendo de la disponibilidad de presas, lo cual es similar a lo encontrado en los análisis bioquímicos y de longitud intestinal relativa. Por otro lado, se encontró que las proteasas ácidas alcanzan su mayor actividad a pH 2; lo que coincide con lo encontrado en la mayoría de los estudios como en *Symphysodon aequifasciata* (Chong *et al.* , 2002), *S. formosus* (Natalia *et al.* , 2004), *Diplodus puntazzo* (Tramati *et al.* 2005), *Latimeria chalumnae* (Tanji *et al.* 2007), *Nemipterus spp.* (Nalinanon *et al.* 2008), *T. alalunga* (Nalinanon *et al.* 2010a). Sin embargo, en el cíclido *P. splendida* y en la trucha *Oncorhynchus mykiss* se han determinado valores de pH óptimos poco comunes para la digestión ácida de 5 y 4 respectivamente (Perales-García, 2010; Furné *et al.* 2005). El que las proteasas tengan un determinado valor de pH en donde alcanzan su mayor actividad, es también el punto donde sus centros activos

presenta una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con gran eficiencia (Álvarez-González, 2003).

También se pone en manifiesto la presencia y abundancia de tal vez una sola isoforma para la digestión ácida, en este caso de tipo pepsina al comprobarlo con una inhibición mayor al 98% por el pepstatin A, inhibidor específico de la enzima pepsina A. La cual, en conjunto con el HCl segregado por las células gástricas, lleva a cabo en primera instancia la hidrólisis de las proteínas en condiciones ácidas por la enzima pepsina A; para después continuar la digestión y absorción de nutrientes en condiciones alcalinas en el intestino. En *C. trimaculatum*, las proteasas alcalinas tienen un pH óptimo de 10, lo cual es algo común encontrar en las distintas especies ya sea de hábitat marino o dulceacuícola; valores de pH óptimos entre 9 y 10 se han reportado en *Brycon orbignyanus* (García-Carreño *et al.* 2002); *Labeo rohita* y *Hypophthalmichthys molitrix* (Kumar *et al.* , 2007); *Thunnus orientalis* (Matus *et al.* 2007); *Ctenopharyngodon idella* (Liu *et al.* 2008); *O. niloticus* x *O. aureus* (Jun-Sheng *et al.* 2006); *D. puntazzo* (Tramati *et al.*, 2005). Sin embargo, se han reportado especies con diferentes valores de pH óptimos; incluso en una misma especie se han indicado dos valores de máxima actividad ejemplo de ello se ha dado para *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003) y *C. undecimalis* (Álvarez-González *et al.* 2010). Esto puede ser posible porque las proteasas alcalinas están constituidas por varios tipos de enzimas, las cuales tienen diferentes pH óptimos (Alarcón *et al.* 1998). El encontrar en *C. trimaculatum* un pH óptimo bien marcado, da la pauta a suponer que se encuentre un solo tipo o varios tipos de enzima en mayor proporción o que comparten el mismo valor de pH; en este caso podrían ser tipo carboxipeptidasa, elastasas o colagenasas; las cuales llegan a mostrar su máxima actividad en un rango de pH 9 a 10 (Matus *et al.* 2007). En *C. trimaculatum* esto también es posible porque se encontró una inhibición mayor al 75% por los inhibidores Fenantrolina y EDTA específicos de estas metal-proteasas. Las proteasas ácidas son estables a pH ácidos y su actividad disminuye al alcalinizarse el pH; mientras que las proteasas alcalinas son estables a pH alcalino y son resistentes a pH ligeramente ácidos, estas condiciones son similares a lo reportado en cíclido *P. splendida* (Perales-García, 2010). Pero en otros peces con tendencia a la carnivoría y de hábitat marino, las proteasas ácidas son estables por cierto tiempo a pH alcalinos como lo descrito para *T. thynnus* (Essed *et al.* 2002) y *S. maximus* (Hai-ying *et al.*

2006). Esto también se ha encontrado en especies carnívoras dulceacuícolas como *A. tropicus* (Guerrero-Zarate, 2010) y en especies omnívoras marinas como *S. senegalensis* (Sáenz *et al.* 2005). Desde el punto de vista fisiológico, el que las proteasas ácidas sean resistentes a pH alcalinos, permite a las proteasas ácidas seguir actuando en la degradación del alimento cuando éste pasa al intestino, hasta alcalinizarse, dando paso a la hidrólisis por parte de las proteasas alcalinas. Esto difícilmente podría suceder en *C. trimaculatum* debido a que las proteasas ácidas pierden actividad a pH neutro y alcalinos. Sin embargo, esta situación de pérdida de actividad es compensada por la hidrólisis que las proteasas alcalinas realizan a pH ácido, y que además se compensa con un largo intestino y fuertes esfínteres, que mantienen el alimento durante más tiempo, y la acción conjunta de las hormonas digestivas como la colecistoquinina que provoca los movimientos peristálticos, incrementando la superficie de contacto en la relación enzima-sustrato (Álvarez-González, 2003). De esta forma, las proteasas digestivas alcalinas podrían comenzar a actuar desde que el alimento entra al intestino aún con pH ácido. Es importante mencionar que por lo general las proteasas alcalinas son más estables a los diferentes pH, por el hecho de tener un mayor número de isoformas que las constituyen (tripsina, quimotripsina, l-aminopeptidasa y carboxipeptidasa A) como se demuestra en el zimograma al detectarse 7 bandas con actividad en el control sin inhibición, lo que aumenta la posibilidad de hidrolizar las proteínas del alimento a pesar de la variación del pH (Alarcón *et al.* , 1998). En cambio las proteasas ácidas suelen ser más susceptibles a los cambios de pH, al solo encontrarse una isoforma que corresponde a la pepsina, la cual al ser sometida a diferentes valores de pH, sufre cambios en su configuración estructural o desnaturalización y por lo consiguiente genera pérdida parcial o total en su actividad (Nalinanon *et al.* 2010b). Es decir, que estas variaciones de la actividad enzimática digestiva, son diferentes entre las especies, dependiendo de sus propios aspectos genéticos, y las condiciones de su hábitat. En este aspecto, la temperatura óptima de las proteasas alcalinas es 10 °C más elevadas a la temperatura óptima de las proteasas ácidas, y son más termoestables. Por lo regular esta diferencia entre las temperaturas óptimas de las proteasas alcalinas y ácidas se ha descrito en especies de hábitos carnívoros como en *T. thynnus* (Essed *et al.*, 2002); *B. orbignyana* (García-Carreño *et al.* 2002) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003). La temperatura óptima en las proteasas ácidas resultó de 55 °C igual a la descrita en el híbrido

de *O. niloticus* x *O. aureus* (Jun-Sheng *et al.* 2006), pero mayor a las encontradas en *S. senegalensis* (Sáenz *et al.* , 2005) y *T. orientalis* (Matus *et al.* 2007) con temperaturas óptimas de 37 y 45 °C. La actividad de las proteasas ácidas es estable hasta los 45 °C, incluso con actividades arriba del 100% en algunos de los tiempos de incubación, pero pierden su estabilidad en más del 60% a los 55 °C en adelante; esto podría deberse a la desnaturalización de la pepsina después de los 55 °C, coincidiendo con lo descrito por Nalinanon *et al.* (2008). En cambio las proteasas alcalinas tienen una temperatura óptima de 65 °C mayor a lo encontrado en *Carank hippos*, *Pseudupeneus maculatus*, *Sparisoma sp.*, *Hoplias malabaricus* (Alencar *et al.* 2003) y en *O. niloticus* (Bezerra *et al.* 2005), las cuales tienen una temperatura óptima de 50 a 55 °C. Además resultaron ser más termoestables, al verse afectadas únicamente en un 50% la actividad a temperaturas de 65 y 75 °C, aspecto parecido a lo encontrado para *C. undecimalis* (Álvarez-González *et al.* 2010) y *A. tropicus* (Guerrero-Zarate, 2010). Cabe mencionar que los valores de temperaturas óptimas y de estabilidad térmica de la actividad de las proteasas digestivas, son solamente parámetros operacionales de las enzimas, más que resultados de importancia fisiológica; los cuales pueden estar asociados a la configuración de las enzimas así como por el hábitat, medio ambiente y aspectos genéticos de las especies (Gildberg, 1998; Alarcón *et al.* 1998; Álvarez-González, 2003; Nalinanon *et al.* 2008). Sin embargo, esta deficiencia en la actividad se compensa con un mayor tiempo de retención de los alimentos en el sistema digestivo para efectuar la hidrólisis de las proteínas a temperaturas más bajas de su óptimos operacionales (Alarcón *et al.* 1998; Álvarez-González, 2003; Moyano, 2006; Uscanga *et al.* 2010). La determinación del tipo de enzimas que constituyen a las proteasas ácidas de *C. trimaculatum*, se realizó utilizando el inhibidor específico Pepstatin A, el cual inhibió en más del 98% la actividad de las proteasas ácidas, resultado menor al encontrado en especies de hábitos carnívoros como *S. maximus* (Hai-ying *et al.* 2006), *Siniperca chuatsi* (Zhou *et al.* 2008) y *Katsuwonus pelamis* (Nalinanon *et al.* 2010b) en donde se purifico y se inhibió totalmente la enzima pepsina con el inhibidor Pepstatin A. Por lo tanto, se pone en manifiesto que la hidrolisis en condiciones ácidas es llevada a cabo en mayor grado por la enzima de tipo pepsina.

Por otra parte, los siete tipos de inhibidores específicos para las proteasas alcalinas afectaron en por lo menos un 50% la actividad enzimática. De estas el grupo de las serina-proteasas resultaron inhibidas en más del 80% por el PMSF y reduciendo su actividad en un 50% ovoalbúmina y SBT1. Este patrón donde las serina-proteasas son bastante afectadas en relación al resto de las otras enzimas, resultó parecido a lo encontrado en *S. aequifasciata* (Chong *et al.*, 2002); *T. thynnus* (Essed *et al.* 2002) y *C. idella* (Liu *et al.* 2008). El otro grupo con una alta inhibición son las metal-proteasas con alrededor de un 80% de inhibición por Fenantrolina y EDTA. Esto indica que la digestión alcalina de *C. trimaculatum* tiene la capacidad de poder hidrolizar las proteínas a partir de los extremos carboxilo y amino, liberando aminoácidos, lo cual debe de ser considerado para la formulación de alimentos o para delimitar el uso de harinas o ingredientes que contengan inhibidores de metal-proteasas y serina-proteasas. El TPCK inhibió en un 60% la actividad de quimotripsina y el TLCK inhibió el 50% de la actividad de tripsina, confirmando la mayor proporción de quimotripsina en relación a tripsina, esto es diferente a lo encontrado en *B. orbignyanus* (García-Carreño *et al.*, 2002); *S. formosus* (Natalia *et al.*, 2004); donde se ha encontrado una mayor inhibición de tripsina por el inhibidor TLCK, por lo que la importancia de determinar los tipos de enzima que componen proteasas digestivas de las especies por medio de inhibidores específicos, permite delimitar el uso de ciertos ingredientes que pudieran reducir la actividad de ciertas enzima y limiten la digestibilidad de los alimentos (Essed *et al.* 2002).

En otros aspectos, el estudio de los inhibidores específicos de las proteasas alcalinas se acompañó con el análisis de electroforesis SDS-PAGE, en donde se presentaron siete bandas en el control conformadas en tres grupos de isoformas bien establecidas. El primero grupo de tres bandas con peso molecular entre 139.8 a 84.5 kDa, el segundo con dos bandas con peso molecular promedio de 36.7 kDa y el tercero con dos bandas con promedio de peso molecular de 22.75 kDa. El número de bandas encontradas en *C. trimaculatum* es igual al de *S. senegalensis* (Sáenz *et al.*, 2005) especie de hábitos omnívoros; pero mayor a los determinados en *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003), *P. splendida* (Perales-García, 2010), *C. undecimalis* (Álvarez-González *et al.* 2010), *A. tropicus* (Guerrero-Zarate, 2010) especies de hábitos carnívoros las cuales presentan de tres a cinco isoformas.

Asimismo, los inhibidores Ovoalbúmina, SBT1 y PMSF, específicos de serina-proteasas, resultaron los que mayor inhibición ejercieron al eliminar entre 3 a 4 bandas, siendo las más afectadas las bandas del tercer grupo. Las cuales pueden ser de tipo tripsina ó quimotripsina, debido a que este tipo de enzimas en forma purificada se han reportado en un rango de distribución de peso molecular de 22 a 28 kDa para tripsina y de 22 a 30 kDa para quimotripsina (Simpson, 2000; Castillo-Yáñez *et al.* 2005; Castillo-Yáñez *et al.* 2006; Castillo-Yáñez *et al.*, 2009; Ben *et al.* 2011). Sin embargo, los inhibidores específicos de tripsina (TLCK) y quimotripsina (TPCK) no inhibieron estas bandas, si no únicamente la primer banda con peso molecular de 139.8 kDa, lo cual es un poco contradictorio a lo antes mencionado por los inhibidores Ovoalbúmina, SBT1 y PMSF. Debido a que en especies como *S. sagax caerulea* (Castillo-Yáñez *et al.* , 2005) y *Sardinella aurita* (Ben *et al.*, 2011), la tripsina purificada mostró un peso molecular entre 25 kDa y 28.8 kDa respectivamente. Mientras que la quimotripsina purificada en *S. sagax caerulea* mostró un peso molecular de 25.5 kDa (Castillo-Yáñez *et al.* 2009), y adicionalmente, los inhibidores fenantrolina y EDTA específicos de metal-proteasas inhibieron de una y dos bandas en el primer grupo. Por lo que se sugiere realizar estudios con enzimas purificadas para determinar el tipo de enzimas específicas presentes para *C. trimaculatum*.

Conclusión

Considerando los aspectos bioquímicos y fisiológicos de esta investigación se pone en manifiesto que la digestión en *C. trimaculatum* es llevada a cabo tanto por proteasas ácidas como por proteasas alcalinas. En las proteasas ácidas, la enzima pepsina es la que lleva a cabo la mayor parte de la hidrólisis, pero es poco resistente a los parámetros de pH y temperatura. En cambio la digestión de las proteasas alcalinas es más estable a estos parámetros. Condiciones que le permiten a *C. trimaculatum* aprovechar las proteínas de su entorno y de alimentos formulados. Por lo tanto, esta especie desde el punto de vista de su capacidad digestiva apunta a ser considerada de hábitos omnívoros, con tendencia a la carnívora.

Referencias bibliográficas

Toledo *et al.*, 2013. Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Tahuina *Cichlasoma trimaculatum*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 405-459.

- Alarcón, F.J. (1997). Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, España. 187 pp.
- Alarcón, F.J. y Martínez-Díaz, M.I. (1998). Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa. *AQUANIC* 5:1-14.
- Alencar, B.R., Biondi, M.M., Paiva, M.V.L., Carvalho-Junior, B.L., Bezerra, S.R., 2003. Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. *Braz. J. Food Technol.* 6(2), 279-284.
- Alvarez del Villar, J. (1970). Peces mexicanos (Claves). Sec. Ind. Com. Direc. Gral. de Pesca e Ind. Conexas, 1-166.
- Álvarez-González, C.A. (2003). Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: serranidae). Tesis doctoral. CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, México. 180 pp.
- Álvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E. y Piedrahita, R. (2006). Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 31:83–93.
- Álvarez-González, C.A., Gabriela-Cortés, G., Jiménez-Martínez, L.D., Sánchez-Zamora, A., Arena-Ortiz, G., Martínez-Bruguete, T., Tovar-Ramírez, D., Concha-Frias, B., Márquez-Couturier, G., Perales-García, N., Asencio-Alcudia, G.G., Jesús-Ramírez, F. (2010a). Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., (Eds). Memorias del X Avances en Nutrición Acuícola y X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 99-232 pp.
- Álvarez-González, C.A., Márquez-Couturier, G., Arias-Rodríguez, L., Contreras-Sánchez, W.M., Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Moyano-López, F.J., Hernández-Jiménez, R., Civera-Cerecedo, R., Goytortua-Bores, E., Isidro-Olán, L., Almeida-Madrigal, J.A., Tovar-Ramírez, D., Gutiérrez-Ribera, J.N., Arévalo-Galán, L.M., Eric, G., Treviño, L. y Morales-Sánchez, B., 2008. Avances en la Fisiología Digestiva y Nutrición de la Mojarra Tenguayaca *Petenia splendida*. En: Cruz, S.E., Ricque, M.D., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A.,
- Álvarez-González, C.A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L. y Dumas, S. (2008). Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. I. Biochemical analysis. *Fish Physiol Biochem* 34:373–384.
- Álvarez-González, C.A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Nolasco-Soria, H., Tovar-Ramírez, D. y Dumas S. (2010b). Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: Electrophoretic analysis. *Fish Physiol Biochem* 36:29–37.

- Anson ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22:79–89
- Archibal, A.L. (1987). Comparison of the serum amylases of farm animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 88B (3):963-968.
- Baltazar, P.M. (2007). La tilapia en el Perú: Acuicultura, mercado y perspectivas. *Revista Peruana de Biología*. 13:267-273.
- Barletta, L. (2001). Importancia de la proteína en los peces. *Portal Veterinaria*, © 2003 <http://www.PortalVeterinaria.com> (consultado el 10 de febrero de 2011).
- Behal, F.J., Asserson, B., Dawson, F., Hardman, J. (1965). A study of human tissue aminopeptidase components. *Arch. Biochem. Biophys.* 111:335-344
- Ben KH, Jellouli K, Souissi N, Ghorbel S, Barkia A, Nasri M (2011) Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). *Fish Physiol Biochem* 37:123-133
- Bergmeyer HV (1974) Phosphatases methods of enzymatic analysis, vol 2. Academic Press, New York.
- Bezerra, S.R., Lins, J.F.E., Alencar, B.R., Paiva, M.G.P., Chaves, E.C.M., Coelho, C.B.B. L., Carvalho, B.L., 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry* 40,1829-1834
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72,248-54.
- Cara JB, Moyano FJ, Cardenas S, Fernandez-Diaz C, Yufera M (2003) Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J Fish Biol* 63:48-58
- Carrillo, F.O., Lee, A.M., Álvarez, V.C. (1987). *Bioquímica de la nutrición*. Editorial Pueblo y Educación. Habana, Cuba. 134-140 pp.
- Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MA (2005) Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*S. sagax caerulea*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 140:91-98
- Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MA, Félix-López M (2006) Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*S. sagax caerulea*). *Food Chemistry* 99(2):252-259
- Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez ME, García-Sánchez G, Quintero-Reyes IE (2009) Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food Chemistry* 112:634-639
- Chakrabarti, R., Mansingh, R.R., Mittal P. y Kumar, S. (2006). Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture* 253:694–702.
- Chan R (2004) Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno en la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México

- Chen BN, Jian GQ, Martin SK, Wayne GH, Steven MC (2006) Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 256:489-501
- Chong, A.S.C., Hashim, R., Chow-Yang, L., Ali, A.B. (2002). Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203:321-333.
- Chong-Carrillo, O., y Vega-Villasante, F., (eds.) y colectivo de autores (2004). El dicamaron. Diccionario de camaricultura. Editorial CIBNOR, S.C. y Universidad de la Habana. Formato electrónico CD. ISBN 968-5715-15-7.
- Conceição LEC, Aragão C, Richard N, Engrola S, Gavaia P, Mira S, Dias J (2010) Novel methodologies in marine fish larval nutrition. *Fish Physiol Biochem* 36:1-16
- Contreras M (2003) Inversión sexual de las mojarra nativas (*Cichlasoma salvini*) y (*Petenia splendida*), Mediante administración de oral de esteroides sintéticos. Tesis de Licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Cousin, J.C.B., Baudin-Laurencin, F., y Gabaudan, J. (1987). Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 30:15-33.
- Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., (Eds). Memorias del X Avances en Nutrición Acuícola y X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. pp. 99-232.
- D'Abramo, L., y Lovell, R.T. (1991). Aquaculture research needs for the year 2000. *Fish and Crustacean Nutrition. World Aquaculture* 22(2):57-62.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* 121,404-427.
- DelMar EG, Largman C, Broderick JW, Geokas MC (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* 99:316-320
- Diaz JP, Mani-Ponset L, Blasco C, Connes R (2002) Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post-embryonic development in three teleost species *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquat Living Resour* 15:196-178.
- Díaz M, Moyano FJ, García-Carreño LF, Alarcón FJ, Sarasquete MC (1997) Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquacult. Int.* 5: 461-471.
- Díaz-Ruiz, S., Aguirre L.A., y Cano, Q.E. (2006). Evaluación ecológica de las comunidades de peces en dos sistemas lagunares estuarinos del sur de Chiapas, México, *Hidrobiológica*, agosto, año/vol. 16, número 002. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F. pp. 197-210. *Hidrobiológica* 16(2):197-210.
- Dixon, M., y Webb, E. (1979). *Enzymes*. Academic Press 3 th. New York.
- Dupuis, Y., Tardival, S., Poremska, Z., y Fournier, P. (1991). Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *The International Journal of Biochemistry* 23:175-180.

- Elliot, J.P., Bellwood, D.R., 2003. Alimentary tract morphology and diet in three coral reef fish families. *J. Fish Biol.* 63,1598-1609.
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95:271–278
- Essed, Z., Fernández, I., Alarcón, F.J., y Moyano, F.J. (2002). Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4):99-107.
- Fabillo MD, Herrera AA, Abucay JS (2004) Effects of delayed first feeding on the development of the digestive tract y skeletal muscles of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. In: Proceedings 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture Philippine International Convention Center Roxas Boulevard, Manila, Philippines, pp 301-315
- FAO. (2004). Informe de la consulta de expertos sobre la aplicación de cuestiones asociadas con la inclusión de especies acuáticas explotadas comercialmente en los apéndices de la citas. En: Informe de Pesca N° 741. Food and Agriculture Organization (of the ONU). Disponible vía DIALOG. <http://www.fao.org/fi/website/>. (Consultado el 11 de febrero de 2011).
- FAO. (2006). Informe de políticas, Seguridad alimentaria, Numero 2, Junio de 2006, Roma. ftp://ftp.fao.org/es/ESA/policybriefs/pb_02_es.pdf (Consultado el 06 de febrero de 2011).
- Fernández I, Moyano FJ, Diaz M, Martínez T (2001) Characterization of a-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 262, 1–12.
- Folk JE, Schirmer EW (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase a system. *J Biol Chem* 238:3884–3894
- Frías-Quintana CA (2009) Diseño de alimentos microparticulados para larvas del pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. Tesis de maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Furné, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezainé, J., Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250,391-398.
- Galaviz M. A, García-Gasca A, Drawbridge M, Álvarez-González CA, López ML (2011) Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 318:162-168
- Galaviz M. A, García-Ortega A, Gisbert E, López LM, García GA (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 161:9-16
- García M. (2003) Determinación de la temperatura preferencial y metabolismo de la rutina de la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Tesis de licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- García-Carreño, F.L., Alburquerque-Cavalcanti, M.A., Navarrete del Toro y Zaniboni-Filho, E. (2002). Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects on protein quality. *Comp. Biochem. Physiol* 132B:343-352.

- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E. y Haard, N.F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214:65-69.
- Gawlicka A, Leggiadro CT, Gallart JW and Douglas SE (2001) Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization. *J. Fish Biol.* 58:529–536
- Gil, S. (1991). Distribución y abundancia de peces, de acuerdo con la salinidad, en la laguna de Tres Palos en Guerrero, México. Tesis. Universidad Autónoma de Guerrero. 78 pp.
- Gildberg A (1988) Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 91:425–435.
- Gisbert E, Gimenez G, Fernandez I, Kotzamanis Y, Estevez A (2009) Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287(3):381–387
- Gómez-González, A., Velázquez-Velázquez, E., y Rivera-Velázquez, G. (2005). Distribución, abundancia y estimación de la relación talla-peso de las mojarras. *Cichlasoma trimaculatum* y *Amphilophus macracanthus* (Perciformes: Cichlidae) en un sistema lagunar-estuarino, de Chiapas, México. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. 4 al 7 de Octubre de 2005. 107-108 pp.
- Govoni, J.J. (1980) Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.*, 39, 69-80.
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., y Watanabe, Y.L. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16, 59-77.
- Guerrero-Zarate, R. (2010). Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de maestría. Departamento de Recursos del Mar. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Mérida. Mérida, Yucatán, México. 101 pp.
- Hai-ying, W., Yue-jun, W., Qing-yin, W., Chang-hu, X., Mi, S. (2006). Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiol Biochem* 32B:179–188.
- Harris, H., (1989). The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta* 186, 133-150.
- He T, Xiao Z, Liu Q, Ma D, Xu S, Xiao Y, Li J (2012) Ontogeny of the digestive tract and enzymes in rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel 1844) larvae. *Fish Physiol Biochem* 38:297–308
- Hepher, B., (2001). Cultivo de peces comerciales. (Eds.), Limusa. México. 316 pp.
- Hidalgo MC, Urea E, Sanz A (1999) Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170:267-283
- Hirikado, M., Hirata, K., Uemarsu, Y., Hatooka, Y., y Kazama, M., (1994). Assay for activities of α -amylase and glucoamylase used in food processing. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 35:28-33.
- Iracheta, T.I., (2006). Determinación de las principales enzimas digestivas y efecto de diferentes regímenes alimenticios en larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

- Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Barkia, A. y Nasri, M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterization. *Food Chem* 116:644-650.
- Jiménez, C. (2004) Efecto de la temperatura en el crecimiento de crías de mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Jiménez-Martínez L. D., Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Gaxiola G, Sanchez-Zamora A, Moyano FJ, Alarcón FJ, Márquez-Couturier G, Gisbert E, Contreras-Sánchez WM, Perales-García N, Arias-Rodríguez L, Indy JR, Páramo-Delgadillo S, Palomino-Albarrán IG (2012). Digestive enzyme activities during early ontogeny in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiol Biochem* 38:441–454
- Jiménez-Martínez, L. D., Álvarez-González, C.A., Tovar-Ramírez, D., Gaxiola G., Sánchez-Zamora, A., Moyano, F.J., Alarcón, F.J., Márquez-Couturier, G., Gisbert, E., Contreras-Sánchez, W.M., Perales-García, N., Arias-Rodríguez, L., Indy, J.R., Páramo-Delgadillo, S., Palomino-Albarrán, I.G. (2012). Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiol Biochem* 38:441-454 pp.
- Jonas E, Ragyanssszki M, Olah J, Boross L (1983) Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio*) fishes. *Aquaculture* 30:145–154
- Jun-Sheng, L., Jian-Lin, L., Ting-Ting, W., 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). *Fish Physiol Biochem* 32,295-303.
- Kageyama T (2002) Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci* 59:288–306
- Kendall, A.W., Ahlstrom, E.H., y Moser, H.G. (1984). En: Molser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall A.W. Richardson, S.L., (Eds.), Ontogeny and systematics of fishes, American Society. Ichthyology. Herpetology. Spec. Public. I. Lawrence. 11-24 pp.
- Kim, K.W., Wang, X.J., y Bai, S.C. (2002). Optimum dietary level for maximum growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 33: 673-679.
- Kolkovski S (2001) Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200:181–201
- Kumar, S., García-Carreño, F.L., Chakrabarti, R., Toro, M.A.N., Córdova-Murueta, J.H., 2007. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency. *Aquaculture Nutrition* 13, 381-388.
- Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J Gen Physiol* 30:291–310
- Kvåle A, Mangor-Jensen A, Moren M, Espe M, Hamre K (2007) Development and characterization of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture* 264:457–468.

- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lazo J, Mendoza R, Holt GJ, Aguilera C, Arnold CR (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265:194–205
- Lazo, J. (2000). Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., López-Ramírez *et al.* , 2011 Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197–208.
- Lazo, J.P., 1999. Development of the digestive system in Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. P.h.D. Dissertation. The University of Texas at Austin. USA.
- Lazo, J.P., Viana, T.V., (eds.). Memoria del IX Avances en Nutrición Acuícola y IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. pp. 135-235.
- Lehninger, A.L., (1984). Bioquímica. Omega, Barcelona, España. 1198 pp.
- Li-Gen Z, Bing-Xin L, Le-Chang S, Kenji H, Wen-Jin S, Min-Jie C (2010) Identification of an aminopeptidase from the skeletal muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiol Biochem* 36:953–962
- Liu BX, Du XL, Zhou LG, Hara K, Su WJ, Cao MJ (2008) Purification and characterization of a leucine aminopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem* 108:140–147
- Liu, Z.Y., Wang, Z., Xu, S.Y., Xu, L.N., (2008). Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture Nutrition* 14,31-39.
- López-Ramírez, G., Cuenca-Soria, C.A., Álvarez-González, C.A., Tovar-Ramírez, D., Ortiz-Galindo, J.L., Perales-García, N., Márquez-Couturier, G., Arias-Rodríguez, L., Indy, J.R., Contreras-Sánchez, W.M., Gisbert, E., Moyano, F.J. (2011) Development of digestive enzymes in larvae of mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197-208.
- Ma H, Cahu C, Zambonino J, Yu H, Duan Q, Le Gall M, Mai K (2005) Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 245:239–248
- Maraux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim Biophys Acta* 321:282–295
- Márquez, C.G. (2011). Producción por acuicultura sustentable de pejelagarto en Comalcalco, Tabasco. Informe técnico MEX/SGP/OP4/Y3/ RAF/2009/22 Programa de Pequeñas Donaciones/FMAM/PNUD–Otot Ibam SPR de RL de CV. Comalcalco, Tabasco. México. 35 pp.
- Martínez J.L. (2004) Desarrollo embrionario larval de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Tesis de licenciatura. División Académica de ciencias Biológicas Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.

- Martínez-Palacios, C.A, y Ross, L.G. (1994) Biología y cultivo de la mojarra latinoamericana *Cichlasoma urophthalmus*. México Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Mathews, C.K., y Van Holde, K.E. (1998). Bioquímica. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Matus de la Parra, A., Rosas A., Lazo, J.P. y Viana, M.T., (2007). Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol Biochem* 33:223-231.
- Mendoza, E.A., Páramo, S.D., Contreras, M.W., Márquez, C.G., (1993). Alternativas para el desarrollo piscícola para el manejo complementario de áreas inundadas de Tabasco, México. En: Tabasco realidad y perspectiva, Vol. II. Gobierno del Estado de Tabasco. 263-279 pp.
- Miller, R. R. 1966. Geographical distribution of Central American freshwater Fisher. *Copeia* 1966(4): 773-802.
- Miller, R.R., Minckley, W.L., Norris, S.M. (2009). Peces Dulceacuícolas de México. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad/El Colegio de la Frontera Sur/Sociedad Ictiológica Mexicana, A.C. /Desert Fishes Council. México. 559 pp.
- Ming-Ji L, Chin-Feng W (2006) Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 261:1403-1412
- Moyano F.J. (2006) Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En editores: Cruz, S.E., Ricque, M.R., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A., Puello, C.A.C., y García, O.A. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5
- Moyano F.J. Diaz M, Alarcon FJ, Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 15:121-130
- Moyano, F.J., Barros, A.M., Prieto, A., Cañavate, J.P. y Cárdenas S. (2005). Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae) *Revista AquaTIC*, nº 22, 39-47 pp.
- Moyano, L.F.J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En editores: Cruz, S.E., Ricque, M.R., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A., Puello, C.A.C., y García, O.A. Avances en Nutrición Acuícola VII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., 2010a. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry* 121,49-55.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., 2010b. Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *European Food Research and Technology* 231,259-269.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., 2008. Tuna Pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) *J Food Sci* 73,C413-C419.

- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., Chong, A. (2004). Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* 233, 305–320.
- Nelson, J.S., E.J. Crossman, H. Espinosa-Pérez, L.T. Findley, C.R. Gilbert, R.N. Lea & J.D. Williams. (2004). *Common and Scientific Names of Fishes from the United States, Canada, and México*. American Fisheries Society, Special Publication 29. Bethesda. 386 pp.
- Orellana-Amador, J.J. (1992). *Inventario preliminar de los peces de agua dulce y marinos de El Salvador, América Central*. Secretaría Ejecutiva del Medio Ambiente.
- Pedersen, B., y Eggum, B.O. (1983). Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *J. Anim. Physiol.* 49, 265-277.
- Perales-García, N., (2009). *Ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida**. Tesis de maestría. División de Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 94 pp.
- Real-Ehuan G (2003) *Masculinización de crías de mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus* mediante la administración de 17 α -metiltestosterona*. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Cahu C, Dinis MT (1999) Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 170: 465-473
- Roby J. F, Whelan WJ (1968) The α -amylase. In: Radley JA (ed) *Starch and its derivatives*. Chapman and Hall, London, pp 430–497
- Rodiles-Hernández R., A. A. González Díaz y C. Chan-Sala. (2005). Lista de Peces Continentales de Chiapas, México. *Hidrobiologica* 15 (2 Especial): 245-253 pp.
- Rojas, C.P., Mendoza, A.R. (2000). *El cultivo de especies nativas en México*. Instituto Nacional de Pesca-SEMARNAP. Dirección General de Investigación en Acuicultura. Estado de salud en la Acuicultura. 1-42 pp.
- Sáenz de Rodrigáñez, M., Alarcón, F.J., Martínez, M.I., Ruiz, F., Díaz, M., y Moyano, F.J. (2005). Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4) 95-104.
- Salvensen, G. y Nagase, H. (1989). Inhibition of proteolytic enzymes. pp. 83-104. En: R. Beynon and J.S. Bond (Eds.). *Proteolytic enzymes*. IRL Press Oxford. UK.
- Sarbahi, D.S. (1951). Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus) and the largemouth black bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). *Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* 100: 24-257.
- Simpson, B.K. (2000). Digestive Proteases from Marine Animals. In: Haard, N.F., Simpson, B.K. (Eds.), *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, New York, NY, 191-213 pp.
- Stauffer, C., 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostand Reinhold/AVI. Nueva York.
- Steeffens, W. 1987. *Principios Fundamentales de la Alimentación de los Peces*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, Spain. 273 pp.

- Stroud, R. (1975). A family of proteins-cutting proteins. *Sci. Am.*, 231 (1), 74-89.
- Su-Hua C, Min-Jie C, Jian-Zhen H, Guo-Ping W (2011) Identification of a puromycin-sensitive aminopeptidase from zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 159:10-17
- Tanaka, M. (1973). Studies in the structure and function of the digestive system of teleost larvae. D. Agric. Thesis, Kyoto University, Japan.
- Tanji, M., Yakabe, E., Kageyama, T., Shin-ichi, Y., Ichinose, M., Miki, K., Ito, H., Takahashi, K., 2007. Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins. *Comp Biochem Physiol B* 146,412–420.
- Tengjaroenkul B, Smith BJ, Smith SA, Chatreewongsin U (2002) Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211:241–251
- Tramati, C., Savona, B., Mazzola, A., 2005. A study of the pattern of digestive enzymes in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) (Osteichthyes, Sparidae): evidence for the definition of nutritional protocols. *Aquaculture International* 13,89-95.
- Ueberschär, B. (1993). Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. (Walther, B. T. & Fuhn, H. J., Eds.), Univ. of Bergen, Norway.
- Uscanga A (2006) Determinación de requerimiento de proteína en juveniles masculinizados y no masculinizados de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*). Tesis de Maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Uscanga, A., Moyano, F. J., Álvarez C. A., 2010. Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 36:1079-1085.
- Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Álvarez-González CA, Moyano FJ, Tovar-Ramírez D, Gisbert GE, Márquez-Couturier G, Contreras-Sánchez WM, Arias-Rodríguez L, Indy JR (2011) Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendid*. *Fish Physiol Biochem* 37:667–680
- Uscanga-Martínez, A., Velázquez-Velázquez, E., Rodríguez-Valencia, W., y Gómez-Gómez, M.A. (2012). “Estudio reproductivo para el cultivo de mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum*” Libro de resúmenes del XIII congreso nacional de ictiología y 1er simposio latinoamericano de ictiología. Facultad de Ciencias Biológicas-UNICACH. 28 de octubre al 02 de noviembre de 2012, en San Cristóbal de las Casas, Chiapas.
- Velázquez-Velázquez, E., Vega-Cendejas, M.E., y Rivera-Velázquez, G. (2005). Riqueza y distribución de peces en un sistema estuarino-lagunar, de la reserva de la biosfera la encrucijada, Chiapas, México. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. 4 al 7 de Octubre de 2005. 64 pp.
- Vendrell J, Querol E, Avilés FX (2000) Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim Biophys Acta* 1477:284-298

- Versaw W, Cuppett S. L, Winters D. D, Williams L.E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J Food Sci* 54:232–254
- Verschelle D, Léger P, Lavens P, Sorgeloos P (1989) L'utilisation d'artémia. In: Barnabé G (ed) *Aquaculture. Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, p. 241-259
- Vidal J.M. (2004) Masculinización de crías de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günter 1862 mediante bioencapsulado del esteroide con 17- α metiltestosterona en nauplios de *Artemia salina*. Tesis de Licenciatura Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Violante, G.J. (1995). Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum* (Gunter, 1868), en la laguna de Tres Palos Guerrero, México, y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría. Facultad de ciencias marinas. Universidad de Colima. Manzanillo, Colima. 70 pp.
- Violante-González, J., Aguirre-Macedo, M.L., y Rojas-Herrera, A., (2008). Comunidad de parásitos metazoarios de la charra *Cichlasoma trimaculatum* en la laguna de Tres Palos, Guerrero, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 405-412.
- Vonk HJ, Western JRH (1984) *Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion*. Academic Press, London.
- Walter H.E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HJ (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol V. Verlag Chemie, Weinham, Pp 270–277
- Whitaker, J.R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. 2a ed., Marcel Dekker, INC, New York, 789 pp.
- Williams DE, Reisfeld RA (1964) Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffers. *Ann N Y Acad Sci* 121:373–381
- Xiu-Juan S, Huang W, Cao L, Zhi-Zhong X, Shuo-Zeng D (2009) Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae *Fish Physiol Biochem* 35:385–398
- Yáñez-Arancibia, A. (1978). Taxonomía, ecología y estructura de las comunidades de peces en lagunas costeras con bocas efímeras del Pacífico de México. Centro de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Autónoma de México, México, D.F. *Publicaciones especiales* (2): 1-306 pp.
- Yúfera M, Darias MJ (2007) Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 267:94–99.
- Yúfera M, Fernández-Díaz C, Vidaurreta A, Cara JB, Moyano FJ (2004) Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* L. (Pisces: Teleostei). *Mar. Biol.* 144:863–869
- Zaiss MM, Papadakis IE, Maingot E, Divanach P, Mylonas CC (2006) Ontogeny of the digestive tract in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) reared using the mesocosm larval rearing system. *Aquaculture* 260:357–368

- Zamani A, Hajimoradloo A, Madani R, Farhangi M. (2009) Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of the endangered Caspian brown trout *Salmo caspius*. *Journal of Fish Biology* 75:932–937
- Zambonino-Infante J, Gisbert E, Sarasquete C, Navarro I, Gutiérrez J, Cahu CL (2008) Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and Digestive Functions of Fish*. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 277–344
- Zambonino-Infante JL, and Cahu CL (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 130:477-487
- Zambonino-Infante JL, Cahu C (1994) Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 12(5): 399-408
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL (2007) Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268:98–105
- Zhou, Q., Guang-Ming, L., Yuan-Yuan, H., Weng, L., Hara, K., Wen-Jin, S., Min-Jie, C., 2008. Pepsinogens and pepsins from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *J. Agric. Food Chem.* 56,5401-5406.
- Zouiten, D., Ben K.I., Besbes, R., y Cahu, C. (2008). Ontogeny of the digestive tract of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) larvae reared in “mesocosms” *Aquaculture* 279 166–172.

Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Castarrica

Cichlasoma urophthalmus

Carlos Alberto Cuenca-Soria^{1,3}, Carlos Alfonso Álvarez-González², Dariel Tovar-Ramírez⁴, José Luis Ortiz-Galindo¹, Sandra Aguilar-Hernández³, Martha Alicia Perera García³, Raúl Hernández Gómez³, Alfonso Castillo-Domínguez³, Enric Gisbert-Casas⁵

¹Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Col. Playa Palo de Sta. Rita, Apdo. Postal 592, La Paz B.C.S. 23096, México.

²Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Laboratorio de Acuicultura Tropical UJAT-DACBIOL. Carretera Villahermosa-Cárdenas km. 0.5, Villahermosa Tabasco 86139, México.

³Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. UJAT-DAMR. Carretera Tenosique-Estapilla km 1, Tenosique Tabasco 86901, México. Email: carlos.cuenca@ujat.mx; ccuencas0900@ipn.mx

⁴Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Apdo. Postal 128; La Paz, BCS 23090, México.

⁵Recerca I Tecnologia Agroalimentàries. Carretera Poble Nou km 5.5, P. O. Box 200, 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona, España.

Resumen

Para mejorar los protocolos de alimentación en los larvicultivos, es menester conocer los cambios morfofuncionales, durante la ontogenia inicial de los peces. El objeto del presente trabajo fue estudiar los cambios morfológicos y de expresión génica ligada a enzimas digestivas en período larvario (0 al 30 después de la eclosión (dde)), así como caracterizar enzimas digestivas en juveniles de *C. urophthalmus*. Para los estudios morfológicos, las muestras fueron teñidas por H&E y PAS/AB; mientras que para los estudios moleculares, se realizó PCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos diseñados para amplificación de α -amilasa, lipasa (dependiente de sales biliares) y fosfatasa alcalina, a partir de cDNA de *C. urophthalmus*, y determinar su expresión génica. También se valoró la actividad específica de tripsina, quimiotripsina, leucina aminopeptidasa, carboxipeptidasa A, α -amilasa y fosfatasas, presentes en extractos multienzimáticos de estómago e intestino. Se realizaron pruebas de inhibición enzimática y se determinó el pH y temperatura óptimos, de proteasas en condiciones ácidas y alcalinas; así como el efecto de ambos factores, sobre la estabilidad de ambos tipos de enzimas. Los resultados histológicos mostraron que *C. urophthalmus* desarrolla cambios morfofuncionales relativamente rápidos en estómago, con glándulas gástricas funcionales a los 14

dde. Los estudios moleculares revelaron importante expresión génica de lipasa dependiente de sales biliares y α -amilasa, a partir de los 3 dde, indicando diferenciación y funcionalidad pancreática. Los estudios de caracterización enzimática en *C. urophthalmus* demostraron importante actividad de proteasas ácidas y alcalinas (con cierto predominio de éstas últimas), evidenciando hábitos omnívoros, con tendencia a carnivoría.

Palabras clave: Fisiología, digestiva, *Cichlasoma*, *urophthalmus*.

Introducción

Actualmente, el larvicultivo de los peces es quizá uno de las etapas más críticas en acuicultura, debido a las altas mortalidades que se presentan, frecuentemente asociadas a deficiencias nutricionales, deficientes protocolos de alimentación, entre otros. El crecimiento y la supervivencia de las larvas de peces dependen del éxito de la alimentación y la efectiva digestión y absorción de nutrientes (Tanaka *et al.*, 1995). En este contexto, uno de los aspectos a considerar en el diseño de protocolos de alimentación, basados en presas vivas o alimentos inertes, es la morfología y fisiología del sistema digestivo de los peces. Las larvas pueden ser morfológicamente capaces de capturar presas, a la primera alimentación (Segner *et al.*, 1994; Bisbal y Bengtson, 1995), pero el sistema digestivo requiere una serie de cambios de desarrollo antes de ser completamente funcional (Govoni *et al.*, 1986). Muchos trabajos han enfatizado la importancia de conducir estudios específicos acerca de la organogénesis del tracto digestivo, con el fin de comprender mejor la fisiología nutricional y la funcionalidad (Lazo *et al.*, 2011). Por lo tanto, el conocimiento acerca de los cambios morfológicos y funcionales durante la ontogenia inicial de los peces es de capital importancia, con miras a sentar las bases para la tecnología de cultivo, de acuerdo a la habilidad digestiva, durante la ontogenia inicial de los peces (Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Lazo *et al.*, 2011). Aunque los peces son un grupo taxonómico diverso, los mecanismos básicos del desarrollo de órganos y sistemas son similares en todos los teleósteos, aún cuando hay considerables diferencias interespecíficas, con relación al “timing” de su diferenciación, desarrollo y funcionalidad, durante su ontogenia inicial (Lazo *et al.*, 2011). Sin embargo, existen considerables diferencias en lo que concierne al timing de cambios morfológicos y citológicos, durante la ontogenia inicial de los peces, dado que depende de varios factores. Entre estos factores, la temperatura, composición del alimento, así como la calidad del agua, son algunos factores importantes (Zambonino-Infante y Cahu, 2007). El timing del desarrollo de órganos y las funciones fisiológicas son afectadas por la historia general de vida y las estrategias reproductivas de cada especie (Lazo *et al.*, 2011). Por consiguiente, existen diferencias específicas en el timing de la diferenciación de órganos, como en los cíclidos, lo cual ha sido relacionado a su estrategia reproductiva. (Treviño *et al.*, 2010). El cíclido maya *C. urophthalmus*

(Günther, 1862), es una de las especies neotropicales en la que se han enfocado más estudios en la actualidad, debido a su alto potencial para la acuicultura. Esta especie goza de una alta demanda en el mercado, a lo cual se agrega su alta adaptabilidad en cautiverio, alta fertilidad, elevada tasa de crecimiento y supervivencia. Sin embargo, actualmente el cultivo de esta especie es aún limitado, debido al poco conocimiento de su desarrollo digestivo a lo largo de su ontogenia inicial. El objeto del presente estudio fue dilucidar la organogénesis, durante la ontogenia inicial de la mojarra castarrica *C. urophthalmus*.

Antecedentes

Es necesario enfatizar que el éxito de los protocolos de alimentación en peces, dependen sumariamente del conocimiento de los tiempos en los que se dan los cambios morfológicos y de la capacidad digestiva y fisiológica, los cuales están estrechamente relacionados con la estrategia reproductiva de la especie. Es necesario llevar a cabo estudios sobre la organogénesis según la especie, para una mejor comprensión de su fisiología nutricional (Treviño *et al.*, 2010). Por tanto, es menester el conocimiento acerca de los cambios morfológicos y en los tiempos en los que tienen lugar estos cambios,

Estudios histológicos y morfológicos

El conocimiento acerca del desarrollo digestivo en peces, facilitará la resolución de los cuellos de botella en los larvicultivos de peces, hacia la substitución total o parcial del alimento vivo, por formulaciones inertes. En este sentido, la ontogenia del tracto digestivo de larvas de peces ha sido objeto de muchos estudios en los pasados 25 años, principalmente en peces de importancia comercial (Lazo *et al.*, 2011). Entonces, los trabajos en lo que concierne a los cambios morfológicos e histológicos a lo largo de la ontogenia inicial son notoriamente vastos, principalmente en peces marinos, tales como *Diplodus sargus* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003), *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004), *Pagellus erythrinus* (Micale *et al.*, 2006) y *Scophthalmus rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009); y de agua dulce como en *Sander lucioperca* (Ostaszewska, 2005) y cíclidos como *Oreochromis niloticus* (Morrison

et al., 2001) y *Petenia splendida* (Treviño *et al.*, 2010). Las técnicas histológicas han permitido disponer de una base importante, para contribuir a dilucidar los cambios morfológicos que se suscitan en la ontogenia inicial de peces.

Estudios de expresión de genes de enzimas digestivas

Los estudios con relación a la expresión molecular de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial en peces, cobran cada vez importancia capital, pues permiten realizar estudios de modo que se tenga una visión más integral de la dinámica de cambios morfofuncionales, en estos períodos críticos de cultivo. El conocimiento de la expresión de genes constituye una herramienta invaluable que complementa la información acerca de la condición nutricional de un organismo, obtenido a través de sus indicadores enzimáticos (Lazo *et al.*, 2011). Sobresalen los trabajos en el pez *Hippoglossus hippoglossus* (Murray *et al.*, 2006), *Pagrus pagrus* (Darias *et al.*, 2006) y *Sphoeroides annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006) entre otros.

Estudios de caracterización enzimática

Existen diversos estudios sobre enzimas digestivas en peces marinos, como la lobina europea marina *Dicentrarchus labrax*, la sardina Monterey *Sardinops sagax caerulea*, el atún azul *Thunnus orientalis*, y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Lindnerl *et al.*, 1995; Castillo-Yáñez *et al.*, 2005; Matus de la Parra *et al.*, 2007; Álvarez-González *et al.*, 2008, respectivamente). Asimismo, cada vez son más relevantes los estudios sobre la fisiología digestiva en peces de agua dulce. Natalia *et al.*, (2003) realizaron la caracterización de enzimas digestivas del pez carnívoro ornamental *Scleropages formosus*, revelando que pese a sus hábitos carnívoros, puede asimilar alimentos inertes artificiales. Lundstedt *et al.*, (2004) trabajaron niveles entre 20 y 50% de proteína cruda y entre 1.9 y 36.2% de almidón en la dieta para encontrar su relación con la actividad enzimática en el bagre de agua dulce *Pseudoplatystoma corruscans*, encontrando las mejores niveles de proteína y almidón dietarios entre 30-40% y 13-25%, para el pez respectivamente con base a la respuesta enzimática. Furné *et al.*, (2005) realizaron un estudio comparativo, al evaluar

la actividad de proteasas, amilasas y lipasas del esturión *Acipenser naccarii* y la trucha de agua dulce *Oncorhynchus mykiss*, indicando que el primero mostró características de un pez omnívoro, por su alta actividad de amilasas y en menor grado de proteasas y lipasas. Debnath *et al.*, (2007), estudiaron el efecto de la composición de la dieta, sobre la actividad de enzimas digestivas en la carpa rohu *Labeo rohita*, determinando que un 30% de proteína cruda en la dieta, fue la que mejor respondió a la maquinaria enzimática del pez y por tanto, obtuvo el menor índice hepatosomático y uno de los mayores rendimientos en peso. Zhong-yi *et al.*, (2008), aislaron catepsina D, a partir de intestino de carpa herbívora *Ctenopharyngodon idellus* con el fin de efectuar pruebas de inhibición y obtener el pH y temperatura óptimas. Perales-García (2009) caracterizó las proteasas de la tenhuayaca *Petenia splendida*, encontrando que sus proteasas digestivas son similares a la de otras especies, y que posee una maquinaria enzimática típica de un pez de hábitos carnívoros estricto. Guerrero-Zarate (2010) exploró las enzimas digestivas presentes en el pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus*, evaluando la actividad de lipasas y demostrando resistencia de proteasas ácidas medios alcalinos y de proteasas alcalinas en medios ácidos, observando entonces actividad enzimática conjunta de proteasas ácidas y alcalinas en intestino.

Estudios histológicos

Material y métodos

Las larvas de *C. urophthalmus* fueron recolectadas a partir de un desove espontáneo (hembras: machos, 3:1), mantenidas en cautiverio dentro de las instalaciones de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México. Las larvas eclosionadas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* no enriquecidos (INVE Aquaculture Nutrition, Bélgica) tres veces por día a saciedad, a partir de los 6 días después de la eclosión (dde) a los 15 dde. De esta edad a los 30 dde, las larvas fueron alimentadas con alimento comercial para trucha (45% de proteína y 16% de lípidos), Nelson and Sons Inc. Las larvas fueron muestreadas del 1 al 30 dde, fijadas en líquido de Bouin y formol al 4% y preservadas en etanol al 50%. Las larvas fueron fotografiadas con un microscopio equipado con cámara fotográfica (ANALYSISTM Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Alemania). Las imágenes fueron utilizadas para las medidas morfométricas (longitud

estándar, altura y saco vitelino). El volumen del saco vitelino fue estimado con la fórmula propuesta por Heming y Buddington, (1988), $V = (1/6)ab^2$, donde V (mm^3) = volumen del saco, a y b longitud máxima y mínima (mm), respectivamente. Las larvas muestreadas fueron deshidratadas con series crecientes de alcohol (50, 75 y 100%) y embebidas en parafina, con el procesador automático de tejidos Histolab ZX-60 Myr (Especialidades Médicas MYR SL, Tarragona, España). Los bloques de parafina fueron elaborados en un dispensador de parafina AP280-2 Myr y cortados en secciones sagitales de 3 μm de grosor, con un micrótopo automático Microm HM (Leica Microsystems Nussioch GmbH, Alemania). Los cortes fueron mantenidos a 40 °C, toda la noche. Posteriormente, las muestras fueron desparafinadas en series crecientes de xileno y teñidas con Hematoxilina-Eosina (H&E), para las observaciones morfológicas generales del tracto digestivo de larvas. La tinción histoquímica a base de ácido peryódico, Reactivo de Schiff (PAS) y Alcian Blue (AB) a pH 0.5, 1.0 y 2.5 fueron realizados para la detección de compuestos neutros, carboxílicos y sulfatados (respectivamente), en células mucosas (Pearse, 1985) del tracto digestivo. Finalmente, las preparaciones histológicas de larvas fueron observadas en un microscopio, Leica DMLB, equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Leica Microsystems Nussioch GmbH, Alemania).

Resultados

En la figura 1, es posible visualizar el crecimiento en longitud estándar, de larvas de *C. urophthalmus* hasta los 30 días dde. Se puede observar un crecimiento tipo potencial, según la ecuación SL (mm) = 2.08 Ln (T) + 0.58 ($R^2 = 0.99$, $p < 0.05$), donde SL = Longitud estándar (mm) y T = Edad (días). De modo paralelo, a la eclosión, el saco vitelino ocupa la mayor parte de la cavidad abdominal, con un volumen promedio de $1.08 \pm 0.05 \text{ mm}^3$ no obstante, tal volumen se reduce en 59.3% ($0.44 \pm 0.07 \text{ mm}^3$) después de 3 dde ($3.14 \pm 0.01 \text{ mm}$) y 81.2% a los 5 dde ($3.91 \pm 0.13 \text{ mm}$). El consumo del saco vitelino está correlacionado con la edad larvaria y descrita por la ecuación $YSV = -0.18 (T) + 0.18$ ($R^2 = 0.98$, $p < 0.01$), donde YSV = volumen del saco vitelino (mm^3) y T = edad (días) (figura interior de la figura 1).

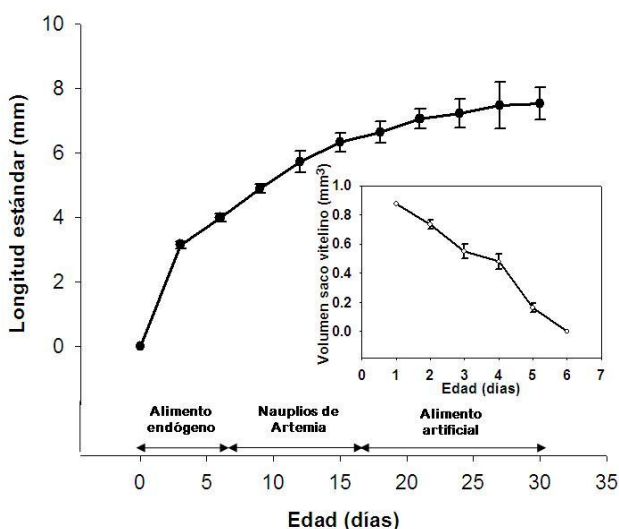


Figura 1. Crecimiento en longitud estándar, y decaimiento del saco vitelino, durante la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus*.

Saco vitelino

Macroscópicamente, el saco no fue más visible a los 6 dde sin embargo, remanentes de saco vitelino fueron microscópicamente visibles junto al tejido hepático, el cual rodea los remanentes a los 16 dde (6.61 ± 0.4 mm). Microscópicamente, el saco vitelino se encontró rodeado por un epitelio sincitial, el cual consistió en cúmulos eosinofílicos de acumulación de proteína (yolk platelets) (figura 2a).

Bucofaringe

A la eclosión, la cavidad bucofaringea fue corta y linealizada con escasas células mucosas. Estas células secretoras se tiñeron de azul y púrpura con PAS y AB pH 2.5, 1.0 y 0.5, indicando la presencia de una combinación de mucinas neutras y ácidas (carboxiladas y sulfatadas). Al 3 dde (3.14 ± 0.11 mm) comenzó la aparición de los primeros dientes caninos hacia el lumen bucofaríngeo. Se observaron ionocitos distribuidos en la parte anterior de la cavidad oral, mientras los primeros corpúsculos gustativos (figura 2b), estuvieron presentes en la región posterior de la bucofaringe. Al 7 dde (4.45 ± 0.23 mm), surgieron las primeras papilas bucofaringeas. El número de células mucosas, dientes

caninos y papilas bucofaringeas se incrementó conforme tuvo lugar el desarrollo larvario (figura 2c).

Esófago

Entre el 1 y los 2 dde, el esófago comenzó a diferenciarse como un ducto corto linealizado por epitelio cúbico con células mucosas (18 ± 4 células in $100 \mu\text{m}$ de epitelio), conectado por la cavidad faríngea con el intestino anterior. Los estudios histoquímicos revelaron que la mayoría de las células mucosas fueron teñidas en magenta (PAS positivo), mientras pocas fueron teñidas en azul pálido (AB pH 0.5, 1.0, 2.5), lo cual indica que contienen glicoproteínas neutrales y acídicas (carboxiladas y sulfatadas), respectivamente. A esta edad, la mayor parte de las células mucosas en esófago producen una mezcla de glicoproteínas neutrales (PAS positivo) y acídicas (AB pH 0.5, 1.0 y 2.5). A los 24 dde, todo el epitelio esofageal estuvo cubierto por células mucosas (21.3 ± 2.5 células en $100 \mu\text{m}$ de tejido esofageal) (figura 2d). En etapas posteriores de desarrollo, el esófago no sufre cambios mayores.

Estómago

Entre los 3 y 4 dde el estómago cardiaco comenzó a formarse, como producto de una dilatación entre el esófago y el intestino medio (figura 2e). Esta área fue linealizada por epitelio columnar pseudoestratificado, carente de células mucosas y los distinguibles incipientes pliegues mucosales. La constricción que separó el estómago del intestino fue visible a los 4 dde, (futuro esfínter pilórico). A los 9 dde (4.86 ± 0.09 mm), los primeros clusters de células cúbicas formando las glándulas gástricas fueron observadas en la región media-posterior de un estómago en desarrollo (figura 2g), mientras que en la superficie interna en forma de pólipo se observaron los micropliegues que se tornan eosinófilos con PAS 2.5 (figura 2f). A los 9 dde (4.88 ± 0.14 mm), las primeras células mucosas secretaron glicoconjugados neutros (PAS positivo) las cuales, fueron visibles en la mucosa gástrica. A los 14 dde (6.35 ± 0.17 mm) su número y reactividad al PAS positivo, incrementó. A los 19 dde (7.02 ± 0.25 mm) es posible distinguir tres regiones en el estómago: estómago

cardias, estómago fundus y estómago pilórico (figura 2i). El primero consiste en una amplia cavidad, linealizada por epitelio simple ciliado columnar y una delgada capa de mucosa y otra capa de tejido muscular liso. El segundo ocupó la mayoría del estómago y estuvo linealizado por epitelio ciliado columnar simple, con células mucosas y glándulas gástricas alargadas. La región pilórica del estómago fue corta y linealizada por epitelio columnar, desprovista de glándulas gástricas. Los rasgos histológicos del estómago no experimentaron cambios remarcables hasta el final del estudio, con la excepción del crecimiento en tamaño y cantidad de glándulas gástricas.

Intestino

A la eclosión, el intestino fue un tubo recto linealizado por tejido columnar con micropliegues y desprovisto de células mucosas. A los 2 dde, la mucosa intestinal comenzó a formar incipientes pliegues y las primeras células mucosas aparecieron entre los enterocitos del epitelio intestinal. A esta edad, cuerpos de inclusión supranucleares eosinofílicos (PAS positivo) fueron detectados en enterocitos del intestino anterior (figura 2L). A los 3 dde, estas células fueron teñidas de magenta (PAS positivo), mientras algunas otras en azul pálido (AB, pH 0.5, 1.0, 2.5 positivo), indicando diferentes contenidos de glicoproteínas neutrales y acídicas (carboxiladas y sulfatadas), respectivamente. A los 4 dde (3.94 ± 0.03 mm), el intestino experimentó una curvatura y la válvula intestinal separando la región anterior de la posterior (figura 2m). Ambas regiones fueron linealizadas con epitelio columnar simple con núcleos basales, un citoplasma ligeramente basofílico y prominentes micropliegues eosinófilos. Entre el 5 y 6 dde, coincidiendo con el inicio de la primera alimentación exógena, las primeras vacuolas lipídicas estuvieron presentes dentro de los enterocitos en ambas regiones del intestino. Las células mucosas fueron teñidas en púrpura, indicando que su contenido fue una mezcla de glicoproteínas neutrales (PAS positivo) y acídicas (AB pH 0.5, 1.0 y 2.5 positivo), mientras unas pocas contenían glicoproteínas neutrales o acídicas. Entre los 6 y 8 dde (4.52 ± 0.14 mm) varias diferencias morfológicas fueron visibles entre el intestino anterior y posterior, particularmente en la cantidad de vacuolas lipídicas (más abundantes en el primero que en el segundo), indicando que el intestino anterior fue el sitio primario de absorción de lípidos

en intestino. Por otro lado, los pliegues intestinales fueron más altos y abundantes en intestino posterior que en intestino anterior (12.3 ± 1.9 vs. 2.7 ± 0.4 células en $100 \mu\text{m}$ de epitelio). Los pliegues del intestino incrementaron considerablemente entre los 11 y 14 dde, coincidiendo con el desarrollo de las glándulas gástricas en el estómago. A partir de los 11 dde, no se hallaron cambios morfoanatómicos de significancia en la mucosa intestinal hasta el final del estudio, con la excepción del progresivo aumento de la longitud del intestino y grosor de la mucosa intestinal, así como en el incremento en tamaño y cantidad de pliegues intestinales. De manera atípica, entre los 21 y 24 dde (7.05 ± 0.41 mm) se visualizaron cuerpos supranucleares eosinófilos (PAS positivo) en intestino posterior.

Glándulas accesorias

A la eclosión, el hígado de *C. urophthalmus* ya se encuentra desarrollado y aparece como una masa lobular que cubre gran parte de la cavidad abdominal (casi hasta el poro anal). El tejido hepático consistió de hepatocitos poliédricos con núcleo central, reducido citoplasma eosinófilo y pocas y pequeñas inclusiones lipídicas ($10.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$ de diámetro). Los ductos biliares fueron visibles entre el 2 y los 3 dde y estuvieron linealizados por epitelio ciliado columnar con núcleos basales, ocupando la mayor parte del citoplasma. A los 7 dde, los hepatocitos comienzan a acumular gran cantidad de lípidos (figura 2ñ), ya que el diámetro de las vacuolas incrementó ($16.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$). Coincidiendo con el inicio de la alimentación exógena, los depósitos de lípidos y glicógeno (PAS positivo) incrementaron progresivamente dentro de los hepatocitos. A los 16 dde (6.61 ± 0.40 mm), las vacuolas lipídicas ocuparon la mayor parte del citoplasma ($71.1 \pm 5.3 \mu\text{m}$), desplazando a los núcleos a la periferia de los hepatocitos lo cual, resultó en un decremento en el almacenamiento de glicógeno (PAS positivo) en el hígado. El páncreas fue organizado por células basofílicas poliédricas, en cúmulos de células acinares en forma de roseta, con gránulos de zimógeno (PAS positivo). Entre los 2 y 4 dde, estos gránulos se tiñeron intensamente, lo que indica su aumento marcado dentro de las células acinares, con implicaciones de una importante síntesis de precursores de enzimas pancreáticas. A los 3

dde, el páncreas endócrino y exocrino fueron notoriamente visibles, aumentando en tamaño, con respecto al tiempo.

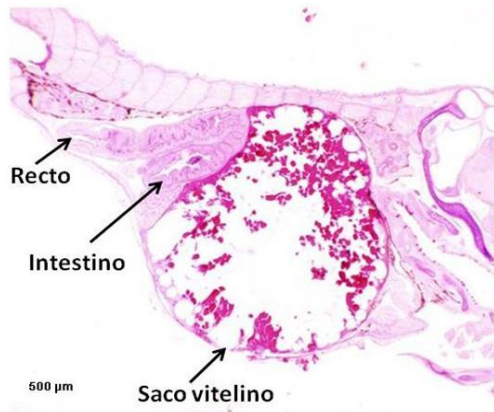


Figura 2a. Saco vitelino 3 dde, PAS 2.5

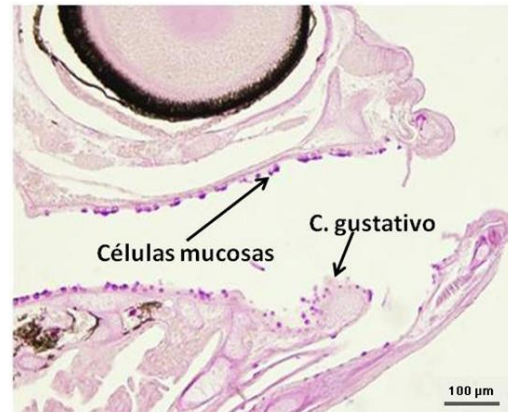


Figura 2b. Bucofaringe, células mucosas 3 dde, PAS 2.5

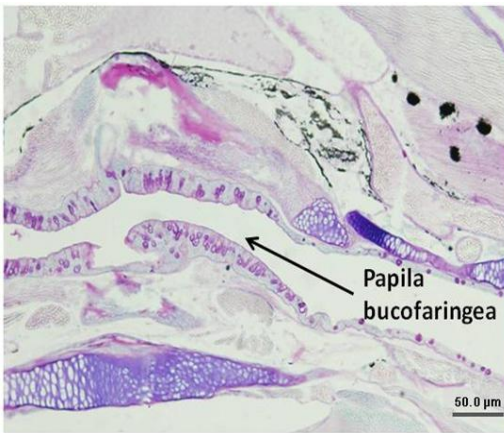


Figura 2c. Bucofaringe: papila bucofaringea 19 dde, PAS 2.5

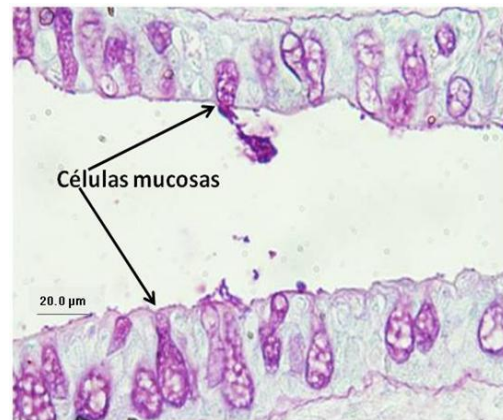


Figura 2d. Esófago: células mucosas 24 dde, PAS 2.5

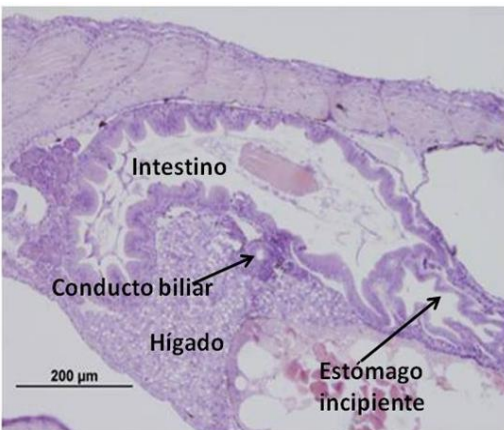


Figura 2e. Esófago diferenciado 4 dde, H&E

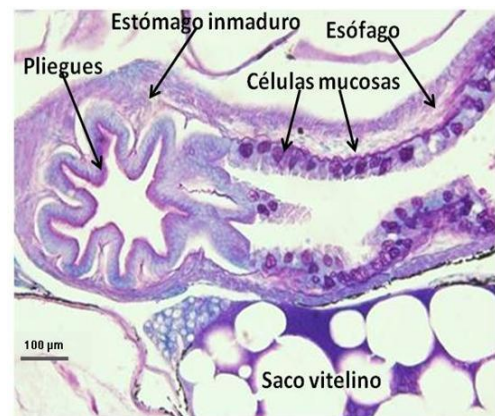


Figura 2f. Estómago: micropliegues 7 dde, PAS 2.5

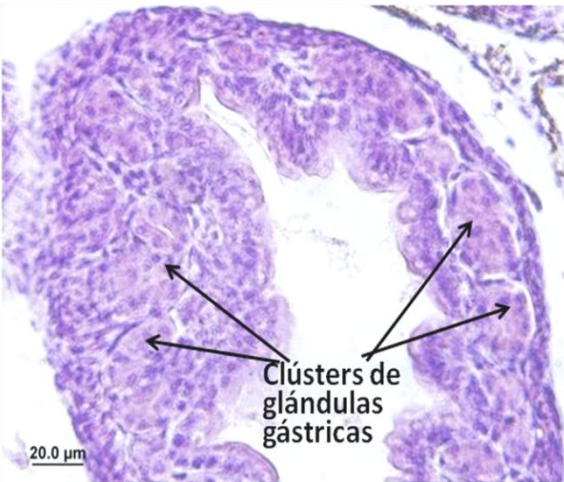


Figura 2g. Estómago: glándulas gástricas 9 dde, H&E

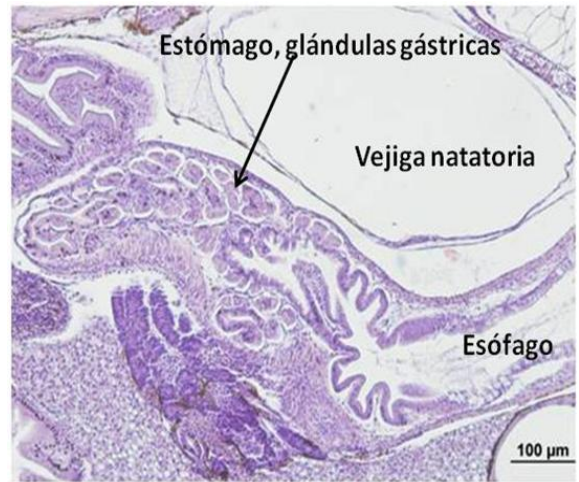


Figura 2h. Estómago: mucopolisacáridos 24 dde, PAS 2.5

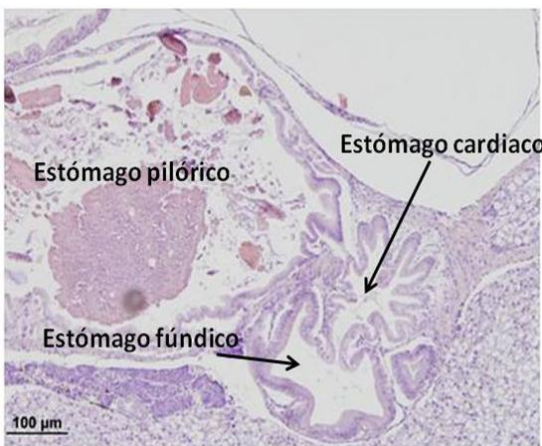


Figura 2i. Estómago, regionalización 19 dde, H&E

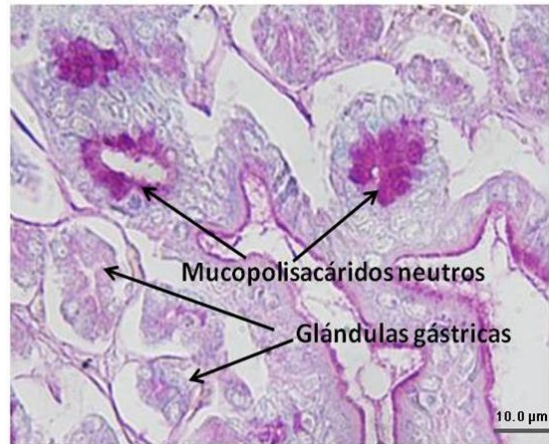


Figura 2j. Estómago: mucopolisacáridos 24 dde, PAS 2.5



Figura 2k. Intestino incipiente 2 dde, H&E

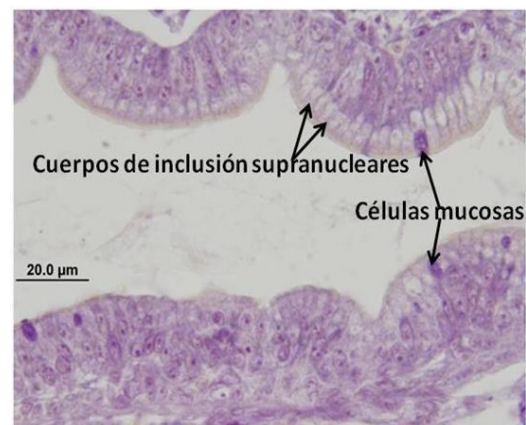


Figura 2L. Intestino, elementos incipientes 2 dde, H&E

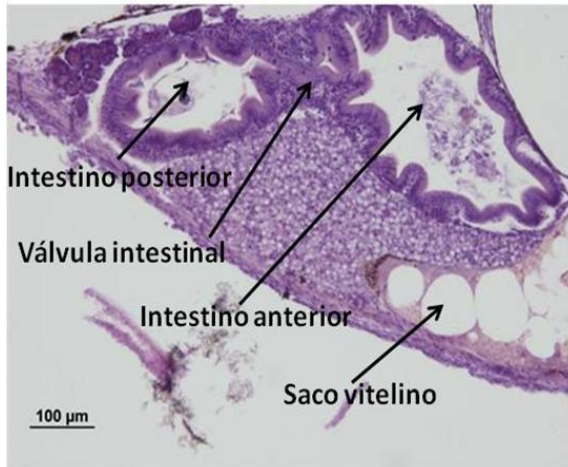


Figura 2m. Intestino: división 4 dde, H&E

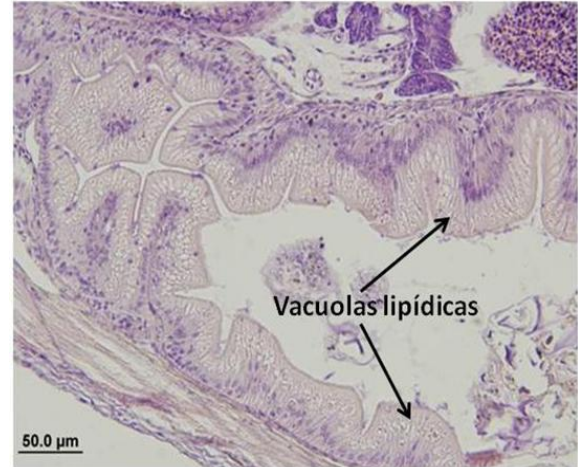


Figura 2n. Vacuolas lipídicas 23 dde, H&E

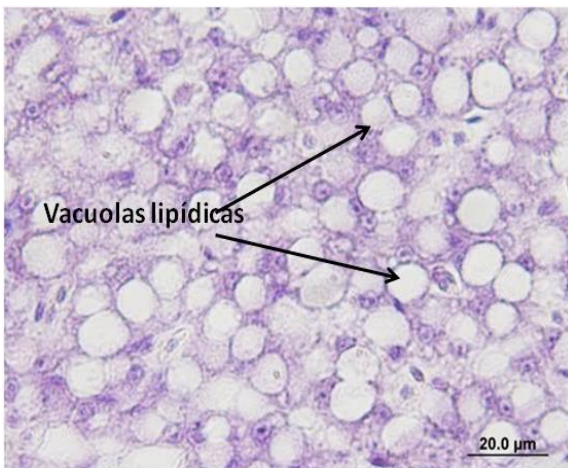


Figura 2ñ. Hígado, lípidos abundantes 7 dde, H&E

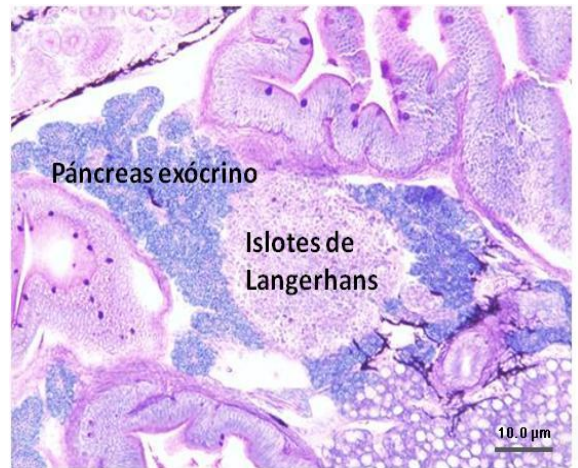


Figura 2o. Páncreas exócrino y endócrino 4 dde PAS 2.5

Estudios moleculares

Material y métodos

Extracción y purificación de RNA

La extracción de RNA a partir de huevos, troncos de larvas de *C. urophthalmus*, se efectuó mediante el método del Trizol™. La homogenización de muestras fue a razón de 1:10 (muestra/Trizol). La precipitación de RNA tuvo lugar con isopropanol absoluto (1:2 isopropanol/Trizol). El lavado de RNA fue con etanol al 75% (1:1 etanol/Trizol) y la

resuspensión del RNA fue en 50 μL de agua DEPC (libre de ribonucleasas). Para la purificación de RNA las muestras resuspendidas fueron tratadas con DNAsa, que degrada otros ácidos nucleicos presentes en las muestras. Las muestras con RNA fueron mezcladas con buffer de reacción y DNAsa (8:1:1, respectivamente) e incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Las reacciones fueron interrumpidas con EDTA al 25 mM, calentadas a 65 °C por 10 min, y finalmente conservadas a -80 °C, hasta la síntesis de cDNA.

Síntesis de cDNA

Se sintetizó cDNA a partir de RNA de las muestras previamente extraído de *C. urophthalmus*. A 5 μL se añadió 1 μL de Random primer (oligonucleótido) e incubados a 70 °C por 10 min. La mezcla para una reacción (1X) de RT-PCR fue como sigue: 5.3 μL de agua DEPC, 4.0 μL de buffer 5X imProm II, 2.4 μL de MgCl_2 25 mM, 1.0 μL de dNTPs 10 mM, 0.5 μL de RNAsin, 0.8 μL de enzima Improm II y los 6 μL de reacción (RNA) previamente incubada. Las condiciones de la RT-PCR fueron 25 °C por 10 min, 45 °C por 60 min y 90 °C por 5 min. Las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20 °C.

Amplificación de cDNA por PCR

Se realizó PCR por gradiente, utilizando oligonucleótidos específicos previamente diseñados (a partir del pez marino *Pleuronectes americanus*), para genes de enzimas pancreáticas α -amilasa, lipasa dependiente de sales biliares (BAL), la intestinal fosfatasa alcalina (APH); así como para el control interno EF α -1 (factor de elongación). Para una reacción de 25 μL , a 1 μL de cDNA se añadieron 16.05 μL de agua mQ, 2.5 de buffer PCR 10X, 0.75 μL de MgCl_2 , 2.0 μL de primer direct, 2.0 μL de primer reverse (ambos 10 mM), 0.5 μL de 10 mM dNTPs y 0.2 μL de enzima amplificadora Taq polimerasa (5 U μL^{-1}). Las condiciones de PCR por gradiente fueron 95 °C (0.5 min) para la desnaturalización; 52-60 °C (0.75 min) para la alineación y 72 °C (0.5 min) para la extensión.

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis se realizó a 90 V durante 30 min, con un gel de agarosa 1.5%, en presencia de buffer TAE 1X y bromuro de etidio (0.7 μL para 35 μL de gel). Cada muestra (5 μL) fueron mezcladas con 2 μL de azul de bromofenol y cargadas junto con marcador de peso molecular de 50 pb.

Purificación en gel de bandas de electroforesis

Se efectuó purificación en gel de bandas de genes asociados a enzimas digestivas empleando el kit GeneClean[®] Spin y se procedió a la clonación.

Clonación y transformación de células

La solución de clonación consistió de 1 μL del plásmido pCR[®]2.1-TOPO[®], 1 μL de agua estéril, 1 μL NaCl y 3 μL de productos de PCR (correspondiente a cada banda de los genes de expresión enzimática). La transformación de células competentes de *Escherichia coli* fue a 42 °C por 30 seg, en presencia de medio SOC (250 μL). Los tubos con las distintas mezclas (un tubo por gen de expresión enzimática) se agitaron horizontalmente por 60 min. Las células transformadas con plásmidos inserto fueron sembradas en medio sólido LB con ampicilina (100 mg mL⁻¹), solución X Gal (40 mg mL⁻¹) y solución IPTG 100 mM, a 37 °C toda la noche. Las colonias de color blanco (bacterias con el plásmido inserto) fueron resembradas posteriormente en medio LB líquido con ampicilina (100 mg mL⁻¹). Los plásmidos clonados (con los genes insertos de expresión) fueron liberados de las células a 95 °C por 10 min mediante lisis de membranas celulares y reamplificados por PCR bajo las mismas condiciones antes descritas.

Purificación de plásmidos

La técnica de mini-prep, mediante la cual los plásmidos con genes de expresión enzimática fueron purificados, tuvo lugar con el Kit RMP[®], para posteriormente ser secuenciados

(Sigma-Aldrich®), con miras a diseñar los oligonucleótidos específicos, de genes asociados a las enzimas digestivas de *C. urophthalmus*.

Determinación de la expresión relativa génica de enzimas digestivas por PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos diseñados para amplificación de α -amilasa, lipasa (dependiente de sales biliares) y fosfatasa alcalina para *C. urophthalmus*. La mezcla de reacción qPCR (40 μ L), consistió en reactivo Sybr Green, cebadores direct y reverse, agua mQ estéril y 20 μ L de solución génica (con el gen codificante para las enzimas mencionadas, por separado). Las muestras fueron puestas para su amplificación en un termociclador para PCR en tiempo real, 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City CA, USA). Las condiciones de PCR fueron: inicio (2 min, 50 °C y 10 min, 95 °C, 1 ciclo), desnaturalización (15 s, 95 °C), alineación/extensión (10 min, 95 °C y 1 min, 60 °C, 40 ciclos). Las expresiones relativas fueron determinadas utilizando el método del $\Delta\Delta C_t$ y las expresiones relativas génicas fueron analizadas por pruebas de “randomización” (Pfaffl, Horgan & Dempfle 2002), haciendo uso del software REST (<http://www.gene-quantification.info>).

Resultados

Por ahora, ha sido posible la secuenciación para las enzimas α -amilasa, lipasa dependiente de sales biliares, fosfatasa alcalina y el factor de elongación EF α -1, utilizado como control interno en *C. urophthalmus* (ya que es un gen que se expresa permanentemente). Los respectivos pesos moleculares (en kDa), son 565, 187, 832 y 232. Las secuencias nucleotídicas de los genes de expresión (y cebadores en color verde), así como correspondientes secuencias aminoacídicas, resultaron ser como sigue.

Secuencia nucleotídica y aminoacídica del factor de elongación EF α -1

$\xrightarrow{\text{RT-AM15'}}$
GCTTCGAGGAAATCACCAAGGAAGTGAGCGCCTACATCAAGAAGATCGGC 50
 A S R K S P R K * A P T S R R S A 17

TACAACCCCGCTGCCGTTGCCTTCGTCCCCATCTCTGGATGGCACGGAGA 100
 T T P L P L P S S P S L D G T E T 34

$\xleftarrow{\text{RT-AM13'}}$
CAACATGTTGGAGACCAGTGACAAGGTGAGGACTTAAACCATTCAAGTGA 150
 T C W R P V T R * G L K P F S V 50

TCCACTTGC TAATTTGACTGAACGTGGACTAAACTGTCAC TTTGATTCT 200
 S T C * F D * T W T K L S L * F L 67

GTAGATGAGCTGGTTCAAGGGATGGAAGGTTG 232
 * M S W F K G W K V 77

Secuencia nucleotídica y aminoacídica de α -amilasa

$\xrightarrow{\text{RT-AM15'}}$
TTT GAGTGGCGCTGGGC TGACATTTGCTCAAGAGTGTGAACGTTTCCTGGG 50
 F E W R W A D I A Q E C E R F L G 17

TCCCAAAGGCTTTGGTGGAGTTCAGATTC TCC TCCAAATGATCACA TTC 100
 P K G F G G V Q I S P P N D H I L 34

TGGTGAACAGTCCC TGGAGGCCATGGTGGCAGAGATACCAGCCAA TCAGC 150
 V N S P W R P W W Q R Y Q P I S 50

$\xleftarrow{\text{RT-AM13'}}$
TACGACC TC TGTTCGAGA TCTGGCAGTGAGGCAGAAC TGAAGGACATGAT 200
 Y D L C S R S G S E A E L K D **M** I 67

CACACGATGCAACAACGTTGGGGTAAAA TC TA TGTGGA TGC TGTGATCA 250
 T R C N N V G V K I Y V D A V I N 84

ACCACA TGTGTGGA TC TGGTGGTGGATCAGGAACCCACTC TTCATGTGGA 300
 H **M** C G S G G G S G T H S S C G 100

AACTGGTTTAATGC TGGCAGTGAAGAGTCCCCAGTGCCCTTATTCCAA 350
 N W F N A G S E E F P S V P Y S K 117

ATTGGAC TTCAATGACCAAAAA TGCAAGACTGGCAGTGCCGAAATTGAGA 400
 L D F N D Q K C K T G S G E I E N 134

ACTATGGTGACATATATCAGGTACGTGACTGCCGCTCGGTGGGTCTGCTG 450
 Y G D I Y Q V R D C R L V G L L 150

GATCTCGCCC TGGAGAAAGATTACGTTAGGGGCAAAGTGAGCGACTACAT 500
 D L A L E K D Y V R G K V S D Y **M** 167

GAACAAGCTGATTGGCATGGGTGTGGCTGGATTCAGAGTGGATGCCTGCA 550
 N K L I G **M** G V A G F R V D A C K 184

Secuencia nucleotídica y aminoacídica de fosfatasa alcalina

ACTGTGACGGCTGCTCGTATACTGAAGGGTCAGCTGAATGGACAGAGCGG. 50
T V T A A R I L K G Q L N G Q S G 17
AGAAGAAACACAATTGGAAA TGGACAAGTCCCTTTTGTATCTTTATCCA. 100
E E T Q L E M D K F P F V S L S K 34
AGACATACAACAC TAACGCACAGGTGCCAGACAGTGCTGGCACAGCCACG. 150
T Y N T N A Q V P D S A G T A T 50
GCTTACCTCTGTGGGGTTAAGGCCAACGAGGGCACAGTGGGCGTGAGTGC. 200
A Y L C G V K A N E G T V G V S A 67
AGCTGCTGTCCGATCCAGTGTAACACCACACAGGGCAATGAGGTCACCT. 250
A A V R S Q C N T T Q G N E V T S 84
CCATCCTCAAATGGGCCAAGGATGCGAGGCAAGTCAGTGGGAATAGTGACC. 300
I L K W A K D A G K S V G I V T 100
ACAACGCGCGTCAACCATGCGACTCCAGTGCTGCTTACGCACAC TG TGT. 350
T T R V N H A T P S A A Y A H C V 117
GGACCGAGACTGGTACTCCGACAACGAGATGCCAGAAGAAGCGCTGAACG. 400
D R D W Y S D N E M P E E A L N A134
CTGGCTGCAAGGATATCGCCAGGCAACTCTTTGAAAACATTCGCAACATT. 450
G C K D I A R Q L F E N I R N I 150
GATGTGATTATGGGCGGAGGAAGGAAGTATATGTTCCCAAGAACCAGTC. 500
D V I M G G G R K Y M F P K N Q S 167
GGATGTAGAA TACCCTAA TG TGC TGAAGCACAGCGGCACACGGAAAGATG. 550
D V E Y P N V L K H S G T R K D G 184
GGATGTAGAA TACCCTAA TG TGC TGAAGCACAGCGGCACACGGAAAGATG. 550
D V E Y P N V L K H S G T R K D G 184
GAAGAAACCTGGTGCAGGAGTGGACTGAAAGAATGAAGGATAAAAAAGGA. 600
R N L V Q E W T E R M K D K K G 200
CGTTATGTATGGAACAAGAAGCAGCTCTTATCCCTAAACCCTAACAATGT. 650
R Y V W N K K Q L L S L N P N N V 217
→
RT-AMIS'
GGATTACCTCTGGGTCTTTGAAACCGGAGATCTGCCATATGACTTGG. 700
D Y L L G L F E P G D L P Y D L E 234
AAAGGAACACTGACTCTGATCCATCACTGACAGAGATGGTGGATGTGGCT. 750
R N T D S D P S L T E M V D V A 250
ATCAAGATCCTGAAGAAGAACCCAAGTGGATTTTACCTGCTTGTAGAGGA. 800
I K I L K K N P S G F Y L L V E E 267
←
RT-AMIS'
AAGGACGAATTGACCACGGACACCATGAGGGC. 832
R T N * P R T P * G 277

Secuencia nucleotídica y aminoacídica de lipasa dependiente de sales biliares



Por otro lado, una vez obtenidos los cebadores (oligonucleóticos) propios de enzimas digestivas de *C. urophthalmus*, ha sido posible realizar ensayos PCR en tiempo real, cuyos resultados muestran que la expresión génica relativa para las enzimas pancreáticas α -amilasa y lipasa dependiente de sales biliares, no observan una supresión génica respecto al tiempo, especialmente ésta última, donde se observa un incremento sostenido de expresión génica relativa, hasta el final de los 30 dde. No obstante, la enzima intestinal fosfatasa alcalina si observa una clara supresión génica (figura 3).

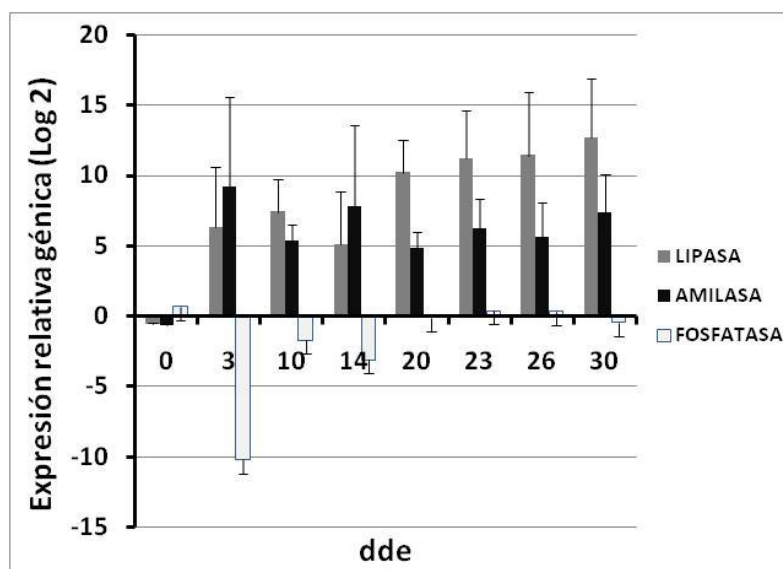


Figura 3. Expresión relativa génica de enzimas digestivas (LIPASA: lipasa dependiente de sales biliares, AMILASA: α -amilasa y FOSFATASA: fosfatasa alcalina), durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*.

Caracterización enzimática de juveniles

Material y Métodos

Obtención de extractos multienzimáticos de juveniles

Los juveniles del cíclido maya *C. urophthalmus* (5.73 ± 3.43 g, peso húmedo) fueron disectados en frío, a fin de aislar estómagos e intestinos de la masa visceral. Se obtuvo el peso húmedo por individuo, estómago e intestino con una balanza analítica (Denver Instrument APX-200, resolución 0.1 mg). Los tejidos fueron homogenizados en un macerador eléctrico (Ultra Turrax[®] Ika T18 Basic), a razón de 1:5 (tejido/agua destilada, p/v). Las mezclas fueron centrifugadas a 14,000 rpm, 4 °C por 30 min, en una centrifuga (Eppendorf 5810-R). Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C, hasta su análisis posterior.

Actividad específica de enzimas digestivas

La concentración de proteína soluble en estómago e intestino de *C. urophthalmus*, fue realizada según Bradford (1976), empleando una solución madre de ovoalbúmina bovina de 1 mg ml⁻¹. Con el fin de conocer la cantidad de unidades de enzimas en extracto de estómago, se hizo uso del método de Anson (1938), con las modificaciones que siguen. Se formó un complejo a partir de 1 ml de hemoglobina (al 1% en tampón glicina-HCl 100 mM, pH 2) y 20 µl de extracto multienzimático de estómago de *C. urophthalmus*. La mezcla fue incubada a 25 °C por 30 min. La reacción se detuvo con 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y reposadas a 4 °C por 15 min. Las muestras por triplicado, fueron centrifugadas a 12,000 rpm, bajo las mismas condiciones de reposo. Los sobrenadantes fueron recuperados y diluidos con agua destilada (1:10) para la lectura de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Visible), utilizando celdas de cuarzo de 1 cm², definiéndose una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µg de tirosina por minuto. Para determinar la actividad de extracto multienzimático de intestino, se utilizó el método de Kunitz (1947). Se utilizó 1 ml de caseína de Hammarsten al 1% en solución tampón tris-HCl 100 mM,

como sustrato de 5 μl de extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*. La mezcla se incubó a 25 °C por 30 min. La reacción fue interrumpida con 500 μl de TCA al 20%. Para el centrifugado y lectura de absorbancias de muestras, se procedió de igual manera que las proteasas estomacales, para obtener la cantidad de tirosina liberada por reacción. Para la determinación de actividad proteolítica de mezclas control, tanto para proteasas ácidas y alcalinas, se añadió extracto multienzimático inmediatamente después de parar la reacción con TCA al 20%. La actividad de la tripsina fue valorada mediante la técnica de Erlanger *et al.* (1961) con las siguientes modificaciones. El BAPNA (N- α -benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida) empleado como sustrato, se diluyó previamente en 200 μl de dimetil sulfóxido (DMSO) y se llevó al 3.5 mM en buffer en tris-HCl 50 mM CaCl₂ 20 mM, pH 8. La reacción tuvo lugar con la adición de 10 μl de extracto multienzimático de intestino a 990 μl de sustrato, incubada a 25 °C por 30 min. La reacción fue interrumpida con 250 μl de ácido acético al 30%. La absorbancia fue medida a 410 nm. Haciendo uso de un coeficiente de extinción molar de 8.8 ml $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, se definió la actividad enzimática como 1 μmol de *p*-nitroanilida liberada por minuto (Dimes *et al.* 1994). Con el fin de conocer la actividad de quimiotripsina, se determinó según Asgeirsson y Bjarnasson (1991) con las modificaciones que se mencionan. El BTEE (N-benzoli-L-tirosina etil ester) al 5 mM en buffer tris-HCl 44.4 mM pH 7.8 (sin CaCl₂) se diluyó previamente en DMSO. La reacción fue iniciada añadiendo 623 μl de buffer a la celda de cuarzo para llevar el espectrofotómetro a cero. Luego se agregaron 70 μl de sustrato y se leyó a 256 nm cada 20 s por 2 min. Posteriormente se adicionaron 10 μl de extracto multienzimático de intestino de y de nueva cuenta, se obtuvo la absorbancia cada 20 seg por 2 min. El valor delta de absorbancia entre la reacción catalizada y la reacción sustrato se tomó para el cálculo de la actividad, considerando un coeficiente de extinción molar de 0.906 ml $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. La actividad se definió como 1 μmol de tirosina liberada por min. Para determinación de la actividad de leucina aminopeptidasa, se utilizó el método propuesto por Maraux *et al.*, (1973). Se utilizó como sustrato leucina-*p*-nitroanilida al 1mM en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.2. A 980 μl de sustrato se añadieron 20 μl de extracto multienzimático de intestino. La mezcla fue incubada a 25 °C por 30 min y la reacción se detuvo con ácido acético al 30%. La lectura de la absorbancia fue a 410 nm, definiéndose la actividad como la cantidad de enzima requerida para obtener 1 μmol de

alanina *p*-nitroanilida por minuto. Se consideró un coeficiente de extinción molar de $8.2 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad de la carboxipeptidasa A, se obtuvo empleando el método de Folk y Schilmer, (1963). Hyporyl-L-fenilalanina, al 1mM en tris-HCl 25 mM NaCl 500 mM pH 7.5 sustrato fue el utilizado para el ensayo. Se agregaron 600 μl de buffer directamente a la celda de cuarzo. El espectrofotómetro fue llevado a cero y se adicionaron de sustrato y se monitoreó la absorbancia a 254 nm por cada 20 seg durante 2 min. Seguidamente se incorporaron 5 μl de extracto multienzimático de intestino y se volvió a monitorear la absorbancia por 2 min, en lapsos de 2 seg. El cálculo fue computado de la misma manera que para la quimiotripsina. La actividad fue definida como la formación de 1 μmol de ácido hipúrico por minuto. Se empleó un coeficiente de extinción molar de $0.36 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para evaluación de las fosfatasas ácida y alcalina, se procedió de acuerdo con Bergmeyer (1974), haciendo uso de 50 μl de extracto multienzimático de intestino, para degradación del sustrato 4-nitrofosfato al 2% en buffer citrato de sodio 41.6 mM pH 4.0 (fosfatasa ácida); o buffer glicina hidróxido de sodio al 100mM pH 10,1 (fosfatasa alcalina). La incubación a 37 °C fue durante 10 min. Se definió la actividad como la cantidad de enzima que produce un incremento de la absorbancia de 0.01 a 405nm, considerando un coeficiente de extinción molar de $17.5 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Con miras a evaluar α -amilasa, se prosiguió según Robyt y Whelan, (1968). A 50 μl de extracto multienzimático (intestino y estómago, por separado) de *C. urophthalmus* se le agregó solución tampón citrato-fosfato pH 7, solución de almidón 1% (después de llegar a máximo hervor). La mezcla se incubó a 37 °C y se leyó a 600 nm. Se definió una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 mg de maltosa por minuto.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de proteasas

Para determinar el efecto de estos factores sobre la actividad de proteasas, se procedió del mismo modo antes descrito, solo que para el pH se utilizó un intervalo entre 2 y 7 (proteasas ácidas) y entre 8 y 12 (proteasas alcalinas), empleando solución de Stauffer (1989). El intervalo de temperatura empleado fue de 25 a 75 °C para ambos tipos de proteasas. Para los ensayos del efecto de estos factores sobre la estabilidad de proteasas, las muestras fueron por un lado, preincubadas a 25 °C durante 0, 30, 60 y 90 min, para cada

uno de los valores de pH señalados (efecto del pH). Por otro lado, las muestras fueron preincubadas a temperaturas crecientes ($25 < t \text{ (}^\circ\text{C)} < 75$), durante 0, 30, 60 y 90 min (efecto de la temperatura).

Inhibición de proteasas

La caracterización de proteasas se complementó mediante electroforesis y el uso de inhibidores. Se cuantificó el número de bandas de actividad enzimática, los tipos de proteasas que componen los extractos multienzimáticos de *C. urophthalmus*. Para realizar este estudio se preincubaron por 1 h los extractos multienzimáticos con los mismos inhibidores descritos anteriormente, para después tomar una muestra de 20 μl y realizar la electroforesis. En el caso de las proteasas ácidas se corrió la electroforesis en condiciones nativas (PAGE) según Davis (1964), en geles continuos de acrilamida al 10% (80 V por 15 min). Para la detección de actividad proteolítica ácida, los geles se sumergieron en una solución de HCl 100 mM, hasta llevar su pH a 2. Posteriormente, se colocaron en una solución de hemoglobina (0.25% en tampón 100 mM glicina-HCl, pH 2 a 4°C). Para las proteasas alcalinas la electroforesis se corrió en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli (1970) y adaptada por García-Carreño *et al.* (1993). El corrimiento de la electroforesis se realizó con un buffer SDS 0.1%, Tris (25 mM) y glicina (192 mM, pH 8.3 a 100 volts, por 120 min). Para detectar la actividad proteasa alcalina, los geles fueron sumergidos en una solución de caseína Hammerstein (2% en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 9, durante 1 h a 4°C). Para la tinción de geles se procedió como describen Weber y Osborn (1969).

Resultados

Los estudios enzimáticos han sido otra de las herramientas preponderantes para el estudio de los cambios enzimáticos, con miras a dilucidar los cambios morfofuncionales, durante la ontogenia inicial de los peces. Los niveles de actividad enzimática ($\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$) de juveniles de *C. urophthalmus* se pueden observar en la tabla 1. La proteasas ácidas muestran 1.8 ± 0.5 y las proteasas alcalinas de 3.1 ± 0.5 . Las endopeptidasas tripsina y

quimiotripsina observan actividades de 0.52 ± 0.02 y 0.8 ± 0.3 , respectivamente; en tanto que las exopeptidasas aminopeptidasa y carboxipeptidasa A, observan niveles de actividad de 0.004 ± 0.003 y 0.4 ± 0.1 , de manera respectiva. La actividad de fosfatasa ácida muestra de 0.0001 ± 0.00002 y la de la alcalina es de 0.0003 ± 0.00005 . Por último, la α -amilasa arroja 3.5 ± 1.7 .

Tabla 1. Caracterización de enzimas digestivas de juveniles de *Cichlasoma urophthalmus*

Actividad	U mL ⁻¹	U g ⁻¹ (tejid)	U mg ⁻¹ (prot)
Proteasas ácidas	2.7±0.7	13.6±3.6	1.8±0.5
Proteasas alcalinas	10.6±1.9	53.2±9.4	3.1±0.5
Tripsina	1.9±0.1	12.1±0.4	0.52±0.02
Quimiotripsina	3.1±1.4	14.5±6.6	0.8±0.3
Leucina aminopeptidasa	0.014±0.009	0.07±0.04	0.004±0.003
Carboxipeptidasa A	1.3±0.4	6.8±2.1	0.4±0.1
Fosfatasa ácida	0.0002±0.0001	0.001±0.0003	0.0001±0.00002
Fosfatasa alcalina	0.0009±0.0002	0.005±0.001	0.0003±0.00005
α -amilasa	12.3±6.1	61.6±30.4	3.5±1.7

Inhibición enzimática (técnicas electroforéticas)

En la figura 4a, en el extracto enzimático del estómago de *C. urophthalmus* (carril Control) se observó una sola isoforma la cual se inhibe completamente al usar Pepstatin A (carril CI). Al contrastar con pepsina porcina (carril P) y la pepsina porcina inhibida con pepstatin A (carril PI) se observa la desaparición de la banda. En lo que concierne a la figura 6b, es posible visualizar las bandas de proteasas por efecto de inhibidores en extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*, la cual muestra la presencia de seis bandas, correspondientes a seis isoformas con actividad proteolítica alcalina (carril Control), de 16.1, 21.5, 43.1, 72.1, 82.2 y 92.9 KDa. En presencia de ovoalbúmina (carril Ovo) se inhiben las seis bandas. Al hacer uso de los inhibidores SBTI (carril SBTI) y PMSF (carril PMSF), se inhiben todas las bandas, salvo las de mayor peso molecular (82.2 y 92.9 KDa) y (92.9 KDa), respectivamente. Con la fenantrolina (carril Fen), no se inhibieron ninguna de las bandas, con excepción de la banda de menor peso molecular (16.1 KDa), mientras que con EDTA (carril EDTA), se inhibieron la mayoría de las

bandas, con excepción de las bandas que corresponden a los pesos moleculares más extremos (16.1 y 92.9 KDa). Al utilizar los inhibidores específicos TPCK (carril TPCK) y TLCK (carril TLCK), no resultaron inhibidas la mayoría de las bandas, salvo la de menor peso molecular (16.1 KDa).

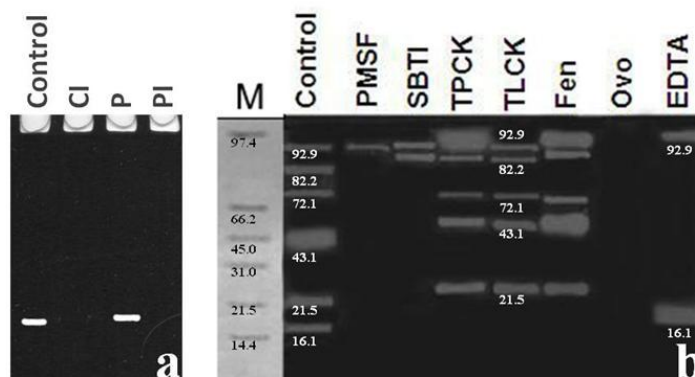


Figura 4. Zimograma de proteasas ácidas (4a) y proteasas alcalinas (4b) con acción de los inhibidores respectivos sobre las isoformas de los extractos multienzimáticos de *C. urophthalmus*. CI: Control con inhibidor Pestatina A, P: Pepsina de cerdo, PI: Pepsina de cerdo con inhibidor Pestatina A, PMSF: luoruro de fenilmetilsulfonilo, SBTI: Inhibidor trípico de soja, TPCK: Tosil-fenilalanina-metil cetona, TLCK: Tosil-lisina-metil cetona, Fen = Fenantrolina, Ovo: Ovoalbúmina, EDTA: Ácido etilendiaminotetracético. M: Marcador de peso molecular (KDa): albúmina de suero bovino (66 kDa), albúmina de huevo (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), Inhibidor de soja tripsica (20 kDa).

Efecto del pH y preincubación sobre la actividad y estabilidad de proteasas

La actividad de proteasas por efecto del pH; así como su estabilidad por efecto del pH y el tiempo de preincubación se muestra en la figura 5. La actividad de proteasas ácidas muestra diferencias significativas ($p < 0.05$), cuyo valor óptimo se observó a pH 3, disminuyendo drásticamente conforme aumenta el valor del pH (figura 5a). Para la estabilidad de proteasas ácidas existen diferencias significativas, con los distintos valores de pH probados ($p < 0.05$), observándose un aumento de la actividad residual conforme aumenta el tiempo de preincubación conforme el valor de pH disminuye, mientras que

conforme el valor de pH aumenta, la estabilidad de proteasas ácidas disminuye (figura 5b). Por otra parte, la actividad de proteasas alcalinas se ve afectada por el valor del pH ($p < 0.05$) siendo esta actividad óptima a un pH de 9 (figura 5c). A distintos valores de pH, la actividad residual de proteasas alcalinas es significativa ($p < 0.05$), mostrando una alta resistencia a los diferentes valores de pH, incrementándolos hasta por arriba del 650% en relación al 100% de actividad inicial, especialmente para los valores de pH de 6 y 7 a partir de los 30 minutos de preincubación, aunque conforme el tiempo de preincubación aumenta, la actividad residual disminuye alrededor del 450% para los 60 y 90 minutos de preincubación (figura 5d).

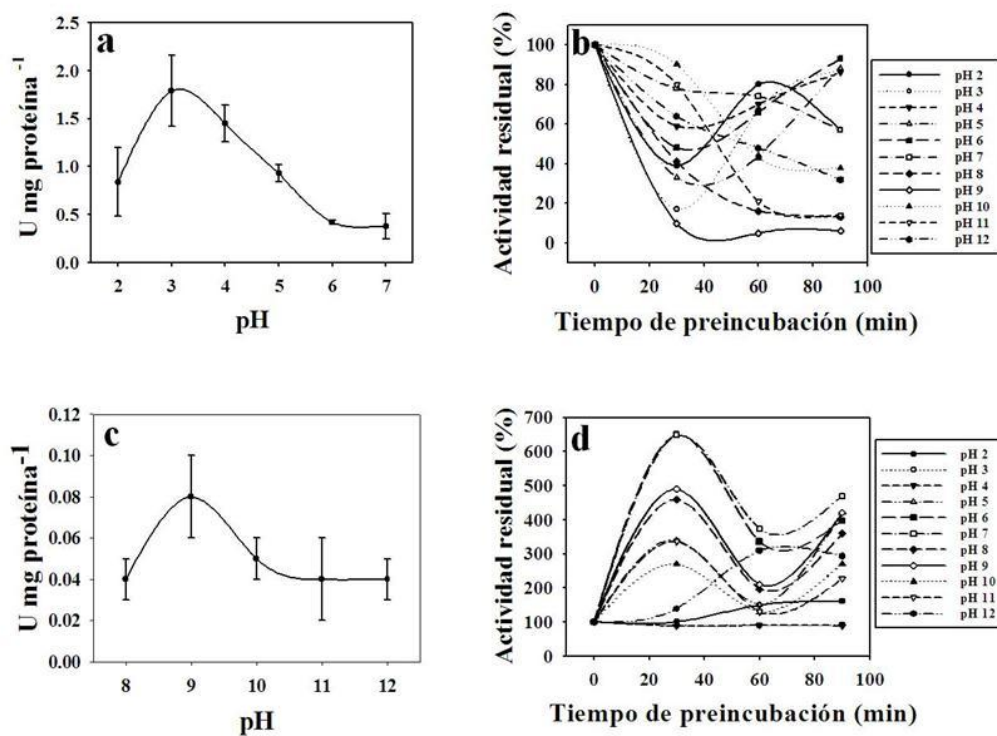


Figura 5. Caracterización de proteasas. 5a) pH óptimo de actividad de proteasas ácidas, 5b) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas ácidas, por efecto del pH y del tiempo de incubación, 5c) pH óptimo de actividad de proteasas alcalinas, 5d) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas alcalinas, por efecto del pH y del tiempo de incubación.

Efecto de la temperatura y preincubación sobre la actividad y estabilidad de proteasas

El papel de la temperatura sobre la actividad de proteasas, se puede observar en la figura 6. No existieron diferencias significativas en los valores de actividad de proteasas ácidas, por efecto de la temperatura ($p > 0.05$), sin embargo, se observa que la mayor actividad fue obtenida a 55 °C (figura 6a). La estabilidad de proteasas ácidas es muy alta para todas los tiempos de preincubación, a 35 y 45 °C, mientras que para temperaturas mayores, la actividad residual disminuye rápidamente ($p < 0.05$), especialmente al preincubar los extractos a 65 °C (fig. 6b). Para el caso de las proteasas alcalinas, la temperatura es determinante, encontrándose diferencias significativas entre los distintos valores de actividad enzimática ($p < 0.05$), siendo el valor más óptimo de actividad a 55 °C (figura 6c).

La estabilidad de proteasas alcalinas a los cambios de temperatura muestran una alta resistencia a los cambios ($p < 0.05$), especialmente a los 45 °C, alcanzando su máximo valor después de 90 minutos, seguido de los 35 °C, después a los 55 °C; el valor más bajo se obtiene al preincubar el extracto multienzimático a los 65 °C (figura 6d).

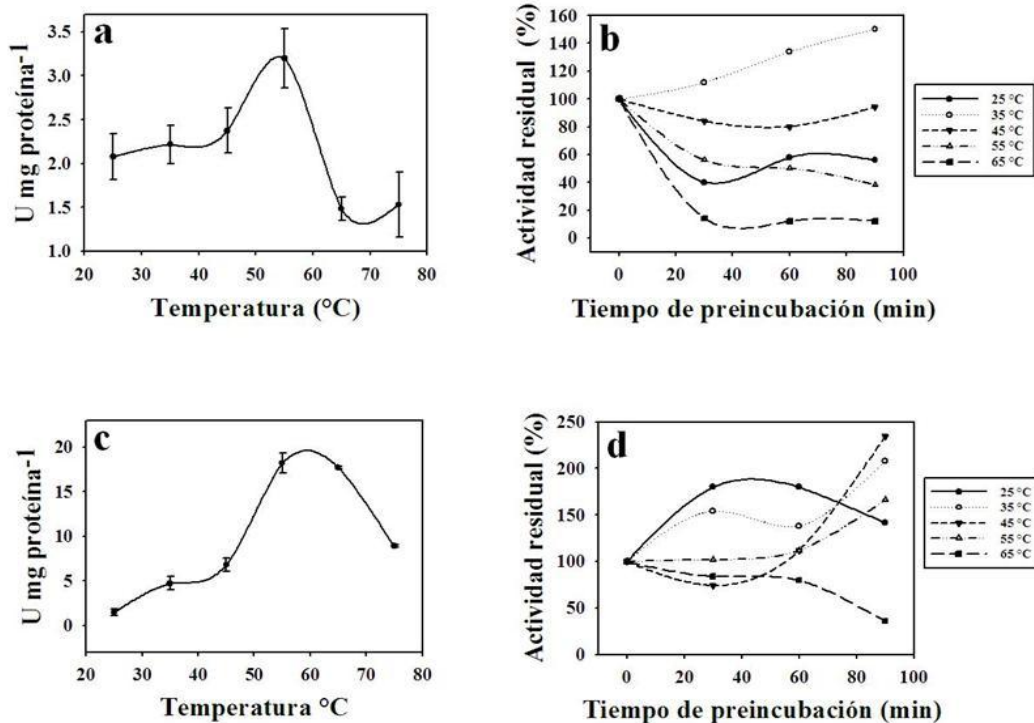


Figura 5. Caracterización de proteasas. 5a) Temperatura óptima de actividad de proteasas ácidas, 5b) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas ácidas, por efecto de la temperatura y del tiempo de incubación, 5c) Temperatura óptima de actividad de proteasas alcalinas, 5d) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas alcalinas, por efecto de la temperatura y del tiempo de incubación.

Discusión

Entre los 3 y 4 dde, *C. urophthalmus* observa el comienzo del desarrollo del estómago cardíaco y la aparición del esfínter pilórico. Estos rasgos de desarrollo precoz estomacal han sido observados también en peces cíclidos como *O. niloticus* (Morrison *et al.* 2001) y *P. splendida* (Treviño *et al.* 2010) e incluso, aunque menos precoz, en otros peces de agua dulce como *S. lucioperca* (Ostaszewska, 2005). Es menester hacer notar que, el primer repunte de proteasas ácidas alrededor de los 13 dde en *C. urophthalmus* como reportan López-Ramírez *et al.* (2010), coincide con la total diferenciación de glándulas gástricas en un estómago con notorio avance de desarrollo reveladas en el presente estudio (H&E). Este evento relevante fue sincrónico con la aparición de las primeras células mucosas en

estómago a los 11 dde (5.75 ± 0.36 mm SL), cuyos glicoconjugados neutros (PAS positivo), permiten amortiguar la autodigestión del epitelio estomacal interno, generada por la actividad del ácido hidroclohídrico y enzimas de las glándulas gástricas (Gisbert *et al.* 2004). Estos hechos, pueden sugerir el cambio de alimentación, mixta a alimento inerte de *C. urophthalmus* a los 13 dde, como sugieren López-Ramírez *et al.* (2010), donde el máximo pico de actividad de proteasas ácidas observado alrededor de los 20 dde, coincide con la observación histológica de un estómago total y plenamente diferenciado a los 19 dde (7.02 ± 0.25 mm SL), mostrando la regionalización típica del estómago en cardias, fundus y pylorus. Por lo tanto, es posible sugerir que el tipo de digestión que lleva a cabo *C. urophthalmus* es química, lo que coincide con otro cíclido de agua dulce *P. splendida*, así como su correspondiente diferenciación estomacal en regiones, encontrado por Treviño *et al.* (2010). Con los elementos hasta ahora que se disponen, los estudios histológicos revelan que, a los 13 dde *C. urophthalmus*, presenta un estómago desarrollado, con presencia de glándulas gástricas posiblemente funcionales, que le confiere cierta capacidad proteolítica, hecho que se confirma con un pico importante de proteasas ácidas, a esa edad López-Ramírez *et al.* (2010). Por lo que, aunado a la actividad importante de otras más enzimas digestivas, es posible sugerir a los 13 dde para el cambio de régimen alimentario de *C. urophthalmus* (destete). Los estudios moleculares permiten asumir un rápido desarrollo morfofuncional del páncreas, dada la expresión génica de enzimas pancreáticas α -amilasa y lipasa dependiente de sales biliares, desde muy temprana edad, lo que supone la importancia de estas enzimas digestivas en *C. urophthalmus*.

Por otro lado, los resultados de caracterización enzimática, confirmaron que *C. urophthalmus* es una especie de hábitos omnívoros, con potencial para degradar sustratos propios de una especie carnívora, ya que presenta actividad específica importante de proteasas ácidas, pero también una alta actividad de proteasas alcalinas, con cierto predominio de éstas últimas.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, por el otorgamiento de la beca, con número de registro 1100006. A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), por el otorgamiento de la beca, mediante el de convenio DAMR-02 UJAT-PROFESOR/2010. Al Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIO-UJAT. Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas para la realización del presente trabajo, especialmente a mi comité doctoral, por sus acertadas observaciones.

Literatura citada

- Álvarez-González C. A., Moyano-López F. J., Civera-Cerecedo R., Carrasco-Chávez V., Ortiz-Galindo J. L., Dumas S. 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*, Biochemical analysis. *Fish Physiol Biochem.* 34:373-384.
- Anson M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal Gen Physiol.* 22:79-89.
- Asgeirsson B., Bjarnason J. B. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B(2): 327-335.
- Bergmeyer H. V. 1974. Phosphatases methods of enzymatic analysis, vol 2. Academic Press, New York.
- Bisbal G. A., Bengtson D. A. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology.* 47: 227-291.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anales of Biochemistry* 72: 248-25.
- Castillo-Yáñez F. J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F. L., Navarrete-Del Toro M. A. 2004. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 140(B): 91-98.
- Darias M. J., Murray H. M., Gallant J. W., Astola A., Douglas S. E., Yúfera M., Martínez-Rodríguez G. 2006. Characterization of a partial α -amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): Expression during larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology.* Part B. 143: 209-218.
- Davis B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121: 404-427.
- Debnath D., Pal A. K., Sahu N. P., Yengkokpam S., Baruah K., Choudhury D., Venkateshwarlu G. 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology.* Part B 146:107-114.
- Dimes L. E., Haard N. F. 1994. Estimation of protein digestibility- I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108(A): 349-362.
- Erlanger B., Kokowsky N., Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278.
- Folk J., Schirmer E. 1963. The porcine pancreatic Carboxypeptidase A System: Three forms of the active enzyme. *The Journal of Biological Chemistry.* 238, 38-84.
- Furné M., Hidalgo M. C., López A., García-Gallego M., Morales A. E., Domezain A., Domezainé J., Sanz A. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: A comparative study. *Aquaculture.* 250: 391-398.

- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., Haard, N. F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*. 214: 65-69.
- García-Gasca A. A., Galaviz M. N., Gutiérrez J., García-Ortega A. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*. 251: 366-376.
- Guerrero-Zárate R. 2010. Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de maestría, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas.
- Gisbert E., Piedrahita R. H., Conklin D. E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*. 232: 455-470.
- Govoni J. J., Boehlert G. W., Watanabe Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*. 16: 59-77.
- Günther A. 1862. Catalog of the Actinopterygii, Pharyngognathi and Anacanthini in the collection of the British Museum. 4(1), pp. 534.
- Hachero-Cruzado I., Ortiz-Delgado J. B., Borrega B. 2009. Larval organogenesis of fl atfi sh brill *Scomphthalmus rhombus* L: histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 286 (1-2): 138-149.
- Heming T. A., Buddington R. K. 1988. Yolk sac absorption in embryonic and larval fishes. In: Fish physiology, Vol. 11A. W. A. Hoar and D. J. Randall (Eds). Academic Press, London, pp. 407-446.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30:291-310.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lazo J. P., Darias M. J., Gisbert E. 2011. Ontogeny of the digestive trac, In: *Larval Fish Nutrition*, First Edition. Edited by Holt G. J. John Wiley & Sons, Inc. Published by John Wiley & Sons, Inc.
- López-Ramírez G., Cuenca-Soria C. A., Álvarez-González C. A., Tovar-Ramírez D., Ortiz-Galindo J. L., Perales-García N., Márquez-Couturier G., Arias-Rodríguez L., Indy J. R., Contreras-Sánchez W. M., Gisbert E., Moyano F. J. 2010. Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem*. DOI 10.1007/s10695-010-9431-6.
- Lundstedt L. M., Melo J. F., Moraes G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 137(B): 331-339.
- Matus de la Parra A., Rosas A., Lazo J. P., Viana M. T. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol Biochem*. 33:223-231.
- Micale V., Garaffo M., Genovese L. 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common Pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture* 251 (2-4): 345-365.
- Morrison C. M., Miyake T, Wright J. R. 2001. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Morphology*. 247 (2): 172-195.

- Murray H. M, Gallant J. W, Johnson S. C, Douglas S. E. 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture*. 252: 394-408.
- Natalia Y., Hashim R., Ali A., Chong A. 2003. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, www.elsevier.com/locate/aqua-online.
- Ortiz-Delgado J. B., Darias M. J., Cañavate J. P. 2003. Organogenesis of the digestive tract in the white seabream, *Diplodus sargus*: Histological and histochemical approaches. *Histology and Histopathology*. 18 (4): 1141-1154.
- Ostaszewska T. 2005. Developmental changes of digestive system structures in pike-perch (*Sander lucioperca* L.). *Electronic Journal of Ichthyology*. 2 (2): 65-78.
- Pearse A. G. E. 1985: *Histochemistry, Theoretical and Applied*, Vol. 2. Analytic Technology, Churchill Livingston, New York.
- Perales-García N. 2006. Ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas.
- Peña R., Dumas S., Villalejo-Fuerte M., Ortiz-Galindo J. L. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219: 633-644.
- Robyt J. F., Whelan W. J. 1968. Starch and its Derivates. Radley, J. A. (Ed.). Chapman and Hall, London.
- Stauffer C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI. Nueva York.
- Segner H., Storch V., Reinecke M., Kloas W., Hanke W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* 119: 471-486.
- Tanaka M., Kawai S, Seikai T, Burke J. S. 1995. Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. *Marine and Freshwater Behavior Physiology*. 28: 19-31.
- Treviño L., Alvarez-González C. A., Perales-García N., Arévalo-Galán L., Uscanga-Martínez A., Márquez-Couturier G., Fernández I., Gisbert E. 2010. A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther (1862), from hatching to the juvenile stage. *Journal of Applied. Ichthyology*. 1-10.
- Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 4406-4412.
- Zambonino-Infante J. L., Cahu C. L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish, applications to diet formulation. *Aquaculture*. 268(1-4): 98-105.
- Zambonino-Infante J., Gisbert, E., Sarasquete C. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae, In: Cyrino, J. E. O, Bureau D, Kapoor B. G. (eds.) *Feeding and Digestive Functions of Fish*. Science Publishers Inc , Enfield, NH , pp. 277-344.
- Zhong-yi L., Zhang W., Jian Z. 2008. An acidic protease from the grass carp intestine (*Ctenopharyngodon idellus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149(B): 83-90.

Requirements for some Marine Fish Species with an Emphasis on Organic Ingredients

G. Cuzon¹, C. Maldonado² and G. Gaxiola²

¹COP-Tahiti, IFREMER, Francia

²UMDI-Sisal. Fac. de Ciencias, UNAM, México

E-mail: (1)mggc@ciencias.unam.mx and gerard.cuzon@ifremer.fr

Abstract

Actually some fish are well known as for their nutritional requirements such as salmon, red drum, grouper. There is consistent information on protein, lipid and sometimes energy. However, energy is under evaluated for species except salmonids. Some information is lacking on digestible energy for main ingredients, as well as for energy density of fish for some new candidate species such as *Platax orbicularis*, *Centropomus undecimalis*. Moreover, there is sometimes a discrepancy between the actual data on requirement and what is proposed in commercial feeds. Some company proposed a unique feed for marine specials (all in one) and some farmers select feeds not so in line with the real need of their species; lack of performances or lack of profitability of the production system. In terms of innovation the concept “organic” become more and more in favor for many producers or coordinating bodies to develop fish farming.

Key words. Temperate marine fishes, organic; requirements; warm water fishes; energetics

Introduction

Background information

A comparative fish growth under the tropics showed a large difference in potential for example a Mahi mahi (*Coryphaena sea bream*) reached 5kg in one year, while a *Siganus* could hardly reach 0.2 kg during the same time. Between those extremes, there was the Jackfish (*Caranx sp.*) (Cuzon *et al.*, 1975), groupers, tropical seabass *Lates calcarifer* the European seabass transferred from Europe to the tropics, *Chanos chanos*, just to mention a few examples.

The classification is not so easy; in terms of regimen for example with juveniles cobia in captivity a regimen with 50% plant protein would impair weight gain (Frazer and Davies, 2009) but in general for carnivorous such as trout (Cho and Bureau, 1995), red drum (Mc Googan and Reigh, 1994; 1996, M Googan and Gatlin, 1007), the requirements are well assessed a little less for grouper (Castillo *et al.*, 2013) and quite insufficient for tuna (Sanz Brau, 1990) at the difference, herbivorous species are less easy to define, one recall the example of carp with variations such as filter (Silver carp), filter-detritivorous (Big head carp, omnivorous (Indian carp) and common carp.

The known requirements were summarized for trout (Cowey, 1995) and reports on compounded feed mentioned in general 35% protein, 10% lipid with a minimum of 1%(EPA+DHA), 10% carbohydrates and amino acids such as LYS (1.9%), ARG (1.8%) MET (1%) THR (0.8%); vitamins were at 100ppm for stable form of vitamin C, choline at 750 ppm; trace elements 20-25ppm for Zn, and well defined for Mg, Cu, Ca and P. Another species living in warm waters, the red drum, was studied in many aspects of its requirements (Gaylord and Gatlin, 1996; Lohmann and Gatlin, 1993; 93; Craig *et al.*, 1992-95; Davis *et al.* 1987, 1995; 1996; Moon *et al.*, 1991,92;94).

Tools box

Cuzon *et al.* 2013. Requirements for some Marine Fish Species with an Emphasis on Organic Ingredients . En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 494-506.

The most detailed nutritional information on marine fish is of course that of salmonids (Corraze *et al.*, 2010) and salmon (Cho and Bureau, 1995) *Dicentrarchus labrax* has been studied in the 70's (Metailier *et al.*, 1973, 1983) and mullet *Mugil cephalus* (Leray, 1971; Albertini,-Berhaut and Vallet, 1979) and at the same time sea bream (Girin *et al.*, 1978), turbot (Person-Le Ruyet, 1983) and sole (Cadena-Roa *et al.* 1980) quickly browsing the main work. More recently, red drum (Gatlin *et al.*, 1991-92) has been the subject of many publications on proteins, amino acids, (Brown *et al.*, 1988), triglycerids, MCT, EPA, DHA (Davis *et al.*, 1995) and even thyroid hormones (These studies have also focused on the digestibility of raw materials (Choubert, 1983). Early 1990's and another fairly comprehensive study was undertaken on the *Lates calcarifer* (Chou *et al.*, 1964;.Lee *et al.*, 1995) in a research program AADCP S'pore. Lupatsch and Kissil, 2003) has produced an update report on the DP/DE in sea bream *Sparus aurata*.

Today, "new" species are being investigated for example cobia , tuna and breeding attempts on the batfish and also corvina in the tropics, *Centropomidae* .At the same time, studies on *in vitro* digestibility progressed (Lemos *et al.*, 2009; Jimenez *et al.*, 2012) to classify feedstuffs and provide faster responses than the *in vivo* determination (ADC). That remains however far behind the level of knowledge achieved with Salmonidae in clear water. In addition, feed formulations will be changing with the restriction on fishmeal, the use of vegetable sources (lupine , peas, beans, soybean) and the arrival of macro-algae (*Laminaria*, *Ulva*) and especially microalgae (*Nannochloropsis* , *Chlorella* , *Spirulina*). All this in the new context of organic (BIO), new rearing conditions ("floc" super intensive,..), taking into account the well- being of animals, but the progress on the known species (digestive enzymes , metabolism, special needs,..), however, will probably move faster than in the past. The new candidate species for aquaculture are legion and research does not always follow. it will be missed specific data, manufacturers will be tempted to propose for example feed formulas "for all carnivorous". It is therefore necessary steps, sometimes

short term, as proposed below, or conditioning animals for metabolic studies (tropical vs. temperate), metabolic enzymes, additives, nutritional disease, deficiency effects.

The other important aspect of the approach is the situation with raw materials available on the market, their quality, price, and level of contribution to meet the requirements of the species. Obviously, there are several options, one of the major manufacturers that export all continents and smaller units looking for raw materials as close as possible of the site of production. Recently, a minor category at the moment emerged with those who are dedicated to “organic” controlling culture surfaces around the plant itself to guarantee non-GMO feedstuffs (soya, wheat); then the proteins of plant origin can be certified to the required quality. At the level of the EU, these plant proteins are not sufficient for the needs of manufacturers, and the deficit has widened since the feed ban on transformed animal protein (TAP) with the story of the “mad cow” disease. But today, we know that these animal meals could be used in carnivorous fish at least, that got the ability to hydrolyze the prion (protein substance) in the digestive tract (www.agriculture-environnement.fr). In fact, the situation of a lack of protein is obvious and is growing on side of aquaculture with rarefaction of fishmeal or the tendency for certain feed qualities to take only meal from sustainable fisheries (Peru, Chile,..) it will arise therefore in the coming years three changes : (i) lack of marine meals (ii) reintroduction of TAP (iii) use of plant proteins in the formulations. And added to this, little information on new native species recently introduced in farming especially for tropical marine fishes (batfish, cobia). Moreover, the quality of the finished product will take into account the quality of the flesh itself. We know, for example, in a terrestrial monogastric (poultry) that the physiological need for animal protein is there and if they are deprived, the meat is affected (ae, 2013). But, above all, additional pressure to produce fish will come from an urgent need for the next decades to meet food demand from a population in constant progression.

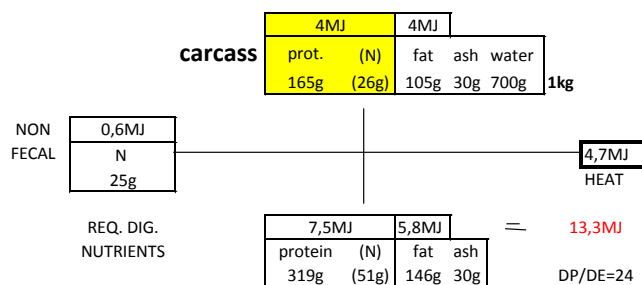
Approaches to a feed appropriate to the species

Of course among species, carnivorous ones such as cobia (Lunger *et al.*, 2006), red drum (Wisner *et al.*, 1991), seabream (Oliva-Teles, 2000), trout (Corraze *et al.*, 2010), grouper (Yu *et al.*, 2012), barramundi (Lee *et al.*, 1005), and “herbivorous” such as siganids (Parazo, 1990), batfish, *Chanos*, or tilapia are under survey to find an adequation between the feed composition and the environmental conditions that generate a wide range of formulations.

-Energetics

Maintenance energy (kJ kg fish per day, HiE) that will vary according to species with for example clear difference between a trout (20% Digestible Energy, DE) and a grouper showing less activity, moving slowly, quite fish in aquaria respired 2.2kJ/MBW*d (Castillo *et al.*, 2013). Excretion is not always assessed and in general that is in order of magnitude of 6% de DE enough to get an idea of energy partitioning of the species. Then, with a given feed, a level of retained energy will help for formulation and husbandry, whether the feed is standard (for example 40% RE) or energy dense. Bioenergetics values help formulate a feed (%CP and kJ/g DE) from ingredients known for DE and DP. Some models such as <http://nutritiondata.self.com/tools/calories-burned> are useful in a scope of application for fish.

For the novel species, an complete analysis of carcass can lead to the concept diet as indicated in an example for trout (table 1) given a whole picture of data needed to elaborate an adequate diet including some metabolic aspects (Cowey, 1992; com.pers.).

Table 1. Carcass analysis (kJ g^{-1}) to conceptual diet

-As described before (Bureau *et al.*, 2000) the feed is distributed according to the average weight and the ration will change following a predictive growth rate of the species. An elaboration of a feed is complex now whether one speaks in terms of “organic” or regular feed, but also whether it is dedicated for intensive or semi-intensive, ponds lined or earthen, or cage, or raceways.

-Another approach consists in amino acids profile determination of muscle (or carcass). The analysis of the profile of essential amino acids (EAA) provide information on the quality of the protein and such a correlation with the EAA requirement of a known species will give additional guidance as to limiting factor correction if it carries on like an amino acid such as LYS, MET or THR (Fig. 1).

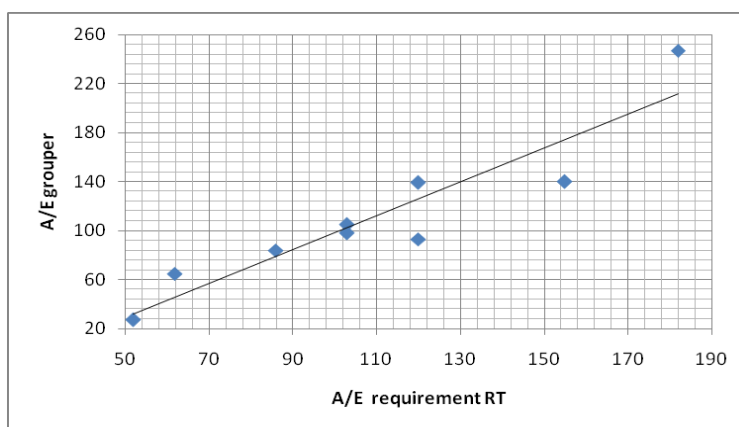


Fig 1. Whole body composition and essential amino acid requirement.

A/E ratios were calculated as concentration of EAA/sum concentration in EAA*1000. This was an old procedure to enlighten the trend in terms of amino acid profile of an unknown species compared to some well known species such as catfish or trout and find a first idea for the amino acid composition that should be kept from a combination of various ingredients. In the example above (Table 3) a grouper ‘ *E. morio* A/E was probably more in adequation with a trout profile in A/E requirement than any other species in comparison (carp, catfish, salmon, shrimp, carp, tilapia).

There is a number of examples of formulae to make a feed taking into account so many factors such as those given here: 1. conventional in case of trout with a combination in % of herring meal(25), wheat shorts (22) soyabean meal (20) dried whey (10), DDGS (8) fish oil (5) and premix or *Lates calcarifer* with local fishmeal (40), soybean meal (20), wheat (20) and premixes for carnivorous. 2. The version called BIO (organic) for example from Le Gouessant (France) was proposed both for red drum and batfish.

Table 2. example of feed formulation with the concept “organic” for two species
(*Platax*, red drum)

	%
FM from sustainable fisheries	24
SBM non GMO	18
Corn gluten meal	15
organic wheat shorts & soy concentrate	24
canola meal	9
premix (oil, vit. min. additives)	10

Those two species are actually fed with this kind of “organic feed” to guarantee to the consumer a quality of the product, with an emphasis of feedstuffs carefully selected and in

final an extruded feed that do not content residual pesticides or heavy metals at least below the authorized levels.

Energy dense feeds were allocated to trout and salmon two decades ago; and the main concern today is for plant-based and microalgae microalgae-based feeds. There is a significant effort to propose feeds for herbivorous such as siganidae with profile such as



FM (5), SBM (10), cereals (30), copra (5), alfalfa (25), yeast (15), molasses, premix and *Medicago* (a plant in use do feed juveniles of Siganidae).

All these situations with natural productivity in floating cages;(*Platax*). In ponds with liner, in pens, in «floc»; could lead to adapt the composition of the feed; the reference to requirements in clear water is each time, obviously a way of verification and rectification if necessary.

Conclusion

Food for marine fish will evolve in the next decade and searches are undertaken since several years in some directions (microalgae, macroalgae, concentrates, isolates). Two large groups will bring different needs (herbivores and carnivores) and is sure that in the future context, the herbivores will find favor in many countries of the tropics in particular. *Tilapia* in this regard has been in rapid development, however, far from solving a world hunger as could be expected in the 70's. However , the level of theoretical and practical knowledge today provides opportunities breeding cages, ponds , water at different salinities , semi-intensive , intensive, super- intensive (monosex red tilapia) and feeding by compounded feeds followed with roughly formulas that matched the requirements and these requirements could change from one farming system to another and paradoxically the super -intensive farming possible to reduce tau protein due to a phenomenon " external rumen " to the environment as well as In the microbial treatment substantial contribution

Cuzon *et al.* 2013. Requirements for some Marine Fish Species with an Emphasis on Organic Ingredients . En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 494-506.

compensating a relatively high " greening " of the food. Unfortunately, not all species are not as easy to breed and among marine fish intensification culture can create problems especially diseases and parasites saddled some farms. The expression of the growth potential is not always reached by species but some of them like *Lates calcarifer* surprised Nordic nutritionists with rapid growth rate that the temperature of the sea water is 27°C. Aside salmonids, can be seen today *Lates* and grouper farms in Indonesia with over 4000mt instantaneous biomass in floating cages and fish receive an extruded feed from Europe. A far cry from the days of "trash fish" although it is still up in this or that operation of the SEA or even whole sardines for tuna farming in the Mediterranean or in Baja California or Australia for example. And commercial feeds have taken over with good recognized grow-out performance as well as breeding in captivity (bass, bream, batfish), which indicates a degree of control and the need for maintaining the animals in optimal conditions (photoperiod, T°C, salinity, DO). All these developments have production of farmed fish in temperate and especially more and more tropical areas). Progress remains to be made with the additional pressure taking account of recent welfare of fish and the health of consumers.

References

- Albertini-Berhaut, J. and Vallet, F. 1979. Alimentary utilization of urea in mullet. *Tethys* 3.3 : 677-680.
- Agriculture et environnement, 2013. N°113. www.agriculture-environnement.fr
- Brown, PB., Davis, DA. and Robinson, EH. 1988. An estimate of the dietary lysine requirement of juvenile red drum. *JWAS*, 19:109-112.
- Bureau, D, Azevedo, PA., Tapia-Salazar, M. and Cuzon,G; 2000. Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp:potential implications. In Cruz-Suarez,E., Ricque, D., Tapia-Salazar, M. and Civera, R (Eds. Mem: del V Simp. Intl. de Nutricion acuicola, nov: 2000, Merida, Mexico, 111-140pp.
- Castillo, A., de los Santos, N.A., Ferreira, A., Cuzon, G. and Gaxiola, G. 2013. Starch quality effected energy partitioning of wild juvenile *Epinephelus morio*. *Aquaculture* (submitted)
- Cho, CY; Bureau, D P. 1995 Determination of the energy requirements of fish with particular reference to salmonids *Journal of applied ichthyology/Zeitschrift fur angewandte Ichthyologie*. Hamburg, Berlin 11:141-163.
- Chou, R. 1984 The effect of dietary water content on the feed intake, food conversion efficiency and growth of young seabass (*Lates calcarifer* Bloch).*Singapore J. Primary Ind.* 2.2:120-127.
- Choubert, G., de la Noue, J. and Luquet, P. 1983 A new automatic quantitative collecting device for fish feces. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 288: 68-72.
- Corraze, G., Medale, F., Panserat, S. 2010. Nutrition and metabolism. *Synthèses*, 101-119.
- Cowey, C B. 1995 Protein and amino acid requirements: A critique of methods *Journal of applied ichthyology/Zeitschrift fur angewandte Ichthyologie*. Hamburg, Berlin 11:199-204.
- Cuzon, G., Coatanea, D., Melard, J., Peignon, J M., Bard, F X. *et al.* 1975. First experiments on the rearing of tropical Carangidae in floating cages. /Presented at: 6. Annu. Meet. World Mariculture Society, Seattle, WA (USA).
- Davis, D.A. and E.H. Robinson. 1987. Dietary phosphorus requirements of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *J. World Aqua. Soc.*, 18(3), 129-136.
- Davis, D.A., D. Jirsa and C.R. Arnold. 1995. Evaluation of soybean proteins as replacements for menhaden fish meal in practical diets for the red drum *Sciaenops ocellatus*. *J. World Aqua. Soc.*, 26:48-58.
- Davis, D.A., Lazo J.P. and Arnold C.R.. 1996. Effects of the utilization of medium-chain triglycerides on growth and body composition of the red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture America* 1996
- Frazer and Davies, 2009. Nutritional requirements of cobia *Rachycentron canadum*: a review *Doi* 10.1111/j.1365-2109.02215x *Aqua.Res*: 40:1219-1234.

- Gatlin III, D.M., Mackenzie D.S., Craig S.R. and Neill W.H. 1992. Effects of dietary Na chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. *The Progressive Fish-Culturist*, 54:220-227.
- Gatlin III, D.M., O'Connell J.P. and Sarpa J.. 1991. Dietary zinc requirement of the red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 92:259-266.
- Gaylord, T.G., and Gatlin III D.M.. 1996. Determination of digestibility coefficients of various feedstuffs for red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 139:303-314.
- Girin, M., Metailler, R. and Nedelec, J. 1977 Adaptation of young sole (*Solea solea*) to various inert diets after metamorphosis completion. 3. Meet. on Mariculture of the Working Group of the International Council for the Exploration of the Sea; Brest (France) Publ.by: CNEXO, Brest (France). 35-50.
- Craig, S.R., C.R. Arnold and G.J. Holt. 1994. The effects of enriching live foods with highly unsaturated fatty acids on the growth and fatty acid composition of larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *J. World Aqua. Soc.*, 25: 24-431.
- Craig, S.R. and D.M. Gatlin, III. 1992. Dietary lysine requirement of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *J. World Aqua. Soc.*, 23(2), 133-137.
- Craig, S.R. and D.M. Gatlin, III. 1994. Choline and lecithin in the diet of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *World Aquaculture '94- New Orleans Book of Abstracts, WAS, Baton Rouge*, 145.
- Craig, S.R. and D.M. Gatlin, III. 1995. Dietary choline requirement of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture '95 - San Diego Book of Abstracts, WAS, Baton Rouge*, 91.
- Craig, S.R., W.H. Neill and D.M. Gatlin, III. 1995. Effects of dietary lipid and environmental salinity on growth, body composition, and cold tolerance of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 14:49-61.
- Craig, S.R., B. Washburn and D.M. Gatlin, III. 1997. Effects of lipid levels on weight gain, feed efficiency and liver composition of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *World Aquaculture '97-Seattle Book of Abstracts, WAS, Baton Rouge*, 92.
- Holt, G.J., F. Sun, P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jasper and F. Ollevier. 1991. Lipase activity and total lipid content during early development of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Larvi '91, Special Publ. EAS*, 15:30-33.
- Jimenez-Martinez, L D; Alvarez-Gonzalez, CA; Tovar-Ramirez, D; Gaxiola, G; Sanchez-Zamora, A; *et al.* 2012 Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*) *Fish Physiology and Biochemistry* 38.2 : 41-454.
- Lee, H B; Guillaume, J; Chou, R., Cuzon, G; Heng, H H. *et al.* 1995 Methodology in the study of seabass (*Lates calcarifer* Bloch): Nutritional requirements in Singapore *Journal of applied ichthyology/Zeitschrift fur angewandte Ichthyologie. Hamburg, Berlin* 11:302-308.

- Lemos, D; Lawrence, AL; Siccardi, A J. 2009 Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by *in vitro* pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Aquaculture 295.1-2 :89-98.
- Leray, C. 1971. Experimental approaches to artificial feeding of some sea fish: present research of the teleost and aquaculture physiology group Report of the 1970 workshop on fish feed technology and nutrition organized by FAO/EIFAC in collaboration with the Bureau of Sport Fisheries and Wildlife at the warmwater fish cultural laboratories, Stuttgart, Arkansas, 7-19 September 1970.
- Lochmann, R.T. and D.M. Gatlin III. 1993. Evaluation of different types and levels of triglycerides, singly and in combination with different levels of n-3 highly unsaturated fatty acid ethyl esters in diets of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture, 114:113-130.
- Lochmann, R.T. and D.M. Gatlin. 1993. Essential fatty acid requirement of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. Fish Physiology and Biochemistry, 12:221-235.
- Lupatsch, I. and Kissil, GW.2003. Modeling of energy and nutrient budgets in intensive aquaculture systems Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh 55.4: 224-225.
- McGoogan, B.B. and R.C. Reigh. 1994. Apparent digestibility coefficients for common feed ingredients in diets for red drum, *Sciaenops ocellatus*. World Aquaculture '94-New Orleans Book of Abstracts, WAS, Baton Rouge, 276.
- McGoogan, B.B. and R.C. Reigh. 1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. Aquaculture, 141:233-244.
- McGoogan, B.B., and D.M Gatlin III. 1997. Determination of protein and energy requirements of red drum, *Sciaenops ocellatus*, for maintenance and maximum growth. World Aquaculture '97-Seattle Book of Abstracts, WAS, Baton Rouge, 319.
- Metailier, R; Febvre, A; Alliot, E. 1973. Preliminary note on the essential aminoacids of the sea-bass *Dicentrarchus labrax* (Linne). Symposium on Brackishwater Aquaculture.
- Metailier, R; Cadena-Roa, M; Person-Le Ruyet, J. 1983 Attractive chemical substances for the weaning of Dover sole (*Solea vulgaris*): Qualitative and quantitative approach. J. World Maricult. Soc. 14: 679-684.
- Moon, H.Y. and D.M. Gatlin III. 1991. Total sulphur amino acid requirement of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture, 95(1-2), 97-106.
- Moon, H.Y., W.H. Neill and D.M. Gatlin. 1991. Evaluation of protein sources for red drum *Sciaenops ocellatus* diets. JWAS, 22:42A-43A.
- Moon, H.Y.L. and D.M. Gatlin III. 1994. Effects of dietary animal proteins on growth and body composition of the red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture, 120:327-340.

- New, M., Tacon, G.J. and Csavas, I. 1993. Farm-made feeds. Proceed: Regional Expert Consultation on farm-made aquafeeds, dec. 1992, Bangkok, Thailand, ed. New *et al.*, 434pp
- Oliva-Teles, A, 2000. Recent advances in european seabass and gilthead seabream nutrition. *Aqua. Intl.* 8:477-492
- Parazo, MM. 1990. Effect of dietary protein and energy level on growth, protein utilization and carcass composition of *Siganus guttatus* *Aquaculture*, 25:86-49.
- Person-Le Ruyet, J; Menu, B; Cadena-Roa, M; Metailler, R. 1983 Use of expanded pellets supplemented with attractive chemical substances for the weaning of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. World Maricult. Soc.*14: 676-678.
- Sanz Brau, 1990. Sur la nourriture des jeunes thons rouges (*Thynnus thynnus* (L: 1758) des côtes du golfe de Valence. *Rapp. Comm. Int. Sci. Mer Mediterr.* 32, 274pp.
- Wisner, BB., Capo, TR. And Cramer, J.1991. Comparison of four commercial aquaculture diets for red drum. *JWAS* 22:66A.
- Yu, YY., Zhou, JB., Yu, M.and Li, MY. 2012. The nutritional composition and evaluation of wild and cultured *Acrossocheliu fasciatus*. *Fish. Sci. Shuichan Kexue*, 31:207-219.

Avances en el Requerimiento de Vitaminas en Peces Marinos

María Cristina Chávez Sánchez

Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental del
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

E-mail: marcris@ciad.mx

Resumen

A escala global se están realizando esfuerzos por cultivar diversas especies de peces marinos con el objeto de tratar de cubrir la demanda de proteína del futuro. Uno de los problemas que enfrenta este objetivo es contar con alimentos adecuados que cubran los requerimientos nutricionales de cada una de las etapas de crecimiento de las especies que se pretende llevar a escala comercial. La mayoría de los esfuerzos de investigación en nutrición de peces marinos se centra principalmente en las proteínas y los ácidos grasos esenciales, y muy poco se ha hecho en cuanto a vitaminas y minerales. La falta de conocimiento en el requerimiento ocasiona que se usen las dietas de otros peces tratando de cubrir las necesidades nutricionales de la especie. En el caso de las vitaminas, la más estudiada es la vitamina C debido a su alta inestabilidad. Se demuestra en base a estudios realizados con diversas especies, que los requerimientos de vitamina C para juveniles con pesos de 3 a 30 g, varía de 15 a 118 mg kg⁻¹ de AA basado preferentemente en ganancia de peso, por lo que no es factible usar el mismo requerimiento para todas ellas. Este trabajo tiene como fin, sin querer ser una revisión exhaustiva de los requerimientos conocidos de vitaminas en peces marinos, mencionar algunos de ellos y hacer hincapié en la importancia que tiene el seguir realizando dichos estudios pues aunque parezca en muchas ocasiones trillado el camino de la investigación para conocer los requerimientos y que pareciera que ya no se van a encontrar nuevos conocimientos, se siguen obteniendo nuevos hallazgos sobre el papel de cada una de ellas.

Palabras clave: *vitaminas, peces marinos*

De acuerdo a la FAO (2012) en 2011 se cosecharon por acuicultura 19.3 millones de toneladas de organismos marinos en el mundo. La producción global continúa creciendo en este milenio de tal manera que en 2010 registró otro record alcanzando los 60 millones de toneladas (sin contar las plantas acuáticas y productos no alimentarios). Dentro de estas estadísticas está el cultivo de peces marinos, los cuáles han tenido un rápido crecimiento con una tasa anual de 9.3% de 1990 a 2010, especialmente los salmónidos que incrementaron su producción de 278,000 toneladas en 1990 a 1.5 millones de toneladas en 2010. Pero también hubo incrementos importantes en especies tales como las seriolas, pargos, grñidores, meros, tambores, mujilidos, turbot, diferentes especies de peces planos, cobia, pámpano, bacalao, peces globo y atunes. En total en 2010 se produjeron 1.8 millones de toneladas de peces marinos, cifra que representa el 1.3% del total FAO (2012). No obstante este bajo porcentaje, se ve al cultivo de peces marinos como una acuicultura naciente y prometedoras debido a que en un futuro cercano se ve la escasez de agua dulce en muchas partes del mundo y debido a ello se están haciendo esfuerzos por conseguir el cultivo de diversas especies marinas que permitan coadyuvar en cubrir la demanda de proteínas del futuro.

Sin embargo, el cultivo de peces marinos representa retos en muchas aristas, uno de ellos es el contar con alimentos adecuados, especialmente en las etapas de larvas y reproductores. La etapa más difícil del cultivo de peces marinos es la larvaria y el éxito depende en gran porcentaje de controlar la calidad nutricional de los primeros estadios así como de proporcionar a los reproductores un régimen alimenticio que cubra todos sus requerimientos para una buena producción de huevo y larvas (Hernández-Palacios e Izquierdo (1997)). Por lo anterior, para lograr el cultivo de las diferentes especies que se consideran con potencial de cultivo, se requiere del estudio de los requerimientos nutricionales en las fases importantes de desarrollo de los diferentes nutrientes tales como proteínas, ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas. La literatura reporta importante número de avances en la descripción de los requerimientos de proteínas y ácidos grasos de diferentes especies de peces marinos, sin embargo en cuanto a vitaminas y minerales todavía es muy escasa y la mayoría de los estudios se realizan en juveniles pequeños (3 a

15 gramos) por lo que la información obtenida no se puede extrapolar a larvas de primera alimentación exógena o a reproductores.

En el caso de las vitaminas la información más abundante es la de la vitamina C, especialmente por su alta inestabilidad en los alimentos y el papel importante en diversos roles de la función de los peces. Sin embargo las demás vitaminas solubles en agua y las vitaminas liposolubles no dejan de ser igual de importantes. La mayoría de los acuicultores al desconocer los requerimientos nutricionales de vitaminas y minerales utilizan los valores que se proporcionan en dietas balanceadas de otros peces, esperando que éstas sean suficientes para cubrir la demanda de la especie en cuestión. Por ejemplo se conoce poco del papel de las vitaminas solubles en grasa durante la ontogenia de los peces marinos y en la mayoría de las ocasiones de conocerse se proporcionan los mismos requerimientos que a juveniles (Hamre *et al.*, 2010). Este desconocimiento puede ocasionar o alto costo en el alimento por incremento en la cantidad de vitaminas solubles en agua e intoxicación por exceso en vitaminas solubles en grasa o bien si se proporciona una cantidad menor a la requerida presentar signos clínicos de deficiencia ya sean crónicos o agudos dependiendo de la deficiencia. Cuando la deficiencia es crónica puede ser enmascarada por enfermedades infecciosas al deprimirse el sistema inmunológico y nunca saber que el problema principal es una carencia de uno o más nutrientes.

Este trabajo tiene como fin, sin querer ser una revisión exhaustiva de los requerimientos conocidos de vitaminas en peces marinos, mencionar algunos de ellos y hacer hincapié en la importancia que tiene el seguir realizando dichos estudios pues aunque parezca en muchas ocasiones trillado el camino de la investigación para conocer los requerimientos y que pareciera que ya no se van a encontrar nuevos conocimientos, se siguen obteniendo nuevos hallazgos sobre el papel de cada una de ellas. Por ejemplo se ha observado por primera vez que la vitamina D3 es importante para el desarrollo ontogénico del sistema digestivo de las larvas (Dariasa *et al.*, 2010), o bien hay que elucidar aspectos como ¿porqué a veces la Vitamina E indica que es necesaria para promover el sistema inmunológico y en ocasiones parece que no es así?

Tomando como ejemplo los estudios de vitamina C (Ácido Ascórbico AA) que son los más abundantes en el caso de los peces marinos, se muestran en la Tabla 1, los requerimientos obtenidos en 11 especies de peces marinos y como se observa, los estudios se llevaron a cabo en juveniles que variaron de 3 a 30 gramos y cuyos requerimientos variaron de 15 a 118 mg kg⁻¹ de AA basado preferentemente en ganancia de peso. Con excepción de los peces que pesaron 17.82 y 30 g al inicio de los experimentos los demás se encontraron entre los 3 y los 12 gramos por lo que podríamos considerar que son de un grupo de peso semejante, sin embargo las variaciones en el requerimiento siguen siendo muy importantes. Esto indica que no se pueden utilizar fácilmente los requerimientos de una especie para alimentar a otra diferente porque aparte de las condiciones experimentales, las materias primas utilizadas y su calidad, las especies tienen diferentes hábitos alimenticios, diferentes condiciones fisiológicas y por lo tanto diferentes requerimientos. Este no solo es el caso para la vitamina C sino para todos los nutrientes. Sin embargo, es posible que los requerimientos de algunas especies sean similares a los de otras, por ejemplo se menciona que para la lobina de mar (*Dicentrarchus labrax*) la dieta para salmones mencionada en NCR (1993) cubre los requerimientos de la especie (Webster y Lim 2002).

Tabla 1. Datos comparativos de requerimientos de ácido ascórbico para diferentes especies de peces marinos basado en ganancia de peso, concentración de ácidos ascórbico en hígado y aparición de primeras señales de signos de deficiencia.

Especies	Forma de	Requerimient	Requerimiento	Primera	Referencia
Nombre	vitamin C	o de AA mg	AA mg kg⁻¹	aparición de	
común	usada y su	kg⁻¹ basado	basado en	señales clínicas	
Peso inicial	equivalente en	en ganancia de	concentración	de deficiencia	
Tiempo	AA mg kg⁻¹	peso	hepática		
Experimental					
<i>Lates calcarifex</i>	L-ascorbyl-2-	500-700 mg	Crecimiento	15 días	Boonyaratpa
<i>Barramundi</i>	monophosphat		normal	Hemorragias,	lin 1994 in :
Asian sea bass	e			distorsión	Webster and
Crías	(AMP),	1100 mg	Para	filamentos	Lim 2002
60 days			almacenamiento	branquias,	
				opreculos cortos,	
				exophtahlmia,	

				escoliosos, lordosis	
<i>Sparus aurata</i> (seabream)	Ascorbyl polyphosphate	25	-----	8 ^{ava} semanas	Henrique <i>et al.</i> (1998)
9 g	0, 25, 50, 100,			más oscura,	
12 semanas	200			pérdida de equilibrio	
<i>Sciaenops ocellatus</i> (Red drum)	Ascorbate polyphosphate	15 ± 3	No detected	8 ^{ava} semanas	Aguirre & Gatlin, (2001)
3.6	0, 10, 20, 30, 45, 60, 75, or 150			Reducción en peso, lordosis, escoliosis, pérdida de equilibrio	
<i>Paralichthys olivaceous</i> (Olive flounder)	L-ascorbyl-2- polyphosphate (LAPP).	93	150	12 ^{ava} semana	Wang <i>et al.</i> (2002)
3 g	0, 25, 50, 75, 150,1500			Anorexia, escoliosis, cataratas, exophthalmia, erosion aletas	
12 semanas					
<i>Oplegnathus fasciatus</i> (Parrot fish)	L-ascorbyl-2- monophosphat e (AMP),	118	-----	3a semana	Wang <i>et al.</i> (2003a)
3.9 g	0, 60, 120, 240, 480 and 2000			Reducción crecimiento, obscurecimient o, anorexia, hígado con severa atrofia, alta mortalidad	
11 semanas					
<i>Sebastes schlegeli</i> (Korean rockfish)	AMP-Na/Ca AMP-Ca,	106	No se logró meseta	9a semana	Wang <i>et al.</i> (2003b)
3.1.g-	0, 50, 100, 200, 400, and 800	101 AMP- Na/Ca		Anorexia, nado errático, color ibscuro en piel, reducción crecimiento	
12 semanas		112 of AMP- Ca			
<i>Lateolabrax japonicus</i> (Japanese seabass)	L-ascorbyl-2- polyphosphate (LAPP).	47.6	53.5 crecimiento	8 ^{ava} semana	Ai <i>et al.</i> (2004)
	0.0, 12.2, 23.8,	53.5	93.4 conc. en hígado	escoliosis, lordosis, erosión de	
			207 conc. en		

6.26 g	47.6, 89.7,		músculo	aletas	
8 semanas	188.5 and 489.0			alta mortalidad	
<i>Epinephelus malabaricus</i> (Grouper)	L-ascorbyl-2- sulphate (C2S)	46	No se logró meseta	----- --	Lin & Shiau, (2005)
7.58 g- 8 semanas	7, 16, 28, 55, 86, 142 L-ascorbyl-2- polyphosphate (C2PP), 4, 9, 15, 31, 49, 75				
<i>Pseudosciaen a crocea</i> (Yellow cracker)	L-ascorbyl-2- polyphosphate (LAPP).	23.8 basado en tasa de supervivencia	87	No hubo señales clínicas de deficiencia. Sobrevivencia aumentó con aumento de vit C	Ai <i>et al.</i> (2006)
17.82 g 8 semanas	0.1, 12.2, 23.8, 47.6, 89.7, 188.5 and 489.0				
<i>Takifugu rubripes</i> (Tiger puffer)	L-ascorbyl-2- monophosphat e	29 – 36??	-----	So hubo señales de deficiencia	Eo & Lee, (2008)
30 g 10semanas	0, 40, 80, 160 and 700				
<i>Rachycentrum canadum</i> (Cobia)	L-ascorbyl-2- polyphosphate (LAPP)	44.7	53.9	Probre crecimiento, alta mortalidad, baja tasa de alimentación	Xiao <i>et al.</i> (2009)
4.59 g 10 semanas	2.70, 8.47, 28.3, 80.6, 241 and 733				
<i>Lutjanus gutattus</i> (Pargo flamenco)	L-ascorbyl-2- polyphosphate (LA2PP)	29	No se logró meseta	8 ^{ava} semana Erosion aletas, Piel oscura, descamación, nado errático	Trabajo en preparació n
8.0 g	0, 7, 19, 29, 62 and 250				

13 semanas

La segunda vitamina más estudiada en cuanto a requerimiento en peces marinos es la vitamina E. En algunos casos en combinación con el requerimiento de vitamina C. En ambos casos la importancia es que son nutrientes antioxidantes e importantes para el mejor funcionamiento del sistema inmune. La vitamina E disminuye la producción de peróxidos lipídicos y especies reactivas de oxígeno que se consideran tóxicos y destruyen las células del sistema inmunitario y otros tejidos. La vitamina E, es soluble en lípidos y protege los ácidos grasos altamente insaturados en contra de la degeneración oxidativa. Se han realizado estudios para conocer el efecto de ésta vitamina en el sistema inmunológico de los peces (Leith and Kaattari, 1989; Lall and Olivier, 1993), pero en este sentido Hardie *et al.* (1990) menciona que los efectos de la vitamina E en el sistema inmune no son consistentes ya que por ejemplo en el salmón del Atlántico el sistema inmune no respondió a las dietas que variaron de 7 a 880 mg/kg de acetato de DL- α -tocoferol, pero que sin embargo, el sistema complementario se vio comprometido en los peces con bajos niveles de la vitamina. La Tabla 2 muestra algunos estudios sobre el requerimiento de vitamina E desde larvas en su primera alimentación hasta organismos de 208 gramos de peso en 7 especies de peces marinos, siendo tres de ellos estudios realizados en los últimos 3 años.

Tabla 2. Datos comparativos de requerimientos de vitamina E para diferentes especies de peces marinos basados en ganancia de peso, sobrevivencia y signos clínicos de deficiencia.

Especie Nombre común Peso inicial Tiempo experimental	Niveles de Vitamina E en mg kg ⁻¹ de dieta seca	Requerimient o de Vitamina E en mg Acetato de DL- α -tocoferol/kg dieta	Requirimento basado en	Señales de deficiencia	Referenci a
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> Chinnok salmon	0, 10, 20, 40, 80 mg Acetato de DL- α - tocoferol /kg dieta	3 mg	Señales de deficiencia	Pobre crecimiento exophtalmia, ascites,	Woodall <i>et al.</i> , 1964

Crías pequeñas 24 semanas					fragilidad eritrocitos, anemia, branquias con hiperplasia, epicarditis	
<i>Salmo salar</i> Salmón del Atlántico Primera alimentación 0.165 g 2 meses	0, 15, 30, 60, 120 mg Acetato de DL- α - tocoferol /kg dieta	60 mg	Sobrevivenci a, peso ganado, vitamina en hígado y sangre	Anorexia, peces delgados, despigmenta ción piel, altas mortalidades	Hamre y Lie, 1995	
<i>Oplegnathus fasciatus</i> <i>Parrot fish</i> 12.3 g 16 semanas	0, 20, 40, 60, 120 or 500 mg dl- α -tocopheryl acetate/kg dieta	45 mg	Maximo crecimiento y máximo contenido en tejidos	Reducción apetito bajo crecimiento, baja TCA y hematócito, Exophthalmi a, distrofia muscular, opérculos cortos	Bai and Lee, 1998	
<i>Dicentrarchu s labrax</i> Sea bass 208 g 87 días	139 mg kg ⁻¹ , 254 mg kg ⁻¹ , 493 mg kg ⁻¹ and 942 mg kg ⁻¹ ,	942	Flesh quality	-----	Gatta <i>et</i> <i>al.</i> , 2001	
<i>Anguila japonica</i> Anguila 15 g 12 semanas	Acetato de DL- α -tocoferol 0, 17, 32, 62 y 19 mg kg ⁻¹	<21.2 mg y <21.6 mg	WG, SGR, FE y PER		Bae <i>et</i> <i>al.</i> , 2013	
<i>Oplegnathus</i>	Acetato de DL- α -tocoferol	38	Para	No hubo	Galaz <i>et</i>	

<i>fasciatus</i>	0, 25, 50, 75, 100, 500 mg		Crecimiento	señales	<i>al.</i> , 2010
<i>Parrot fish</i>			normal	clínicas ni	
20 g				mortalidades	
12 semanas			Para		
		Más de 500	incrementar		
			respuesta		
			inmune		
<i>A.latus</i>	HUFA+5%, 10% and 15%	Enriquecer	Por	La tasa de	Adlo <i>et</i>
Brema	<i>Artemia</i> enriquecida con	<i>Artemia</i>	supervivenci	mortalidad	<i>al.</i> , 2012
marina de	vitamina C	<i>fransiscana</i>	a	fue	
aleta amarilla		con HUFA y		significativa	
Larva en su	HUFA+5% and 10%	vitaminas E		mente entre	
primer	<i>Artemia</i> enriquecida con			grupo	
alimentación	vitamina E			control y	
exógena con				experimental	
53 ± 5 mg	HUFA+2.5% (W/W)			es	
body weight	<i>Artemia</i> enriquecida con				
	vitamina C y E				
	HUFA+5% (W/W)				
	<i>Artemia</i> enriquecida con				
	vitamina C y E				
	<i>Artemia</i> no enriquecida =				
	control				

Con respecto a los estudios realizados con otras vitaminas, estos son más escasos. Recientemente se llevó a cabo un trabajo con la vitamina D₃ sobre el crecimiento, sobrevivencia y morfogénesis de la lobina de mar (*Dicentrachus labrax*) durante el desarrollo larval de esta especie. Se proporcionaron niveles de 0, 19.2, 38.4, or 140 IU de VD₃ por gramo de dieta (D0, D1, D2 y D3 respectivamente) y se reportan supervivencia, madurez intestinal, osificación y por primera vez un impacto sobre la ontogénesis del sistema digestivo y que solamente los grupos alimentados con 19.2 UI/g de Vitamina D₃ se logró una adecuada morfogénesis larval (Dariasa *et al.*, 2010)

Los estudios sobre requerimientos de vitaminas para la lobina marina de Asia o barramundi (*Lates calcarifex*) son contradictorios ya que unos autores mencionan que los peces no requieren colina, niacina, inositol, vitamina E, piridoxina o ácido pantoténico (Boonyaratpalin *et al.*, 1988 y Pimoljinda y Boonyaratpalin 1989), mientras que Wanakowat *et al.* (1989) y Boonyaratpalin y Wanakowar, (1993) demostraron la necesidad de los peces para su crecimiento normal de 5 mg kg⁻¹ de piridoxina y de tiamina, ácidos pantoténico (15 mg kg⁻¹ para crecimiento normal, eficiencia alimenticia y crecimiento), inositol y vitamina E para su crecimiento normal.

Tabla 3. Estudios reportados sobre los requerimientos de vitaminas en *Lates calcarifex*

Vitamina	Requerimiento		Referencia
Piridoxina	5 mg kg ⁻¹	para crecimiento normal	Wanakowat <i>et al</i> (1989)
Piridoxina	10 mg kg ⁻¹	para niveles normales de linfocitos	Boonyaratpalin y Wanakowar., 1993
Acido pantoténico	15 mg kg ⁻¹	para crecimiento normal, eficiencia alimenticia y sobrevivencia	Boonyaratpalin <i>et al</i> 1994
	90 mg kg ⁻¹	Para almacenaje en el tejido, sin embargo no se alcanzó meseta así que es necesario más	

En el caso de la brema marina roja (*Pagrus major*) se realizaron varios estudios para determinar los requerimientos de vitamina C con diferentes tipos de vitamina encontrándose un requerimiento para un máximo de crecimiento de 50 mg de L-Ascorbil -2 fosfato de magnesio/ kg⁻¹ de dieta. En cuanto a otras vitaminas Yone and Fuji (1974),

eliminaron diferentes vitaminas de las premezclas y observaron anorexia y lento crecimiento.

Tabla 4. Estudios sobre los requerimientos de vitaminas en *Sparus aurata*

Vitamina	Requerimiento	Referencia
Ácido Nicotínico	63-83 mg kg ⁻¹ de dieta	Morris and Davis (1995a)
Tiamina (B1)	10 mg kg ⁻¹ de dieta	Morris and Davis (1995b)
Pirodoxina (B6)	1.97 mg kg ⁻¹ de dieta	Kissil <i>et al.</i> , (1981)
Biotina	0.21 y 0.37 mg kg ⁻¹ de dieta	Kissil (1981)

Actualmente, las formulaciones de dietas para diferentes especies que recientemente están siendo estudiadas para llevarlas al cultivo comercial está basada en información limitada de requerimientos de nutrientes, dejando a los organismos malnutridos y altamente susceptibles a enfermedades. En México se están cultivando ya sea experimentalmente, a escala piloto o semi-comercial alrededor de 12 especies de peces marinos. En varias de ellas se han llevado a cabo investigaciones sobre requerimientos de proteínas y ácidos grasos y solamente en el caso del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* se han iniciado estudios sobre sus requerimientos nutricionales en vitaminas. Se determinó que el requerimiento de vitamina C para un óptimo de crecimiento y sin señales clínicas de deficiencia es de 29 mg AA kg⁻¹ pero se requieren más de 753 mg kg⁻¹ de LA2PP (equivalente a 250 mg AA kg⁻¹ dieta) para eliminar alteraciones histológicas (Trabajo en preparación), también se están realizando los trabajos para el requerimiento de ácido pantoténico y riboflavina.

Referencias

- Adloo MN, Matinfar, A. and Sourinezhad, I. 2012. Effects of Feeding Enriched *Artemia franciscana* with HUFA, Vitamin C and E on Growth Performance, Survival and Stress Resistance of Yellowfin Seabream Larvae. *J Aquacult Res Dev* 2012, 3:8. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000157>
- Aguirre P. and Gatlin DM. 2001. Dietary vitamin C requirement of red drum *Sciaenops ocellatus* aquaculture Nutrition: 5(4): 247-250
- Aguirre P, Gatlin DM III (1999) Dietary vitamin C of red drum *Sciaenops Ocellatus*. *Aquacult Nutr* 5:247-249
- Ai Q, Mai K, Zhang C, Xu W, Duan Q, Tan B, Liufu Z (2004) Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 242:489–500
- Ai Q, Mai K, Tan B, Xu W, Zhang C, Ma H, Liufu Z (2006) Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 261:327–336
- Bai. SC and Lee KJ. 1998. Different levels of dietary dl- α -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture* 161, 1–4, 405–414
- Bae, J.Y. Park, G. H., Yoo., K.Y. Lee., J.Y. Kim, D.J. and Bai S. C. 2013. Evaluation of optimum dietary vitamin E requirements using DL- α -tocopheryl acetate in the juvenile eel, *Anguilla japonica* 29, (1): 213–217
- Boonyaratpalin, M. and Wanakowat, J. 1993. Effect of thiamine, riboflavin, pantothenic acid and inositol on growth, feed efficiency and mortality of juvenile seabass In: In Webster, C.D., y Lim C.E. (Editors). 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. Great Britain. pp. 40-50
- Boonyaratpalin, M., Unprasert, N., Kosutharak, P., Chumsungnern, S. and Sothana, W. 1988. Effect of choline, Niacin, inositol, and Vitamin E on growth, feed efficiency and survival of seabass fingerlings in freshwater. Technical Paper No 7. National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, Thailand, 22 pp. (In Thai): In Webster, C.D., y Lim C.E. (Editors). 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. Great Britain. pp. 40-50
- Boonyaratpalin, M., Boonyaratpalin, S. and Supamataya, K (1994a). Ascorbyl-Phosphate-Mg., as dietary vitamin C sources for seabass (*Lates calcarifer*). In Webster, C.D., y Lim C.E. (Editors). 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. Great Britain. 418 pp
- Boonyaratpalin, M., Wanakowat, J. and Hangsapreurke, K. 1994b. Pantothenic acid requirement of seabass In Webster, C.D., y Lim C.E. (Editors). 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. Great Britain. pp. 40-50
- Dariasa MJ., Mazuraisa, D., Koumoundourosb, G., Glynatsib, N., Christodouloupouloub, S., Huelvana, C., Desbruyeres, E., Le Galla, M., Quazuguela, P., Cahua L.C. and Zambonino-Infante, J.L. 2010.
- Chavez, C. 2013. Avances en el Requerimiento de Vitaminas en Peces Marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 507-520.

- Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Aquaculture* January 2010, Volume 298, Issues 3-4, Pages 300-307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.002>
- Eo J, Lee K (2008) Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Fish and Shellfish Immunol* 25:611-616
- FAO, 2012. World Review of Fisheries and Aquaculture. <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e01.pdf>
- Galaz GB., Kim, S.S. and Lee, K.J. 2010. Effects of Different Dietary Vitamin E Levels on Growth Performance, Non-specific Immune Responses, and Disease Resistance against *Vibrio anguillarum* in Parrot Fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 23, No. 7 : 916 - 923
- Gatta, Pirini, Testi, Vignola and Monetti (2000), The influence of different levels of dietary vitamin E on sea bass *Dicentrarchus labrax* flesh quality. *Aquaculture Nutrition*, 6: 47–52. doi: 10.1046/j.1365-2095.2000.00127.x
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., Secombes, C.J., 1990. The effect of dietary vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 87, 1-13.
- Hamre K and Lie, O. 1995. Minimum requirement of vitamin E for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at first feeding. *Aquaculture Research*., 26: 175–184
- Hamre, K., Kross C, Lock E.J. & Moren M. 2010. Review article. Roles of lipid-soluble vitamins during ontogeny of marine fish larvae. *Aquaculture Research*, 2010, 41: 745-750
- Hernández-Palacios H., Izquierdo M. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock . In: Tacon A.G.J. (ed.), Basurco B. (ed.). *Feeding tomorrow's fish*. Zaragoza: CIHEAM, 1997. p. 243-264 (Cahiers Options Méditerran éenn es; n. 22)
- Henrique MMF, Gomes EF, Gouillou-Coustans MF, Oliva-Teles A, Davies SJ (1998) Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 61(1–4): 415–426
- Kissil G.W. 1981. Known nutritional requirements of the gilthead seabream *Sparus aurata* in culture In Webster, C.D., y Lim C.E. (Editors). 2002. *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*. CABI Publishing. Great Britain. pp. 64-78
- Kissil, G.W. Cowey, C.B., Adron J.W., and Richards R.H. 1981. Piridoxine requirements of the gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture* 23: 243-255
- Lall, S.P., Olivier, G., 1993. Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish. In: *Fish Nutrition in Practice* (Kaushik, S.J, Luquet, P., Eds.), pp.101-118. INRA, Paris.
- Leith, D. and Kaatari, S., 1989. Effects of vitamin nutrition on the immune response of hatchery-reared salmonids. Final report. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Div. of Fish and Wildlife, Portland, Oregon.
- Lin M, Shiau Y (2005) Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 244:215– 221
- Chavez, C. 2013. Avances en el Requerimiento de Vitaminas en Peces Marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 507-520.

- Morris, P.C., and Davies, S.J., 1995a. The requirement of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L). for nicotinic acid. *Animal Science* 61, 437-443.
- Morris, P.C., and Davies, S.J., 1995b. Thiamine supplementation of diets containing varied lipid: carbohydrate ratio given to gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Animal Science* 61, 597-603
- NCR (National research Council) 1993. Nutrient requirements of fish . Natioanl Academy of Sciences , Washinton, DC. 114 p
- Pimoljinda, T., and Boonyaratpalin, M., 1989. Study on vitamin requirements of seabass *Lates calcarifer* in sea water. Technical paper No. 3. Phuket Brakishwater, Department of Fisheries, Thailand 24 pp (InThai) in: In Webster, C.D., y Lim C.E. (Editors). 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. Great Britain. pp. 40-50
- Wanakowat, J., Boonyaratpalin, M., Pimoljinda, T., and Assavaaree M. 1989. Vitamin B6 requirement of juvenile seabass *lates calcarifer*. In takeda, M. and Wartanabe T. (eds). The Current status of fish nutrition in Aquaculture. Tokio University of Fisheries, Tokyo, Japan pp. 141-147.
- Wang X, Kim K, Bau SC (2002) Effect of different dietary levels of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceous* (Temminck et Schlegel) *Aquacul Res* 33: 261-267
- Wang X, Kim K, Sungchul C (2003a) Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 225:387-395
- Wang X, Kim KC, Bai S, Huh M, Cho BY. 2003b) Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture* 215:203-211
- Webster, C.D., y Lim C.E. (Editors). 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. Great Britain. 418 pp
- Woodall, A.N., Ashley, L.M., Halver, J.E., Olcott, H.S. and Van Der Veen J. 1964. Nutrition of salmonoid fishes: XIII. The α -tocopherol requirement of *Chinook salmon*. *J. Nutr.*, 84 (1964), pp. 125–135
- Xiao LD, Mai KS, Ai HQ, Xu W, Wang XJ, Zhang WB, Liufu ZG (2009) Dietary ascorbic acid requirement of cobia, *Rachycentron canadum* Linnaeus. *Aquacult Nutr* 16(6):582-589
- Yone, Y. and Fujo, M. 1974. Studies on nutrition of red sea bream. X. Qualitative requirements for water soluble vitamins. Report of Fishery research laboratory. Kyushu University 2, 25-32) (En japonés con resumen en ingles) In Webster, C.D., y Lim C.E. (Editors). 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. Great Britain. pp. 51-63

Requerimientos de Proteína y Energía en Juveniles Silvestres del Mero rojo *Epinephelus morio*

Silva Adriana¹, Cuzón Gerard³, Gaxiola Gabriela²

¹Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México

²UMDI-Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México ³Centro Oceanológico del Pacífico- IFREMER, Francia

E-mail: g_gaxiola@hotmail.com

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo determinar la relación de proteína/energía en dietas para juveniles silvestres de *Epinephelus morio* estudiando la combinación óptima de fuentes de origen animal y vegetal seleccionadas por la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*, para la máxima retención en el crecimiento y mayor supervivencia. La digestibilidad de ingredientes pre-seleccionados fue evaluada en juveniles de *E. morio* con la técnica de pH-Stat, usando extractos multienzimáticos del estómago, intestino y ciegos del organismo objetivo. Los resultados muestran que la harina de jaiba y el polvo de camarón presentaron mayores GH (grado de hidrólisis) en el estómago (87 y 32% GH para harina de jaiba y polvo de camarón respectivamente). Mientras que en ciegos e intestino el suero de leche presentó valores de GH de 6 y 7.4% no difiriendo de la harina de jaiba (4.5 y 8.7% para ciegos pilóricos e intestinos respectivamente) ($p>0.05$). Concentrado proteico de soya (CPS) fue el mejor ingrediente de origen vegetal con 3.6, 4 y 4.1% GH para estómago, ciegos pilóricos e intestinos respectivamente. La pasta de canola+ mostró valores de GH% superiores al agregar la enzima fitasa (0.8 to 2%). Este proceso se repitió en condiciones alcalinas 0.6 a 2.6 y 1 a 2.2% ciegos pilóricos e intestinos respectivamente. A partir de estos resultados, se diseñaron cuatro dietas elaboradas con 1) polvo de camarón (DPC), 2) suero de leche (DSL), 3) concentrado proteico de soya (DCPS) e 4) Pasta de canola +phytase (DPC+). Posteriormente al evaluarlas *In vivo*, los resultados muestran que los juveniles alimentadas con la DSL y DPC+ tuvieron el mayor ADC para proteína (95 e 92% respectivamente) comparadas con los otros tratamientos. Pos selección de las fuentes proteicas, se evaluaron los efectos de los niveles de proteínas en juveniles de *Epinephelus morio* sobre los parámetros de crecimiento y composición corporal. Un total de 150 juveniles (206 a 212g) fueron sembrados en 15 tanques de fibra de vidrio, 500 L, durante 90 días. Para el experimento se utilizaron cinco dietas isocalóricas, que consistían en niveles (37; 42;47;52; 57%) proteína

cruda. Los resultados obtenidos en el bioensayo determinaron que las dietas con mayor porcentaje de proteínas incrementaron más el crecimiento en peso- longitud en los juveniles de mero rojo comparado con las dietas de menores niveles de proteína. Estos resultados indican que los juveniles del mero rojo requieren por lo menos 52% de proteína en la dieta. Entre tanto, esta especie responde positivamente a dietas con niveles superiores de PC. Para finalizar se evaluó el desempeño productivo de juveniles silvestres del mero rojo (*Epinephelus morio*), alimentados con dietas conteniendo diferentes niveles de energía y proteína. Se implementaron cuatro dietas con dos niveles de lípidos (6 y 12 %) y dos niveles de proteína (42 y 52%). Los juveniles alimentados con las dietas de mayor contenido proteico, presentaron crecimiento equivalente a los juveniles alimentados con el nivel proteico más bajo (42%) y nivel de lípidos más altos (12%). Se recomienda utilizar una relación de proteína/lípidos de 42/12 en dietas para juveniles de *E. morio*, mezclando harinas de origen animal y vegetal para propiciar el buen desarrollo de los animales.

Palabras clave: *requerimientos, proteína, mero rojo*

Silva *et al.*, 2013. Requerimientos de Proteína y Energía en Juveniles Silvestres del Mero rojo *Epinephelus morio*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 521-531.

Introducción

La piscicultura enfocada a los serránidos de la subfamilia *Epinephelinae* en México está en desarrollo, a diferencia de otras partes del mundo. En Asia particularmente en la zona tropical del Oriente (China, Hong Kong, Taiwán) y el sudeste asiático (Indonesia, Malasia, Filipinas, Singapur, Tailandia, y Vietnam), su alimentación sigue siendo un factor limitante en la producción, pues no existe un alimento balanceado comercial para este grupo de peces marinos (SIH-YANG *et al.*, 2005). Sin embargo la producción intensiva de esta especie depende de muchos factores y uno de ellos es una nutrición adecuada. La determinación del requerimiento de proteína es prerequisite para el desarrollo de esta, e influye en el adecuado crecimiento (ELANGO VAN *et al.*, 1997). El desarrollo de investigación sobre nutrición en Mero, es mínima debido entre otros factores a la gran diversidad de especies de Mero que existen. El mero rojo (*Epinephelus morio*) presenta carne de excelente calidad, la pesca de Mero rojo contribuye al desarrollo regional, la economía de subsistencia, genera divisas por concepto de exportaciones y da ocupación a un número importante de personas del sector pesquero e industrial en la península de Yucatán. Estas y otras características hacen que el Mero rojo sea un candidato para producción intensiva en México. Sabiendo que el conocimiento de las necesidades nutricionales es el paso fundamental para identificar las características relacionadas con el crecimiento de los peces, que el alimento representa gran parte de los gastos de funcionamiento de la producción, que la proteína es uno de los nutrientes más importantes en la formulación de dietas debido a la alta demanda por parte del pez y el alto costo de este ingrediente, este trabajo tuvo como objetivo determinar la relación de proteína/energía en dietas para juveniles silvestres de *Epinephelus morio* estudiando la combinación óptima de fuentes de origen animal y vegetal seleccionadas por la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*, para la máxima retención en el crecimiento y mayor supervivencia.

Material y Métodos

Para cumplir con el objetivo de la presente investigación se realizó un total de cuatro

experimentos. Los juveniles de *E. morio* utilizados en los experimentos fueron obtenidos por medio de la pesca en el medio natural, en las aguas adyacentes a las costas de Yucatán (21° 9'55. 22"N 90° 1'54. 93"W). En el primer experimento fueron seleccionados ingredientes proteicos (origen animal y vegetal) por medio de la digestibilidad *in vitro* con la técnica de pH-stat. Se evaluaron catorce ingredientes (considerando hemoglobina y caseína como control), seis de origen animal (harina de jaiba, polvo de camarón, harina de calamar, CPSP⁷⁰, suero de leche y harina de pescado), también seis ingredientes de origen vegetal (harina de canola, harina de canola + fitasa, harina de soya, harina de soya + fitasa, concentrado proteico de soya y gluten de trigo). Para determinar el grado de hidrolisis (GH%) de los ingredientes proteicos se utilizó una modificación del método propuesto por SAUDERS 1972. Para el segundo experimento, se determinó la digestibilidad *in vivo* o aparente de dietas elaboradas con los ingredientes proteicos seleccionados en el experimento anterior. Las dietas experimentales presentaron 70% de una dieta referencia para trucha (CHO 1992), más 30% de las fuentes probadas. Se evaluó la digestibilidad aparente de dietas denominadas; suero de leche (DSL), pasta de canola tratada con fitasa (DPC+), polvo de camarón (DPC), concentrado proteico de soya (DCPS). La colecta de las heces fue posterior a cada alimentación. Se retiraron los restos de alimento no consumido y heces mediante sifoneo. El método de digestibilidad *in vivo* se realizó, de acuerdo con Cuzon *et al.*, 1998, usando como marcador la zeolita. Las fórmulas empleadas para determinar la digestibilidad de la proteína (DAP), materia seca (DAMS) fueron las siguientes: %DAP = 100 x (1 - (% zeolita en el alimento/% zeolita en heces)(% proteína en heces% proteína en el alimento). %DAMS = 100 x (1- (% zeolita en la dieta/ % zeolita en las heces).

Para el tercer y cuarto experimento los peces fueron sembrados en un sistema con circuito cerrado de agua. La recirculación se mantuvo con una bomba (1 ½ hp Zacisi), correspondiente a 30 circulaciones/día para todo el sistema experimental. El abastecimiento de aire estaba a cargo de un Blower de (2hp). Durante quince días previos al experimento, los peces fueron alimentados con una dieta de mantenimiento. Posteriormente se sustituyó el alimento de mantenimiento por la dieta experimental correspondiente. En cada

Silva *et al.*, 2013. Requerimientos de Proteína y Energía en Juveniles Silvestres del Mero rojo *Epinephelus morio*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 521-531.

experimento se ofrecieron alimento hasta saciedad dos veces al día (9:00 y 16:00). Se registraron el peso de los juveniles al inicio y posteriormente, cada 30 días hasta el día 90. Fueron evaluados: Ganancia de Peso (GP), Tasa de Crecimiento Específico TCE), Factor de Conversión Alimenticia (FCA) y Supervivencia (S). En el experimento tres (requerimiento de proteína cruda) fueron evaluados los efectos de cinco tratamientos con diferentes niveles de proteína (37%, 42%, 47%, 52% y 57% de PC) en tres repeticiones por tratamiento (10 individuos por tanque); en un diseño completamente aleatorio. Las dietas experimentales elaboradas eran semi-húmedas isoenergéticas, formuladas utilizando hojas de cálculo Excel. En el cuarto y último experimento se evaluó el desempeño productivo de juveniles silvestres del mero rojo (*Epinephelus morio*), alimentados con diferentes relaciones de energía y proteína. Se implementaron cuatro dietas con dos niveles de lípidos (6 y 12 %) y dos niveles de proteína (42 y 52%) generando cuatro diferentes relaciones energía/proteína (26, 30, 24 y 28 kJ ED/g: PC). Se utilizaron 84 juveniles los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en tres tanques por tratamiento a una densidad de 7 individuos por tanque. A los resultados de todos los experimentos fueron hechas pruebas de normalidad y homocedasticidad. En los casos donde estos postulados se cumplieron, se aplicaron análisis de varianza de una vía y prueba *aposteriori* de Tukey (SOKAL & ROHLF, 1969). En los casos donde no se cumplieron los postulados, se aplicaron prueba de Kruskal-Wallis. Para el análisis de datos de crecimiento a fin de comprobar diferencias entre los tratamientos, se utilizó el modelo de análisis de regresión lineal de los logaritmos. El nivel de probabilidad fue de 5%. El paquete utilizado fue STATISTICA 6.0.

Resultados y discusión

Los ingredientes probados en el análisis *in vitro* mostraron diferencias significativas en los valores de hidrólisis de las proteínas utilizando extractos de enzimas de juveniles de *E. morio*. Los valores de GH en condiciones ácidas para la harina de jaiba y polvo de camarón fueron $86,6 \pm 8,4\%$ y $32,1 \pm 4,2\%$, respectivamente ($p < 0,01$, $H = 83$). Confirmaron que el mero rojo es un depredador de crustáceos (Brulé and Rodríguez-Canché, 1993). Frías-Quintana *et al.* (2010) estudiando %GH en *Atractoterus tropicus* encontraron valores

similares en las enzimas digestivas y concluyeron una alta preferencia por alimentos marinos. El polvo de camarón es un subproducto que se emplea poco en México, a pesar de que tiene buenas características nutricionales, como alta digestibilidad y excelente palatabilidad. Suero de leche (subproducto de la ganadería) mostró valores que no difiere de otros ingredientes de origen animal ($p > 0,05$, Tabla 1), también mostró alta digestibilidad mostrando alto potencial para acuicultura. El uso del suero de leche como un reemplazo para la harina de pescado, considerando un límite de inclusión, abre el camino para una dieta de bajo costo y alta digestibilidad para el mero rojo. La harina de soya ($1,2 \pm 0,3$), harina de soya + ($1,5 \pm 0,4$), harina de canola ($0,8 \pm 0,2$) tuvieron bajos valores de GH% ($p < 0,01$, $H = 77$) en condiciones ácidas. Los valores de GH de pasta de canola + y CPS, fueron significativamente mas altos que los otros ingredientes de origen vegetal, pero similar a la harina de pescado. En pastas vegetales (soya y canola) sin tratamiento con la enzima fitasa se observaron valores más bajos de GH principalmente en condiciones alcalinas (ciegos pilóricos y intestinos) ($p < 0,05$, Tabla 1). Los resultados de la digestibilidad *in vivo*, de las dietas experimentales, se pueden constatar en la Tabla 2. En términos de desempeño de crecimiento y sobrevivencia, resultados expresivos fueron alcanzados.

Tabla 1. Digestibilidad proteica *in vitro* de los ingredientes (origen animal y vegetal) con extractos enzimáticos de *E. morio*. GH%. Resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar \pm DE.

Ingredientes	%GH ¹		
	ácido	alcalino	
	estomago	cecos	intestino
Hb*/caseina**	2.3 ± 0.7^c	3.2 ± 0.7^{ab}	3.1 ± 0.7^b
H. jaiba ⁴⁰	86.8 ± 8.4^a	4.5 ± 2.1^a	8.7 ± 2.6^a
Puelvo de camaron ⁵⁰	32.1 ± 4.2^{ab}	1.4 ± 0.2^b	5.2 ± 1.0^b

Suero de leche ¹¹	4.5 ± 0.6 ^c	6 ± 1.5 ^a	7.4 ± 1.8 ^a
H. Calamar ⁷²	2.7 ± 0.2 ^c	1.4 ± 0.2 ^b	4.6 ± 0.8 ^b
CPSP ^{70**}	3.6 ± 1.9 ^c	2.1 ± 0.8 ^b	3 ± 0.1 ^b
H. pescado ⁶²	4.1 ± 1.0 ^c	2.6 ± 0.8 ^b	2.8 ± 0.7 ^b
CPS ⁶⁰	3.6 ± 1.5 ^c	4 ± 0.4 ^b	4.1 ± 0.3 ^b
H. Soya ⁴⁴	1.2 ± 0.3 ^d	1 ± 0.2 ^c	0.9 ± 0.1 ^d
H. Soya+fitasa	1.5 ± 0.4 ^d	1.6 ± 0.5 ^b	0.9 ± 0.2 ^d
Pasta de canola ³²	0.8 ± 0.2 ^d	0.6 ± 0.3 ^c	1 ± 0.2 ^d
Pasta de canola+fitasa	2.0 ± 0.3 ^{cd}	2.6 ± 0.2 ^b	2.2 ± 0.3 ^c
Gluten de trigo ⁸⁰	1.6 ± 0.2 ^d	2.1 ± 0.7 ^b	1.7 ± 0.8 ^c

*Estándar analítico para ingredientes de origen animal ** estándar analítico para ingredientes de origen vegetal *** concentrado proteico soluble de pescado, 1Metodo se describe en el texto, (n = 3 peces). Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas.

Tabla 2 - Coeficientes de Digestibilidad Aparente (CDA) de la materia seca (MS), proteína cruda (PC), de los ingredientes; suero de leche (DSL); pasta de canola tratada con fitasa (DPCF); polvo de camarón (DPC) y concentrado proteico de soya (DCPS) suministrados a

E. morio

DIETAS				
CDA	DPC	DPCF*	DSL	DCPS
MS	67.1 ± 8.8 ^b	67.0 ± 1.6 ^b	81.8±9 ^a	57.6±3.4 ^c
Proteína	88 ± 3.3 ^b	92 ± 1.5 ^{ab}	95 ± 0.8 ^a	76 ± 2.4 ^c

*Fitasa FTEII (1.6 U/g Unidades de fitasa por cada g de harina. Los datos son promedios ± desviación estándar. Letras iguales en la misma línea, indican que los promedios no difieren significativamente (p>0.05).

En el experimento 3, hubo un efecto en el crecimiento cuando los niveles de inclusión de PC fue aumentado (Tabla 4). Los resultados obtenidos en el bioensayo determinaron que las

Silva et al., 2013. REQUERIMIENTOS DE PROTEÍNA Y ENERGÍA EN JUVENES SILVESTRES DEL BIETO ROJO *Epinephelus morio*. En: Cruz-Suarez, L.E., Riquelme, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 521-531.

dietas con mayor porcentaje de proteínas incrementaron más el crecimiento en peso-longitud en los juveniles de mero rojo comparado con las dietas de menores niveles de proteína. Se determinó que dietas ricas en proteínas tienen un mejor aprovechamiento del alimento (factor de conversión bajo). Estos resultados indican que los juveniles del mero rojo requieren por lo menos 52% de proteína en la dieta, para su mayor crecimiento y supervivencia.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento del mero rojo sometidos a dietas con diferentes niveles de inclusión de proteína cruda: peso promedio inicial (PI, g PH), peso promedio final (PF, g PH), ganancia de peso diaria (GPD, g PH/d), supervivencia (S,%), tasa específica de crecimiento (TEC, g PH/d), factor de condición (FC, %), factor de conversión alimenticia (FCA, %) , y tasa de eficiencia proteica (TEP)

	Proteína, %				
	37	42	47	52	57
PI	206.1 ± 4.9 ^a	206.5 ± 9.5 ^a	212 ± 0.3 ^a	212.2 ± 8.4 ^a	209.04 ± 5.6 ^a
PF	248.11 ± 08 ^a	258.15 ± 19 ^b	258.92 ± 11 ^c	277.44 ± 15 ^d	300.50 ± 17 ^e
GPD	0.76 ± 0.07 ^a	0.81 ± 0.21 ^{ab}	0.98 ± 0.14 ^b	1.02 ± 0.20 ^b	1.08 ± 0.14 ^b
S	95 ± 7.34 ^a	100 ± 0.00 ^b	95 ± 7.34 ^a	100 ± 0.00 ^b	95 ± 7.34 ^a
TEC	0.21 ± 0.03 ^a	0.25 ± 0.08 ^{ab}	0.23 ± 0.06 ^{ab}	0.30 ± 0.1 ^{abc}	0.40 ± 0.04 ^c
FC	0.0151 ± 0.0011 ^a	0.0155 ± 0.0009 ^a	0.0158 ± 0.0016 ^{ab}	0.0159 ± 0.0009 ^{ab}	0.0166 ± 0.0010 ^b
FCA	3.07 ± 0.28 ^a	2.60 ± 0.39 ^b	2.60 ± 0.29 ^b	2.02 ± 0.15 ^c	1.90 ± 0.12 ^c
TEP	1.13 ± 0.18 ^a	1.23 ± 0.45 ^{ab}	1.24 ± 0.37 ^{ab}	1.26 ± 0.35 ^{ab}	1.60 ± 0.23 ^b

Los datos son promedios ± desviación estándar. Letras iguales en la misma línea indican que los promedios no difieren significativamente ($p > 0,05$).

Tabla 4. Desempeño productivo del mero rojo sometidos a dietas con diferentes niveles de proteína y lípidos, peso promedio inicial (PI, g PH), peso promedio final (PF, g PH), ganancia de peso diaria (GPD, g PH/d), supervivencia (S, %), tasa específica de crecimiento (TEC, g, PH/d), y factor de conversión alimenticia (FCA, %).

Proteína, %	42		52	
	6	12	6	12
PI	200 ± 5.0 ^a	199 ± 6.5 ^a	198 ± 6.2 ^a	211 ± 6.6 ^a
PF	319.7 ± 12 ^b	343.3 ± 23 ^{ab}	347.9 ± 14 ^a	365.5 ± 21 ^a
GPD	1.33 ± 0.05 ^b	1.60 ± 0.04 ^a	1.67 ± 0.08 ^a	1.72 ± 0.11 ^a
S	95.23 ± 0.57 ^a	95.23 ± 0.57 ^a	100 ^a	100 ^a
TEC	0.54 ± 0.05 ^b	0.58 ± 0.07 ^a	0.59 ± 0.04 ^a	0.61 ± 0.08 ^a
FCA	2.81 ± 0.09 ^a	2.31 ± 0.07 ^b	2.24 ± 0.04 ^b	2.20 ± 0.15 ^b

Los datos son promedios ± desviación estándar. Letras iguales en la misma línea, indican que los promedios no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En el experimento 4, los juveniles alimentados con las dietas de mayor contenido proteico, presentaron crecimiento equivalente a los juveniles alimentados con el nivel proteico más bajo (42%) y nivel de lípidos más altos (12%), tabla 5. Este aumento en el nivel de lípidos en la dieta resultó en un efecto economizador de la proteína consumida permitiendo que más proteína fuera depositada en el tejido. Una relación de Proteína:lípidos de 42/12 no induce una mayor ganancia en peso, pero no difiere estadísticamente de dietas con niveles superiores de proteína (52%), de esta manera dietas con niveles sub óptimos de proteína (mínimo exigido), pueden resultar en tasas de conversión más eficientes, con mayor economía en el manejo alimentar de la especie.

Conclusión

Los resultados mostraron la posibilidad de usar fuentes alternativas para la harina de pescado como fuente de proteína para el mero rojo.

De los ingredientes analizados el polvo de camarón, el suero de leche, la canola + y el CPS fueron las fuentes proteicas seleccionadas para la fabricación de dietas para los juveniles.

Se recomienda utilizar una relación de proteína/lípidos de 42/12 en dietas para juveniles de *E. morio*, mezclando harinas de origen animal y vegetal para propiciar el buen desarrollo de los animales. Entretanto, esta especie responde positivamente a dietas con niveles superiores de proteína cruda.

Agradecimientos:

Se agradece el apoyo financiero a los proyectos 220410 y 219713-3 de la UNAM. Al CONACyT por la beca recibida por estudios de doctorado. Además se agradece el apoyo técnico a Adriana Paredes, Oscar Santiago, Natalia de los Santos y Daniel Rocher.

Referencias Consultadas

- Brulé, T., Rodríguez-Canché, L.G., 1993. Foods habits of juvenile red groupers, *Epinephelus morio* (Valenciennes 1828) from Campeche Bank, Yucatan, Mexico. Bull. Mar. Sci. 52, 772-779.
- Cho, C.Y., 1992. Feeding systems for rainbow trout and others salmonides with reference to current estimates of energy and protein requirements. Aquaculture 100, 107-123.
- Cuzon, G., Guillaume, J., Cahu, C., 1998. Composition, preparation and utilization of feeds for crustacean. Aquaculture 124, 253-267.
- Elangovan A., Shim K.F. Growth response of juvenile *Barbodes altus* Fed isocaloric diets whit variable protein levels. Aquaculture, 1997; 321-328.
- Frías-Quintana, C.A., Álvarez-González, CA., Márquez-Couturier G., 2010. Design of microdiets for the larviculture of tropical gar *Atractosteus tropicus*, Gill (1863). Univ. y Ciencia 26, 265-282.
- Sauders, R.M., Conner, M.A., Booth, A.N., Bickoff, E.M., Kohler, G.O., 1972. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. J. Nutr. 103, 530-535.
- Sih-Yang Sim, Rimmer M., Williams K., Toledo J, Sugama K., Rumengan I., and Phillips M. A Practical Guide to Feeds and Feed Management for Cultured Groupers. Marine finfish Aquaculture, 2005; 1-2.
- Sokal, R.R. and F.J Rohlf. 1969. Biometry. Principle and practices of statistics in biological research. W.H. Freeman & Co, 776p.

Evaluation of a Beta-propeller Phytase for its Application in Aquaculture

Martha Guerrero-Olazarán¹, L. Elizabeth Cruz-Suárez², Denis Ricque-Marie²,
Martha Nieto-López², Mireya Tapia-Salazar², Eddy L. Cab-Barrera¹,
José M. Viader-Salvadó¹.

Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, ¹Instituto
de Biotecnología, ²Programa Maricultura

Av. Universidad s/n, Col. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México,
66450.

Tel: (52 81) 8329-4000 Ext. 6439, e-mail: martha.guerreroool@uanl.edu.mx

Abstract

The beta-propeller phytases are structurally different from the commercially available phytases, possess high thermal stability, an optimal temperature of 55 to 70°C, unique Ca²⁺-dependent catalytic properties, a pH optimum close to 7, and exhibit activity within a range of pHs that is broader than those of the histidine acid phytases. In this work, the performance of FTEII, a new beta-propeller phytase, was compared with those of three commercial phytases in terms of thermostability at 99°C, resistance to proteolysis by digestive enzymes, and their effectiveness for phosphorus (P) release from two feed ingredients.

FTEII showed the highest thermostability with residual activity of 82±3 after 1.5 min treatment at 90°C. All phytases were resistant to shrimp digestive enzymes and to porcine trypsin, residual activities showed values higher than 60% in all cases. Total phosphorus released from each phytase-treated ingredient was time, temperature and type of ingredient dependent. FTEII treatments showed the higher levels of phosphorus release in both, soybean meal (68%) and pea (57%) at 50°C. Endogenous hydrolytic activity of both ingredients promoted a phosphorus release, up to 28% or 17% of total phosphorus in soybean meal or in pea protein concentrate, respectively. Unlike commercial phytases, FTEII is phytate specific; therefore it is possible to assume that most of the phosphorus released came only from phytate. FTEII offer an alternative as phytase additive for pelleted feeds and for releasing phosphorus under conditions suitable for digestive tracts of species grown in aquaculture.

Key words: Phytase, Soybean meal, Pea protein

Introduction

Phytate (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate), the major storage form of phosphorus in plant-derived feedstuffs, is regarded as an antinutritional factor, since it forms insoluble complexes with proteins and a variety of nutritionally important metal ions such as calcium, zinc, magnesium and iron, and decreases phosphorus bioavailability (Greiner and Konietzny, 2006).

Phytate accounts for 60–90% of total phosphorus content in plants, principally in cereals and legumes, and it is considered to be an important reserve material in the germination and growth of plants (Vats *et al.*, 2007). In cereals, phytate accounts for 60–80% of total phosphorus (Selle *et al.*, 2007), in soybean (*Glycine max*), phytate represent a 57% of total organic phosphorus and 70% of total phosphorus (Beleia *et al.*, 1993). Soybean meal accounts for 6.49 (5.7-6.94) g/kg of total phosphorus and 3.88 (3.54-4.53) g/kg of phytic phosphorus that represent 59.9% (53-68) of total phosphorus (Selle and Ravindran, 2007). Phytate in pea (*Pisum sativum*) is present in 0.75-0.94% (Carnovale *et al.*, 1988).

Aquaculture nutrition has been trying to find suitable alternatives to fish meal. Under this context, soybean meal is the most promising plant protein source among the other ingredients, as alternatives to fish meal (Biswas *et al.*, 2007). Due to the presence of high content of phytate the use of soybean meal is often limited in aquaculture nutrition. The phytate phosphorus, which cannot be digested by crustaceans or fish species due to the lack of phytase enzyme, becomes a pollutant in the aquatic environment, which can be balanced by the use of exogenous phytase (Biswas *et al.*, 2007).

Legume seeds are an important source of dietary protein, with great potential for human and animal nutrition. The nutritive utilization of legumes can be negatively affected by their content of antinutritional factors such as R-galactosides, trypsin inhibitors, or phytic acid, which interfere with the digestive utilization of proteins and minerals by monogastric animals (Urbano *et al.*, 2007).

Phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases; EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.26, and EC 3.1.3.72) catalyze the release of phosphate from phytate, generating less-phosphorylated *myo*-inositol derivatives (Lei *et al.*, 2007).

Simple-stomached species such as swine, poultry, and fish cannot utilize dietary phosphorus because their gastrointestinal tracts are deficient in enzymes with phytase activity (Lei *et al.*, 2007). Therefore, during the last two decades, these enzymes have been used as feed additives to enhance the utilization of plant-derived feedstuffs, improving the utilization of phytate-phosphorus in diets, so that inorganic phosphorus supplementation is unnecessary, reducing their manure phosphorus excretion to the environment (Lei *et al.*, 2007). While supplemental phytase has shown to improve utilization of calcium, zinc, and iron utilization by animals (Lei *et al.*, 2013), the digestibility response of copper or manganese is less consistent, and the ability of phytase to improve amino acid availability has been controversial (Lei *et al.*, 2013; Selle and Ravindran, 2007).

At present, phytases are classified into four major classes (Lei *et al.*, 2007; Mullaney *et al.*, 2007): histidine acid, beta-propeller, cysteine, and purple acid phytases. Most of the commercially available phytases are histidine acid phytases and possess catalytic activity in the pH range of 2.5 to 6. On the other hand, the beta-propeller phytases, also referred to as alkaline phytase, are structurally different from the histidine acid phytases, possess pH optimums close to 7, and exhibit activity within a range of pHs that is broader than those of the histidine acid phytases (Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2001). In addition, beta-propeller phytases are characterized to have a high thermostability, an optimal temperature of 55 to 70°C and exhibit unique Ca²⁺-dependent catalytic properties (Ha *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2004).

Although commercial production of phytases is currently focused on fungal histidine acid phytases from *Aspergillus* species (Lei *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2004), the second phytases generation, also histidine acid phytases but isolated from strains of *Escherichia coli* (AppA and AppA2), were identified as more effective phytases than the fungal PhyA (Lei *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 1999), with acidic pH optimum, higher catalytic efficiency, and pepsin resistance.

The beta-propeller bacterial phytases from *Bacillus* species are an alternative to histidine acid phytases enzymes because of their high thermostability, calcium-phytate complex substrate specificity, pH profile, and proteolysis resistance (Kerovuo *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2004). In contrast to the histidine acid phytases, *Bacillus* phytases are

specific for phytate. Therefore, important phosphate compounds other than phytate are not hydrolyzed by the *Bacillus* phytases and remain available for animal uptake.

Recently several beta-propeller phytases, one from *Bacillus subtilis* (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010) and others that were designed by a structure-guided consensus approach (Viader-Salvadó *et al.*, 2010) were produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In this work, one of these beta-propeller phytases (FTEII), designed to have high thermostability and activity over a broad range of pH (Viader-Salvadó *et al.*, 2010), was evaluated for their performance as feed additive. The performance of this new phytase was compared with three commercial phytases (histidine acid phytases) in terms of thermostability at 99°C, resistance to proteolysis by digestive enzymes, and their effectiveness for phosphorus (P) release from two feed ingredients.

Materials and methods

FTEII and commercial phytase preparations.

FTEII preparation was obtained from cell-free culture medium recovered from a 5-L bioreactor culture of a recombinant *P. pastoris* strain (Viader-Salvadó *et al.*, 2013). Cell-free culture medium was concentrated 20-fold and diafiltrated by ultrafiltration as described elsewhere (Viader-Salvadó *et al.*, 2010). This enzyme preparation was analyzed by Bradford protein and enzymatic activity assays and used for all assays.

Commercial phytases used as reference were Natuphos[®] (5,000 FTU/g, granulate, BASF), Allzyme[®] SSF (1000 FTU/g, granulate, Alltech, Inc), both histidine acid phytases classified as 3-phytase from *Aspergillus niger*, and Ronozyme[®]P (5,000 FTU/g, granulate, NOVOZYMES/DSM), histidine acid phytase classified as 6-phytase from *Peniophora lycii*. All commercial phytases were resuspended at 10 mg/mL in acetate buffer (360 mM sodium acetate, 100 µg/mL Tween 20, 1 mM CaCl₂, pH 5.5). The suspensions were clarified by centrifugation at 6900 g for 30 min. The clear supernatants were fractioned and stored at -20°C until their use.

Enzymatic activity assays

For FTEII, phytase activity was measured in a reaction mixture containing the enzyme preparation, 1.6 mM sodium phytate, 100 mM Tris- HCl buffer (pH 7.5), and 1 mM CaCl₂, with incubation at 37°C for 30 min. The reaction mixture was stopped by adding an equal volume of 15% trichloroacetic acid, and the inorganic phosphate released was measured using the ascorbic acid method (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010). For commercial phytases, enzyme activity were measured in acetate buffer (360 mM sodium acetate, pH 5.5, without CaCl₂) instead of Tris-HCl buffer. One unit of phytase activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μmol of phosphate per min from sodium phytate under the assay conditions.

Thermostability. Thermostability of each phytase preparation was evaluated by measuring phytase activity after incubation at 99°C for 1.5 or 5 min in 360 mM sodium acetate (pH 5.5) with 5 mM CaCl₂ for FTEII or without CaCl₂ for commercial phytases. Residual activity was calculated as phytase activity measured after heat treatment and expressed as a percentage (Viader-Salvadó *et al.*, 2010).

Phytase susceptibility to digestive enzymes. Susceptibility to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) digestive enzymes was tested by incubating a mixture containing the phytase preparations at 0.08 U/mL and 1X (0.045 U *N*-α-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide [BAPNA]/mL of trypsin), 10X, or 40X shrimp digestive enzyme extract in presence of 1 mM CaCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 37°C for 30 min, followed by phytase activity measurement to test for residual phytase activity. Similar assays were performed with 0.12 (1X) and 1.20 (10X) U/mL porcine trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) instead of the shrimp digestive enzymes. Trypsin activity determinations were carried out evaluating amidase activity in a reaction mixture containing porcine pancreas trypsin or shrimp digestive enzymes, 1 mM BAPNA as the substrate, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), and 20 mM CaCl₂ at 37°C. The amount of *p*-nitroaniline released was monitored for 3 min by measuring the increase in absorbance at 405 nm ($\epsilon=8,270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Phosphorus release from feed ingredients. Phosphorus release was evaluated for soybean meal (0.38% of phytic phosphorus and 0.65% of total phosphorus, Natural Proteins, NL, Mexico.) and pea protein concentrate (0.58% phytic phosphorus and 0.89% of total phosphorus, Prestige protein R400, Parheim Foods Ltd. Saskatoon, Canada). All phytases were used in a concentration of 1600 or 800 U/kg of ingredient. Both ingredients (250 mg) were treated with each phytase in a reaction mixture containing water (pH 6.3, 250 mg ingredient:500 μ L water). Each ingredient suspension-water-phytase and controls (ingredient without enzymes) were incubated with constant stirring at 250 rpm, different temperatures (30, 40 and 50°C) and times (0 to 12 h). The enzymatic reaction was stopped with 9.5 mL of 15% TCA, the supernatant recovered by two successive centrifugations (8000 g, 30 min and 14000 g, 15 min) and phosphate released was determined as a percentage of total phosphorous reported for each ingredient, 6.5 g/kg for soybean meal and 8.9 g/kg for pea protein concentrate.

All the analytical determinations were carried out at least three times (coefficient of variation less than 5%). All results were compared between groups using analysis of variance and Tukey's multiple comparisons with a significance level of $P < 0.05$

Results

Thermostability. FTEII showed the highest thermostability with residual activities of 82 ± 3 and $63 \pm 3\%$ after 90 s and 300 s of heat treatment, respectively, as is shown in Figure 1. Natuphos, and Ronozyme showed the same residual activities of 30 and 16%, after 90 s and 300 s of heat treatment, respectively, while Allzyme showed residual activities of 45 and 30%, after the same treatment. While FTEII lost only 18% activity after 90 s of heat treatment, Natuphos and Ronozyme, both lost 70% of initial activity and Allzyme lost 55% of its initial activity.

By increasing the treatment time, FTEII lost only a 37% of its initial activity, while commercial enzymes lost until 84% of their initial activity. Allzyme showed to be the most heat stable phytase among the commercial phytases tested.

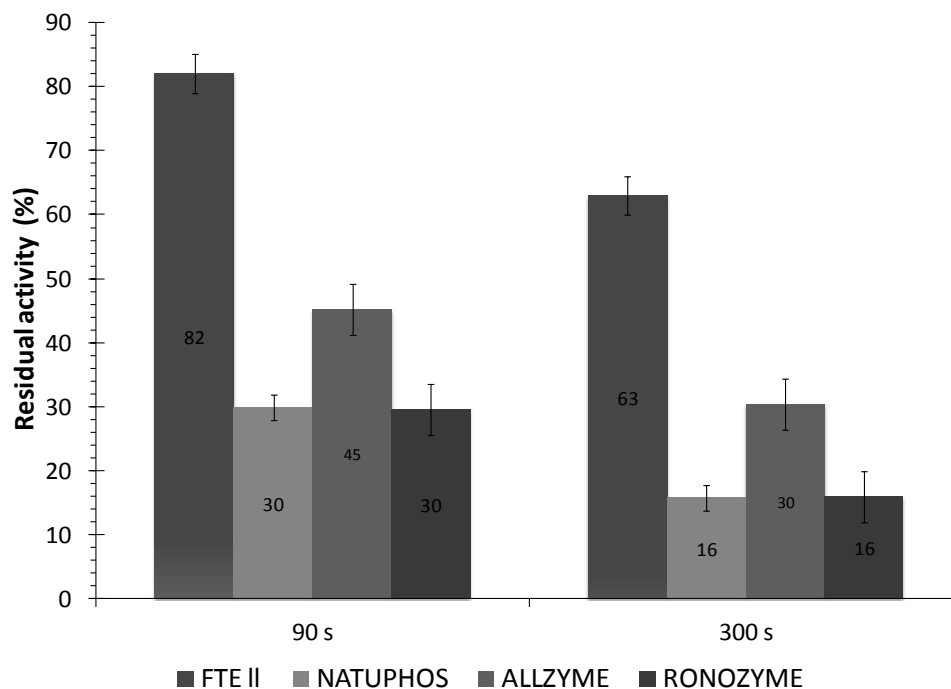


Fig. 1. Residual activities of FTEII after 90 and 300 seconds of heat treatment at 99°C and pH 5.5. FTEII heat treatment was in presence of 1 mM CaCl₂. Values represent the means for at least three independent determinations (coefficient of variation, <5%).

Phytase susceptibility to digestive enzymes. All phytases were resistant to shrimp digestive enzymes and to porcine trypsin. Residual activities showed values higher than 60% in all cases (Fig. 2 and 3). The residual activities of FTEII after shrimp digestive enzyme treatment were higher than 67% (Fig. 2). After 30 min of shrimp digestive enzymes treatment, Allzyme showed residual activities that were higher than 100% (Fig. 2). Natuphos residual activity increases were observed when the protease concentration was increased from 1X to 40X (Fig. 2), while FTEII residual activity increased 13% when the protease concentration was increased from 1X to 10X. However, a 33% depletion of residual activity was observed after 40X shrimp digestive enzyme treatment of FTEII (Fig. 2).

After 30 min of porcine trypsin treatment, residual activities of all phytases were higher than 95% (Fig. 3). Residual activity increases were observed when the protease concentration was increased from 1X to 10X, 16% for FTEII and 12% for Natuphos, while residual activity for Allzyme decreased in a 10%. While FTEII and Natuphos showed

similar performance under trypsin treatment, Allzyme showed less stability when the trypsin concentration was increased.

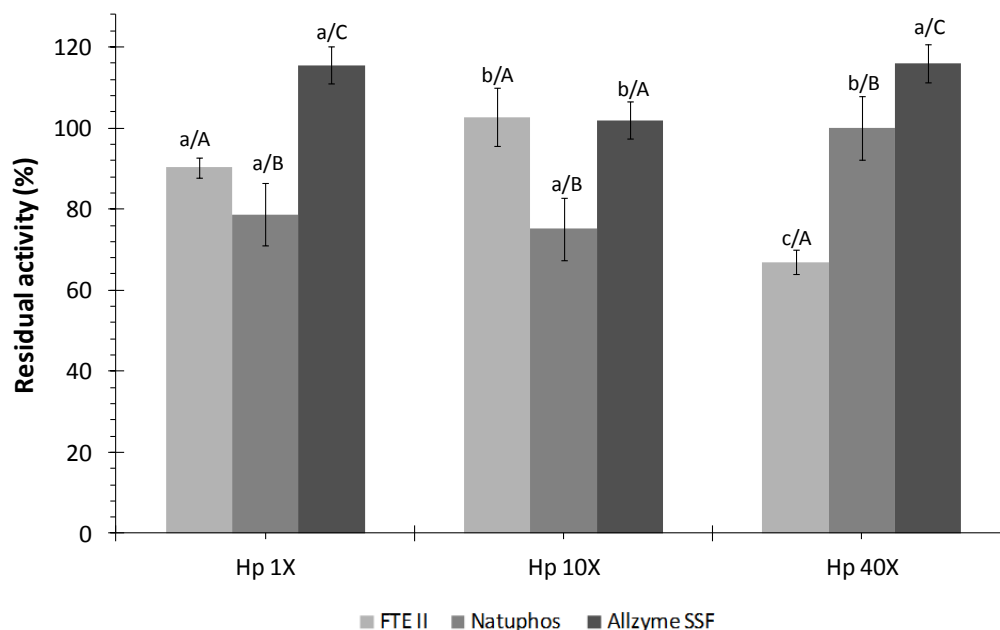


Fig. 2. Residual phytase activities of FTEII, Natuphos and Allzyme preparations after shrimp digestive enzyme (Hp) treatment. The data are the means \pm the standard deviations of at least three independent assays. Different lowercase, differences for the effect of the protease treatment concentration on each phytase, $P < 0.05$. Different uppercase, differences among phytases at the same protease treatment concentration, $P < 0.05$.

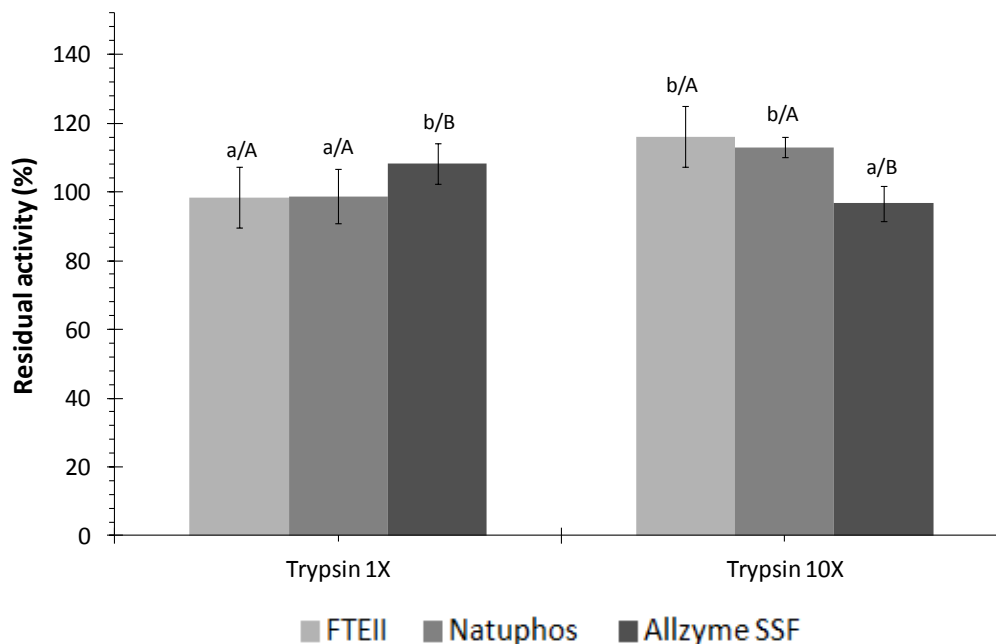


Fig. 3. Residual phytase activities of FTEII, Natuphos and Allzyme preparations after trypsin treatment. The data are the means \pm the standard deviations of at least three independent assays. Different lowercase, differences for the effect of the protease treatment concentration on each phytase, $P < 0.05$. Different uppercase, differences among phytases at the same protease treatment concentration, $P < 0.05$.

Phosphorus release from feed ingredients. Figure 4 shows the phosphorus release kinetics from soybean meal for FTEII treatments at different temperatures. The average rate of phosphorus release was higher at 40°C ($0.37 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) than treatments at 30 and 50°C (Table 1). After 12 h incubation the highest value of phosphorus released was observed at 50°C with $4.38 \pm 0.09 \text{ g/kg}$ ($67.5 \pm 1.3\%$ from total phosphorus) followed by the treatment at 40°C with $4.29 \pm 0.09 \text{ g/kg}$ ($66.2 \pm 1.4\%$ from total phosphorus). The phosphorus released at the end of the treatment at 30°C was 12 and 14% lower than those at 40 and 50°C, respectively (Table 1).

The average rate of phosphorus release for controls ($0.14 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was in average 56% lower than those showed by FTEII treatments. The phosphorus released from total phosphorus for controls at 12 h incubation was 27% in average, representing 40% of phosphorus released from the soybean meal treated with FTEII phytase (Table 1).

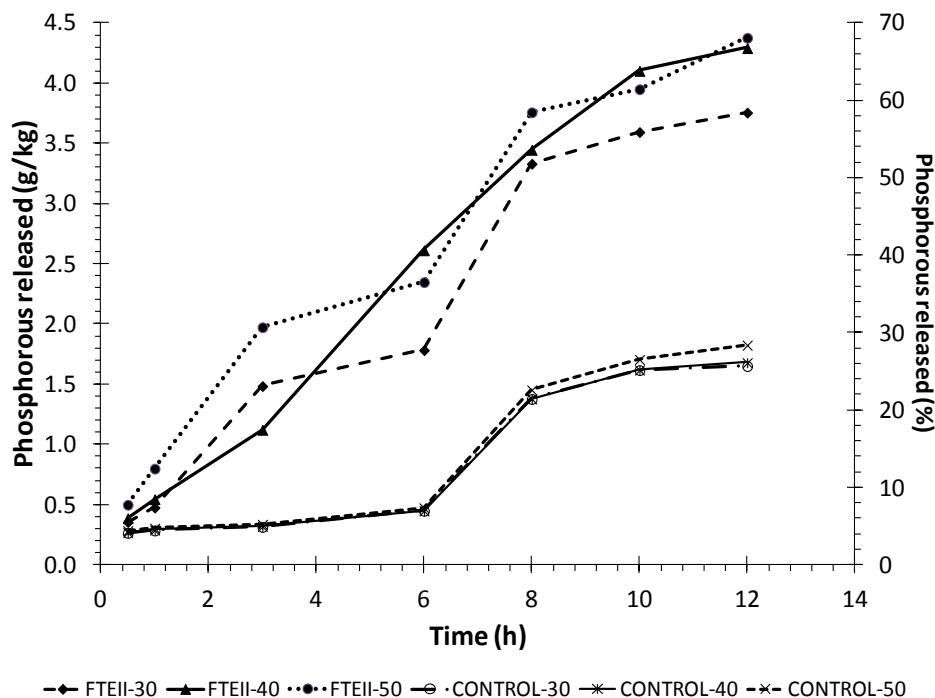


Fig. 4. Phosphorus release kinetics from soybean meal. Treatments with 1600 U/kg of FTEII at 30, 40 and 50°C. Controls were treatments without enzyme. The data are the means \pm the standard deviations of at least three independent assays (coefficient of variation, <5%).

Table 1. Average rate of phosphorus release and total phosphorus released values from different treatments of soybean meal.

Treatment	ARPR (g kg ⁻¹ h ⁻¹)			TPR (g/kg)			TPR (%)		
	30°C	40°C	50°C	TPRSC (g/kg)			TPRSC (%)		
				30°C	40°C	50°C	30°C	40°C	50°C
Control	0.14	0.14	0.15	1.65 \pm 0.05	1.68 \pm 0.06	1.83 \pm 0.06	25.5 \pm 0.8	25.9 \pm 0.9	28.1 \pm 0.9
FTEII 1600	0.32	0.37	0.34	3.76 \pm 0.07	4.29 \pm 0.09	4.38 \pm 0.09	57.9 \pm 1.1	66.2 \pm 1.4	67.5 \pm 1.3
	0.17	0.23	0.18	2.11 \pm 0.07	2.61 \pm 0.09	2.55 \pm 0.09	32.4 \pm 1.9	40.3 \pm 2.3	39.3 \pm 2.2
Natuphos	0.33			3.84 \pm 0.12			59.1 \pm 1.9		
	0.20			2.26 \pm 0.12			34.8 \pm 3.1		
Allzyme	0.34			2.39 \pm 0.32			61.2 \pm 2.1		
	0.21			2.11 \pm 0.07			36.8 \pm 4.1		
FTEII 800	0.28			3.46 \pm 0.02			53.3 \pm 0.3		
	0.15			1.88 \pm 0.02			28.9 \pm 0.5		

ARPR: average rate of phosphorus release.

TPR: total phosphorus released after 12 h incubation.

TPRSC: total phosphorus released subtracting control after 12 h incubation.

The data are the means \pm the standard deviations of at least three independent assays.

Average rates and kinetics of phosphorus release from pea protein concentrate at different temperatures for FTEII treatments are shown in Table 2 and Figure 5. Unlike soybean meal, in pea protein concentrate the average rates of phosphorus release was higher at 50 °C (0.37 g kg⁻¹ h⁻¹) than at 40°C (0.35 g kg⁻¹ h⁻¹) and at 30°C was lower (0.26 g kg⁻¹ h⁻¹). After 12 h incubation, the highest phosphorus released was observed at 50°C with 5.05± 0.11 g/kg (56.7±1.2% from total phosphorus). The treatment at 30°C showed a lower percentage of phosphorus release at the end of the treatment, 22 and 28% lower than those at 40 and 50°C, respectively (Figure 5 and Table 2).

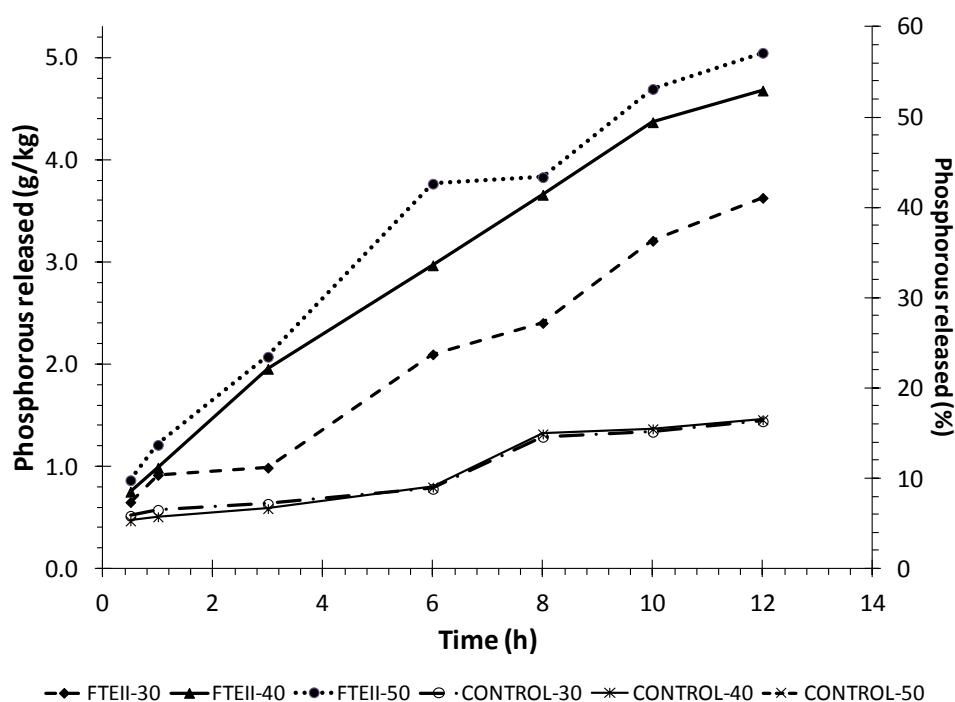


Fig. 5. Phosphorus release kinetics from pea protein concentrate. Treatments with 1600 U/kg of FTEII at 30, 40 and 50°C. Controls were treatments without enzyme. The data are the means ± the standard deviations of at least three independent assays (coefficient of variation, <5%).

The average rate of phosphorus release for controls in pea protein concentrate treatment was only 27% (0.09 g kg⁻¹ h⁻¹) of those obtained by FTEII treatment (0.33 g kg⁻¹ h⁻¹). After 12 h of incubation, the control of pea protein concentrate treatment released up to 17% of total phosphorus (1.54±0.05 g/kg) representing an average value of 33% of phosphorus released from pea protein concentrate treated with FTEII phytase (Table 2).

Despite the percentage of phosphorus released from pea protein concentrate was lower than those released in soybean meal, the amount of phosphorus released in pea protein concentrate was higher than in soybean meal, reaching up to 5.05 g/kg after 12 h incubation.

A low percentage of phosphorus released from pea protein concentrate is likely justified by a high content of phytate-phosphorus and total phosphorus in this ingredient (5.76 and 8.9 g/kg, respectively) compared to the content of phytate-phosphorus and total phosphorus in soybean meal (3.88 and 6.49 g/kg, respectively). Furthermore, endogenous hydrolytic activity was higher in soybean meal (up to 28% of phosphorus released) than pea protein concentrate (up to 17% of phosphorus released); therefore, FTEII was more efficient to release phosphate in pea protein concentrate than in soybean meal. FTEII showed values of phosphorus released 3.7 % lower in soybean paste than pea protein concentrate at 30°C, 18.79 % lower at 40°C and 27.4 % lower at 50°C.

While the hydrolysis under FTEII treatment in soybean meal was more efficient at 40°C than 50°C, in pea protein concentrate was more efficient at 50°C than 40°C, consistent with the average rates of phosphorus release and levels of phosphorus released only by FTEII activity (without endogenous hydrolytic activity). The hydrolysis at 30°C was less efficient in both ingredients, where pea protein concentrate showed the lowest phosphate release efficiency.

Table 2. Average rate of phosphorus release and total phosphorus released values from different treatments of pea protein concentrate.

Treatment	ARPR (g kg ⁻¹ h ⁻¹)			TPR (g/kg)			TPR (%)		
				TPRSC (g/kg)			TPRSC (%)		
	30°C	40°C	50°C	30°C	40°C	50°C	30°C	40°C	50°C
Control	0.09	0.09	0.10	1.44±0.05	1.46±0.05	1.54±0.05	16.2±0.5	16.4±0.5	17.3±0.6
FTEII 1600	0.26	0.35	0.37	3.63±0.07	4.68±0.09	5.05±0.11	40.8±0.8	52.6±1.0	56.7±1.2
	0.17	0.26	0.27	2.19±0.07	3.22±0.09	3.51±0.11	24.6±1.3	36.2±1.5	39.4±1.8
Natuphos	0.35			4.59±0.11			51.6±1.2		
	0.27			3.26±0.11			36.6±1.8		
Allzyme	0.33			4.53±0.11			50.9±1.2		
	0.26			3.20±0.11			35.9±1.8		
FTEII 800	0.26			3.87±0.06			43.4±0.9		
	0.18			2.53±0.08			28.4±1.5		

ARPR: average rate of phosphorus release.

TPR: total phosphorus released.

TPRSC: total phosphorus released subtracting control.

The data are the means ± the standard deviations of at least three independent assays.

The phosphorous release performance of FTEII compared to commercial phytases performance was tested at 40°C using a treatment with 1600 U/kg. Treatment with FTEII at 800 U/kg was also evaluated to determinate the concentration effect.

The highest average rate of phosphorus release for soybean meal was observed for FTEII treatment at 1600 U/kg ($0.37 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), followed by Allzyme and Natuphos treatment (0.34 and $0.33 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively), while treatment at 800 U/kg with FTEII showed an average rate of phosphorus release of $0.28 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, corresponding to a 25% from the value obtained by FTEII treatment at 1600 U/kg.

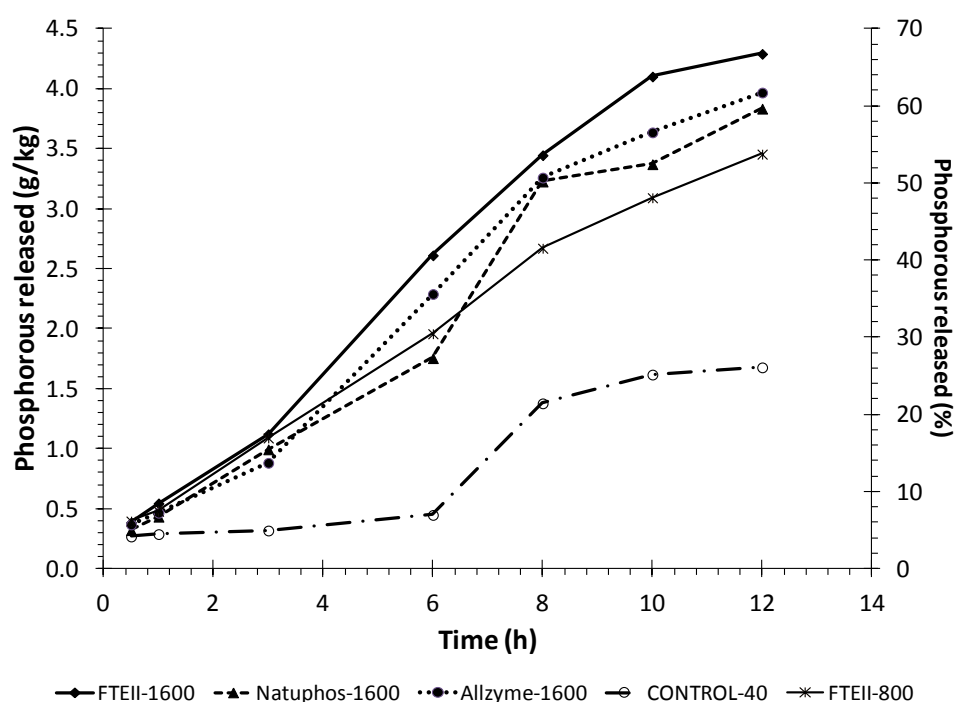


Fig. 6. Total phosphorus release kinetics from soybean meal. Treatments with 1600 or 800 U/kg of FTEII, Natuphos and Allzyme at 40°C. Controls were treatments without enzyme. The data are the means \pm the standard deviations of at least three independent assays (coefficient of variation, $<5\%$).

After 12 h incubation, FTEII treatment at 1600 U/kg showed the highest phosphorus released value ($4.29 \pm 0.09 \text{ g/kg}$) corresponding to 66.2% of total phosphorous present in soybean meal, while Natuphos and Allzyme released 59.1 and 61.2%, respectively (Table 1).

The FTEII treatment at 800 U/kg released 53% of total phosphorous (3.46 ± 0.02 g/kg), 19% less than those released by FTEII treatment at 1600 U/kg.

Subtracting the endogenous hydrolytic activity (phosphorus released by the control), FTEII at 1600 U/kg and 40°C released 40.3 ± 2.3 % (2.61 ± 0.09 g/kg) of total phosphorous present in soybean meal, Natuphos 34.8 ± 3.1 % (2.26 ± 0.12 g/kg), Allzyme 36.8 ± 4.1 % (2.11 ± 0.07 g/kg) and FTEII at 800 U/kg released 28.9 ± 0.5 % (1.88 ± 0.02 g/kg)

These results demonstrate a higher hydrolytic efficiency of FTEII on soybean meal compared to the commercial phytases tested.

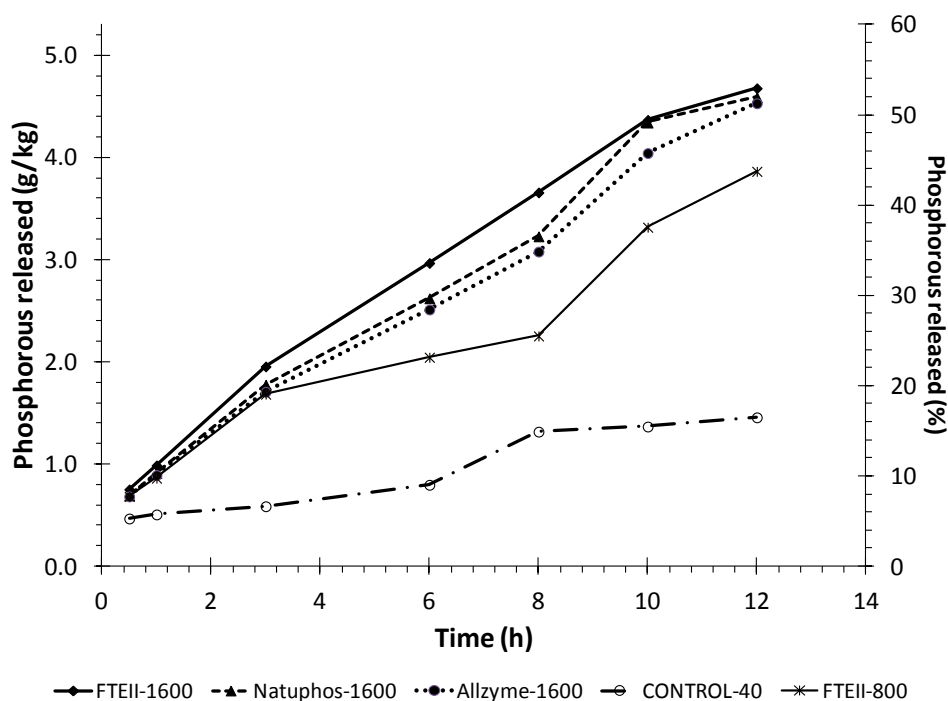


Fig.7. Phosphorus release kinetics from pea protein concentrate. Treatments with 1600 or 800 U/kg of FTEII, Natuphos and Allzyme at 40°C. Controls were treatments without enzyme. The data are the means \pm the standard deviations of at least three independent assays (coefficient of variation, <5%).

Figure 7 shows the phosphorus release kinetics of pea protein concentrate treated at 40°C with FTEII, Natuphos, or Allzyme at 1600 U/kg, or FTEII at 800 U/kg. The average rate of phosphorus release for pea protein concentrate treated with FTEII at 1600 U/kg or Natuphos showed a value of $0.35 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, higher than those obtained by Allzyme and FTEII at 800 U/kg treatments (Table 2).

The highest phosphorus release was observed in FTEII treatment at 1600 U/kg, with 4.68 ± 0.09 g/kg ($52.6 \pm 1\%$). Natuphos and Allzyme showed similar performance but lower than FTEII treatment at 1600 U/kg. FTEII treatment at 800 U/kg released 43% of total phosphorous, 17% less than those released at 1600 U/kg.

Subtracting the percentage of phosphorus released by the control, FTEII at 1600 U/kg released $36.2 \pm 1.5\%$ (3.22 ± 0.09 g/kg) of total phosphorous present in pea protein concentrate, while Natuphos, Allzyme and FTEII at 800 U/kg released $36.6 \pm 1.8\%$ (3.26 ± 0.11 g/kg), $35.9 \pm 1.8\%$ (3.20 ± 0.11 g/kg) and $28.4 \pm 1.5\%$ (2.53 ± 0.08 g/kg) respectively. These results demonstrate a similar hydrolytic efficiency of all phytases tested in pea protein concentrate.

Discussion

Recently, FTEII, a new beta-propeller phytase, was designed and produced in *P. pastoris* (Viader-Salvadó *et al.*, 2010, 2013). Based on their pH profiles, the beta-propeller phytases may have potential as feed additives for animals with neutral-basic digestive tracts and in the pretreatment of plant-derived ingredients used in animal diets. In this paper we have compared the FTEII performance against three commercial phytases in terms of thermostability, resistance to proteolysis by digestive enzymes, and their effectiveness for phosphorus release from two feed ingredients, soybean meal and pea protein concentrate.

In terms of thermostability, FTEII showed higher thermostability under the same denaturation conditions than commercial phytases tested, with 82% residual activity, in comparison to only 30% for Ronozyme, a second generation phytase, provided with technology to increase thermostability.

The results showed that FTEII have an intrinsic thermostability, allowing support thermal treatment at broad time intervals. This property is important for phytases, since they would be able to resist the high temperatures encountered in the feed-pelleting process used in commercial fish diets (Wang *et al.*, 2009). Most of commercial phytases are thermally unstable, resulting in loss of activity at processing temperatures of $>80^{\circ}\text{C}$, temperatures over 87°C during steam pelleting of feed results in a reduction of the phytase activity by more than half (Wang *et al.*, 2009).

Phytase supplementation by spraying or encapsulation are approaches used to overcome the lack of thermostability of phytases, however some reports indicate that encapsulation of microbial phytases tended to diminish its ability to liberate phosphorus, likely due to a reduced interaction between the enzyme and dietary phytate-phosphorus (Vandenberg *et al.*, 2011), and phytase spraying on feed pellets cannot hydrolyze phytate efficiently *in vitro* (Wang *et al.*, 2009).

Phytase C from *B. subtilis*, a beta-propeller phytase, has been shown to be resistant to papain, pancreatin, and trypsin, even under conditions of calcium depletion. Nevertheless, this phytase has been found to be susceptible to pepsin (Kerovuo *et al.*, 2000), an effect that was explained by the denaturation of the enzyme at low pH, making it more susceptible to pepsin. In the present work, we tested the susceptibility of FTEII and two commercial phytases to shrimp (*L. vannamei*) digestive enzymes. All phytases were resistant to shrimp digestive enzymes (residual activities of 60 to 100%) and to the exposure to porcine trypsin (activity above 95%). In addition, all phytases showed increased residual activities when the concentration of the protease preparations were increased from 1X to 10X or 1X to 40X. This result may be due to conformational changes occurring on the phytases because of the hydrolysis of some peptide bonds. An increase in residual activity (30%) due to exposure to proteolytic enzymes (pepsin) has been previously described for the phytase r-AppA from *E. coli* (Rodríguez *et al.*, 2000). Authors concluded that stable polypeptides of r-AppA with phytase activity were generated after pepsin treatment.

In vitro methods can be helpful to understand the mode of action of feed enzymes under standardized conditions and to predict the nutrient digestibility of feedstuffs. In this work we have evaluated the effectiveness for phosphorus release from two ingredients treated with FTEII and two commercial phytases *in vitro* conditions.

The total phosphorus released from each ingredient treated included the phosphorus released by the endogenous hydrolytic activity (phosphorus released by control treatment), because it represents the actually available phosphorus. However to evaluate the hydrolytic efficiency of tested phytases, it is necessary to consider the phosphorus released from controls.

Total phosphorus released from each ingredient treated with FTEII phytase was time, temperature and type of ingredient dependent. The average rate of total phosphorus release

was temperature and ingredient dependent, which was affected by a synergic effect of FTEII and endogenous hydrolytic activities. Endogenous hydrolytic activity of both ingredients promoted a phosphorus release up to 28% or 17% of total phosphorus in soybean meal or in pea protein concentrate, respectively, with an average rate of phosphorus release higher at 50°C in both ingredients.

While in soybean the highest average rate of phosphorus release under FTEII treatment was at 40°C, in pea protein concentrate was at 50°C. FTEII was more efficient to release phosphorus in pea protein concentrate than in soybean meal at 40 and 50°C, consistent with the higher average rates of phosphorus release and levels of phosphorus released determined at these temperatures and considering only the FTEII activity. The same effect was observed at 40°C in both commercial phytases tested. Higher availability of substrate in pea protein concentrate than in soybean meal or inhibitors in soybean meal may be considered to be the cause of this effect.

While FTEII demonstrated be more efficient regarding its hydrolytic activity in soybean treatment than commercial phytases ($P<0.05$), showing the highest average rate of phosphorus release, in pea protein concentrate all phytases showing similar hydrolytic activity.

The reduction to half concentration of FTEII showed a reduction of average rate of phosphorus release in 25%, indicating an enzyme concentration dependent response and that an excess of substrate concentration is present in both ingredients.

FTEII treatments showed the highest levels of phosphorus released in both, soybean meal (68%) and pea protein concentrate (57%) at 50°C after 12 h incubation. On the other hand, FTEII treatments showed higher levels ($P<0.05$) of phosphorus released, compared to commercial phytases treatment at 40°C after 12 h incubation in both ingredients.

The percentage of phosphorus released from pea protein concentrate was lower than those released in soybean meal; however the amount of phosphorus released in pea protein concentrate was higher than in soybean meal. This result can be justified by the high content of phytate and total phosphorus in pea protein concentrate (5.76 and 8.9 g/kg) compared to the content in soybean meal (3.88 and 6.49 g/kg).

The phytate content in different raw materials have different characteristics influencing their hydrolysis and subsequent release of phosphorus. Thus, the efficacy of phytase

depends on the phytate solubility, which varies among vegetable feedstuffs and affects the degree of enzymatic degradation and their utilization by the animal (Pointillart, 1993).

Phytase pretreatment feed ingredients has been studied *in vitro* assays (Frias *et al.*, 2003; Urbano *et al.*, 2003), *in vivo* with some aquatic species (Vielma *et al.*, 2002; Nwanna *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009, Denstadli *et al.*, 2011; Fortes-Silva *et al.*, 2011) and it has demonstrated to be effective on reduction of phytate-phosphorus, increase of phosphorus bioavailability, reduction of phosphorus excretion and, some cases, it has demonstrated to be effective on specific growth rate (SGR), digestibility and retention efficiencies of nutrients and energy. Under these considerations phytase pretreatment of feed ingredients could be an effective method for supplementation phytase as feed additive.

In this work we demonstrate a higher hydrolytic efficiency of FTEII on soybean meal compared to the commercial phytases tested, and a similar hydrolytic efficiency of all phytases tested in pea protein concentrate. Considering the global results, FTEII demonstrates a better performance in phosphorus release than commercial phytases under the tested conditions, further unlike commercial phytases, FTEII is phytate specific; therefore it is possible to assume that most of phosphorus released comes only from phytate.

FTEII is a beta-propeller phytases requiring calcium for activity and stability, and exhibiting maximum activity at pH between 6.0 and 9.0, and is suitable for animals with neutral digestive tracts. The stability of FTEII in a high temperature range is another important and useful characteristic for their application as animal feed additives, because the process of pelleting uses steam at high temperatures. FTEII offer an alternative as phytase additive for pelleted feeds and for releasing phosphorus under conditions suitable for digestive tracts of species grown in aquaculture.

Acknowledgments

This study was supported by grants IT146-09 (PAICYT) from Universidad Autónoma de Nuevo León and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-SAGARPA). We thank the many undergraduate students for technical assistance.

References

- Beleia A, Thu Thao LT, Ida El. 1993. Lowering phytic phosphorus by hydration of soybean. *J Food Sci* 58:375-388.
- Biswas P, Pal AK, Sahu NP, Reddy AK, Prusty AK and Misra S.2007. Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: Effect on growth, body composition and lipid profile. *Aquaculture* 265 (2007) 253–260.
- Carnovale E, Lugaro E, Lomabardi-Boccia G. 1988. Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem* 65:114-117.
- Denstadli V, Hillestad M, Verlhac V, Klausen M, Øverland M. 2011. Enzyme pretreatment of fibrous ingredients for carnivorous fish: Effects on nutrient utilisation and technical feed quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 319:391-397.
- Fortes-Silva R, Sánchez-Vázquez FJ, Martínez FJ. 2011. Effects of pretreating a plant-based diet with phytase on diet selection and nutrient utilization in European sea bass. *Aquaculture* 319:417-422.
- Frias J, Doblado R, Antezana JR, Vidal-Valverde C. 2003. Inositol phosphate degradation by the action of phytase enzyme in legume seeds. *Food Chem* 81:233-239.
- Greiner R. and Konietzny U. 2006. Phytase for food application. *Food Technol. Biotechnol.* 44:125–140
- Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Carreón-Treviño JG, Gallegos-López JA, Viader-Salvadó JM. 2010. Expression of a *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol.*76:5601-5608.
- Ha NC, Oh BC, Shin S, Kim HJ, Oh TK, Kim YO, Choi KY, Oh BH. 2000. Crystal structures of a novel thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nat Struct Biol.*7:147-153.
- Kerovuo J, Lappalainen I and Reinikainen T. 2000. The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 365–369
- Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2079–2085.
- Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb Technol.*22:2-7.
- Kim, DH, B. Oh BC, Choi WC, Lee JK and Oh TK. 1999. Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive. *Biotechnol. Lett.* 20:925–927.
- Lei XG, Porres JM, Mullaney EJ, Brinch-Pedersen H. 2007. Phytase: source, structure and application. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Dordrecht: Springer;;505-529.
- Lei XG, Weaver JD, Mullaney EJ, Ullah AH, and Azain MJ. 2013. Phytase, a new life for an “old” enzyme. *Annu Rev Anim Biosci.* 1:283-309.

- Mullaney EJ, Ullah AHJ. 2007. Phytases: attributes, catalytic mechanisms, and applications. In: Turner L, Richardson AE, Mullaney EJ, editors. *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*. Oxfordshire: CAB International;:97-110.
- Nwanna LC, Eisenreich R, Schwarz FJ. 2007. Effect of wet-incubation of dietary plant feedstuffs with phytases on growth and mineral digestibility by common carp (*Cyprinus carpio* L). *Aquaculture* 271(1):461-468.
- Oh BC, Choi WC, Park S, Kim Yo, Oh TK. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 362–372.
- Pointillart A. 1993. Proc 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition. Eds. C. Wenk y M. Boessinger, Kartause Ittingen, Switzerland pp: 192-199.
- Rodriguez E, Porres JM, Han Y, Lei XG. 1999. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-phyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* 365(2): 262-267.
- Rodriguez, E., Z. A. Wood, P. A. Karplus, and X. G. Lei. 2000. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 382:105–112.
- Selle PH and Ravindran V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135:1–41
- Shin S, Ha NC, Oh BC, Oh TK, Oh BH. 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase. *Structure*.9:851-858.
- Urbano G, Aranda P, Gomez-Villalva E, Frejnagel S, Porres J, Frias J, Vidal-Valverde C and Lopez-Jurado M. 2003. Nutritional Evaluation of Pea (*Pisum sativum* L.) Protein diets after mild hydrothermal treatment and with and without added phytase . *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2415-2420.
- Vandenberg GW, Scott SL, Sarker PK, Dallaire V, de la Noüe J. 2011. Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim Feed Sci Technol* 169:230-243.
- Vats P, Bhushan B, Banerjee UC. 2009. Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from *Aspergillus niger* van Teighem. *Bioresource Technology* 100: 287–291
- Viader-Salvadó JM, Castillo-Galván M, Fuentes-Garibay JA, Iracheta-Cárdenas MM, Guerrero-Olazarán M. 2013. Optimization of five environmental factors to increase beta-propeller phytase production in *Pichia pastoris* and impact on the physiological response of the host. *Biotechnol Prog.* doi: 10.1002/btpr.1822.
- Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Carreón-Treviño JG, Castillo-Galván M, Rojo-Domínguez A, Guerrero-Olazarán M. 2010. Design of thermostable beta-propeller phytases with activity over a broad range of pHs and their overproduction by *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol.*;76:6423-6430.
- Vielma J, Ruohonen K, Peisker M. 2002. Dephytinization of two soy protein increases phosphorus and protein utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 204: 145-456.

Wang F, Yang YH, Han ZZ, Dong HW, Yang CH, Zou ZY. 2009. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac Int* 17:143-157.

Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*

L. Elizabeth Cruz-Suárez, Martha Nieto-López, Mireya Tapia-Salazar, Julián Gamboa-Delgado, Maribel Maldonado-Muñiz, David Villarreal-Cavazos,
Denis Ricque-Marie

Cuerpo Académico en Nutrición y Tecnología de Alimentos de Organismos Acuáticos,
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd Universitaria
AP F67, San Nicolás de los Garza, NL 66451, México. Tel +fax: +52 8183526380.

E-mail: lucia.cruzs@uanl.edu.mx

Resumen

Las algas marinas constituyen una fuente natural de antimicrobianos, antioxidantes, hepatoprotectores, inmunoestimulantes, minerales y prebióticos, que al ser suplementados (en forma de harina o extracto) como aditivos funcionales en alimentos para camarón pueden ayudar a promover la producción, la salud y aumentar la resistencia a enfermedades durante las diferentes etapas del cultivo (maduración, desarrollo larvario, engorda). El Programa Maricultura a través de su cuerpo académico ha promovido esta línea de investigación durante los últimos 3 años especialmente con el género *Ulva*. El objetivo de este trabajo es presentar una breve revisión de los efectos funcionales que hemos comprobado *in vivo* e *in vitro*, tales como: efecto antibiótico, antioxidante, promotor de maduración y sobrevivencia larvaria, estimulador de respuesta inmune y remediador contra aflatoxicosis y la estimación de contribuciones nutricionales a partir de análisis isotópicos.

Palabras clave: ulvaceas, camarón blanco del Pacífico, nutrición, antioxidante

Introducción

El género *Ulva* (Phylum Chlorophyta, Class Ulvophyceae, Order Ulvales, Family Ulvaceae) fue identificado por Linnaeus (1753) y al inicio incluía una variedad de algas con diferencias morfológicas. En el siglo XIX sus miembros fueron separados en varios géneros. Las algas verdes de forma laminar fueron mantenidos bajo el nombre de *Ulva* y las formas tubulares fueron cambiadas al género *Enteromorpha* (Link, 1820). El género *Ulva* ha sido difícil de clasificar debido a la gran plasticidad morfológica que presentan muchos de sus miembros y a la falta de caracteres confiables para diferenciar el taxa (Silva *et al.*, 2013). De hecho, en 2003, Hayden y colaboradores, con estudios moleculares, muestran que Linnaeus tenía razón y que *Ulva* y *Enteromorpha* son el mismo género, por lo que unifican el nombre a *Ulva* por ser el nombre definido con más antigüedad. Son algas verde brillante cuya morfología es influenciada por las condiciones, edad del talo, y ciclo de vida, lo que hace difícil la identificación de especies solo por características morfológicas.

La identificación de las especies de *Ulva* tradicionalmente se han basado en características morfológicas, anatómicas y citológicas como forma, tamaño, presencia o ausencia de dentado, espesor, dimensiones de la célula y número de pirenoides. Muchos estudios han demostrado que estas características pueden ser muy variables dentro de las especies, variando con la edad, estado reproductivo, exposición a mareas, temperatura, salinidad, luz, y factores biológicos como el pastoreo. En años recientes el desarrollo de patrones en cultivo, detalles reproductivos y capacidad aparente de entrecruzamiento han sido usados para evaluar conceptos de especies basados en características morfológicas y anatómicas. Actualmente hay 568 especies del género *Ulva* reportadas en la “Algaebase”.

Las ulvas presentan un crecimiento rápido con una distribución cosmopolita en diferentes hábitats y ambientes; hay especies marinas, salobres y de agua dulce (incluso se encuentra en hábitats subaéreos húmedos, entre ellos la nieve). Aparecen en ambientes muy ricos en nutrientes que son aprovechados para su proliferación y para acumular en su talo cantidades importantes de macro y micronutrientes; estos componentes varían en su concentración dependiendo del lugar y la época del año. Pueden llegar a ser consideradas como plagas por su desarrollo exacerbado en bahías eutrofizadas.

1. Efecto Vibriocida *in vitro* e *in vivo*

Las macroalgas marinas tienen compuestos bioactivos que pueden ser potencialmente explotados como ingredientes funcionales en aplicaciones de salud animal y humana. Entre ellos presentan compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano de diversos patógenos incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas tanto de cepas patógenas y no patógenas. El estudio de esta actividad antibacteriana en las algas se remonta a 1954 con el estudio de una sola alga (*Ascophyllum nodosum*) hasta la actualidad con un amplio rango de estudios en algas pardas, verdes y rojas (Tan *et al.*, 2011). Esta actividad es generada por metabolitos secundarios de las algas, cuya producción puede variar por diversos factores tales como el crecimiento de la planta que a su vez es afectado por factores ambientales externos como temperatura del agua, irradiación solar y presencia de iones de metales, la estación, el grado de estrés y depredación, la especie de alga, la localización geográfica y temporada así como las condiciones en las que creció y en que fue colectada la muestra (Osman *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011, Trigui *et al.*, 2012).

Los compuestos fenólicos, terpenoides y lipofílicos (ácidos grasos) son algunos de los responsables de la actividad antimicrobiana presente en las algas (Chiheb *et al.*, 2009; Chakraborty *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011; Manilal *et al.*, 2012). Las algas verdes presentan gran variedad de este tipo de compuestos y un rango de acción amplio. En lo particular el género *Ulva* presenta una amplia gama de metabolitos antimicrobianos (solubles en solventes con diferentes polaridades como hexano, etanol, metanol, butanol, diclorometano y agua) que inhiben el crecimiento de vibrios de importancia sanitaria en acuicultura. Las especies *Ulva fasciata*, *rigida*, *lactuca* y *clathrata* comparten esta propiedad *in vitro* (Selvin y Lipton, 2004; Immanuel *et al.*, 2004; Bansemir *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008; Christobel *et al.*, 2011; Priyadharshini *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2014; Campos-Deloya, 2012; Silva *et al.*, 2013; Gonzalez-Colunga *et al.*, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades antivibrio de las algas del género *Ulva* evaluadas *in vitro*

Especie	Patógenos	Referencia
<i>Ulva fasciata</i>	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. fischeri</i>	Selvin and Lipton, 2004
<i>Ulva lactuca</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	Immanuel <i>et al.</i> , 2004
<i>Ulva rigida (Portugal)</i>	<i>V. anguillarum</i>	Bansemir <i>et al.</i> , 2006
<i>Ulva clathrata</i>	Cepa 65 <i>V. anguillarum</i>	Lu <i>et al.</i> , 2008
<i>Ulva fasciata (fresca)</i>	<i>V. fischeri</i> ; <i>V. alginolyticus</i> ; <i>V. harveyi</i>	Christobel <i>et al.</i> , 2011
<i>Ulva fasciata</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Priyadharshini <i>et al.</i> , 2011
<i>Ulva clathrata</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> ; <i>V. vulnificus</i> , <i>V. campbellii</i> ; <i>V. harveyi</i>	Cruz <i>et al.</i> , 2014 (publicación en desarrollo), Campos-Deloya, 2012
<i>Ulva fasciata</i>	<i>V. barasiliensis</i> 113; <i>V. barasilensis</i> 130 <i>V. parahaemolyticus</i> ; <i>V. navarrensis</i>	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Ulva clathrata</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	Gonzalez-Colunga <i>et al.</i> , 2013 POSTER (tesis Doctorado)

Los estudios realizados en nuestro laboratorio con *Ulva clathrata* producida por cultivo en estanques de camarón en México, , muestran resultados prometedores. En 2012, al evaluar la actividad antibacteriana (método de difusión) contra *Vibrio parahaemolyticus*, *V. campbelli*, *V. harveyi* y *V. vulnificus*, con 3 extractos (hexano, diclorometano, etanol) del alga verde *Ulva clathrata*, encontramos que el extracto hexánico fue el único que presentó actividad antibacteriana contra las 4 cepas. Se observaron halos de inhibición de 15, 17, 14 y 16 mm para *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. campbelli* y *V. harveyi* respectivamente, y un MIC de 7.5 mg/ml sobre *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* y de 1.8 mg/ml sobre *V. vulnificus* y *V. campbelli*. Los grupos funcionales y metabolitos secundarios en *Ulva clathrata* encontrados fueron: dobles enlaces, quinonas, carbohidratos, cumarinas, sesquiterpenlactonas, flavonoides, esteroides y triterpenos. Adicionalmente, demostramos en extracto hexánico la presencia de un grupo lactona probablemente una sesquiterpenlactona, metabolito que por sus antecedentes puede ser el responsable de la actividad bactericida (Cruz-Suárez *et al.*, 2014). En 2013, al evaluar la actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus* (misma cepa) en extractos de la misma alga, usando como solventes hexano, agua o cloroformo, además del polisacárido ulvan (extraído de la misma muestra), se demostró que el extracto acuoso y el ulvan no presentan actividad contra *V. parahaemolyticus*. En contraste con los resultados previos, en esta ocasión el extracto en hexano tampoco presentó actividad, mientras que el extracto en cloroformo si mostró actividad vibriocida.

La principal problemática que hemos detectado en esta línea de investigación, es la dificultad de comparar los trabajos realizados por otros grupos y de encontrar resultados repetibles, posiblemente por la falta de estandarización en los métodos microbiológicos utilizados por los diferentes grupos de investigación, así como por la variabilidad en la metodología de extracción y en el contenido de compuestos activos entre las diferentes especies y lotes de algas aun de la misma especie. Actualmente, estamos realizando nuevas investigaciones con la especie *Ulva clathrata* cultivada considerando diferentes solventes, métodos microbiológicos y variables estacionales con la posibilidad de poder elegir la estación de cosecha más apropiada, o generar un estrés artificial que produzca un contenido mayor de metabolitos secundarios antes de la cosecha.

Finalmente vale la pena mencionar que el efecto antimicrobiano de las *Ulvaceas* no se restringe a vibrios de importancia en acuicultura, sino también se ha encontrado efectivo contra otras bacterias (con o sin problemas de resistencia) de importancia en alimentos, salud animal y humana por lo que el impacto de estas aplicaciones puede ser mucho más amplio.

El efecto antivibrio de extractos de *ulvaceas* también se ha evaluado *in vivo* como agente terapéutico en diferente tipo de organismos acuáticos incluyendo los extractos o las algas deshidratadas en alimentos a niveles muy bajos como aditivos.

En estudios exploratorios que hemos realizado con extractos de *Ulva clathrata* adicionados al alimento, hemos encontrado una disminución en la carga bacteriana de vibrios en el hepatopáncreas de los camarones *L. vannamei* que consumieron ese alimento. Esto coincide con los estudios realizados por Selvin *et al.* (2011); Malinal *et al.*, (2012); ellos encuentran que la inclusión de un extracto (diclorometano/metanol) de *Ulva fasciata* a concentraciones de 1g Kg⁻¹ de camarón *Penaeus monodon* mejora significativamente la sobrevivencia en camarones infectados por diversos vibrios. Con ello concluyen que el extracto de *Ulva fasciata* es una excelente alternativa para el desarrollo de alimento terapéutico para el manejo de las enfermedades bacterianas en camarones.

De la misma manera, Immanuel *et al.* (2004) muestran que al enriquecer por 24 hrs *Artemia franciscana* con extractos butanólicos de *Ulva fasciata* encapsulados (400 mg/l) y ser consumidas por *Penaeus indicus* desafiados con *V. parahaemolyticus*, se mejora la sobrevivencia y disminuye el número de UFC presentes en el músculo y hepatopáncreas del camarón, concluyendo que el uso de extractos de alga en el alimento aumenta la resistencia a enfermedades bacterianas. Manilal *et al.* (2012) también demuestran como otra alga verde de la familia de las *Ulvaceas*, *Acrosiphonia orientalis*, también es eficaz como agente terapeuticoterpéutico para contrarrestar problemas de vibriosis en camarones peneidos.

En base a lo anterior varios extractos de *Ulvaceas* y otras algas están siendo evaluados en nuestro laboratorio como agentes profilácticos o terapéuticos prometedores, para contrarrestar problemas de vibriosis (síndrome de muerte temprana) que actualmente está

padeciendo la industria camaronera a nivel mundial, por ejemplo síndrome de muerte temprano, con las consecuentes pérdidas económicas.

2. Efecto de la inclusión de harinas de algas verdes y productos a base de mezcla de algas como aditivo en dietas para camarón *L. vannamei*

Numerosos estudios han demostrado que el uso de harinas de macroalgas como aditivo (menos del 5% de inclusión) en alimento para camarón blanco *Litopenaeus vannamei* mejora la calidad física del alimento, aumenta el consumo de alimento, la ganancia en peso, mejora la utilización del alimento (efecto prebiótico) y la sobrevivencia. Sin embargo, la magnitud de los efectos varía en función de las diferencias de algunos compuestos químicos (polisacáridos entre otros) entre las algas verdes, rojas y pardas (Cruz-Suárez *et al.*, 2009). En el 2013 llevamos a cabo un trabajo cuyo objetivo fue evaluar, en medio controlado, el efecto de harinas de macroalgas verdes individuales y mezclas de macroalgas como aditivo nutricional (2%) en un alimento tipo comercial para engorda de juveniles de *L. vannamei*.

Para ello, se prepararon 5 dietas isoprotéicas (40%) e isolipídicas (7%) suplementando una dieta control (DC) con 2% de dos tipos de harinas de *algas verdes* (AV1) o (AV2), una mezcla comercial de algas (MIX1) o una mezcla experimental de algas pardas y rojas (MIX2). Se determinó la estabilidad de las dietas después de 1 hora de inmersión en agua marina sintética en términos de pérdida de materia seca (PMS), pérdida de proteína (PP) y absorción de agua (ABS). Las dietas fueron suministradas durante 41 días a camarones juveniles de *L. vannamei* (0.64 g). Cada dieta fue evaluada por triplicado en acuarios de 60L con 11 camarones cada uno. Se alimentó a saciedad 3 veces al día. Los parámetros evaluados fueron ganancia en peso (GP), consumo de alimento (CA), sobrevivencia (SOB), tasa de conversión alimenticia (TCA), tasa de eficiencia proteica (PER) y utilización neta de proteína (UNP).

Las dietas AV1 y MIX2 fueron las más estables al disminuir la PMS en un 2.8 y en 7.3% respectivamente, la PP en 15 y 23% y la ABS 2.4 y 0.8% con respecto a la DC (Tabla 2). Así mismo, produjeron los mejores valores de TCA (1.3), PER (1.7) y UNP (0.41 y 0.33 respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 2. Estabilidad de dietas en términos de pérdida de materia seca (PMS), pérdida de proteína (PP) y absorción de agua (ABS).

	DC	AV1	AV2	MIX1	MIX2	Prob. ANOVA
PMS (%)	17.7 ^a ±0.4	17.2 ^a ±1.2	21.5 ^b ±1.2	20.9 ^b ±0.6	16.4 ^a ±0.3	<0.001
PP (%)	14.6 ^b ±1.0	12.4 ^a ±1.3	17.5 ^c ±1.5	16.0 ^{bc} ±1.0	11.2 ^a ±0.3	<0.001
ABS (%)	126 ^a ±16	123 ^a ±9	157 ^b ±7	188 ^c ±12	125 ^a ±1	<0.001

Tabla 3. Comparación del consumo de alimento (CA), Tasa de conversión alimenticia (TCA), Tasa de eficiencia proteica (PER) y Utilización neta de proteína (UNP) (41 días)

Parámetro	DC	AV1	AV2	MIX1	MIX2	Prob. ANOVA
CA (g/org)	6.6 ^a ±0.6	7.0 ^a ±0.4	9.6 ^b ±0.2	9.9 ^b ±0.4	6.7 ^a ±0.3	<0.001
TCA	1.4 ^{ab} ±0.1	1.3 ^a ±0.1	1.6 ^{bc} ±0.1	1.7 ^c ±0.3	1.3 ^a ±0.1	0.012
PER	1.6 ^b ±0.1	1.7 ^b ±0.1	1.3 ^a ±0.1	1.2 ^a ±0.2	1.7 ^b ±0.1	<0.001
UNP	0.2 ^a ±0.07	0.4 ^b ±0.03	0.3 ^a ±0.03	0.3 ^a ±0.05	0.3 ^{ab} ±0.07	0.075

PER= g de peso ganado/ g de proteína ingerida; UNP= incremento en Nitrógeno carcass/ N ingerido

En contraste, las dietas AV2 y MIX1 disminuyeron la estabilidad del alimento, aumentando de forma significativa el consumo de alimento (45 y 50%, $P < 0.001$) y la tasa de conversión alimenticia (14 y 21%, $P = 0.012$), con una disminución del PER con respecto a la DC (19 y 25%, $P < 0.001$). Sin embargo, mejoraron el incremento en peso (Figura 1).

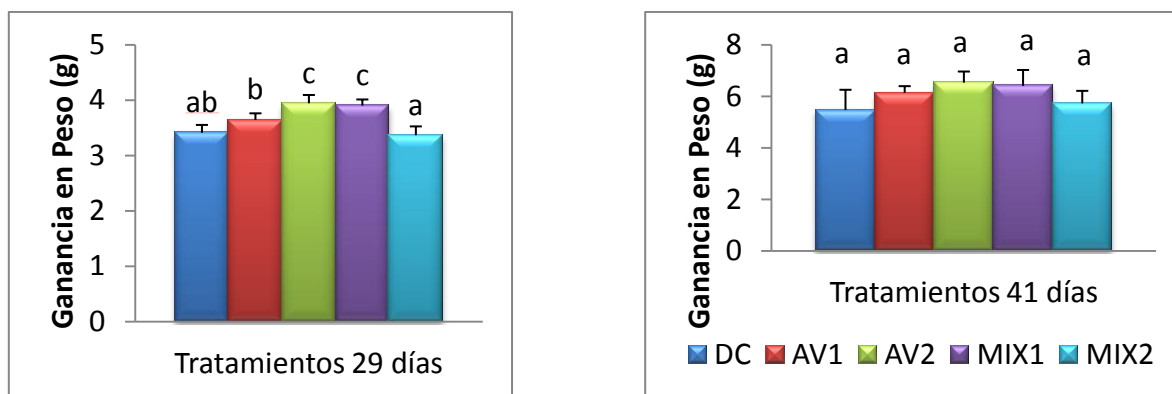


Figura 1.- Comparación de Ganancia en peso entre tratamientos

A los 29 días AV2 y MIX1 mejoraron significativamente la ganancia en peso (20 y 17%, $P < 0.001$), manteniéndose la tendencia a los 41 días aunque se perdió la significancia ($P = 0.160$).

Al final del experimento, la biomasa fue mayor con AV2 y MIX1 con diferencias cercanas a la significancia (Figura 2, $P = 0.058$).

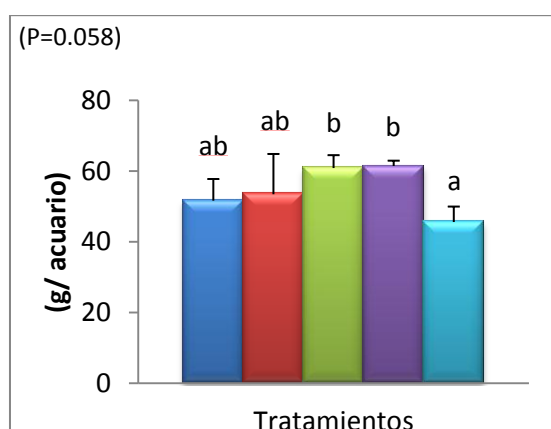


Figura 2. Biomasa 41 días

Entre los 29 y 41 días, la sobrevivencia disminuyó en todos los tratamientos, pero sin generar diferencias significativas entre tratamientos (Figura 3).

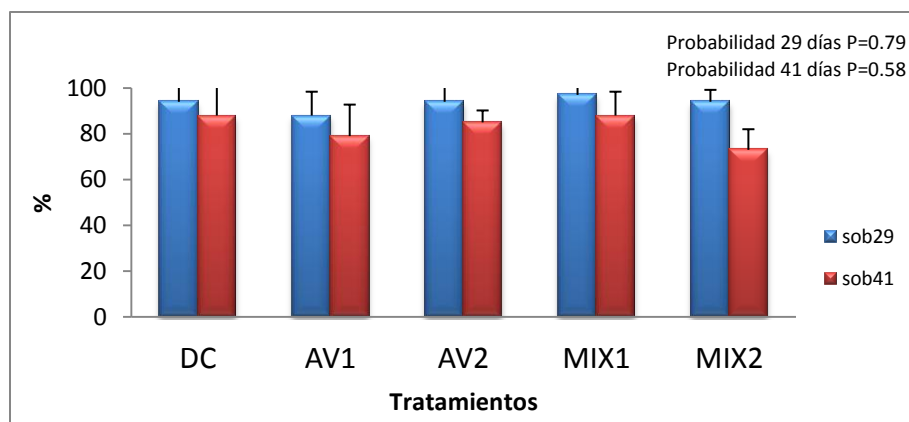


Figura 3. Sobrevivencia a 29 y 41 días

En resumen, la inclusión de 2% del alga verde AV1 y la mezcla de algas MIX2 mejoró la estabilidad de las dietas, así como la TCA y el PER, mostrando mayor capacidad aglutinante, lo cual implica una menor pérdida de nutrientes. Por otro lado, AV2 y MIX1 mejoraron el consumo de alimento (efecto attractante) y con ello el crecimiento y la producción de biomasa. Se recomienda usar estos productos con dosificación adaptada a cada formulación para evitar un aumento indeseado en la TCA y una posible sobre-inmunoestimulación y para aprovechar adecuadamente las propiedades que confiere cada tipo de alga o mezcla de algas en cada formulación.

3. Efecto de la inclusión de algas o sus extractos como inmunoestimulantes

Los crustáceos no poseen un sistema inmune específico ni memoria inmunológica (Berger, 2000), lo que dificulta la utilización de vacunas. No obstante, poseen una respuesta inmune rápida y eficiente en donde se distinguen efectores celulares y humorales, los cuales actúan en conjunto para eliminar los agentes extraños. Dentro de los efectores celulares se han descrito tres tipos de hemocitos: células hialinas, semi-granulares y granulares (Hose *et al.*, 1990), los cuales poseen una capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les facilita las funciones de coagulación, reconocimiento, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (Aguirre-Guzman *et al.*, 2009). El sistema inmune de los

camarones cuenta además con la presencia de varios componentes plasmáticos (péptidos antimicrobianos, histonas, enzimas lisosomales, lipopolisacáridos, proteínas de reconocimiento a glucanos), sistema profenoloxidasa, y la cascada de coagulación que favorecen la destrucción de los patógenos (Chi *et al.*, 2010).

Existen un sin número de estudios en los que se demuestra que el uso de β -glucanos, extractos de plantas, mezclas de nucleótidos, etc. (Ringo *et al.*, 2012) puede conferir protección y/o mejorar la resistencia a las enfermedades en el camarón, una práctica a menudo denominada inmunoestimulación (Smith *et al.*, 2003; Campa-Córdova *et al.*, 2005).

En lo que respecta a la resistencia a enfermedades, varios estudios demuestran que los suplementos dietéticos tanto de harina de algas (pardas y rojas) como de sus extractos, pueden aumentar la respuesta inmune, mejorar la supervivencia y aumentar la resistencia cuando los camarones se ven desafiados por algunas bacterias o virus (Tabla 4), debido a la presencia de ciertos compuestos como son los alginatos, laminarias, carragenatos, fucoidan y otros polisacáridos sulfonados.

Algunas especies de *Ulva* así como sus extractos presentan importantes actividades biológicas que han sido demostradas principalmente en humanos y animales como son la actividad antioxidante (Qi *et al.*, 2006), antihepatotóxica e inmunomoduladora (Raghavendra *et al.*, 2004; Lahaye and Robic, 2007; Leiro *et al.*, 2007) antiinflamatoria, antitumoral (Kaeffer *et al.*, 1999; Barcelo *et al.*, 2000) y antiviral. El alga *Ulva clathrata* es un alga de la familia Ulvaceae que contiene como principal polisacárido sulfatado al ulvan, este tiene como principales componentes disacáridos constituidos de ramnosa y ácido glucurónico o ácido idurónico, o xilosa, todos portadores de grupos sulfatos (Lahaye, 1998; Paradossi *et al.*, 1999).

Los estudios sobre los efectos protectores de las Ulvas en organismos acuáticos son muy escasos, en peces se ha visto que la inclusión de *Ulva* o extractos de esta, incrementan la actividad de los macrófagos al ser incluidos en dietas para rodaballo que contribuye a la

resistencia a enfermedades (Castro *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2006); por otro lado Satoh *et al.* (1987), utilizando 5% de harina de *Ulva pertusa* en dietas para pargo rojo *Pagrus major*, encuentran un aumento en los parámetros de respuesta inmune tales como un aumento en la fagocitosis de los granulocitos al ser infectados con *Pasteurella piscicida*. Así mismo, encuentran que el número de linfocitos se incrementa en los animales alimentados con la dieta suplementada y un aumento en actividades complementarias como la actividad hemolítica espontánea y la actividad bactericida frente a *Escherichia coli*.

Tabla 4. Algunos estudios sobre el efecto inmuno-estimulante, de harina de algas (pardas o rojas), o de sus extractos en los camarones peneidos.

Producto	Especie de camarón / alga	administración	Resultado
Alginato	<i>L. vannamei</i> /Alginato de sodio ¹	inyectado intramuscular (10, 20 o 50 µg/g)	Incrementa significativamente la actividad de la profenoloxidasa, la actividad fagocítica, la limpieza bacteriana cuando los camarones son inyectados. Incrementa la resistencia a infección por <i>V. alginolyticus</i>
Extracto en agua caliente	<i>L. vannamei</i> / <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ²	Inmersión (4 o 6 µg/g) Inyectado intramuscularmente	Aumenta el recuento total de hemocitos, la actividad fenoloxidasa y estallido respiratorio y la resistencia a la infección por <i>V. alginolyticus</i> .
Extracto en agua caliente	<i>P. vannamei</i> /Sargassum duplicatum inyectado ³	Inmersión (100, 300 y 500 mg/L) Inyectado Intramuscularmente (2, 6, 10 y 20 µg/g)	Aumenta el recuento total de hemocitos, la actividad fenoloxidasa y estallido respiratorio, así como la resistencia a la infección por <i>V. alginolyticus</i> .
Fucoidan extraído tres veces con 0,05 N HCl a 95 ° durante 12 h	<i>P. monodon</i> / <i>Sargassum polycystum</i> ⁴	Inyectado intramuscularmente	Produce una expresión significativamente mayor (p <0,05) del gen de la proteína ribosomal L26 (RPL26, un gen activador de los macrófagos en <i>P. monodon</i>)
Extracto en agua caliente	<i>Litopenaeus vannamei</i> / <i>Gelidium amansii</i> ⁵	Inmersión (200, 400 y 600 mg/l) Inyectado (4 y 6 mg/g shrimp) Oral (0, 0.5, 1.0 y 2.0 g /kg).	Aumenta la actividad fagocítica, la eficiencia de limpieza de bacterias en hemolinfa, el conteo total de hemocitos, la actividad de la fenoloxidasa la resistencia a la infección por <i>V. Alginolyticus</i>
Extracto en agua caliente	<i>Litopenaeus vannamei</i> / <i>Spirulina platensis</i> ⁶	Inmersión (200, 400, and 600 mg/l) Inyectado Intramuscularmente	Aumenta el recuento total de hemocitos, la actividad fenoloxidasa y estallido respiratorio, así como la resistencia a la infección por <i>V. alginolyticus</i> .

Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

Producto	Especie de camarón / alga	administración	Resultado
		(6, 10, and 20 µg/g)	
Extracto en agua caliente	<i>Litopenaeus vannamei</i> / <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ⁷	Oral (0.5, 1.0, and 2.0 g/kg)	Aumenta la resistencia a la infección por <i>V. alginolyticus</i> y WSSV, Aumento en los parámetros de respuesta inmune.
Extracto en agua caliente	<i>Fenneropenaeus indicus</i> / <i>Sargassum glaucescens</i> ⁸	Inmersión (100, 300 and 500 mg/l.)	Aumenta del conteo total y diferencias de hemocitos, aumento de la resistencia a <i>Vibrio harveyi</i>
Fucoidan	<i>Penaeus monodon</i> / <i>Sargassum wightii</i> ⁹	Oral (0.1, 0.2 and 0.3%).	Aumenta en todos los parámetros de respuesta inmune y aumento en la resistencia a la infección con WSSV
Extracto en etanol	<i>Penaeus monodon</i> / <i>Gracilaria fisheri</i> ¹⁰	Inyectado	Aumenta en el número total de hemocitos, aumento en el numero de hemocitos semigranulosos y granuloso, aumento en la actividad de la fenoloxidasa y la superoxidodismutasa y una reducción en la mortalidad a la infección con <i>V. harveyi</i>

¹Cheng *et al.*, 2004; ²Hou and Chen, 2005; ³Yeh *et al.*, 2006; ⁴Deachamag *et al.*, 2006; ⁵Fu *et al.*, 2007; ⁶Tayag *et al.* 2010; ⁷Sirirustananun *et al.* 2011 ; ⁸Ghaednia *et al.* 2011 ; ⁹ Immanuel *et al.* 2012 ; ¹⁰Kanjana *et al.*, 2011

En el caso de los camarones existen reportes del uso de diferentes especies de ulvas y/o sus extractos para aumentar la resistencia a patógenos o incrementar los parámetros de respuesta inmune; por ejemplo Selvin *et al.* (2004) incluyen *Ulva fasciata* en la dieta para *P. monodon* y demuestran que su inclusión incrementa los factores de defensa como hemograma, índice de aglutinación, tasa de fagocitosis, remoción de bacterias y actividad bactericida del suero. En otro estudio realizado el mismo año (Felix *et al.*, 2004) se encontró que al incluir a la dieta para *P. monodon* 750 mg/kg de harina de *Ulva lactuca*, se incrementó la actividad de la profenoloxidasa y la sobrevivencia al ser desafiados con *V. parahaemolyticus*. En el 2011, Selvin y colaboradores utilizan un extracto en agua caliente de *Ulva fasciata* incluido a la dieta (0, 0.5, 1 y 1.5 g kg⁻¹ de camarón) y alimentan a *P. monodon* durante 15 días, posteriormente infectan con diferentes vibrios (*V. fisheri*, *V.*

harveyi, *V. alginolyticus* y *Aeromonas sp.*) y observan que la dosis de 1 g kg^{-1} de camarón fue la más eficiente y que la sobrevivencia de los camarones infectados alimentados con la dieta medicada fue significativamente mejorada con respecto al control.

Ulva clathrata

En el caso de la especie *Ulva clathrata* no existen reportes previos de su utilización como inmunoestimulante, nosotros hemos llevado a cabo un bioensayo para tratar de describir los cambios que ocurren en el hemograma, en el contenido de proteína de la hemolinfa y en la actividad de la fenoloxidasa de juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* como respuesta a una inmunoestimulación oral, utilizando harina de *Ulva clathrata* o ulvan extraído de la misma. Para ello, se llevó a cabo un bioensayo en el que los animales fueron alimentados con una dieta control o con una dieta adicionada con 6% (60 g kg^{-1}) de harina *Ulva clathrata* o una dieta adicionada con un extracto de la misma alga (1 g kg^{-1}) por 15 días; se trabajó con 6 replicados para cada tratamiento y se utilizaron organismos de 2.7 g de peso promedio, posteriormente se obtuvieron muestras de hemolinfa que fueron sometidas a análisis de parámetros de respuesta inmune.

Hemograma

Los animales que recibieron la dieta con *Ulvan*, mostraron un mayor contenido de hemocitos semigranulosos (1.96 y 4.23×10^5 vs 8.32×10^5), hialinos (1.52 y 1.56×10^5 vs 4.10×10^5) y totales (6.88 y 6.93×10^5 vs 1.61×10^6) en comparación con los animales alimentados con las otras dos dietas. Estos resultados concuerdan con varios estudios en los que se ha encontrado que la inclusión de diferentes extractos de algas aumenta el contenido de hemocitos; por ejemplo, Yu-Win *et al.* (2007) encontraron, al adicionar a la dieta un extracto en agua caliente de *Gelidium amansii* ($0,0.5, 1.0$ y 2.0 g kg^{-1}) y alimentar a *L. vannamei* durante 14 días, un aumento en el conteo total de hemocitos a los 6 días con la dosis de 2.0 g kg^{-1} y a los 14, 21 y 28 días con la dosis de 1.0 g kg^{-1} . En otro estudio realizado por Sirirustananun *et al.* (2011) al suplementar la dieta con un extracto en agua caliente de *Gracilaria tenuistipitata* ($0, 0.5, 1.0, \text{ y } 2.0 \text{ g kg}^{-1}$ por 7-35 días), y alimentar

camarones *L. vannamei*, encontraron que el contenido de hemocitos hialinos (HC) y el contenido total de hemocitos (THC) de los camarones alimentados con dietas suplementadas con 1.0 and 2.0 g kg⁻¹ fue significativamente más alto que el control desde 7 a 35 días; los HC y THC de los camarones alimentados con 0.5 g kg⁻¹ fueron más altos que el control de 14-28 días. Los hemocitos granulares (GC) de los camarones alimentados con 2.0 g kg⁻¹ fueron más altos que los del control de 14 a 35 días y los GC de los animales alimentado con 0.5 y 1.0 g kg⁻¹ fueron significativamente más altos que los del control a los 21 y 28 días. Pero también notaron que los HC, GC y THC de los camarones alimentados con las dietas conteniendo los extractos decrecen lentamente después de 35 días. En otro estudio realizado por Grasian *et al.* (2012) en el que administraron a camarones *Penaeus monodon* por inmersión un extracto en buffer salino de fosfatos del alga *Gracilaria verrucosa* (1, 1.5 y 2ppt), revelaron que todas las dosis provocaron un aumento en el THC significativo con respecto al control, el efecto siendo dosis dependiente.

Proteína en hemolinfa

En lo que respecta al contenido de proteína en la hemolinfa, se encontró que la dieta control era la que presentaba el valor significativamente más elevado seguido por la dieta adicionada con ulvan y finalmente por la dieta adicionada con harina de alga, presentando estas dos últimos valores similares. En general, la concentración de proteína en hemolinfa puede aumentar o disminuir dependiendo del tipo de inmunoestimulante y el tiempo de muestreo (Campa-Córdoba *et al.*, 2005).

Huang *et al.*, en el 2006, realizan un estudio en el que se evaluó la capacidad inmunoestimulante de un polisacárido extraído de *Sargassum fusiforme* (0%, 0,5%, 1,0%, y % 2,0) adicionado a dietas de *Fenneropenaeus chinensis* que fueron alimentados por 14 días, encontrando que la concentración de proteínas de la hemolinfa presentó valores más elevados que el control a 1 y 2% del extracto, observando primero un aumento de la concentración de proteína al incrementar la dosis (0, 0.5 y 1%), siendo el valor más alto en la dosis de 1% de extracto (167 mg ml⁻¹), pero luego a 2% la proteína en hemolinfa disminuyó (156 vs 140mg ml⁻¹ en el control). En otro estudio similar Sánchez-Campos *et*

al. (2010) reportaron que al adicionar un extracto de *Macrocystis pyrifera* al camarón *Litopenaeus vannamei* por inyección o por inmersión antes de infectar con *Vibrio campbellii*, la concentración de proteína en el plasma disminuye las primeras 6 o 12 horas y aumenta después de 24 horas, pero al inyectar solo con el *Vibrio* la concentración de proteína en la hemolinfa fue mucho más baja que en la dieta control.

Actividad enzimática

El efecto inmunoestimulante de algunas especies de algas o sus extractos ha sido bien documentado gracias a la capacidad que poseen de incrementar la actividad de enzimas de respuesta inmune tales como la fenoloxidasa y la profenoloxidasa entre otras (Tabla 4), sin embargo, dentro de los resultados obtenidos en el presente estudio, la actividad de fenoloxidasa total no se vio afectada por la adición de la harina de *Ulva* o por la adición del ulvan.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Felix *et al.* (2004a), quienes utilizan el alga *Ulva lactuca* como inmunoestimulante recubriendo dietas para *Penaeus monodon* (100, 250, 750 y 1000 mg/kg) y alimentando a los camarones los primeros 5 días con los tratamientos y los siguientes 12 días con la dieta control, luego toman muestras de hemolinfa el día 1, 3, 6, 9 y 12 y determinan la actividad de la fenoloxidasa, no encuentran ninguna diferencia entre los tratamientos o días de muestreo excepto para el primer día de muestreo en el que la dieta con 750 mg/kg fue la única que presentó un valor mayor a la dieta control, sin embargo no indican si las diferencias fueron o no significativas. Por su parte Fu *et al.* (2007), alimentaron a *Litopenaeus vannamei* por 14 días con un extracto en agua caliente del alga roja *Gelidium amansii* (0, 0.5, 1.0 and 2.0 g kg⁻¹), encontrando que a los 0, 3 y 6 días de alimentación no hay diferencia en la actividad de la Fenol-oxidasa (PO); a los 9 días las dietas adicionadas con el extracto presentan una actividad significativamente más alta que la control, siendo iguales entre ellas, pero a los 28 días las diferencias son dosis dependiente. Por lo que probablemente la ausencia de diferencias en la actividad de la PO encontradas en nuestro estudio, se puedan deber al tiempo de muestreo que fue solo a los 14 días.

Por otro lado, en lo que se refiere a la actividad de la fenoloxidasa libre si se observaron diferencias entre la dieta control y la dieta adicionada con 6% de alga, siendo mayor significativamente ($p=0.045$) la dieta con la harina del alga; la dieta adicionada con Ulvan no presentó diferencia con la dieta control. Esto concuerda con el estudio de Felix *et al.* (2004b), quienes evaluaron la actividad de la fenoloxidasa en hemolinfa de *Penaeus monodon* alimentados con dietas adicionadas con el alga *Sargassum wightii* (10, 20 y 30 g/kg), los camarones fueron muestreados el día 1, 3, 6, 9 y 12 de alimentación y el valor más alto de actividad de la PO fue registrado los días 9 y 12 con la dieta que contenía 10g/kg de harina del alga.

La ausencia de resultados favorables de aumento en la actividad de la PO al adicionar el Ulvan, se puede deber a que la mayoría de los estudios reportan extractos hechos en agua caliente a diferencia de nuestro ulvan que fue un extracto hidroalcoholico (etanol 78%) hecho a temperatura ambiente; otra causa puede ser la concentración utilizada y/o el tiempo de muestreo ya que como se mencionó, estos factores afectan los valores de actividad enzimática.

4. Efecto de la inclusión de algas para la reducción de aflatoxicosis en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*

Las micotoxinas son sustancias extremadamente estables, permanecen durante largo tiempo activas en los ingredientes y resisten fácilmente las condiciones de procesamiento de los alimentos (Kabak *et al.*, 2006). Existen entre 300 y 400 micotoxinas identificadas, siendo las más importantes por su ocurrencia y toxicidad en especies de producción pecuaria las aflatoxinas, la ocratoxina A, la citrinina (CIT), el deoxinivalenol, la zearalenona, la toxina T2 y otros tricotecenos (Roseanu *et al.*, 2010). La presencia de estos compuestos tóxicos en animales terrestres causa desórdenes gastrointestinales y neurológicos, cambios degenerativos y necrosis en vísceras, cáncer, reducción en el crecimiento, consumo de alimento, hemorragias de estómago e intestino, agrandamiento de riñones, (Carrillo, 2003). En camarón se ha reportado que la presencia de aflatoxinas en forma pura o presentes en

granos contaminados en alimentos reduce el consumo de alimento, la ganancia en peso, causa daños en el hepatopáncreas y a niveles altos puede llegar a reducir la sobrevivencia (Lightner *et al.*, 1982; Boonyaratpalin *et al.*, 2001; Gopinath y Raj, 2009; Tapia-Salazar *et al.*, 2012).

Una ruta secundaria que sigue el metabolismo de las aflatoxinas incluye la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS; Shen *et al.*, 1996) así como la peroxidación de lípidos (Shen *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1995a). El daño/estrés oxidativo resulta cuando el nivel de ROS sobre pasa la capacidad del sistema para neutralizarlos y eliminarlos. El aumento del nivel de ROS por lo general resulta de la falta o la alteración funcional de moléculas antioxidantes, o debido a la sobreproducción de ROS en el entorno (Sohal y Weindruch, 1996). Estudios recientes muestran que las ROS también tienen un papel importante en algunos procesos bioquímicos tales como la apoptosis, la expresión de genes y la activación de cascadas de señalización celular (Hancock *et al.*, 2001).

Las algas marinas son conocidas por contar con una amplia gama de compuestos bioactivos, muchos de los cuales tienen aplicación comercial en la rama de la farmacéutica, médica, cosmética, nutracéutica, alimenticia e industria agropecuaria (Kelman *et al.*, 2012). Abdel- Wahhab *et al.* (2006) observan que la inclusión de extractos de *Laurencia obtusa* y *Caulerpa prolifera* (50 mg kg⁻¹ peso) redujo la hepatotoxicidad causada por la presencia de aflatoxina B1 en ratas. Además estos autores agregaron que al alimentar con los extractos de algas a ratas que estaban anteriormente sometidas a una dieta con AFB1 se observaba una rápida recuperación en la ganancia de peso, además del perfil hemático disminuido por los efectos de las aflatoxinas, concluyendo que los extractos de algas tienen una acción químico-protectora contra la carcinogénesis hepática inducida por la aflatoxina B1 y que además pueden estimular el sistema de defensa antioxidante regenerando las células hepáticas. Manoharan (2008) reporta que la utilización de un extracto acuoso de *Gracilaria corticata* (250 mg Kg⁻¹) en ratas Wistar que fueron alimentadas durante 30 días con una dieta contaminada con aflatoxina B1, contrarrestaron los efectos negativos causados por la

presencia de esta micotoxina dando resultados equivalentes a la dieta control sin contaminar.

Para observar el efecto protector de *Ulva clathrata* contra aflatoxicosis, hemos realizado una serie de experimentos. En un primer experimento, se alimentaron camarones *L. vannamei* (peso promedio de 0.4 g) con una dieta que contenía granos contaminados con aflatoxinas a un nivel de inclusión de 120 ppb durante 42 días y otra conteniendo la misma cantidad de aflatoxinas totales, pero además se le adicionó % 2 de Alga *U. clathrata*. Después de 42 días de experimentación se observó una reducción significativa debido a la presencia de granos contaminados con aflatoxinas en términos de consumo de alimento (Figura 4) y ganancia en peso (Figura 5); además la tasa de conversión alimenticia fue mayor (Figura 6). Al final del experimento la sobrevivencia no fue afectada por las dietas evaluadas. La inclusión de harina de ulva incremento el consumo de alimento en un 28% y produjo una ganancia en peso similar a la dieta sin contaminar. La tasa de conversión alimenticia fue mejorada en un 20%.

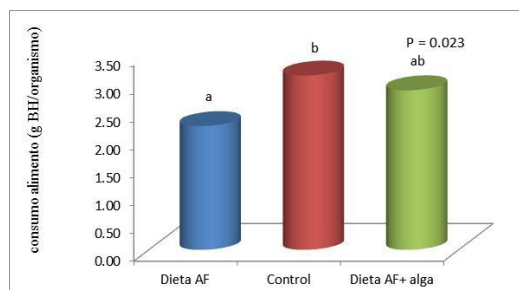


Figura 4. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre el consumo de alimento de juveniles *L. vannamei* durante 42 días.

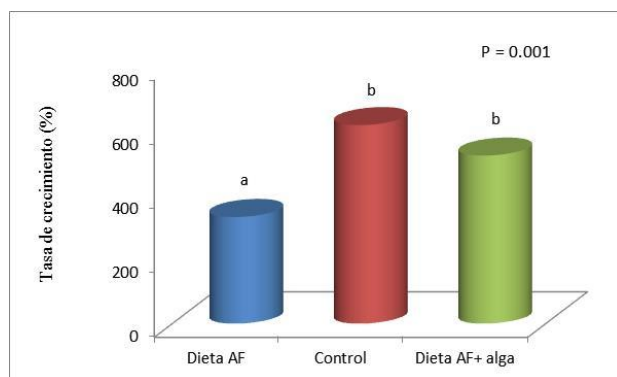


Figura 5 . Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre la ganancia en peso de juveniles *L. vannamei* durante 42 días.

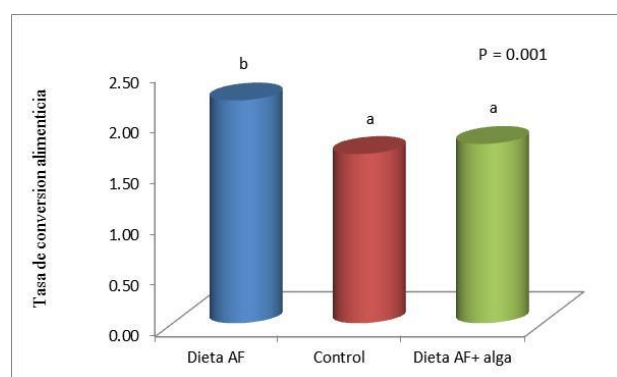


Figura 6. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre la Tasa de Conversión Alimenticia en peso de juveniles *L. vannamei* durante 42 días.

En un segundo experimento, se evaluó el efecto de niveles crecientes de harina de alga *U. clathrata* (0, 2.5, 5.0, 10, 20 y 40 g kg⁻¹) en alimentos que contenían granos contaminados con aflatoxinas totales a un nivel de 80 ppb durante 28 días; al final del experimento el consumo de alimento no fue afectado por las dietas experimentales (Figura 7), mientras que la tasa de conversión alimenticia (Figura 8) fue mejor en un 20% con la Dieta AF + 1% Alga y la ganancia en peso en un 22% (Figura 9). La sobrevivencia no fue afectada por los diferentes tratamientos.

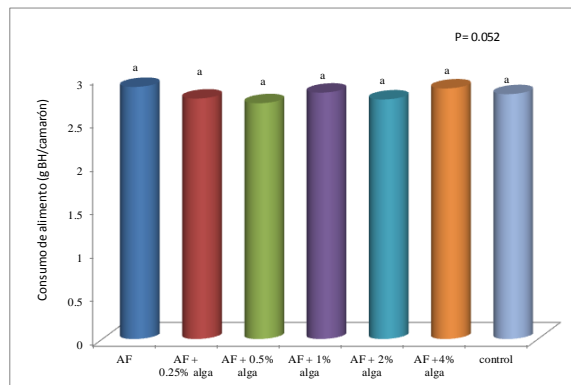


Figura 7. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre el consumo de alimento de juveniles *L. vannamei* durante 28 días.

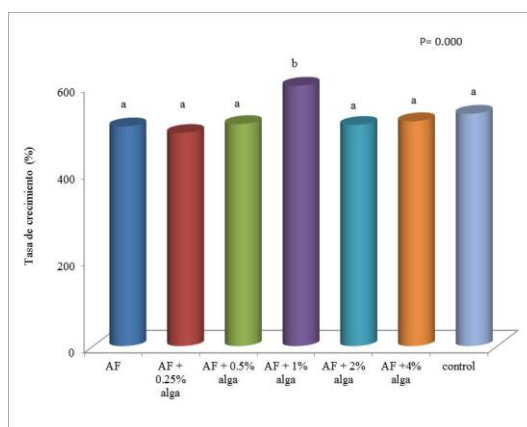


Figura 8. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre la ganancia en peso de juveniles *L. vannamei* durante 28 días.

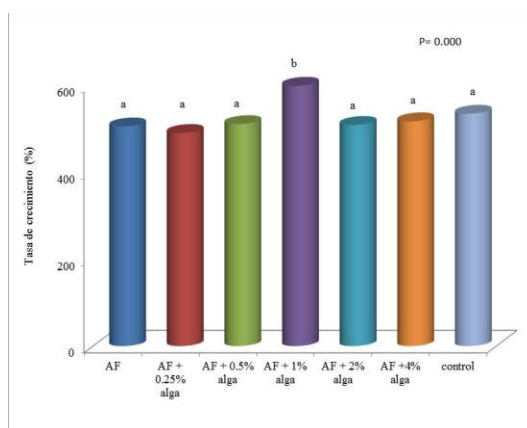


Figura 9. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre la ganancia en peso de juveniles *L. vannamei* durante 28 días.

Por otro lado, también se cuantificó la capacidad que posee *Ulva clathrata* en forma de harina para absorber aflatoxinas: los resultados muestran que un nivel de inclusión de 2% de alga y una concentración de 3 ppm de aflatoxinas (pH de 8) tiene una capacidad de adsorción de 49% y un porcentaje de desorción (a pH de 6.5) de 23%, poseyendo una eficiencia para secuestrar aflatoxinas de un 25%. A pesar de que se observa una baja capacidad de adsorción los resultados muestran que la inclusión de esta macroalga mejora los parámetros de rendimiento en camarones alimentados con dietas que poseen harinas de granos contaminados con micotoxinas.

Es muy posible que el efecto secuestrante del *Ulva clathrata* así como la presencia de un sin número de compuestos activos, tales como pigmentos, ulvan, polifenoles etc., contribuyan a contrarrestar los efectos negativos causados por la presencia de aflatoxinas.

Heo *et al.* (2005) evaluaron la capacidad antioxidante de siete extractos de algas marinas pardas, los extractos enzimáticos mostraron efectos antioxidantes más elevados para eliminar el peróxido de hidrógeno (aproximadamente 90 %). El Baky *et al.* (2008) reportan que los extractos de *Ulva latutis* poseen una actividad antioxidante y antibacteriana. Seo *et al.* (2013) reporta que un extracto metanólico de *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi inhibe la acumulación de lípidos y la producción de ROS durante un proceso de adipogénesis en células 3T3-L1.

Los beneficios observados con el suplemento de algas en los camarones alimentados con las dietas contaminadas con aflatoxinas pueden deberse al efecto sinérgico de la capacidad secuestrante del producto así como la presencia de compuestos antioxidantes. Actualmente nos encontramos analizando las enzimas relacionadas con el proceso de oxidación celular y sustancias reactivas de oxígeno.

5. Mejora de la capacidad reproductiva y de la calidad de las larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* por la inclusión de un fitogénico en dietas para maduración

El abastecimiento de poslarvas de buena calidad depende del buen manejo de los reproductores y de la calidad del alimento que se suministra durante la maduración. Una deficiencia nutricional en esta etapa influye directamente en la tasa de apareamiento, el desarrollo gonadal, la fertilidad y la calidad del desove, así como en el desarrollo embrionario, y la calidad fisiológica y bioquímica de la progenie resultante (Cahu 2000). Por otro lado, se sabe que el consumo de *algunos fitogénicos* mejora el crecimiento, la tasa de conversión, la respuesta inmune, la resistencia a enfermedades y la pigmentación de camarones juveniles, pero poco se sabe sobre su efecto en dietas para maduración. Por ello, nos propusimos evaluar el efecto de la inclusión de un fitogénico al 2% de una dieta a base de mariscos frescos en reproductores de camarón *Litopenaeus vannamei* provenientes de 2 familias sobre la capacidad reproductiva, y la calidad de las larvas.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de producción de poslarvas Aquapacific S. A. de C. V.; se utilizó una dieta control a base de mariscos frescos congelados y una dieta experimental con inclusión de 2% del *Ulva* siguiendo las condiciones de alimentación y cultivo propias de la empresa durante 57 días de alimentación. Se utilizaron 4 pilas con 1000 camarones cada una (500 machos y 500 hembras, densidad de 9-10 camarones/m²) en un diseño factorial 2x2, los factores siendo la suplementación fitogénica (*fitogénico* vs control) y la familia de origen de las hembras (familia A vs B), las replicas siendo reportes diarios (n=33). El peso promedio inicial fue de 40 g para machos y 45 g para hembras. Se evaluaron variables de producción e indicadores de calidad de gónadas, huevos y larvas. Los parámetros reproductivos evaluados fueron sometidos a un análisis de varianza factorial bajo la modalidad de modelo lineal general.

Los parámetros físico químicos del agua se mantuvieron en rangos iguales en todas las pilas de maduración: temperatura 26.8±.5 °C, oxígeno disuelto 5 mg/L, salinidad de 30±1 g/L. El

peso final fue de 65 y 68 g para machos y hembras. El consumo del alimento enriquecido con el fitogénico incrementó en 14, 16 y 20% la frecuencia de aparición de los estadios de maduración gonadal I-II, III, y IV respectivamente. Aumentó en un 21% la frecuencia de hembras copuladas (parchadas) y en un 30 % la frecuencia de cortejo; la producción de huevo aumentó 25%; el número de huevos no eclosionados por hembra bajó en un 25%; el porcentaje de eclosión aumentó en un 6% (llegando a 82% de éxito en la eclosión con *el fitogénico*), consiguiendo mejorar en un 34 % la producción total de nauplios; los tiempos de desarrollo larvario se acortaron en 1, 5 y 6 horas para los estadios nauplio V, protozoa III y poslarva V respectivamente, con una disminución significativa de la frecuencia de deformidades y mortalidad. Estos resultados fueron observados tanto en la familia A como en la B, en general sin interacción entre los factores *fitogénico* y familia. En base a los resultados encontrados se considera que el fitogénico actúa de manera sinérgica complementando con sus componentes químicos y funcionales (minerales, pigmentos, vitaminas, ácidos grasos, antioxidantes, polisacáridos prebióticos) el alimento fresco. En conclusión, la adición de 2% del fitogénico en la dieta fresca para maduración mejora la capacidad reproductiva, la calidad de los huevos y de las larvas siendo una estrategia rentable y recomendable para aumentar la producción larval y disminuir los costos de producción.

6. Actividad antioxidante

La oxidación de moléculas consiste en una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante ávido de electrones. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres causando daño en las células. Los camarones en cultivo están expuestos de manera continua a estrés oxidativo causado por variaciones importantes en las condiciones ambientales o por agentes infecciosos, entre otros. Durante el proceso de infección, las células hialinas participan en la fagocitosis produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), activando el complejo enzimático ligado a membrana, NADPH oxidasa, después de la unión de la partícula extraña a la célula. El oxígeno molecular se reduce a anión superóxido (O_2^-), conduciendo a la producción de

Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno simple (O₂) y radicales hidroxilo (OH) (Muñoz *et al.*, 2000).

Los antioxidantes, son compuestos que previenen o retardan el proceso de oxidación, por lo tanto, contar con estos aditivos en el alimento es determinante para reducir el daño oxidativo a nivel celular.

Las algas constituyen una fuente de antioxidantes, ya que son organismos fotosintéticos que se encuentran expuestos a los rayos UV y a altas concentraciones de oxígeno, lo cual favorece la formación de radicales libres. La ausencia de daños oxidativos en sus membranas celulares sugiere que tienen un mecanismo de protección apto para soportar la intensa radiación solar a la que son sometidas. Estos mecanismos pueden estar generados por la capacidad secuestrante de radicales libres, la quelación de metales pro-oxidantes, los mecanismos de donación y aceptación de electrones y la capacidad de interrupción de la peroxidación lipídica presente en las algas (Batista-Gonzalez *et al.*, 2009). Entre los compuestos antioxidantes reportados en las algas se encuentran compuestos lipofílicos como ácidos grasos insaturados, clorofila y carotenos y compuestos hidrofílicos como polifenoles y vitamina C y polisacáridos sulfatados (SPs por sus siglas en inglés). Algunos de los compuestos antioxidantes también se reportan como apolares, (derivados de clorofilas, terpenoides y carotenoides) y polares (polifenólicos como los flavonoides, ácido fenólico y cinámico) (Batista González *et al.*, 2009).

El contenido total de polifenoles y la capacidad antioxidante en las algas varía con la especie, pero se sabe que las algas verdes presentan altas propiedades de eliminación de radicales libres. Shanab (2007) estudió la actividad antioxidante y antibacterial de los extractos etanólicos y diclorometano de las algas *Sargassum dentifolium*, *Laurencia papillosa* y *Jania corniculata*. Estudios espectrofotométricos y cromatográficos revelaron que la capacidad antioxidante y antibacterial podría ser atribuida al contenido de clorofilas, carotenoides y fenoles libres y también al contenido de ácidos grasos de las algas.

Xue *et al.* (2004) reportan que varios polisacáridos sulfatados (SPs) derivados de algas presentan actividades antioxidantes en una suspensión liposomal de fosfatidilcolina y en

solventes orgánicos. Los SPs no solo funcionan como fibra dietaria (prebióticos), si no que también contribuyen con actividad antioxidante de algas marinas. Se ha demostrado que los SPs tienen una alta capacidad antioxidante incluyendo, fucoidan, laminaran y ácido algínico (Rupérez *et al.*, 2002; Rocha de Souza *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Esta capacidad antioxidante de SPs depende del peso molecular; el ulvan de bajo peso molecular proveniente de *Ulva pertusa* presenta mayor actividad antioxidante debido a que éstos SPs pueden incorporarse dentro de la célula y donar el protón más eficientemente que los SPs de alto peso molecular (Qi *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Zubia *et al.* (2007) se encontró que tres especies de algas tropicales (*Obophora variegata*, *Avrainvillea longicaulis* y *Chondria baileyana*) tienen una actividad equivalente a los antioxidantes comerciales. En el caso de género *Ulva* se han detectado altas concentraciones (2.2 mg g^{-1}) de vitamina C (un importante antioxidante) en comparación a distintas especies de algas colectadas en Hawai (McDermid y Stuercke, 2003). El contenido de las moléculas antioxidantes de *Ulva rigida* ha sido reportado por Yildiz *et al.* (2012) (Tabla 5).

Tabla 5.- Contenido de moléculas bioactivas con capacidad antioxidante de *Ulva rigida* en peso húmedo (Yildiz *et al.*, 2012).

ANTIOXIDANTE	UNIDAD	CONTENIDO
CALT	$\mu \text{ mol } \alpha\text{-tocoferol g}^{-1}$	130.91±24.56
CAHT	$\mu \text{ mol } \alpha\text{-ácido ascórbico g}^{-1}$	375.59±61.63
Vitamina E	$\text{mg } \alpha\text{-tocoferol } 100 \text{ g}^{-1}$	147.00±0.28
Vitamina A	μM	0.91±0.47
Vitamina C	$\text{mg } \alpha\text{-ácido ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$	46.00±0.17
Fenoles totales	$\text{mg de ácido gálico } 100 \text{ g}^{-1}$	73.00±0.13
Proteína total	%	52.33±4.51
Carbohidratos totales	%	34.98±20.39
Clorofila-a	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	51.13±25.69

Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutraceutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

Clorofila-b	mg 100 g ⁻¹	43.40±19.32
Carotenos totales	mg 100 g ⁻¹	9.67±3.18

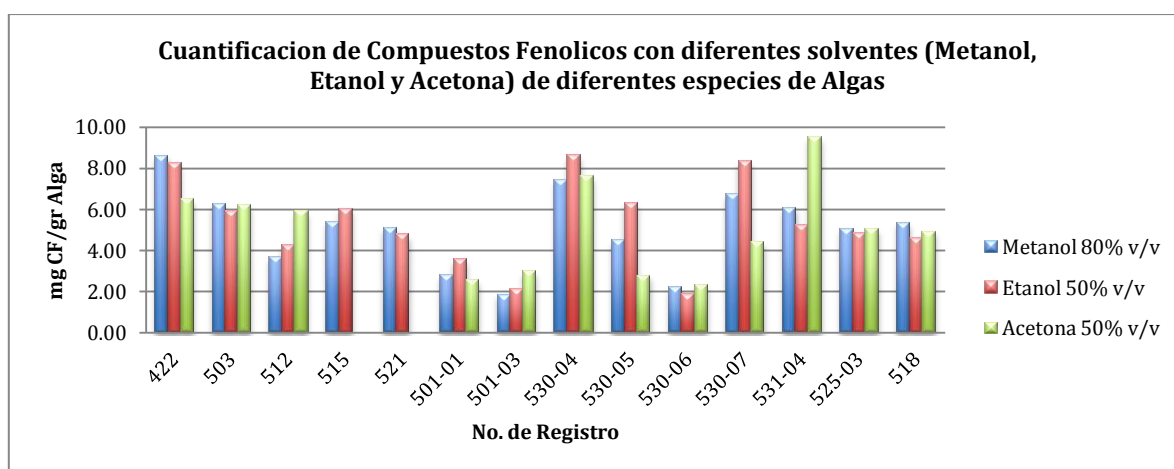
CALT: capacidad antioxidante soluble en agua CAHT: capacidad antioxidante liposoluble.

Se ha encontrado que algunos compuestos antioxidantes de algas, adicionalmente tienen un efecto sobre las enzimas de estrés oxidativo del camarón. Madhumathi, en el 2011 investigó la protección de camarones *Penaeus monodon* frente a virus de la mancha blanca (WSSV). Los animales fueron alimentados con células del alga *Dunaliella salina*, la cual contiene un betacaroteno antioxidante. Se observó un aumento en la actividad de la proPO y una disminución en la actividad de la SOD y catalasa. En este estudio se concluye que la incorporación de *Dunaliella salina* en dietas constituye una alternativa profiláctica contra WSSV.

La capacidad antioxidante evaluada *in vitro* puede usarse como un indicador indirecto de la actividad *in vivo*. La mayoría de los métodos para determinar capacidad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema biológico. La capacidad antioxidante de un producto alimenticio está determinada por interacciones entre diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción. Por esto mismo, la determinación de la capacidad antioxidante de extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que evalúen diversos mecanismos de acción. Algunos de los métodos más utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad, son FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro, por sus siglas en inglés), DPPH (depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ABTS (depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico). El método FRAP se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso; en esta forma, el ion forma un complejo coloreado con el compuesto 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ). El método FRAP es, por tanto, un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones. Por el contrario, los métodos ABTS y DPPH evalúan la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres modelo. El DPPH• es un radical libre estable soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno, principalmente; por otra parte, el

ABTS•+ es generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o electroquímica y su mecanismo de neutralización es principalmente por transferencia de electrones. En el método ABTS, también conocido en la literatura científica como el método TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, por sus siglas en inglés) se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos; en cambio, el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares. Otra diferencia entre ambos métodos es que el radical ABTS•+ tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm. Existen otras técnicas que miden la capacidad antioxidante como CUPRAC (Capacidad antioxidante reductor de ion cúprico), ABAP (depleción del 2'-azobis (2-amidopropano), DMPO (depleción de óxido N-5,5-dimetil-1-pirrolina), ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno) y TRAP (capacidad antioxidante total), entre otras” (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

En estudios preliminares realizados en el Programa Maricultura de la FCB-UANL se ha encontrado que extractos del alga *Ulva clathrata* y otras algas analizadas presentan concentraciones variables de compuestos fenólicos totales (método de Folin-Ciocalteu) y de actividad antioxidante determinada con el método DPPH (Fig.10).



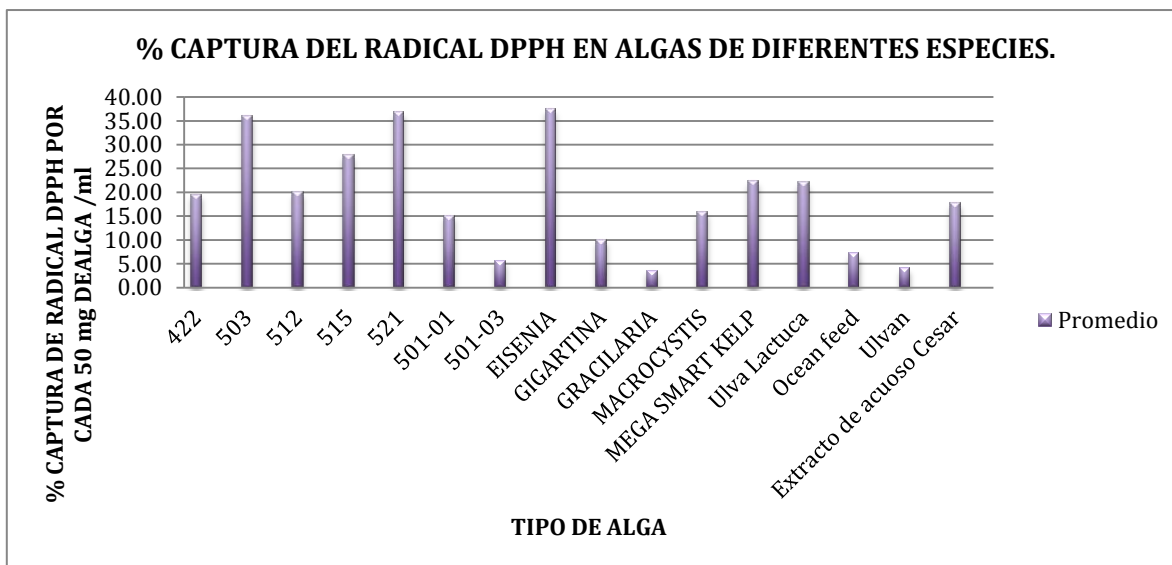


Figura 10.- Concentración de compuestos fenolicos y actividad antioxidante de muestras de *Ulva clathrata* de diferentes lugares y temporadas (422, 503, ...501-3) y otras algas.

La actividad biológica reportada por las macroalgas analizadas, podría deberse no sólo en diferentes mecanismos ejercidos por los compuestos fenólicos que poseen (flavonoides, taninos, quinonas), sino además al efecto sinérgico de su conjunto de metabolitos secundarios; para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de las algas, se está contemplando el uso de otros 2 métodos, así como el aislamiento de las moléculas y finalmente la evaluación *in vivo* en camarones sometidos previamente a un estrés oxidativo.

7. Estimación de contribuciones nutricionales de *Ulva clathrata* a partir de análisis isotópicos

Análisis isotópico de los alimentos y consumidores

Una de las formas más confiables para determinar eficiencias de asimilación es por medio de evaluaciones isotópicas. La mayoría de los elementos con interés biológico tienen dos o más isótopos estables (por ejemplo ^{12}C y ^{13}C para carbono, ^{14}N y ^{15}N para nitrógeno) y usualmente uno de estos isótopos está presente en abundancia mucho mayor que el isótopo “pesado” (Ehleringer y Rundel, 1989). Una vez analizados, los valores isotópicos se

expresan en notación delta (δ) simplemente para indicar que el valor reportado es una proporción de isótopos que se comparó con un estándar. Los isótopos son parte integral natural en los tejidos orgánicos pero también pueden ser adicionados a cierto componente a fin de marcarlo o enriquecerlo isotópicamente. En contraste con los radio-isótopos, los isótopos estables no presentan peligro, no son invasivos y varias estimaciones pueden efectuarse sobre una población, individuo o tejido específico. La disponibilidad de estas técnicas y equipos de laboratorio cada vez más sensibles, ha permitido trazar el destino de estos isótopos dentro de diversos organismos consumidores; por lo tanto, es posible estimar la ingestión, la asimilación y las tasas de recambio metabólico elemental por medio de métodos directos en lugar de las técnicas indirectas usadas tradicionalmente (Verschoor *et al.*, 2005). El uso de proporciones de isótopos estables como trazadores nutricionales se presenta como una poderosa herramienta para estimar procesos, conexiones y flujos de energía dentro de sistemas acuáticos (Michener y Schell, 1994). Esto es posible debido a que la firma isotópica de un organismo consumidor refleja el perfil isotópico del material asimilado y provee información sobre la alimentación en un periodo de tiempo (Peterson y Fry, 1987). La proporción isotópica natural de un elemento puede ser entonces utilizada para evaluar contribuciones dietarias e inferir relaciones tróficas (DeNiro y Epstein 1978, 1981; Van der Zanden *et al.*, 1999). En nutrición acuícola, esta relación se ha utilizado previamente para identificar componentes dietarios contribuyentes al crecimiento de los organismos en estanques acuícolas (Schroeder, 1983; Nunes *et al.*, 1997; Burford *et al.*, 2004; Gamboa-Delgado, 2014) y en sistemas de cultivo larval (Schlechtriem *et al.*, 2004; Jomori *et al.*, 2008; Gamboa-Delgado *et al.*, 2008; Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009b). La estimación de incorporación de nutrientes utilizando isótopos estables tiene también varias aplicaciones prácticas en la estimación del desempeño nutricional que presentan diversos ingredientes propuestos para reducir o sustituir la harina de pescado como fuente de proteína en dietas acuícolas (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009a).

Experimentos en laboratorio

Diversos ensayos en laboratorio han tenido como objetivo evaluar la contribución nutricional del alimento natural y del alimento artificial. Por ejemplo, en el caso de la etapa de cultivo larvario, estos experimentos han demostrado que en larvas y postlarvas de camarones y peces, la incorporación del carbono dietario proveniente de presas vivas (*Artemia* y rotíferos) es significativamente mayor que la incorporación de carbono dietario suministrado por el alimento artificial (Gamboa-Delgado *et al.*, 2008; Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009b). De la misma forma, como se describe a continuación, se ha determinado en camarones juveniles co-alimentados con alimento artificial y biomasa de macroalga viva, que la contribución nutricional de esta última es mucho mayor. Sin embargo, altas cantidades de nutrientes suministrados por la macroalga no producen un aumento rápido de tamaño corporal debido a la restricción de nutrientes en *U. clathrata* (bajo contenido de lípidos y energía) (Gamboa-Delgado *et al.*, 2011).

Evaluación de la incorporación de nutrientes en camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* co-alimentado con biomasa viva de macroalga *Ulva clathrata* y alimento inerte

Con el objetivo de determinar la contribución nutricional del carbono y nitrógeno dietario suministrados por medio de co-alimentación de biomasa viva de macroalga *Ulva clathrata* y alimento inerte, camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* de 0.2 gramos fueron cultivados bajo regímenes de alimentación en los cuales 75, 50 and 25% de la biomasa de macroalga consumida diariamente fue sustituida con alimento artificial. Tratamientos con animales recibiendo solamente alimento artificial (100I) y biomasa de macroalga (100U) también fueron establecidos a fin de obtener controles isotópicos positivo y negativo, respectivamente. El experimento por lo tanto consistió en cinco regímenes de alimentación establecidos por duplicado en acuarios de 60 l conectados a un sistema de recirculación de agua marina artificial y bajo parámetros controlados. La presencia de macroalga fue constante (suministrada entre sustratos plásticos) y el alimento artificial se suplió dos veces por día. Muestras de alimento artificial, macroalga y tejido muscular de camarón fueron colectadas en 6 diferentes tiempos, secadas a 60 °C durante 24 horas y homogeneizadas utilizando un mortero y pistilo. Muestras de 1 mg fueron enviadas para análisis elemental e

isotópico dual (carbono y nitrógeno) a niveles de abundancia natural en el Departamento de Ciencias de las Plantas de la Universidad de California (Davis, CA, EU). A fin de examinar diferencias entre los contenidos elementales de carbono y nitrógeno y sus respectivos valores isotópicos medidos en la macroalga y el alimento artificial, se realizaron comparaciones por medio de pruebas *t* de Student. Por otro lado, pruebas ANOVA fueron aplicadas para detectar diferencias en supervivencia, ganancia de peso y valores isotópicos en los camarones. Comparaciones múltiples por medio de la prueba de Tukey fueron efectuadas cuando fue requerido. Pruebas de bondad de ajuste fueron aplicadas para determinar si la proporción de nutrientes ofrecidos en los regímenes alimenticios fue similar a las proporciones observadas en tejido muscular y cuerpo completos de camarones.

Las mayores tasas de crecimiento fueron observadas en camarones alimentados bajo un régimen 75% alimento / 25% macroalga, seguidos por camarones alimentados solamente con alimento artificial. Animales alimentados solamente con suministro de macroalga mostraron un mínimo crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Crecimiento, tasa de supervivencia y consumo de alimento estimado (peso seco) por juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* mantenidos bajo diferentes regímenes de alimentación por 28 días (n= 8-20, valor medio \pm DE).

Régimen	Supervivencia (%)	Peso húmedo (mg)	Incremento en peso (%)	Alimento Inerte consumido (g)	Macroalga consumida (g)
100A	95 \pm 13 ^a	995 \pm 289 ^a	429	0.94	-
75A/25U	93 \pm 11 ^a	1067 \pm 364 ^a	467	0.81	0.40
50A/50U	78 \pm 11 ^{ab}	768 \pm 273 ^{ab}	308	0.43	0.44
25A/75U	60 \pm 21 ^b	424 \pm 207 ^b	125	0.14	0.65
100U*	23 \pm 4 ^c	221 \pm 49 ^c	18	-	1.32

Peso húmedo inicial = 188 \pm 28 mg.

Diferentes letras indican diferencias significativas a un nivel $p < 0.05$.

* Parámetros en animales en régimen 100U fueron estimados en el día experimental 21.

Al final del experimento, los valores isotópicos de carbono y nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) en el tejido de camarón estuvieron fuertemente sesgados hacia los valores isotópicos de la macroalga *U. clathrata*., de esta forma indicando una alta proporción de carbono y nitrógeno dietario asimilados a partir de esta última (Figura 11).

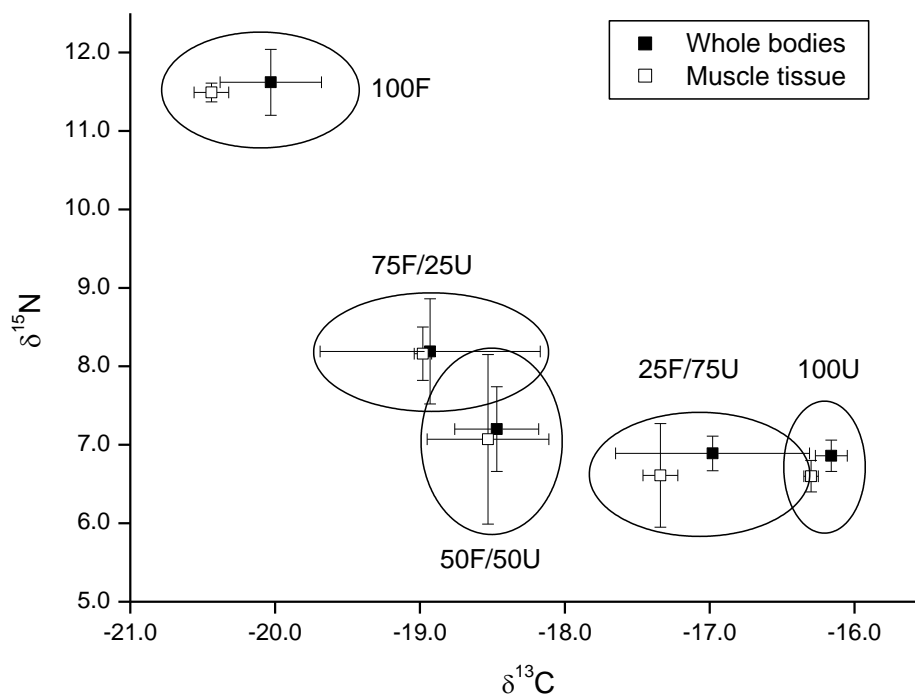


Figura 11. Grafica dual para valores isotópicos (‰) de carbono y nitrógeno en cuerpos completos y tejido muscular de camarón blanco *L. vannamei* alimentados con diferentes proporciones de de alimento inerte y biomasa viva de macroalga *U. clathrata*. 100F y 100U corresponden a los valores isotópicos de camarones alimentados exclusivamente con alimento inerte y macroalga, y por lo tanto son considerados como valores isotópicos corregidos para ambas fuentes nutricionales. Distancias más cercanas a estos puntos representan mayores contribuciones de esa fuente. n= 2-4, valores medios \pm DS.

Resultados a partir de un modelo de mezclado isotópico indicaron que las contribuciones de carbono fueron 52% a partir del alimento inerte y de 48% a partir de la macroalga en los animales alimentados bajo el régimen 75% alimento / 25% macroalga. Animales que recibieron proporciones de alimento inerte de 50% y 25% incorporaron la mayoría de nitrógeno dietario a partir de la macroalga; sin embargo, las altas proporciones de incorporación de nitrógeno dietario a partir de la macroalga no fueron reflejadas en altas tasas de crecimiento en estos últimos tratamientos. El análisis proximal de la biomasa de macroalga reveló un bajo contenido de lípidos (1.5%) y energía, lo cual puede parcialmente

explicar el menor desempeño biológico observado en los camarones alimentados solamente con macroalga o altas proporciones de esta. Se estimaron las tasas de recambio metabólico del nitrógeno y el carbono (datos no mostrados) y ambas fueron muy altas en organismos en el régimen incluyendo solamente macroalga. Este hecho apunta hacia un incremento del metabolismo cuando hay una restricción de nutrientes específicos (menor deposición de carbono y nitrógeno en tejido, mayor uso para mantenimiento de funciones vitales). Los valores isotópicos para carbono y nitrógeno medidos en el alimento artificial ($\delta^{13}\text{C} = -23.0\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 9.7\text{‰}$) y en la macroalga ($\delta^{13}\text{C} = -13.1\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = -3.5\text{‰}$) fueron muy contrastantes. Adicionalmente, ambos tipos de alimento rápidamente reflejaron sus valores isotópicos en el tejido de camarón, por lo tanto, fue posible estimar exitosamente las contribuciones nutricionales al crecimiento.

El fomento y monitoreo constante de la productividad natural de los estanques de cultivo asegura la presencia constante de alimento suministrado por la biota natural. Varios estudios que han utilizado isótopos estables como trazadores indican que al final de los ciclos de cultivo (tanto larvario como de engorda), la mayor parte del nitrógeno y carbono dietario es suministrado por el alimento natural (Gamboa-Delgado, 2014). Sin embargo, a pesar de que el alimento artificial contribuye con menores proporciones al contenido estomacal, su aporte al crecimiento es mayor debido a su comparativamente alta digestibilidad y alto contenido de proteína. Por lo tanto, el alimento artificial representa un excelente suplemento alimenticio en las operaciones de producción tipo semi-intensivo. Los valores isotópicos presentes a niveles de abundancia natural en los camarones y en sus dietas naturales pueden proveer información relevante para elucidar el flujo y la incorporación de nutrientes que contribuyen al crecimiento, definiendo a la vez periodos en los cuales los organismos se encuentran fisiológicamente mejor preparados para ingerir y asimilar nutrientes. Las evaluaciones nutricionales usando isótopos estables proveen una útil herramienta analítica para interpretar la fisiología digestiva de organismos acuáticos, siendo de particular asistencia en estudios de nutrición enfocados a determinar las contribuciones dietarias que ofrecen los diversos elementos de la productividad natural en los estanques de cultivo.

La posibilidad de manipular los perfiles isotópicos de ingredientes, dietas inertes y alimento vivo, presenta una oportunidad adicional para incrementar la resolución en tales estudios. La creciente adopción del uso de análisis isotópicos de compuestos específicos, particularmente para aminoácidos, representa una oportunidad para incrementar el conocimiento actual de la utilización de nutrientes específicos. La disponibilidad comercial de sustratos específicos (aminoácidos, ácidos grasos, colesterol, vitaminas, etc.) pre-marcados hasta con isótopos pesados, aumenta las posibilidades de aplicación en estudios sobre la fisiología nutricional de especies acuáticas.

Conclusión

Las algas marinas del género *Ulva*, en especial *Ulva clathrata* cultivada en México, tienen un amplio potencial para ser utilizadas como aditivos funcionales o nutraceuticos en alimentos para camarón, por su contenido natural de compuestos antimicrobianos, antioxidantes, hepatoprotectores, estimulantes del sistema inmune y antioxidante. Las evidencias presentadas muestran que al suplementar estos aditivos en las dosis apropiadas se promueven diversas funciones como la ingesta, la eficiencia en la utilización del alimento, el crecimiento, y la salud del tracto digestivo. Así mismo, a través de la acción sinérgica de estos productos (antibacteriana y antioxidante) y de su acción estimulante sobre los mecanismos propios de defensa de los camarones (sistema enzimático inmune y antioxidante), se logra un aumento en la resistencia a enfermedades y un efecto protector al estrés oxidativo que puede generar beneficios en las diferentes etapas del cultivo (maduración, desarrollo larvario, engorda). En especial, la amplia capacidad antioxidante de estas algas favorece las diferentes funciones fisiológicas ligadas al metabolismo de lípidos como la maduración y sobrevivencia larvaria, al eliminar o neutralizar los radicales libres generados por factores que producen estrés oxidativo. El análisis de la expresión diferencial por secuenciación masiva de transcriptoma de hepatopáncreas de camarones alimentados con o sin el alga y la demostración de las altas contribuciones nutricionales que genera el consumo del alga a partir de análisis isotópicos, está permitiendo mejorar el entendimiento del modo de acción de estos aditivos. Sin embargo, aun son necesarios estudios para caracterizar productos activos, definir dosis óptimas, desarrollar productos de

actividad constante y definir formas optimas de aplicación; en especial el estudio de la variación estacional del contenido de los compuestos activos permitirá en el caso de la *Ulva clathrata* (producida por acuacultura) cosechar y procesar el alga de la forma más adecuada para explotar de manera más eficiente las propiedades funcionales de este aditivo en la producción de camarón.

Referencias

- Abdel-Wahhab MA, Ahmed HH, Hagazi MM. 2006. Prevention of aflatoxin B₁-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. *Journal of Applied Toxicology*, 26(3), 229-238. doi: 10.1002/jat.1127.
- Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J. G., Campa-Córdova, A. I., Luna-González, A., & Ascencio, F. (2009). Penaeid shrimp immune system. *Thai Journal of Veterinary and Medicine*, 39(3), 205–215.
- Bansemir A, Blume M, Schröder S, Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252(1), 79–84.
- Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvaille JA, Cuber JC, Plaisancie P. 2000. Mucin secretion is modulated by liminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 46: 218-224.
- Batista González A. E., Charles M. B., Mancini-Filho J., Vidal Novoa A. 2009. Las algas marinas como fuente de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 14: 2-4
- Berger, C. (2000) Aportes de la Biotecnología a la alimentación y a la inmunestimulación de camarones peneidos. Asociación Langostina Peruana (ALPE). 102- 110.
- Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, Suprasert D. 2001. Effects of aflatoxin B₁ on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture Research*, 32, 388-398.
- Burford, M.A., Preston, N.P., Minh, T.H., Hoa, T.T.T., Bunn, S.E., Fry, V.M. (2004) Dominant sources of dietary carbon and nitrogen for shrimp reared in extensive rice-shrimp ponds. *Aquac. Res.* 35, 194-203.
- Cahu, C. (2000). Dietas para reproductores de camarón y su efecto en la calidad larvaria. In Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. Cruz-Suárez L.E. (Ed.), *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, 1998* (pp. 65–72). La Paz, B.C.S., México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., Aguirre-Guzmán, G., & Ascencio, F. (2005). Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inmunostimulantes Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) expos. *Ciencias Marinas*, 31(4), 661–669.
- Campos Deloya M. T. (2012) Actividad antioxidante y bactericida contra Vibrios del extracto de *Ulva clathrata*. Tesis de licenciatura en Biología. 01/02/2013
- Carrillo L. 2003. Microbiología agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Salta: [\(http://www.unsa.edu.ar/matbib\)](http://www.unsa.edu.ar/matbib).(02 06 2008).
- Castro, R., Zarra, I., & Lamas, J. (2004). Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*, 229(1-4), 67–78. doi:10.1016/S0044-8486(03)00401-0

- Castro, R., Piazzon, M. C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M., & Lamas, J. (2006). Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture*, 254(1-4), 9–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.10.012
- Chakraborty K, Lipton AP, Paulraj R, Viajayan KK (2010) Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from south western coast of the Indian Peninsula. *Food Chem* 119: 1399-1408. 12.
- Chakraborty, K., Lipton, A. P., Paulraj, R., & Chakraborty, R. D. (2010). Guaiane sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata* Delile and their antibacterial properties. *European journal of medicinal chemistry*, 45(6), 2237–44. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.065
- Cheng, W., Liu, C.H., Yeh, S.T. & Chen, J.C. (2004). The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunology*, 17(1), 41-51.
- Chi, Z.-M., Liu, G., Zhao, S., Li, J., & Peng, Y. (2010). Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1227–41. doi:10.1007/s00253-010-2483-9
- Chiheb, I., Riadi, H., Martinez-Lopez, J., Dominguez-Seglar, J. F., Gomez-Vidal, J. A., Bouziane-Hassan, & Kadiri, M. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 8(7), 1258–1262. Retrieved from <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/60101/48355>
- Christobel J.G., Lipton A.L., Aishwarya M.S., Sarika A.R. and Udayakumar A. 2011. Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. *Seaweed Res. Utiln.* 33: 67-75.
- Cruz-Suárez, L. E., *et al.*, (2009). Use of seaweeds for shrimp nutrition: status and potential, The Rising Tide: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming, The World Aquaculture Society. 131-141.
- Cruz Suarez L.E., Campos Deloya M.T., Oranday A., Rivas C., Ricque D., 2014. Vibriocidal activity of *Ulva clathrata* extracts. En preparación.
- Deachamag P., Intaraphad U., Phongdara A., Chotigeat W., 2006. Expression of a Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp *Aquaculture* 255: 165-172.
- DeNiro M.J., Epstein S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotope ratios in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495–506.
- DeNiro M.J., Epstein S. (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 341–351.
- Ehleringer, J.R., Rundel, P.W. (1989) Stable isotopes: History, units and instrumentation. In: Rundel, P.W., Ehleringer, J.R. and Nagy, K.A. (Eds) *Stable Isotopes in Ecological Research*. Springer- Verlag. New York. pp.1-16.
- El-Baky, H.H.A., El-Baz, F.K., Baroty, G.S.E. 2008. Evaluation of Marine Alga *Ulva lactuca* as A Source of Natural Preservative Ingredient. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 3 (3): 434-444.
- Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

- Felix, S., Robins, P. H., & Rajeev, A. (2004a). Pro-PO based assessment of eco-friendly immunostimulation in *Penaeus monodon* (H. Milne Edwards). *Indian J. Fish*, 51(4), 401–405.
- Felix, S., Robins, P. H., & Rajeev, A. (2004b). Immune enhancement assessment of dietary incorporated marine alga *Sargassum wightii* (Phaeophyceae / Punctariales) in tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea / Penaeidae) through prophenoloxidase (proPO) systems. *Indian Journal of Marine Sciences*, 33(December), 361–364.
- Fu, Y.W., Hou, W.Y., Yeh, S.T., Li, C.H., & Chen, J.C. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 22(6), 673–85. doi:10.1016/j.fsi.2006.08.014
- Gamboa-Delgado J., Cañavate J.P., Zerolo R., Le Vay L. (2008) Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 280, 190-197.
- Gamboa-Delgado J. (2009) Application of natural stable isotopes in aquaculture nutrition. PhD Thesis. University of Wales-Bangor, UK. 180 pp.
- Gamboa-Delgado J., Le Vay L. (2009a) Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture* 291, 115-123.
- Gamboa-Delgado J., Le Vay L. (2009b) *Artemia* replacement in co-feeding regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon stable isotopes. *Aquaculture* 297, 128-135.
- Gamboa-Delgado, J., Peña-Rodríguez, A., Cruz-Suárez, L.E., Ricque, D. (2011). Direct assessment of the nutritional contribution of co-fed live macroalgae *Ulva clathrata* and artificial feed to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Shellfish Research*, Vol. 30, No. 3, 1–10.
- Ghaednia, B., Mehrabi, M. R., Mirbakhsh, M., Yeganeh, V., Hoseinkhezri, P., Garibi, G., & A, G. J. (2011). Effect of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(4), 616–630.
- Gopinath R, Raj RP. 2009. Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius (1798) given aflatoxin B-1-incorporated diets. *Aquaculture Research*, 40(11), 1235-1242. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02207.x
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 600–609. doi:10.1016/j.ifset.2011.07.004
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*. 29 (2): 345–350.

- Hayden, H. S., Blomster, J., Maggs, C. A., Silva, P. C., Stanhope, M. J., & Waaland, J. R. (2003). Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *European Journal of Phycology*, 38(3), 277–294. doi:10.1080/1364253031000136321
- Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol.* 2005 Sep;96(14):1613-23.
- Hose, J. E., Martin, G. G., & Gerard, A. S. (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin*, 178(1), 33. doi:10.2307/1541535
- Hou, W.Y. & Chen, J.C. 2005. The immunoestimulatory effect of the hot- water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 19(2), 127-138.
- Huang, X., Zhou, H., & Zhang, H. (2006). The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & shellfish immunology*, 20(5), 750–7. doi:10.1016/j.fsi.2005.09.008
- Immanuel, G., Vincybai, V., Sivaram, V., Palavesam, A, Marian, M. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236(1-4), 53–65.
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S., & Palavesam, A. (2012). The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish & shellfish immunology*, 32(4), 551–64. doi:10.1016/j.fsi.2012.01.003
- Jomori R.K., Ducatti C., Carneiro D.J., Portella M.C. (2008) Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquaculture Research* 39, 370–381.
- Kabak B, Dobson AD, Var I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(8): 593–619.
- Kaeffer, B., Bernard, C., Lahaye, M., Blottiere, H. M. & Cherbut, C. (1999). Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. *Planta Med.* 65:527–31.
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 389–96. doi:10.1016/j.fsi.2010.11.016
- Kelman D, Posner EK, McDermid KJ, Tabandera NK, Wright PR, Wright AD. 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Marine Drugs* 10(6): 403-416.
- Lahaye, M., & Robic, A. (2007). Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765–1774.

- Lahaye, M., Inizan, F., & Vigouroux, J. (1998). NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan–boron complex formation. *Carbohydrate Polymers*, 36, 239–249.
- Leiro, J. M., Castro, R., Arranz, J. a, & Lamas, J. (2007). Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International immunopharmacology*, 7(7), 879–88. doi:10.1016/j.intimp.2007.02.007
- Lightner DV, Redman RM, Price RL, Wiseman MO. 1982. Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(2), 279-291. doi: 10.1016/0022-2011(82)90127-6
- Lu K., Lin W. & Liu J. 2008. The characteristics of nutrient removal and inhibitory effect of *Ulva clathrata* on *Vibrio anguillarum* 65. *Journal of Applied Phycology*. 20: 1061-1068.
- Madhumathi, M. (2011). Antioxidant status of *Penaeus monodon* fed with *Dunaliella salina* supplemented diet and resistance against WSSV. *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)*, 3(10), 7249–7259
- Manilal, A., Selvin, J., Sugathan, S., & Panikkar, M. V. N. (2012). Evaluation of therapeutic efficacy of indian green alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. AGARDH) in the treatment of vibriosis in *Penaeus monodon*, *Thalassas An International Journal of Marine Sciences*, 28(January), 33–46.
- Manoharan N, Sampathkumar P, Dheeba B, Sheikabdulla S, Vinothprasanna G. Vinothkannan R. Kalavathy S, Vijayaanand A, Shanmugasundaram A, 2008. Potential hepatoprotective effect of aqueous extract of *Gracilaria corticata* in AFB1 induced hepatotoxicity in Wistar Rats. *Journal of Biological Sciences* 8 (8): 1352-1355.
- McDermid, K. J., and Stuercke, B. (2003). Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 15(6), 513–524.
- Mercado-Mercado, G., Carrillo, L. de la R., Wall-Medrano, A., López Díaz, J. A., and Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición hospitalaria*, 28(1), 36–46. doi:10.3305/nh.2013.28.1.6298
- Michener, R.H., Schell, D.M. (1994) Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs In: Stable isotopes in ecology and environmental science. Chapter 7. Vol 1 (ed. by Lajtha, K. and Michener, R.H.) Blackwell scientific publications. Oxford, UK. 138-157 pp.
- Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, Van der Knap WPW, Mialhe E, Bachère E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191:89e107.
- Nunes, A.J.P., Gesteira, T.C.V., Goddard, S. (1997) Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149, 121–136.
- Osman, M., Abu-Shady, A., & Elshobary, M. (2010). The seasonal fluctuation of the antimicrobial activity of some macroalgae collected from Alexandria coast, Egypt. *researchgate.net*. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/233726941_The_Seasonal_Fluctuation_of_the_Antimicrobi

[al Activity of Some Macroalgae Collected from Alexandria Coast Egypt/file/d912f50accd4b99b17.pdf](file/d912f50accd4b99b17.pdf)

- Paradossi, G., F. Cavalieri, L. Pizzoferrato and A.M. Liquori. 1999. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *International Journal of Biological Macromolecules* 25:309-315.
- Peterson, B.J., Fry, B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 293-320.
- Priyadarshini, S., Bragadeeswaran, S., Prabhu, K., Ran, S. S. (2011). Antimicrobial and hemolytic activity of seaweed extracts *Ulva fasciata* (Delile 1813) from Mandapam, Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S38–S39
- Qi H. Zhang Q, Zhao T, Hu R, Zhang K and Li Z. 2006. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioor Med Chem.* 16:2441-2445.
- Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao, Z., Xing, R. (2006). Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 17(6), 527–534.
- Ringø, E., Erik Olsen, R., Gonzalez Vecino, J. L., & Wadsworth, S. (2011). Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: A Review. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 02(01), 1–22. doi:10.4172/2155-9910.1000104
- Rocha de Souza, M.C., C. Texeira-Masques, C.M. Guerra-Dore, F.R. Ferreira da Silva, H.A. Olivera-Rocha and E. Lisboa-Leite. (2007). Antioxidant activity of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 19: 153–160.
- Roseanu, A., Jecu, L., Badea, M., & Evans, R. W. (2010). Mycotoxins: An overview on their quantification methods. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47(1), 79-86.
- Ruperez, P., Ahrazem, O., Leal, A. (2002). Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 840–845.
- Sánchez Campos, L. N., Díaz, F., Licea, A., Re, A. D., Lizárraga, M. L., Flores, M., Tordoya Romero, C. (2010). Effect of hydrosoluble polysaccharides of *Macrocystis pyrifera* on physiological and metabolic responses of *Litopenaeus vannamei* infected with *Vibrio campbellii*. *Hidrobiologica*, 20(3), 246–255.
- Schlechtriem, C., Focken, U., Becker, K. (2004) Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. *Aquat. Ecol.* 38, 93-100.
- Schroeder, G.L. (1983) Sources of fish and prawn growth in polyculture ponds as indicated by $\delta^{13}\text{C}$ analysis. *Aquaculture* 35, 29–42.
- Selvin, J., Huxley, A. J., & Lipton, A. P. (2004). Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. *Aquaculture*, 230(1-4), 241–248.

- Selvin, J., & Lipton, A. P. (2004). Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea muscliformis* collected from the peninsular coast of India. *Journal of Marine Science and Technology*, 12(1), 1–6.
- Selvin, J., Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S., & Lipton, A. P. (2011). Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases Eficacia del extracto del alga marina verde *Ulva fasciata* sobre el manejo de las enfermedades bacterianas en camarones. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39(2), 197–204. doi:10.3856/vol39-issue2-fulltext-1
- Seo MJ, Choi HS, Lee OH, Lee BY, 2013. *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi, the edible red seaweed, inhibits lipid accumulation and reactive oxygen species production during differentiation in 3T3-L1 cells. *Phytother Res.* 7(5), 655-63. doi: 10.1002/ptr.4765.
- Shanab S. M. M. (2007) Antioxidant and antibiotic activities of some seaweed (Egyptian Isolates). *International J Agric & Biol.*2:220-5.
- Shen HM, Shi CY, Lee HP, Ong CN. 1994. Aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127:145–150.
- Shen HM, Ong CN, Shi CY. 1995. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology* 99:115–123.
- Shen HM, Shi CY, Shen Y, Ong CN. 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B₁. *Free Radical Biology and Medicine* 21:139–146.
- Silva M, Vieira L, Almeida AP, Kijjoa A. (2013). The marine macroalgae of the genus *Ulva*: chemistry, biological activities and potential plications. *Oceanography* 1: 101. doi:10.4172/ocn.1000101
- Silva, G. C., Albuquerque-Costa, R., Oliveira-Peixoto, J. R., Pessoa-Nascimento, F. E., Macedo-Carneiro, P. B. de, & Silva dis Fernandes-Vieira, R. H. (2013). Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant *Vibrio*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(1), 183–188.
- Sirirustananun, N., Chen, J.-C., Lin, Y.-C., Yeh, S.-T., Liou, C.-H., Chen, L.-L., Sim, S. S., *et al.* (2011). Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 31(6), 848–55. doi:10.1016/j.fsi.2011.07.025
- Smith, V. J., Brown, J. H., & Hauton, C. (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology*, 15(1), 71–90. doi:10.1016/S1050-4648(02)00140-7
- Sohal RS, Weindruch R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 273 (5271): 59–63.
- Tan, S. P., O’Sullivan, L., Prieto, M. L., Gardiner, G. E., Lawlor, P. G., Leonard, F., Duggan P., McLoughlin P., Hughes, H. (2011). Extraction and bioautographic-guided separation of antibacterial compounds from *Ulva lactuca*. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 513–523. doi:10.1007/s10811-011-9747-3.
- Tapia-Salazar M, García-Pérez OD, Velásquez-Soto RA, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos D, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2012. Growth, feed intake, survival, and histological response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing grains naturally contaminated with aflatoxin. *Cienc. Mar.* 38: 491–504.
- Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

- Tayag, C. M., Lin, Y.-C., Li, C.-C., Liou, C.-H., & Chen, J.-C. (2010). Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 28(5-6), 764–73. doi:10.1016/j.fsi.2010.01.023
- Trigui, M., Gasmi, L., Zouari, I., & Tounsi, S. (2012). Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 319–328. doi:10.1007/s10811-012-9866-5
- Van der Zanden, M.J., Shuter, B.J., Lester N., Rasmussen. J.B. (1999) Patterns of food chain lengths in lakes: A stable isotope study. *Am. Nat.* 154, 406–416.
- Verschoor A.M., Boonstra H., Meijer T. (2005) Application of stable isotope tracers to studies of zooplankton feeding, using the rotifer *Brachionus calyciflorus* as an example. *Hydrobiologia*, 546, 535–5
- Wang L, Piao X L, Kim S W, Piao X S, Shen Y B, Lee H S.(2008). Effects of *Forsythia suspensa* extract on growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities in broiler chickens under high ambient temperature. *Poultry Science*, 87, 1287-1294.
- Xue, Z., C.H. Xue, Z.J. Li, Y.P. Cai, H.Y. Liu and H.T. Qi. (2004). Antioxidant and hepatoprotective activities of low molecular weight sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology.*, 16: 111–5
- Yeh ST, Lee CS, Chen JC (2006) Administration of hot-power extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 20:332-345.
- Yildiz, G., Celikler, S., Vatan, O., Dere, S. (2012). Determination of the antioxidative capacity and bioactive compounds in green seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Journal of Food Properties*, 15(6), 1182–1189.
- Zubia, M., Robledo, D., & Freile-Pelegri, Y. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 449–458. doi:10.1007/s10811-006-9152-5

El Isótopo ^{15}N como Indicador de la Asimilación del Nitrógeno de la Dieta en Rotíferos y Copépodos Utilizados como Alimento vivo en la Acuicultura

José Cristóbal Román Reyes, Gustavo Alejandro Rodríguez Montes de Oca

Cuerpo Académico: Desarrollo sustentable en sistemas acuáticos

Laboratorio de reproducción y cultivo de peces. Facultad de Ciencias del Mar - Universidad Autónoma de Sinaloa. Paseo Claussen S/N, Colonia los Pinos. Mazatlán, Sinaloa, México. C.P.

82000. Tel./Fax 01 669 9828656. E-mail: jocrore@gmail.com

Resumen

Los requerimientos nutricionales de rotíferos y copépodos cultivados en condiciones controladas aún no son bien entendidos, debido a la incertidumbre en la cuantificación del consumo y la asimilación del alimento, utilizando métodos indirectos. La adopción de la técnica de isótopos estables enriquecidos, como una medida directa de la asimilación de nutrientes en rotíferos y copépodos, ha demostrado ser viable para determinar la asimilación de nutrientes de diferentes tipos de alimento. El objetivo del presente trabajo es determinar la asimilación de nitrógeno en el rotífero *Brachionus plicatilis* y el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*, alimentados con las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Isochrysis* sp. y *Thalassiosira weissflogii*, utilizando el ^{15}N enriquecido como trazador.

Los rotíferos y copépodos fueron obtenidos del CIAD-Mazatlán, mientras que las cepas de microalgas provienen del laboratorio de cultivos de apoyo de la FACIMAR-UAS-Mazatlán. Las microalgas fueron enriquecidas, reemplazando el 20% del $\text{Na}^{14}\text{NO}_3$ de la formulación F, por $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ enriquecido con el 98% de átomos de ^{15}N (Sigma Aldrich Co. USA). Durante los experimentos, los rotíferos y copépodos se aclimataron al tipo y concentración de la microalga sin enriquecer, por al menos una hora, en volúmenes de 12 L y concentraciones de 200 rotíferos y cuatro copépodos por mL, respectivamente. Posteriormente, los rotíferos o copépodos se transfirieron a recipientes de 12 L con la microalga enriquecida con ^{15}N , previamente tamizados y lavados con agua filtrada a 0.2 μm . A continuación, se procedió a tomar muestras con volúmenes de 300 mL, a intervalos de tiempo consecutivos, durante cuatro horas en el caso de los rotíferos, y 13 horas para los copépodos. Durante cada extracción, los organismos experimentales fueron inactivados con agua carbonatada y consecuentemente concentrados y conservados a -80°C , para su posterior liofilización. Una vez liofilizadas, las muestras fueron homogenizadas y empacadas (1 mg) en cápsulas de estaño, y enviadas al

laboratorio de isótopos estables de la Universidad de California, Davis, USA, para su análisis. Para cada tratamiento experimental con tres repeticiones, la tasa de asimilación de nitrógeno (%N corporal por hora); se determinó mediante el producto de la pendiente de la regresión lineal (de la relación entre el incremento del ^{15}N átom% con respecto al tiempo) con el recíproco del ^{15}N átom % de la microalga marcada, y el resultado multiplicado por cien.

Los resultados indicaron que los rotíferos tuvieron tasas de asimilación de nitrógeno con valores de 2.57, 3.42 y 1.41 %N corporal·hora⁻¹, cuando fueron alimentados con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., respectivamente. En este mismo orden, los copépodos en los estadios nauplios+copepoditos combinados registraron tasas de asimilación de 2.06, 3.37 y 1.79 %N corporal·hora⁻¹, mientras que en los copépodos adultos fueron de 0.81, 1.84 y 1.64 %N corporal·hora⁻¹, para cada microalga respectivamente. Las fluctuaciones en los valores de la tasa de asimilación de nitrógeno en rotíferos y copépodos fueron atribuidas a las características estructurales y bioquímicas de las dietas, así como a la historia de alimentación y el estado nutricional de los animales experimentales. La técnica del ^{15}N enriquecido mostró ser reproducible y eficaz para definir la significancia de la asimilación del nitrógeno de la dieta, por rotíferos y copépodos. Los valores mayores de la asimilación de nitrógeno con periodos cortos de asimilación, obtenidos con la microalga *Nannochloropsis* sp., confirman los buenos resultados que se tienen al utilizarla como alimento en los cultivos de rotíferos y copépodos.

Palabras clave: ^{15}N , isótopos, asimilación, rotíferos, copépodos.

Roman, C. 2013. El Isótopo ^{15}N como Indicador de la Asimilación del Nitrógeno de la Dieta en Rotíferos y Copépodos Utilizados como Alimento vivo en la Acuicultura. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 599-632.

Introducción

El éxito del cultivo larvario de peces marinos está condicionado a la producción de alimento vivo para la primera alimentación, lo cual constituye uno de los principales obstáculos para el escalamiento productivo comercial de varias especies con potencial acuícola. Los nauplios de *Artemia*, los rotíferos *Brachionus plicatilis* y *Brachionus rotundiformis*, y los copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* y *Tizbe monozota* son los tipos de alimento vivo del zooplancton más utilizados en el noroeste de México para alimentar larvas de peces marinos (Puello-Cruz *et al.*, 2006). Son organismos marinos predominantemente herbívoros, que durante los cultivos se alimentan generalmente de las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Isochrysis* sp., *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp., *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp. y *Rhodomonas* sp. (Wikfors y Ohno, 2001), las cuales transfieren, a través del alimento vivo zooplanctónico, los nutrientes necesarios para obtener mayores supervivencias y mejorar el desarrollo de las larvas; en consecuencia, es necesario conocer las características bioquímicas de los rotíferos y copépodos cultivados con distintas fuentes de alimento y cuantificar la transferencia de nutrientes para entender su función fisiológica, el metabolismo y su valor nutritivo, los cuales son relevantes para la transferencia de energía y la producción secundaria.

Sin embargo, los requerimientos nutricionales de rotíferos y copépodos cultivados en condiciones controladas aún no son bien entendidos, debido a la incertidumbre en la cuantificación del consumo, la asimilación y la transferencia de nutrientes de distintas dietas, utilizando métodos indirectos. Los métodos comunes cuantifican, mediante el balance de masas, la diferencia entre el total de nutrientes ingeridos en la dieta y los que son expulsados posteriormente como desecho metabólicos (Abou Debs, 1984; Nagata, 1989; Tanaka, 1991) y la utilización de partículas inertes para medir la selectividad y la digestibilidad de la dieta (Vadstein *et al.*, 1993; Ronneberger, 1998; Baer *et al.*, 2008). Peters (1984) revisa y discute algunos métodos indirectos utilizados en la época para determinar la ingestión y la asimilación de las dietas por especies del zooplancton, mientras que Verschoor *et al.* (2005) refiere los métodos directos desarrollados recientemente para estudiar la alimentación del zooplancton, incluyendo la técnica de los isótopos estables. La

adopción de la técnica de isótopos estables constituye una medida directa de la asimilación de nutrientes en rotíferos y copépodos, y ha demostrado ser viable para determinar la incorporación de nutrientes de diferentes tipos de alimento (Aoki *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2004; Verschoor *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2007; Loick-Wilde *et al.*, 2012).

En particular, el valor nutricional de las proteínas de la dieta de los animales está relacionado con su habilidad para obtener los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos para el crecimiento y mantenimiento (Rennie *et al.*, 1994). Esta habilidad está relacionada con la digestibilidad de las proteínas y con el metabolismo subsecuente de los aminoácidos absorbidos. La calidad de las proteínas de la dieta es clásicamente investigada llevando a cabo estudios de largo plazo del balance de nitrógeno de los animales, proporcionando diferentes niveles de proteínas en la dieta (Braude *et al.*, 1970; Alm, 1981). Una técnica reciente para estimar la retención de nitrógeno, es el uso de dietas marcadas con ^{15}N , lo cual hace posible seguir el destino metabólico del nitrógeno de la dieta en el corto plazo.

Lo anterior es especialmente relevante debido a que es importante comprender el ciclo del nitrógeno en los sistemas acuícolas, puesto que éstos están diseñados para mantener una capacidad de carga biológica alta en espacios relativamente pequeños (Twarowska *et al.*, 1997), lo cual ocasiona el rápido deterioro de la calidad del agua, debido a la acumulación de alimento no consumido y a que los organismos cultivados liberan una gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos a través de las heces y la excreción; entonces, el rendimiento y la eficiencia de un sistema acuícola puede ser evaluado a través del análisis de la conversión de nitrógeno a biomasa animal. Existe información limitada sobre la eficiencia con que los rotíferos y copépodos retienen nitrógeno, así como el efecto de los niveles de nitrógeno de la dieta sobre la calidad del agua de los cultivos. El nitrógeno (proteína) de la dieta que no es retenida por los rotíferos o copépodos, es excretado como desechos sólidos (material fecal y alimento no consumido) o como nitrógeno inorgánico, principalmente en forma de amonio. Ambas formas son agregadas a la descarga total en el sistema de cultivo, causando el detrimento del ambiente de cultivo.

En consecuencia, el presente trabajo hace una revisión del estado del arte y se aportan resultados relevantes de nuestras investigaciones en el tema, con énfasis en el potencial de los isótopos estables de nitrógeno enriquecidos para evaluar la asimilación de nitrógeno en dos especies del zooplancton, utilizados ampliamente como alimento vivo en la larvicultura marina del noroeste de México, el rotífero *Brachionus plicatilis* y el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*, alimentados con las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis* sp., enriquecidas con ^{15}N .

Estado del arte

Los átomos de un mismo elemento que difieren en su masa atómica son llamados isótopos y las diferencias en la masa de los isótopos es debido a que poseen diferente número de neutrones en sus núcleos. Los isótopos estables de carbono (^{12}C y ^{13}C) y nitrógeno (^{14}N y ^{15}N) son los más utilizados en los estudios biológicos, y como en la mayoría de los elementos, tienen isótopos estables naturales donde generalmente los más abundantes son los más livianos (^{12}C : 98.89% y ^{14}N : 99.63 %), de tal manera que el porcentaje de abundancia natural de los más pesados, ^{13}C y el ^{15}N , es de 1.11 y 0.37 % respectivamente.

La composición de los isótopos estables de una muestra son determinados en un espectrómetro de masas y los resultados de los estudios biológicos utilizando trazadores isotópicamente enriquecidos son reportados en unidades de porcentaje de átomos (átom %), lo cual indica el número absoluto de átomos de un determinado isótopo en 100 átomos totales en el elemento; mientras los estudios que analizan los isótopos estables cercanos a sus niveles de abundancia natural son reportados en unidades delta (δ), un valor dado en partes por mil (‰) que indica una medida relativa de la desviación de la razón absoluta (ejem. $\delta^{15}\text{N} = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$) de los isótopos estables de la muestra y de un estándar de referencia, que en el caso del carbono es una piedra caliza del cretácico llamada Peedee Belemnita (VPDB) u otros equivalentes, mientras que para el nitrógeno es el nitrógeno atmosférico (N_2) (Owen, 1987). La transformación de los valores absolutos (átom %) a valores delta relativos (con respecto a un estándar de referencia) se realiza porque las diferencias absolutas de la abundancia natural de las razones isotópicas entre el estándar y la muestra son muy pequeñas, y aparecen valores en la tercera o cuarta posición decimal si se reportan en unidades de átom %.

Durante los procesos enzimáticos de las reacciones biológicas se presenta la discriminación diferencial de los isótopos pesados (fraccionación isotópica) debido a que los isótopos livianos de un elemento reaccionan a una tasa mayor que los isótopos pesados, de tal manera que el producto de la reacción esta disminuido en el isótopo pesado en relación al

reactante (Peterson y Fry, 1987). Por ejemplo, durante las funciones metabólicas el ^{14}N es excretado a una mayor tasa que ^{15}N , lo cual incrementa el ^{15}N en las proteínas contenidas en los tejidos, debido a la excreción preferencial de ^{14}N , cuando el animal está en el proceso de degradación de las proteínas. Considerando éstas propiedades, junto con la posibilidad de que los átomos pueden ser enriquecidos con isótopos estables pesados, los cuales pueden ser incorporados en las moléculas para ser utilizados como trazadores, la técnica ha resultado excepcionalmente útil para estudiar los flujos de nutrientes en los sistemas biológicos (Boschker y Middelburg, 2002).

La literatura señala la proliferación de estudios que utilizan a los isótopos estables enriquecidos como marcadores para estudiar el consumo de alimento, la digestión, absorción y la utilización de nutrientes de especies importantes en la acuicultura (Aoki *et al.*, 1995; Kreeger *et al.*, 1996; Preston *et al.*, 1996; Schlechtriem *et al.*, 2004, Saavedra *et al.*, 2007; Comtet y Riera, 2006). En particular, Aoki *et al.* (1995); Hino *et al.* (1997); Hasegawa *et al.* (2001); Cheng *et al.* (2004), Vincent *et al.* (2007) y Loick-Wilde *et al.* (2012) ya han utilizado el isótopo estable de nitrógeno (^{15}N) enriquecido para estudiar el destino del nitrógeno en algunas especies del zooplancton marino. Aoki *et al.* (1995), Bakonyi (1998), Verschoor *et al.* (2005) y Vincent *et al.* (2007) han desarrollado métodos de cálculo para la determinación de las tasas de ingestión, asimilación y producción con isótopos estables como marcadores, mientras que Otsuki *et al.* (1987) propusieron un método basado solamente en la determinación de la razón isotópica de la muestra para estimar la tasa de crecimiento relativo de anfípodos. En general, esta técnica ha sido de gran ayuda para mejorar el conocimiento de la fisiología nutricional de varios grupos taxonómicos con potencial acuícola (Conceição *et al.*, 2007).

La asimilación y el flujo de nitrógeno de algunas especies de copépodos fueron estudiados por Abou Debs (1984), Hasegawa *et al.* (2001), Vincent *et al.* (2007) y Loick-Wilde *et al.* (2012). Hasegawa *et al.* (2001) utilizaron el ^{15}N para evaluar la eficiencia en la acumulación de nitrógeno por los copépodos *Acartia* sp., *Pseudocalanus* sp. y *Paracalanus* sp., alimentados con plancton natural para estimar el nitrógeno liberado al medio como nitrógeno disuelto. Dichos autores señalaron que en muchas ocasiones los copépodos

transfirieron al ambiente una gran cantidad de nitrógeno disuelto (entre el 25 y 91% del nitrógeno ingerido), a través de la excreción y la ruptura de las células algales por las piezas bucales de los copépodos (sloppy feeding), mientras que muy poco nitrógeno fue acumulado, indicando la presencia de dietas (microalgas) de mala calidad que disminuyeron la producción de huevos y la tasa de eclosión de los copépodos.

Vincent *et al.* (2007) también utilizaron el ^{15}N para estimar la cantidad de nitrógeno de la dieta que es incorporado en los copépodos para propósitos de crecimiento, mantenimiento y reproducción (incorporación neta) y la cantidad total de nitrógeno ingerido y la fracción que se pierde al medio (incorporación bruta). Utilizando las especies de copépodos *Acartia discaudata* y *Calanus helgolandicus*, encontraron que sólo 1/3 del nitrógeno ingerido se incorporó en el nitrógeno corporal de los copépodos y ambas especies contribuyeron altamente en la producción total de nitrógeno orgánico disuelto a través de la excreción de amonio (con el 79 y 64% respectivamente) y la alimentación sloppy (20.9 y 35.7% respectivamente). Las diferencias en el patrón de utilización del nitrógeno entre ambas especies, también fueron explicadas en términos de la calidad de las dietas suministradas durante los experimentos, así como al tamaño diferencial en ambas especies de copépodos. Similarmente, Loick-Wilde *et al.* (2012) estudiaron la incorporación de nitrógeno en el copépodo *Eurytemora affinis* alimentado con la microalga *Rhodomonas salina* y una cianobacteria enriquecidas con ^{15}N , reportando resultados de la tasa de incorporación de nitrógeno similares a los obtenidos por Hasegawa *et al.* (2001) y Vincent *et al.* (2007).

La asimilación y el flujo de nitrógeno de rotíferos fue estudiado por Nagata (1989), Tanaka (1991) y Aoki *et al.* (1995) utilizando distintas técnicas. Los dos primeros trabajos fueron realizados para explicar los repentinos colapsos durante los cultivos de rotíferos utilizando el balance de masas del nitrógeno, mientras que Aoki *et al.* (1995) fue realizado para probar el uso del ^{15}N como trazador para medir el balance de nitrógeno de rotífero. Nagata (1989) encontró que el rotífero alimentado con *Chlorella* asimiló el 83% del nitrógeno ingerido, mostrando que el 66.3% de nitrógeno asimilado fue utilizado para el crecimiento y la reproducción. También señala que mientras el nitrógeno particulado no puede ser

reutilizado, el nitrógeno disuelto fue remineralizado totalmente por la microalga *Chlorella*. Contrariamente, Tanaka (1991) reportó que un gran porcentaje (76.5%) del nitrógeno ingerido por los rotíferos es transferido al agua, lo cual puede ser causa de su deterioro, y consecuentemente puede influenciar directa o indirectamente el crecimiento de la población de rotíferos durante los cultivos. Aoki *et al.* (1995) señalaron que el 77.2% del nitrógeno ingerido por los rotíferos fue transferidos al agua de cultivo a través de las heces. El 23.5% del nitrógeno asimilado fue utilizado por la excreción, mientras que el 76.5% fue utilizado para el crecimiento y la reproducción. Sugieren que la técnica del ^{15}N como trazador puede ser utilizada para medir los requerimientos de nitrógeno por especies del zooplancton.

Materiales y métodos

Origen y producción de los organismos experimentales

Los rotíferos y copépodos fueron obtenidos del CIAD-Mazatlán, mientras que las cepas de microalgas provienen del laboratorio de cultivos de apoyo de la FACIMAR-UAS-Mazatlán. Las microalgas *Isochrysis sp.*, *Thalassiosira weissflogii* y *Nannochloropsis sp.* fueron cultivadas con la técnica semicontinua en garrafones de plástico transparentes con 16 litros de medio de cultivo. Diariamente se realizaron diluciones del 50 % en todos los casos, reponiendo el volumen cosechado con medio fresco. Los cultivos de microalgas se realizaron con agua de mar a 25 °C, con iluminación continua y con aireación profusa para la agitación de los cultivos. Se realizaron conteos de las mezclas obtenidas de las cosechas diarias de microalgas con la ayuda de un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad equipado con reglilla de Neubauer, que fue utilizado para verificar la estabilidad de los cultivos y para calcular el volumen de cada mezcla a emplearse para la alimentación de los rotíferos.

Para la producción de rotíferos se utilizaron seis recipientes transparentes con volumen de 12 litros. La temperatura y salinidad se mantuvieron constantes a 29 °C y 35 ups, respectivamente y el pH se mantuvo entre 7.8 y 8.4 para evitar el estrés causado por este factor durante los cultivos. Las raciones de alimentación durante los cultivos de

mantenimiento y durante los experimentos fueron las recomendadas por (Hino *et al.*, 1997) para *Nannochloropsis* sp. (6×10^6 cél·mL⁻¹ y no menor de 3×10^6 cél·mL⁻¹) para una concentración de 200 rot·mL⁻¹. Se determinó el contenido orgánico unitario de *Nannochloropsis* sp. y del resto de las especies de microalgas; posteriormente se obtuvieron las equivalencias en biomasa orgánica (33.9×10^6 pg·mL⁻¹) para las cuatro microalgas, relativas a la microalga *Nannochloropsis* sp., de esta manera los rotíferos recibieron en su alimentación las mismas raciones en términos de biomasa orgánica. Se verificó la concentración de rotíferos presentes en cada recipiente, realizando conteos diarios con la ayuda de una cámara de Sedgwick-Rafter.

Los cultivos de copépodos se realizaron en las mismas condiciones que para los rotíferos, sólo que las raciones de alimentación fueron las recomendadas por Teixeira *et al.* (2010) y consistieron en agregar una concentración diaria de 20,000 y 320,000 cél·mL⁻¹ de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis* sp., respectivamente, mientras que la ración de alimentación de la microalga *Nannochloropsis* sp., fue de 1,170,000 cél·mL⁻¹ y se determinó en función de la equivalencia en biomasa orgánica (PO) de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis* sp. La biomasa orgánica de *T. weissflogii*, *Isochrysis* sp., y *Nannochloropsis* sp., fueron de 327.24, 20.77 y 5.65 pg·cél⁻¹, de tal manera que los copépodos recibieron en su alimentación un equivalente de 6.6 µgPO·mL⁻¹ correspondiente a cada una de las concentraciones señaladas para cada especie de microalga.

Determinación de la biomasa seca y orgánica de rotíferos y copépodos

La biomasa seca y orgánica de rotíferos y copépodos se determinó utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 47 mm de diámetro, previamente secados a 450 °C y calibrados en una balanza analítica semimicro con precisión de lectura de 0.01 mg. Las muestras filtradas con una concentración conocida, fue lavada con formiato de amonio para eliminar las sales. La muestra secada a 60 °C en una estufa fue llevada a biomasa seca constante, posteriormente fueron incineradas por 12 horas en una mufla a 450 °C para obtener la cantidad de cenizas y finalmente por diferencia entre la biomasa seca total y de cenizas se calculó el contenido orgánico de cada muestra de acuerdo a Sorokin (1973).

Enriquecimiento de microalgas con ^{15}N

En la preparación del medio de cultivo se utilizó la formulación F (Guillard y Ryther, 1962) reemplazando el 20% de $\text{Na}^{14}\text{NO}_3$ por $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ (enriquecido con el 98 % de átomos de ^{15}N , Sigma Aldrich Co. USA) para lograr la señal más fuerte posible en un tiempo de cultivo de 48 horas, después del inicio del enriquecimiento, la cual es el tiempo de cosecha programada en base a experimentos preliminares que indicaron que es el tiempo que se ajusta para obtener la cantidad de biomasa necesaria para alimentar a rotíferos y copépodos durante los experimentos. Los cultivos de microalgas enriquecidas se realizaron en contenedores plásticos de tereftalato de polietileno (PET) transparentes con volumen de tres litros.

Enriquecimiento de rotíferos y copépodos con ^{15}N

Durante los experimentos, los rotíferos primeramente se aclimataron al tipo y concentración de la microalga sin marcar por al menos una hora, en volúmenes de 12 litros y concentraciones de 200 rotíferos por mililitro. Posteriormente, los rotíferos se transfirieron al alimento enriquecido con ^{15}N , previamente tamizados y lavados con agua filtrada a 0.2 μM para eliminar cualquier remanente de la microalga sin marcar.

Con respecto a los copépodos, antes de iniciar los experimentos, éstos fueron separados mediante el tamizado con luz de malla de 300 micras para separar los estadios adultos de la combinación de los estadios de nauplios+copepoditos. La separación se argumenta en el hecho de que a diferencia de los copépodos menores de 300 μm , los copépodos mayores de 300 μm se encuentran en periodo de reproducción y en la formación de sacos ovígeros por las hembras (Flores Santana, 2008), por lo que se pretende separar este efecto para observar las diferencias en la asimilación de nitrógeno debido a la producción de huevos ($>300 \mu\text{m}$) y al crecimiento somático ($<300 \mu\text{m}$) (Vincent *et al.*, 2007). Posteriormente, los copépodos se aclimataron al tipo y concentración de la microalga experimental sin marcar por al menos una hora, en volúmenes de 12 litros y concentraciones de 4 copépodos por mililitro. Inmediatamente después, los copépodos se transfirieron a la microalga enriquecida con ^{15}N , previamente tamizados y lavados con agua filtrada a 0.2 μM para eliminar cualquier remanente de la microalga sin marcar.

Para rotíferos y copépodos, se realizaron tres repeticiones por tratamiento manteniendo la salinidad en 35‰ y la temperatura a 29°C utilizando calentadores termorregulados en los recipientes experimentales. Las raciones de alimentación para ambas especies fueron las descritas previamente.

Obtención de muestras para determinar de la tasa de asimilación de nitrógeno

Los rotíferos transferidos a la microalga enriquecida con ^{15}N , fueron muestreados consecutivamente por 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 horas, mientras que para los copépodos se realizaron muestreos cada hora, durante 13 horas, después de su transferencia a la microalga enriquecida con ^{15}N . Para ambas especies se tomaron volúmenes de 300 mL, permitiendo evacuar el contenido estomacal por 30 minutos en una suspensión de agua filtrada a 0.2 μM . El tiempo cero corresponde al ^{15}N átomo % de los rotíferos alimentados con la microalga sin marcar. Posteriormente, los organismos se concentraron, se inactivaron con agua carbonatada y se almacenaron en frascos de vidrio de 5 ml y se colocaron en un ultra congelador a -80°C.

Preparación de las muestras y determinación de los Isótopos estables de nitrógeno.

El procedimiento de preparación de la muestra se realizó en el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo para la Acuicultura, de la Facultad de Ciencias del Mar. Inicialmente, las muestras colectadas fueron colocadas en frascos de 5 mL, posteriormente ultra congeladas (-80°C) y liofilizadas (-46°C a -50°C y 55 MBR de presión durante 24 horas). A continuación fueron sometidas al proceso de homogeneización en morteros de ágata. Las muestras homogeneizadas se pesaron (aprox. 1 mg) en una balanza analítica Denver Instrument con precisión de ± 0.01 mg, se empacaron en cápsulas de estaño y se almacenaron en cajas de plástico de 96 pocillos con identificación bidimensional y posteriormente fueron enviadas para su análisis al laboratorio de isótopos estables de la Universidad de California, Davis, U.S.A.

La razón de isótopos estables de nitrógeno fueron determinados utilizando un espectrómetro de masas de flujo continuo Europa 20-20 (PDZ Europa Ltd. Sandbach, UK), después de la combustión (a 1000°C) y transformación de la muestra a N₂ en el analizador elemental C-N (PDZ Europa, ANCA-GSL) conectado al espectrómetro de masas. Los gases fueron separados en una columna (Carbosieve Gas Column, Supelco, Bellefonte, PA, USA) antes de ser inyectados al espectrómetro de masas. Los valores isotópicos fueron expresados en porcentaje de átomos de ¹⁵N, mediante la ecuación:

$$^{15}\text{N átom \%} = \frac{^{15}\text{N}_2}{^{15}\text{N}_2 + ^{14}\text{N}_2}$$

Donde ¹⁵N y ¹⁴N son el número de átomos de ¹⁵N y ¹⁴N en el gas de nitrógeno generado por combustión de la muestra en el espectrómetro de masas. Adicionalmente, junto con los valores de ¹⁵N también se obtuvo el contenido de nitrógeno y de carbono de las muestras, los cuales fueron medidos en el analizador elemental acoplado al espectrómetro de masas, y fueron utilizados para evaluar los cambios en la composición de nitrógeno dentro del periodo de incubación experimental

Determinación de la tasa de asimilación de nitrógeno por rotíferos y copépodos

El nitrógeno asimilado por el rotífero fue calculado mediante la ecuación empleada por Aoki *et al.* (1995).

$$\frac{A}{W_b} = \left(\frac{I_t - I_o}{t} \right) \left(\frac{1}{I_f} \right) * 100$$

El primer miembro de la igualdad denota el nitrógeno asimilado (% N corporal por hora); el primer término del segundo miembro proporciona la tasa de incremento de la razón ^{15}N átom % con respecto al tiempo t , la cual es obtenida por la pendiente (b) de la regresión lineal simple $^{15}\text{N} = a - bt$. I_t , I_o , e I_f son ^{15}N átom % del rotífero alimentado con la microalga marcada por t horas, ^{15}N átom % de los rotíferos al tiempo cero y ^{15}N átom % de la microalga marcada respectivamente. La tasa de asimilación de nitrógeno se obtiene mediante el producto de la pendiente (b) de la regresión lineal simple x el recíproco de la microalga marcada con ^{15}N x 100.

Procesamiento y análisis estadístico de los datos.

Los datos fueron procesados mediante las técnicas de análisis de regresión lineal y las tasas de asimilación fueron comparadas utilizando el análisis de varianza de un factor (Zar, 1999). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados

Descripción de la biomasa seca y orgánica unitaria, contenido de nitrógeno y carbono de las microalgas experimentales y la ración diaria de nitrógeno en la alimentación de rotíferos y copépodos.

Los datos describen diferencias importantes en los promedios de la biomasa seca (PSU) y orgánica (POU) unitaria de las tres especies de microalgas utilizadas como alimento (Tabla 1). *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. presentaron un PSU promedio de 535.21, 10.16 y 39.23 $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$, respectivamente; mientras que el POU para *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. fue de 327.24, 5.65 y 20.77 $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$, respectivamente. En lo que respecta al contenido elemental promedio de las microalgas, los datos mostraron que el contenido de nitrógeno en la biomasa seca de *T. weissflogii* fue de 20.16 $\text{pgN}\cdot\text{cél}^{-1}$, mientras que las microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. mostraron valores de 0.31 y 1.24 $\text{pgN}\cdot\text{cél}^{-1}$, respectivamente. El contenido de carbono también presentó una tendencia similar a la del nitrógeno, debido probablemente a las diferencias en el tamaño (en términos de peso seco) de las microalgas experimentales. El valor registrado por la microalga *T. weissflogii* fue de 173.63 $\text{pgC}\cdot\text{cél}^{-1}$, mientras que la microalga *Nannochloropsis* sp. registró un valor de 2.43 $\text{pgC}\cdot\text{cél}^{-1}$. En la microalga *Isochrysis* sp. el contenido de C registró un valor de 9.56 $\text{pgC}\cdot\text{cél}^{-1}$. Los datos de la tabla 1 también muestran que, aunque las raciones de alimentación de las microalgas experimentales se estandarizaron en términos de la biomasa orgánica, el contenido de nitrógeno en las raciones de alimentación de copépodos y rotíferos fue muy similar, por lo que también pueden considerarse equivalentes en términos de nitrógeno dietético.

La figura 1 muestra la razón carbono:nitrógeno (C:N) de las microalga experimentales. Los valores fueron de 7.71, 7.84 y 8.61 para las microalgas *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp. y *T. weissflogii*, respectivamente. La falta de diferencias entre las microalgas, indica que la razón C:N se mantuvo estable durante el proceso experimental.

Enriquecimiento de las microalgas experimentales con ^{15}N .

La figura 2 muestra que el enriquecimiento de las microalgas después de 48 horas de cultivo fue de gran magnitud, con valores que fueron de 0.37 a 21.50 ^{15}N átom% en la microalga *T. weissflogii*, mientras que los valores registrados para la microalga *Isochrysis* sp., fueron desde 0.37 a 21.23 ^{15}N átom%. En *Nannochloropsis* sp., éstos valores fueron desde 0.38 ^{15}N átom% a 17.53 ^{15}N átom%. La magnitud del enriquecimiento isotópico registrado, sustentan el supuesto básico en la utilización de la técnica para determinar la incorporación directa de nutrientes en los organismos, la cual indica que para que esta sea efectiva las dietas deben ser isotópicamente distintas.

Tabla 1. Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa orgánica unitaria (POU), composición química elemental y la ración de alimentación diaria suministrada a rotíferos y copépodos, en términos de concentración celular y nitrógeno total, de las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

	Microalga		
	Thala	Nanno	Isoch
PSU (pg.cél ⁻¹)	535.21±69.34	10.16±3.69	39.23±3.69
POU (pg.cél ⁻¹)	327.24±47.29	5.65±1.32	20.77±1.32
C (pg.cél ⁻¹)	173.63±3.17	2.43±0.31	9.56±3.03
N (pg.cél ⁻¹)	20.16±3.17	0.31±0.09	1.24±0.42
Rotífer: Ración diaria (cél.mL ⁻¹)	103,500	6,000,000	1,630,000
Rotífer: Ración de N (µg.mL ⁻¹)	2.09	1.86	2.02

Cópepod: Ración diaria (cél.mL ⁻¹)	20,000	1,170,000	320,000
Cópepod: Ración de N (μg.mL ⁻¹)	0.40	0.36	0.40

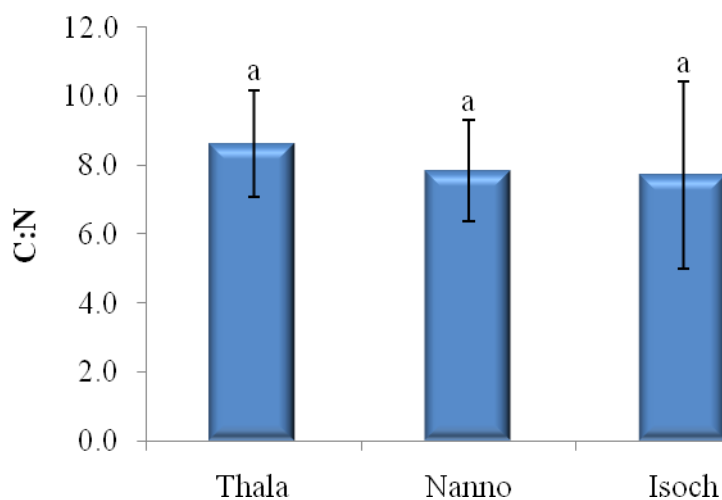


Figura 1. Valores promedio de la razón C:N de las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

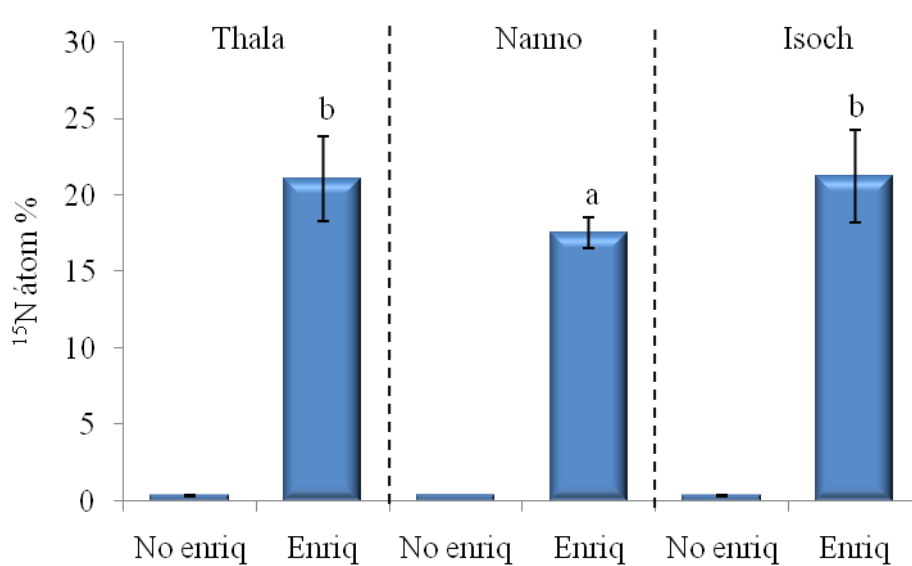


Figura 2. Firmas isotópicas (¹⁵N) de las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch), antes y después de ser enriquecidas con ¹⁵N durante 48 horas de cultivo.

Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa orgánica unitaria (POU), contenido de nitrógeno (N), contenido de carbono (C) y la razón C:N de rotíferos y copépodos alimentado con las microalgas experimentales

La tabla 2 indica que la PSU del rotífero cuando se alimentó con *T. weissflogii* fue de $0.602 \mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$, mientras que con las microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., fue de 0.431 y $0.316 \mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$, respectivamente. La POU de los rotíferos fue de 0.419 , 0.294 y $0.242 \mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$ cuando se alimentaron de manera respectiva con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. En lo que respecta al contenido de nitrógeno, el mayor valor se encontró en los rotíferos alimentados con la microalga *Isochrysis* sp. ($24.26 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$), pero no fue diferente al registrado con *Nannochloropsis* sp. ($23.37 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$) mientras que el valor más bajo se encontró cuando se alimentó con la microalga *T. weissflogii* ($15.56 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$).

Los datos del contenido de carbono en los rotíferos reflejaron un comportamiento similar al contenido de nitrógeno, encontrando los valores mayores con las microalgas *Nannochloropsis* sp. ($133.99 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$) e *Isochrysis* sp. ($114.26 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$). Los rotíferos alimentados con la microalga *T. weissflogii* registraron un valor promedio ($77.60 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$), significativamente menor a los descritos anteriormente.

En lo que respecta a la razón C:N, los valores obtenidos no fueron diferentes entre tratamientos, con valores de 4.99 , 5.28 y 4.71 para las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., respectivamente. En este sentido se puede observar que la razón C:N de las microalgas fueron mayores a los obtenidos con los rotíferos, esto nos indica que el contenido elemental de las microalgas experimentales, fueron insuficiente para que el rotífero obtenga los requerimientos necesarios de nitrógeno y carbono para realizar sus funciones biológicas.

Tabla 2. Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa orgánica unitaria (POU), contenido de carbono (C) y nitrógeno (N) y la razón C:N de rotíferos alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

	PSU	POU	C	N	
Microalga	$\mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$	$\text{ng}\cdot\text{rot}^{-1}$	$\text{ng}\cdot\text{rot}^{-1}$	C:N
Thala	0.602 ^c ± 0.13	0.419 ^b ± 0.08	77.60 ^a ± 12.45	15.56 ^a ± 3.27	4.99 ^a ± 1.17
Nanno	0.431 ^b ± 0.10	0.294 ^a ± 0.07	133.99 ^b ± 20.40	23.37 ^b ± 5.63	5.28 ^a ± 1.59
Isoch	0.316 ^a ± 0.06	0.242 ^a ± 0.09	114.26 ^b ± 22.19	24.26 ^b ± 5.91	4.71 ^a ± 1.28

En la tabla 3 se presenta la biomasa seca y orgánica promedio por organismo, de los copépodos en los estadios de nauplios+copepoditos mezclados, cuando fueron alimentados con las microalgas experimentales. Los nauplios+copepoditos alimentados con *T. weissflogii* registraron una biomasa seca unitaria de 1.68 $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$ y de 2.03 y 1.33 $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$ cuando se alimentaron con las microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. La biomasa orgánica unitaria de nauplios+copepoditos vario entre 1.0 y 1.29 $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$ sin mostrar diferencias entre los tratamientos. El contenido de nitrógeno para los nauplios+copepoditos combinados presentaron un contenido de nitrógeno de 155.96, 198.91 y 125.82 $\text{ngN}\cdot\text{cop}^{-1}$ para cuando fueron alimentados con *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., presentando con ésta última el valor significativamente menor. El contenido de nitrógeno fue significativamente mayor en los nauplios+copepoditos alimentados con *Nannochloropsis* sp. (846.90 $\text{ngC}\cdot\text{cop}^{-1}$), seguido en orden decreciente por los alimentados con *T. weissflogii* (717.22 $\text{ngC}\cdot\text{cop}^{-1}$) e *Isochrysis* sp. (524.52 $\text{ngC}\cdot\text{cop}^{-1}$). Se observa en la tabla 3, que la razón C:N fue muy homogénea en los nauplios+copepoditos alimentados con las tres microalgas, con valores que fluctuaron entre 4.17 y 4.60.

Tabla 3. Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa organica unitaria (POU), contenido de carbono (C) y nitrogeno (N) y la razón C:N de los copépodos en los estadios nauplios+copepoditos combinados, alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

	PSU	POU	C	N	C:N
Microalga	$\mu\text{g.cop}^{-1}$	$\mu\text{g. cop}^{-1}$	ng.cop^{-1}	ng.cop^{-1}	
Thala	1.68 ^a ± 0.59	1.01 ^a ± 0.38	717.22 ^b ± 12.45	155.96 ^b ± 18.11	4.60 ^a ± 1.11
Nanno	2.03 ^b ± 0.08	1.29 ^b ± 0.09	846.90 ^c ± 58.75	198.91 ^b ± 23.06	4.26 ^a ± 1.03
Isoch	1.33 ^a ± 0.10	1.00 ^a ± 0.10	524.52 ^a ± 34.43	125.82 ^a ± 10.67	4.17 ^a ± 1.07

Los copépodos adultos registraron valores del PSU de 11.91, 8.43 y 7.15 $\mu\text{g.cop}^{-1}$, con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., respectivamente (tabla 4). El PSU fue significativamente mayor cuando fueron alimentados con la microalga *T. weissflogii*. En lo que respecta a la POU, ésta fue mayor en los copépodos adultos alimentados con *T. weissflogii* (7.40 $\mu\text{g.cop}^{-1}$), mientras que fue significativamente menor (5.66 $\mu\text{g.cop}^{-1}$) con *Isochrysis* sp. Cuando fueron alimentados con *Nannochloropsis* sp. registraron un valor promedio de 6.67 $\mu\text{g.cop}^{-1}$ y no fue significativamente diferente de los obtenidos con *T. weissflogii* e *Isochrysis* sp. (tabla 4). El contenido de carbono fue diferente en los copépodos adultos alimentados con las tres microalgas, con valores en orden descendente de 5120.05, 3249.50 y 2434.82 ng.cop^{-1} con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. El contenido de nitrógeno fue mayor (1068.09 ng.cop^{-1}) en los copépodos adultos alimentados con *T. weissflogii*, mientras que fueron menores y similares en los copépodos alimentados con *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp.

Con respecto a la razón C:N, los valores fluctuaron entre 3.08 y 4.79, con los copépodos alimentados con *Isochrysis* sp. presentando el menor valor (3.08), evidenciando un mayor

contenido de nitrógeno en los copépodos adultos alimentados con ésta microalga. Las diferencias en la razón C:N de los copépodos adultos alimentados con *T.weissflogii* y *Nannochloropsis* sp. no fueron significativas, con valores superiores (4.29 y 4.79) al registrado en los copépodos adultos alimentados con *Isochrysis* sp.

Tabla 4. Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa organica unitaria (POU), contenido de carbono (C) y nitrogeno (N) y la razón C:N de los copépodos adultos, alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

	PSU	POU	C	N	
Microalga	$\mu\text{g.cop}^{-1}$	$\mu\text{g. cop}^{-1}$	ng.cop^{-1}	ng.cop^{-1}	C:N
Thala	11.91 ^b ± 1.49	7.40 ^b ± 0.57	5120.06 ^c ±416.59	1068.09 ^b ±91.43	4.79 ^b ±1.00
Nanno	8.43 ^a ± 0.72	6.67 ^{ab} ± 0.22	3249.50 ^b ±151.23	757.40 ^a ±75.80	4.29 ^b ±1.07
Isoch	7.15 ^a ± 0.36	5.66 ^a ± 0.32	2434.82 ^a ±107.21	789.51 ^a ±67.15	3.08 ^a ±0.96

Enriquecimiento de rotíferos y copépodos con ¹⁵N.

La figura 3 muestra la composición isotópica (¹⁵N átom%) de los rotíferos alimentados con *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. enriquecidas con ¹⁵N. La figura indica que hubo una tendencia a aumentar los valores del ¹⁵N cuando los rotíferos fueron alimentados con la microalga enriquecida. En el caso de *T. weissflogii* fue desde 0.38 a 1.44 ¹⁵N átom%, para *Nannochloropsis* sp. de 0.34 a 1.27 ¹⁵N átom% y para *Isochrysis* sp. de 0.37 a 0.97 ¹⁵N átom%). El enriquecimiento con ¹⁵N de los nauplios+copépodos combinados, después de 13 horas de alimentación con la microalga marcada, se describe en la tabla 4. El factor de enriquecimiento vario desde valores de 4 (sin enriquecer: 0.36 átom%; enriquecidos: 1.48 átom%), 5.8 (sin enriquecer: 0.40 átom%; enriquecidos: 2.34 átom%) y 6.5 (sin enriquecer: 0.38 átom%; enriquecidos: 2.48 átom%) veces el valor inicial, cuando fueron alimentados con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e

Isochrysis sp., respectivamente. En este mismo orden, el factor de enriquecimiento en los copéodos adultos fluctuaron entre 8.8 (sin enriquecer: 0.36 átom%; enriquecidos: 3.18 átom%), 6.7 (sin enriquecer: 0.41 átom%; enriquecidos: 2.75 átom%) y 7.4 (sin enriquecer: 0.40 átom%; enriquecidos: 2.95 átom%) veces el valor inicial.

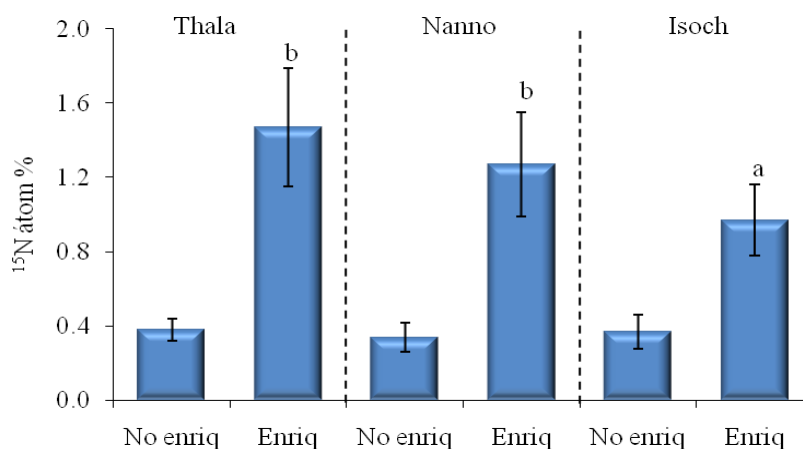


Figura 3. Firmas isotópicas (^{15}N) del rotífero antes (microalga sin enriquecer) y después de ser alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con ^{15}N .

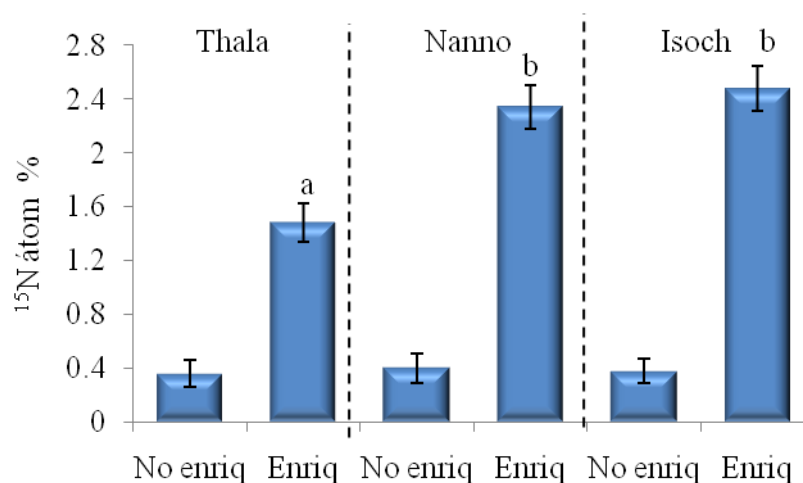


Figura 4. Firmas isotópicas (^{15}N) de los copéodos en los estadios nauplios+copepoditos combinados, antes (microalga sin enriquecer) y después de ser alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con ^{15}N .

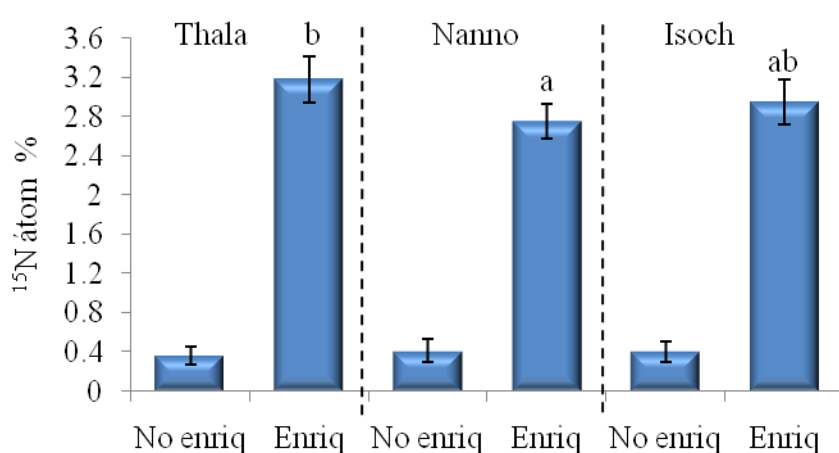


Figura 5. Firmas isotópicas (^{15}N) de los copépodos adultos, antes (microalga sin enriquecer) y después de ser alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con ^{15}N .

Tasa de asimilación de nitrógeno por rotíferos y copépodos alimentados con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp.

Las tasas de asimilación de nitrógeno de rotíferos y copépodos se muestran en las tablas 5, 6 y 7, en donde se resumen los parámetros de las regresiones lineales, el tiempo de máximo enriquecimiento de rotíferos y copépodos alimentados con las microalgas enriquecidas con ^{15}N y la firma isotópica de las microalgas enriquecidas. Se utilizó la pendiente de la parte lineal de la curva para determinar la tasa de incremento del ^{15}N con respecto al tiempo de experimentación, y consecuentemente la tasa de asimilación de nitrógeno. Las regresiones lineales del tiempo de alimentación de los rotíferos y copépodos alimentados con las microalgas experimentales marcadas con ^{15}N y las tasas de incremento del ^{15}N fueron significativas ($p < 0.05$) y los modelos de regresión explicaron más del 97% de la variabilidad observada ($r^2 > 0.97$). Los rotíferos asimilaron con mayor eficiencia el nitrógeno de la microalga *Nannochloropsis* sp. con una tasa de asimilación de $3.42 \text{ \%N corporal} \cdot \text{hora}^{-1}$ con un tiempo de máximo enriquecimiento de 90 minutos (tabla 5). *T. weissflogii* fue la segunda microalga mejor asimilada con promedio de $2.57 \text{ \%N corporal} \cdot \text{hora}^{-1}$, mientras que el nitrógeno de la microalga *Isochrysis* sp. fue asimilado con menor eficiencia (1.41 \%N

corporal·hora⁻¹). El tiempo de máximo enriquecimiento de los rotíferos alimentados con estas dos últimas microalgas fue de 120 minutos.

Los copépodos en los estadio combinados de nauplios+copepoditos asimilaron el nitrógeno de la microalga *Nannochloropsis* sp. con una tasa de 3.37 %N corporal·hora⁻¹, con un tiempo de máximo enriquecimiento de 3 horas, mientras que *T. weissflogii* e *Isochrysis* sp. fueron asimiladas con tasas de 1.79 y 2.06 %N corporal·hora⁻¹ y no fueron estadísticamente diferentes. El tiempo de máximo enriquecimiento fue de 9 y 10 horas con las microalgas *T. weissflogii* e *Isochrysis* sp., respectivamente.

El nitrógeno de la microalga *T. weissflogii* fue asimilada a una tasa de 0.81 %N corporal·hora⁻¹ y fue significativamente inferior a los valores de la tasa de asimilación de nitrógeno registradas cuando los copépodos adultos fueron alimentados con *Nannochloropsis* sp. (1.84 %N corporal·hora⁻¹) e *Isochrysis* sp. (1.64 %N corporal·hora⁻¹) y cuyas diferencias no fueron significativas (p>0.05). Los copépodos adultos alimentados con la microalga *Nannochloropsis* sp. presentaron el menor tiempo de máximo enriquecimiento (5 horas) y por consiguiente un tiempo de asimilación del nitrógeno de la dieta de más corta duración. Los copépodos adultos tardaron más tiempo en asimilar el nitrógeno de las microalgas *T. weissflogii* (8 horas) e *Isochrysis* sp. (9 horas).

Tabla 5. Parámetros de la recta de regresión $^{15}\text{N} = a + bt$ (^{15}N átom% vs. Tiempo en minutos) para determinar la tasa de asimilación de nitrógeno (A/W_b), en rotíferos alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con ^{15}N .

Microalga	t_{\max} minutos	a ^{15}N átom%	b ^{15}N átom%·min ⁻¹	r		A/W_b
				²	I_f ^{15}N átom%	
Thala	120	0.398	0.009	99.6	21.05 ^b	2.57 ^b
Nanno	90	0.388	0.010	97.7	17.53 ^a	3.42 ^c
Isoch	120	0.362	0.005	98.2	21.23 ^b	1.41 ^a

t_{\max} = Tiempo de máximo enriquecimiento con ^{15}N

a, b y r^2 = Intercepto, pendiente y coeficiente de determinación de la recta de regresión

A/W_b = Tasa de asimilación de nitrógeno

I_f = ^{15}N de la microalga enriquecida

Tabla 6. Parámetros de la recta de regresión $^{15}\text{N} = a + bt$ (^{15}N átom% vs. Tiempo en horas) para determinar la tasa de asimilación de nitrógeno (A/W_b), de copépodos en los estadios de nauplios+copepoditos combinados, alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con ^{15}N .

Microalga	t_{\max} horas	a ^{15}N átom%	b ^{15}N átom%·h ⁻¹	r		A/W_b %N corporal·h ⁻¹
				r^2 %	I_f ^{15}N átom%	
Thala	9	0.208	0.298	97.8	14.43 ^b	2.06 ^a
Nanno	3	0.447	0.512	99.1	15.2 ^b	3.37 ^b
Isoch	10	0.468	0.225	99.4	12.59 ^a	1.79 ^a

t_{\max} = Tiempo de máximo enriquecimiento con ^{15}N

a, b y r^2 = Intercepto, pendiente y coeficiente de determinación de la recta de regresión

A/W_b = Tasa de asimilación de nitrógeno

I_f = ^{15}N de la microalga enriquecida

Tabla 7. Parámetros de la recta de regresión $^{15}\text{N} = a + bt$ (^{15}N átom% vs. Tiempo en horas) para determinar la tasa de asimilación de nitrógeno (A/W_b), en copépodos adultos alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con ^{15}N .

Microalga	t_{\max} horas	a ^{15}N átom%	b ^{15}N átom%·h ⁻¹	r		A/W_b %N corporal·h ⁻¹
				r^2 %	I_f ^{15}N átom%	
Thala	8	0.355	0.116	99.1	14.43 ^{ab}	0.81 ^a
Nanno	5	0.454	0.279	98.6	15.2 ^b	1.84 ^b
Isoch	9	0.296	0.207	98.7	12.59 ^a	1.64 ^b

t_{\max} = Tiempo de máximo enriquecimiento con ^{15}N

a, b y r^2 = Intercepto, pendiente y coeficiente de determinación de la recta de regresión

A/W_b = Tasa de asimilación de nitrógeno

I_f = ^{15}N de la microalga enriquecida

Roman, C. 2013. El Isótopo ^{15}N como Indicador de la Asimilación del Nitrógeno de la Dieta en Rotíferos y Copépodos Utilizados como Alimento vivo en la Acuicultura. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 599-632.

Discusión

Los resultados de la presente investigación se obtuvieron experimentalmente siguiendo un método novedoso de dilución isotópica que consistió en alimentar a rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) cuyos tejidos corporales fueron equilibrados inicialmente con la microalga no enriquecida con ^{15}N ($< ^{15}\text{N}$ átom%) y posteriormente transferirlos a la microalga enriquecida ($> ^{15}\text{N}$ átom %) y registrar cambios consecutivos de las señales isotópicas en el tiempo (Martínez del Rio y Anderson-Sprechner, 2008).

Dada las características de las dietas, la hipótesis planteada al inicio de la investigación consistió en probar si las tres dietas monoalgales (*T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp.) tienen efecto sobre la tasa de asimilación de nitrógeno en rotíferos y copépodos. En general, los resultados mostraron claramente que ambas especies tuvieron la capacidad de utilizar nitrógeno de todas las microalgas experimentales, pero la asimilación de nitrógeno fue dependiente de la especie de microalga ofrecida como alimento, así como del estadio de desarrollo de los copépodos (copépodos adultos y nauplios+copepoditos combinados). Los rotíferos y los copépodos de ambos estadios tuvieron mayor capacidad para asimilar a la microalga *Nannochloropsis* sp., incluso los copépodos adultos tuvieron tasa de asimilación muy semejante a la obtenida con *Nannochloropsis* sp. cuando fueron alimentados con la microalga *Isochrysis* sp., mientras que en los nauplios+copepoditos combinados, la tasa de asimilación con ésta última microalga fue inferior. Lo anterior indica que los copépodos pueden cambiar su preferencia de alimentación dependiendo de los estadios de desarrollo.

La calidad nutricional de la microalga *Nannochloropsis* sp. es ampliamente reconocida, pues constituyen unas de las microalgas más utilizadas en la acuicultura comercial (Sukenik *et al.*, 1989; Duerr *et al.*, 1998) y es común encontrar que se combinen con otras especies de microalgas en los cultivos de rotíferos y copépodos. La microalga *Nannochloropsis* sp. es una célula inmóvil, con un tamaño pequeño (2-4 μm) relativo a las otras microalgas experimentales. El valor nutricional de *Nannochloropsis* sp. se basa en ser fuente de vitamina B₁₂ y ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentanoico (EPA) y en que tiene compuestos nutricionales tales como esteroides (Rocha *et al.*, 2003).

Los rotíferos, al igual que los nauplios+copepoditos combinados, asimilaron con menor eficiencia a la microalga *Isochrysis* sp., mientras que la microalga *T. weissflogii* fue la segunda más importante. Los copépodos de ambos estadios asimilaron con menor eficiencia a la microalga *T. weissflogii*. Las características de las microalgas en términos de tamaño, forma, concentración de células, calidad nutricional y la digestibilidad de las células podrían ser consideradas como el posible factor influenciando este patrón (Vincent *et al.*, 2007). Por ejemplo, Jeffrey *et al.* (1994) mencionan que las células de *Isochrysis* sp. son fácilmente asimilables debido a su pequeño tamaño, a la ausencia de una pared celular gruesa y no poseen toxinas. Sin embargo, las bajas tasas de asimilación, comparado con la microalga *T. weissflogii* y *Nannochloropsis* sp., se debieron más probablemente al exceso en la concentración de células de *Isochrysis* sp., ya que se ha observado que menores eficiencias de asimilación y mayor producción de heces está relacionada con raciones de alimentación excesivas (Yúfera y Pascual, 1985), como fue observado en el presente trabajo. Los cultivos de rotíferos con dietas monoalgales de *Isochrysis* sp., aunque inducen buenas tasas de crecimiento, contribuyen en gran medida con grandes descargas de nitrógeno particulado y no son recomendadas en los cultivos de rotíferos en grandes densidades (García Marín, 2010).

Por otra parte, Hotos (2003) menciona que la ingestión de grandes partículas (como *T. weissflogii* en este estudio) puede ser ventajosa para los rotíferos desde el punto de vista energético, puesto que se obtiene mayor energía y mejor crecimiento utilizando presas mayores. *T. weissflogii* es una diatomea caracterizada por una pared de sílice que rodea la célula y que dificulta su digestión y eficiencia de asimilación; sin embargo, los rotíferos son capaces de triturar el alimento con un estómago especializado (mastax) para macerar el alimento. Esto, probablemente explica la eficiencia de asimilación intermedia obtenida en rotíferos. Lo anterior también puede explicar por qué Rothhaupt (1995) no encontró diferencias en las tasas de crecimiento de rotíferos alimentados con dietas a base de microalgas verdes y diatomeas con pared celular de sílice.

La menor asimilación de nitrógeno de la microalga *T. weissflogii* por los copépodos (aunque no muy diferente de la tasa de asimilación obtenida para nauplios+copepoditos combinados

alimentados con *Isochrysis* sp.), puede ser el resultado de la alimentación fragmentaria (sloppy feeding) debido al gran tamaño de la microalga. Este fenómeno ha sido observado en copépodos alimentándose de microalgas de gran tamaño como *T. weissflogii*, mientras que no se presenta en microalgas pequeñas (Vincent *et al.*, 2007, Saba *et al.*, 2011) y se cree que tiene un efecto importante en la subestimación de la ingestión y la asimilación de nutrientes en copépodos alimentados con microalgas de gran tamaño (Roy *et al.*, 1989). Además, se ha encontrado que algunas diatomeas inhiben el crecimiento en algunas especies zooplactónicas, lo cual está relacionado con la producción de aldehídos (Lacoste *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados son controversiales debido a que dietas puras de diatomeas son utilizadas rutinaria y exitosamente en la acuicultura de *B. plicatilis* (Luis Villaseñor, 2003).

Con respecto a la microalga *Isochrysis* sp., constituye una microalga pequeña y móvil con un tamaño celular promedio de 5 x 3,5 µm. Su uso en el cultivo de varias especies de copépodos es relativamente común y ha sido determinado que sostiene altas tasas de producción de huevos y altas tasas de desarrollo en los estadios juveniles de copépodos calanoideos (Knuckey *et al.*, 2005); sin embargo, fue identificada como la dieta con menor tasa de asimilación de nitrógeno en los nauplios+copepoditos combinados, y pero mejor asimilado en los copépodos adultos, lo cual sugiere una posible selección de presas de acuerdo al estado de desarrollo de los copépodos.

Los nauplios del copépodo *P. euryhalinus* eclosionan del huevo y experimentan seis mudas (estadios naupliares NI a NVI) antes del cambio a copepoditos y se nutren del saco vitelino durante los estadios NI y N2. Los copepoditos también pasan por seis estadios de desarrollo, con el estadio final CVI como estado adulto (Johnson, 1948; Su *et al.*, 2005). A partir de este estadio han alcanzado la talla de 300 µm e inicia el periodo de reproducción y en la formación de sacos ovígeros por las hembras (Flores Santana, 2008). Considerando el desarrollo vital anterior de los copépodos, separamos a los copépodos alimentados con las tres microalgas experimentales en dos grupos de tamaños para separar el efecto del estado reproductivo (copépodos adultos >300µm) y del crecimiento somático (nauplios+copepoditos <300µm), sobre la asimilación de nitrógeno. Aunque se esperaba observar una cierta preferencia de los nauplios+copepoditos combinados por las microalgas más pequeñas (*Nannochloropsis* sp., e *Isochrysis* sp.), los nauplios+copepoditos también asimilaron cantidades importantes de

nitrógeno de la microalga *T. weissflogii*, mientras que los copépodos adultos presentaron la menor asimilación de nitrógeno con esta última microalga. Las diferencias probablemente se vean enmascaradas por la combinación de nauplios+copepoditos, puesto que se ha observado en otros copépodos calanoideos, que los estadios naupliares prefieren presas de menor tamaño, mientras que los copepoditos y los copépodos adultos muestran cierta preferencia por células de mayor tamaño, sin discriminar a las más pequeñas (Bonnet y Carlotii, 2001).

Finalmente, fue observado que los copépodos adultos presentaron tasas de asimilación de nitrógeno, inferiores al nitrógeno asimilado por los nauplios+copepoditos combinados, lo cual se debe probablemente a que están utilizando rápidamente el nitrógeno para maximizar la producción de huevos.

Conclusiones

La técnica del ^{15}N enriquecido mostró ser reproducible y eficaz para definir la significancia de la asimilación de nitrógeno en la alimentación de rotíferos y copépodos. Los valores mayores de la asimilación de nitrógeno, obtenidos con la microalga *Nannochloropsis* sp., confirman los buenos resultados que se tienen al utilizarla como alimento en los cultivos de rotíferos y copépodos. La microalga *T. weissflogii* constituye una buena alternativa para enriquecer el contenido de nitrógeno en rotíferos y copépodos (nauplios+copepoditos). La menor tasa de asimilación de nitrógeno en rotíferos y copépodos (nauplios+copepoditos) alimentados con *Isochrysis* sp., se debe probablemente a su baja digestibilidad, debido a que se ha reportado que la alimentación con ésta microalga contribuye con grandes descargas de nitrógeno particulado al medio de cultivo. Las menores tasas de asimilación de nitrógeno registradas en los copépodos adultos, se debe probablemente a que están utilizando rápidamente el nitrógeno para maximizar la producción de huevos.

Agradecimientos

Agradecemos al Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa (Proyecto PROFAPI-2011/155), por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Referencias

- Abou Debs, C. 1984. Carbon and nitrogen budget of the calanoid copepod *Temora stylifera*: effect of concentration and composition of food. *Marine Ecology Progress Series* 15: 213-223.
- Alm, L. 1981. The effect of fermentation on the biological value of milk proteins evaluated using rats. A study on Swedish fermented milk products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31: 1247-1253.
- Aoki, S., Kanda, J. y Hino, A. 1995. Measurements of the nitrogen budget in the rotifer *Brachionus plicatilis* by using ^{15}N . *Fisheries science* 61: 406-410.
- Baer, A, Langdon, C, Mills, S., Schulz, C., y Hamre, K. 2008. Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* “Cayman” using polystyrene latex beads. *Aquaculture* 282: 75–82
- Bakonyi, G. 1998. Nitrogen Turnover of *Sinella Coeca* (Collembola: Emtombryidae). *European Journal of Entomology* 95: 321-326.
- Bonnet, D. y Carlotii F. 2001. Development and eggs production in *Centropages typicus* (Copepoda: Calanoida) fed different food types: a laboratory study. *Marine Ecology and Progress Series* 224: 133-148
- Boschker, H.T.S. y Middelburg J.J. 2002. Minireview: Stable isotope and biomarker in microbial biology. *FEMS Microbial Ecology* 40: 85-95.
- Braude, R., Mitchell, K.G., Newport, M.J. y Porter, J.W. 1970. Artificial rearing of pigs. 1. Effect of frequency and level of feeding on performance and digestion of milk protein. *British Journal of Nutrition* 24: 501–516.
- Cheng, S.H., Aoki, S., Maeda M. y Hino, A. 2004. Competition between the rotifer *Brachionus rotundiformis* and the ciliate *Euplotes vannus* fed on two different algae. *Aquaculture* 241: 331-343.
- Comtet, T. y Riera, P. 2006. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ changes after dietary shift in veliger larvae of the slipper limpet *Crepidula fornicata*: an experimental evidence. *Helgological Marine Research* 60: 281-285.
- Conceição, L.E.C., Morais, S.J. y Rønnestad, I. 2007. Tracers in fish larvae nutrition: an overview of tools and applications. *Aquaculture* 267: 62-75.
- Duerr, E.O., Molnar, A. y Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology* 6:65–70.
- Flores Santana, R.E. 2008. Variación en el contenido de ácidos grasos del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939) alimentado con las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur. México. 52 p.

- García Marín, M.E. 2010. Balance de nitrógeno del rotífero *Brachionus plicatilis* (s.s.) “10-2003” alimentado con dos especies de microalgas, utilizando el ^{15}N enriquecido como trazador. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, Sinaloa. México. 42 p.
- Guillard, R.R.L. y Rhyther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal Microbiology. 8: 229–239.
- Hasegawa, T., Koike, I., y Mukai, H. 2001. Fate of food nitrogen in marine copepods. Marine Ecology Progress Series 210: 167-174.
- Hino, A., Aoki, S. y Ushiro, M. 1997. Nitrogen-flow in the rotifer *Brachionus rotundiformis* and its significance in mass cultures. Hydrobiologia 358: 77-82.
- Hotos, G.N. 2003. Growth, filtration and ingestion rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed with large (*Asteromonas gracilis*) and small (*Chlorella* sp.) celled algal species. Aquaculture Research 34: 793-802.
- Jeffrey, S.W., Brown, M.R. y Garland, C.D. 1994. Microalgae for mariculture. Final report to fisheries research and development council on FIRTA grant 86/81 and 47 FIRDC grant 90/63. Division of Fisheries. Miscellaneous Publication. CSIRO Australia. 79 p.
- Johnson, M.W. 1948. The postembryonic development of the copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* Johnson, and its phylogenetic significance. Transaction of the American Microscopic Society 68: 319-330.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J. y Rimmer, M.A. 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. Aquaculture 249: 339-351.
- Kreeger, D.A., Hawkins, A.J.S. y Bayne, B.L. 1996. Use of dual-labeled microcapsules to discern the physiological fates of assimilated carbohydrate, protein carbon, and protein nitrogen in suspension-feeding organisms. Limnology and Oceanography 41:208-215.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M. y Poulet, S.A. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Diseases of Aquatic Organisms 46: 139-145.
- Loick-Wilde, N., Dutz, J., Miltner, A., Gehre, M., Montoya, J.P. y Vossa, M. 2012. Incorporation of nitrogen from N_2 fixation into amino acids of zooplankton. Limnology of Oceanography 57: 199-210.
- Luis Villaseñor, I.E. 2003. Cultivos de larvas mysis de *Litopenaeus vannamei* con el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentadas con dos especies de diatomeas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México. 37 p.
- Martínez del Río, C. y Anderson-Sprecher, R. 2008. Beyond the reaction progress variable: the meaning and significance of isotopic incorporation data. Oecologia 156: 765–772.

- Nagata, W. D. 1989. Nitrogen flow through a *Brachionus/Chlorella* mass culture system. *Hydrobiologia* 186/187: 401-408.
- Otsuki, A., Seki, H., McAllister, C.D. y Levings, C.D. 1987. Measurement of net growth rates of herbivorous benthic animals using periphyton labeled simultaneously with ^{13}C and ^{15}N . *Limnology and Oceanography* 32: 499-503.
- Owens, N. 1987. Natural variations in ^{15}N in the marine environment. *Advanced in Marine Biology* 24: 390-451.
- Peters, R.H. 1984. Methods for the study of feeding, grazing and assimilation by zooplankton. In Downing, J. A. & F. H. Rigler (eds) *A manual for the assessment of secondary production in fresh waters*. IBP Handbook 17 (2nd edn., 36-412 p.). Blackwell, Oxford, 336-412.
- Peterson, B.J. y Fry, B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematic* 18: 293-320.
- Preston, N.P., Smith, D.M., Kellaway, D.M. y Bunn, S.E. 1996. The use of enriched ^{15}N as an indicator of the assimilation of individual protein sources from compound diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 147: 249-259.
- Puello-Cruz, A. C., Gonzales-Rodríguez, B. y García-Ortega, A. 2008. Investigación en producción y uso del copépodo larvario. *Avances en Nutrición Acuícola IX/IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad en Acuicultura y Manejo Ambiental. 90-107 p.
- Rennie, M.J., Tadros, L. y Khogali, S. 1994. Glutamine transport and its metabolic effects. *Journal of Nutrition* 124: 1503S-8S.
- Rocha, J.M., Gracia, J.E. y Henriques, M.H. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana* *Biomolecular Engineering* 20 (4-6): 237242.
- Ronneberger, D. 1998. Uptake of latex beads as size-model for food of planktonic rotifers. *Hydrobiologia* 387/388: 445-449.
- Rothhaupt, K.O. 1995. Algal nutrient limitation affects rotifer growth rate but not ingestion rate. *Limnology and Oceanography* 40: 1201-1208.
- Roy, S. H., Deluca, C. J. y Casavant, D. A., 1989. Lumbar muscle fatigue and chronic lower back pain. *Spine* 14: 992-1001.
- Saavedra, M., Beltrán, M., Pousão-Ferreira, P., Dinis, M.T., Blasco, J. y Conceição, L.E.C., 2007. Evaluation of bioavailability of individual amino acids in *Diplodus puntazzo* larvae: towards the ideal dietary amino acid profile. *Aquaculture* 263: 192-198.
- Saba, G.K., Steinberg, D.K. y Bronk, D.A. 2011. The relative importance of sloppy feeding, excretion, and fecal pellet leaching in the release of dissolved carbon and nitrogen by *Acartia tonsa* copepods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 404: 47-56.

- Schlechtriem, C., Focken, U. y Becker, K. 2004. Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. *Aquatic Ecology* 38: 93-100.
- Sorokin, C. 1973. Dry Weight, Packed Cell Volume and Optical Density. En: Stein, J. R. (Ed.). *Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth. Measurements*: 321-343. Cambridge University Press. Cambridge, MA.USA. 448 pp
- Su, H.M., Cheng, S.H., Chen, T.I. y Su, M.S. 2005. Culture of copepods and application to marine finfish larval rearing in Taiwan. En: *Copepods in Aquaculture* (Ed. By C.S. Lee, P.J. O'Bryen, N.H. Marcus. 183-104 p. Blackwell Publishing Ltd., UK.
- Sukenik, A., Falkowski, P.G. y Bennet, J. 1989. Energy transfer in the light-harvesting complex II of *Dunaliella teriolecta* is unusually sensitive to Triton X-100. *Photosynthesis Research* 21: 37-44.
- Tanaka, Y. 1991. Nitrogen budget for the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 22:57-64.
- Teixeira, P.F., Kaminski, S.M., Avila, T.R., Cardozo, A.P., Bersano, J.G.F. y Bianchini, A. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82: 333-339.
- Twarowska, G.T., Westermam, W.P. y Losordo, M.T. 1997. Water treatment and waste characterization evaluation of an intensive recirculating fish production system. *Aquaculture Engineering* 16: 133-147.
- Vadstein, O., Oie, G. y Olsen, Y. 1993. Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. En: J. J. Gilbert, E. Lubzens y M. R. Miracle (eds), *Rotifer Symposium VI. Hydrobiologia* 255/256 : 261-267.
- Verschoor, A.M., Boonstra, H. y Meijer, T. 2005. Application of stable isotope tracers to studies of zooplankton feeding, using the rotifer *Brachionus calyciflorus* as an example. *Hydrobiology* 546: 535-549.
- Vincent, D., Slawyk, G., L'Helguen, S., Sarthou, G., Gallinari, M., Seuront, L., Sautour, B. y Ragueneau, O. 2007. Net and groos incorporation of nitrogen by marine copepods fed on ¹⁵N-labelled diatoms: Methodology and trophic studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352: 295-305.
- Wikfors, G.H. y Ohno, M. 2001. Impact algae research in aquaculture. *Journal of Phycology* 37: 968-974.
- Yúfera, M. y Pascual, E. 1985. Effects of algal food concentration on feeding and ingestión rates of *Brachionus plicatilis* in mass cultura. *Hydrobiology* 122: 181-187.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Fourth edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 663p.