

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



EFFECTO DE LA MICROALGA *Tetraselmis suecica* EN EL DESARROLLO DEL TRACTO DIGESTIVO Y CRECIMIENTO DE LARVAS DEL PARGO LUNAREJO (*Lutjanus guttatus*)

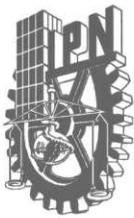
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

EVA NIDIA OSUNA PALAFOX

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 9 del mes de Junio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"EFECTO DE LA MICROALGA *Tetraselmis suecica* EN EL DESARROLLO DEL TRACTO DIGESTIVO Y CRECIMIENTO DE LARVAS DEL PARGO LUNAREJO (*Lutjanus guttatus*)"

Presentada por el alumno:

OSUNA PALAFIX EVA NIDIA
Apellido paterno materno nombre(s)
Con registro:

A	1	3	0	3	9	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DRA. SILVIE DUMAS
Director de Tesis

DR. JUAN CARLOS PÉREZ URBIOLA
2º. Director de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ

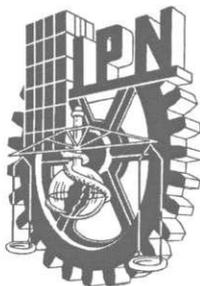
DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 18 del mes Junio del año 2015
el (la) que suscribe ING. EVA NIDIA OSUNA PALAFOX alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A130396 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DRA. SILVIE DUMAS Y DR. JUAN CARLOS PÉREZ URBIOLA
y cede los derechos del trabajo titulado:

"EFECTO DE LA MICROALGA *Tetraselmis suecica* EN EL DESARROLLO DEL TRACTO
DIGESTIVO Y CRECIMIENTO DE LARVAS DEL PARGO LUNAREJO (*Lutjanus guttatus*)"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: osuna_palafox7@hotmail.com - silviedumas@hotmail.com - jperez@cibnor.mx
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


ING. EVA NIDIA OSUNA PALAFOX

nombre y firma

DEDICATORIA

A mis padres José Ramón y Victoria, por su amor, trabajo y dedicación en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Ha sido y será un privilegio ser su hija, son los mejores, los amo.

A mis hermanos Greysi, Juan José, Daniela y mi sobrinita María José que con su amor me han enseñado a salir adelante. Gracias por su paciencia, gracias por preocuparse por su hermana, gracias por compartir sus vidas, pero sobre todo, gracias por estar en otro momento tan importante en mi vida.

A David, mi gran amor por ser mi compañero inseparable de cada día, por ser mi fortaleza y mi pilar, te amo.

AGRADECIMIENTOS

- Al instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por su invaluable formación tanto profesional como personal.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional, por las becas otorgadas para el apoyo de mis estudios de posgrado.
- Al comité revisor de mi tesis: Dra. Silvie Dumas; Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola; Dra. Bárbara González Acosta; Dr. Renato Peña Martínez; Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz, por sus acertados comentarios y revisiones.
- Al personal que laboró a mi paso por la Unidad Piloto de Maricultivos del CICIMAR, los cuales forman un excelente grupo de trabajo: Dra. Silvie Dumas, M. en C. Mauricio Contreras, Dr. Renato Peña, Biol. Laura Flores, M. en C. Ivette Moguel, M. en C. Margarita Rosa Rangel Durán, por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo por su gran amistad.
- Al personal que laboro a mi paso por CIBNOR en el laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, el laboratorio de Patogénesis Microbiana, laboratorio de Bioquímica Fisiológica, laboratorio de Edafología y el laboratorio de Diagnóstico Parasitológico, gracias por el apoyo durante el desarrollo de este trabajo a Manuel Trasviña, Roberto Hernández, Dra. Martha Reyes, Jorge Sandoval Soto, Gilberto Colado, especialmente a la M. en C. Roxana Bertha Inohuye Rivera, Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola, Biol. Patricia Hinojosa Baltazar y al Dr. Dariel Tovar Ramírez, por su asesoría en la realización de este trabajo y por su gran amistad.
- Al Dr. Leonardo Ibarra del CIAD de Mazatlán, por proporcionarme el desove para la realización de este proyecto de tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
ABREVIATURAS	9
GLOSARIO	10
I. INTRODUCCIÓN	12
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
III. ANTECEDENTES	16
IV. JUSTIFICACIÓN	22
V. HIPÓTESIS	23
VI. OBJETIVOS	24
VII. METODOLOGÍA	25
VII.1. Cultivo Larvario	25
VII.2. Inicio de Alimentación Exógena	25
VII.3. Análisis Bioquímicos	26
VII.3.1. Obtención del Extracto	26
VII.3.2. Concentración de Proteínas	27
VII.3.3. Determinación de Tripsina	27

VII.3.4. Determinación de Quimotripsina	27
VII.3.5. Determinación de Lipasa	28
VII.3.6. Determinación de Fosfatasa Alcalina	28
VII.4. Análisis Estadísticos	28
VIII. RESULTADOS	29
VIII.1. Actividad enzimática digestiva	29
VIII.2. Actividad enzimática de <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Pseudodiptomus euryhalinus</i> .	39
VIII.3. Efecto de los regímenes alimentarios sobre el crecimiento de las larvas.	41
IX. DISCUSIÓN	42
X. CONCLUSIONES	46
XI. RECOMENDACIONES	47
XII. REFERENCIAS	48

RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar el efecto de la microalga *Tetraselmis suecica* en la actividad enzimática y el crecimiento de larvas del pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*). Se obtuvo un desove de 230 mL, los huevos viables fueron incubados en tanques cónicos y las larvas eclosionadas fueron sembradas en tanques de 100 L. Las larvas fueron expuestas a cuatro tratamientos 1) Inanición, 2) *Tetraselmis suecica*, 3) *Pseudodiaptomus euryhalinus* y 4) Combinación: *Tetraselmis suecica* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Se realizaron muestreos en los días 1, 2, 3, 4, 5 y 6 después de la eclosión (DDE), determinándose en cada uno de ellos la concentración de proteína, así como también la actividad de las enzimas digestivas (lipasa, tripsina y quimotripsina) y de la enzima metabólica fosfatasa alcalina. Estas determinaciones se llevaron a cabo usando técnicas de fluorescencia. Se observó actividad de enzimas digestivas y metabólicas a partir del día 3 al 5 DDE en todos los tratamientos pero no se observaron diferencias significativas entre días y tratamientos. Las actividades enzimáticas presentaron el mismo patrón de cambio temporal que se observa en otras especies, sin embargo, los valores fueron más altos. Las larvas sobrevivieron hasta el día 5 DDE excepto en el tratamiento de combinación (*Tetraselmis suecica* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*). En este tratamiento se observaron diferencias significativas en la actividad de lipasa ($P=0.03$) y fosfatasa alcalina ($P=0.001$) entre los días, siendo significativamente más alta la actividad específica de lipasa 1371.31 ± 658.29 (U mg^{-1} de proteína) y fosfatasa alcalina 206.03 ± 12.70 (U mg^{-1} de proteína) en el día 6. Se cuantificó la actividad enzimática de *Tetraselmis suecica* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*, obteniendo en *Tetraselmis suecica* una mayor actividad específica en fosfatasa alcalina, y en *Pseudodiaptomus euryhalinus* en tripsina. Al evaluar el crecimiento de las larvas no se encontraron diferencias significativas entre días ($P=0.96$) y tratamientos ($P=0.99$). Se concluye que la presencia de *Tetraselmis suecica* no aumentó la actividad enzimática en los primeros días de desarrollo de las larvas, sin embargo, se observó un efecto de la microalga en la ingesta de la presa ya que la incidencia alimenticia fue más elevada en el tratamiento de combinación que en el tratamiento de *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

ABSTRACT

A study was conducted to determine the effect of the microalgae *Tetraselmis suecica* in the enzyme activity and growth of spotted rose snapper larvae (*Lutjanus guttatus*). A spawning of 230 mL was obtained, viable eggs were incubated in conical tanks and the hatched larvae were placed in 100 L tanks. Larvae were subjected to four treatments 1) Starvation, 2) *Tetraselmis suecica*, 3) *Pseudodiaptomus euryhalinus* and 4) Combination: *Tetraselmis suecica* and *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Samples were taken on days 1, 2, 3, 4, 5 and 6 after hatching (DDE). Protein concentration was determined using fluorescence techniques, as well as the activity of digestive enzymes (lipase, trypsin and chymotrypsin) and the metabolic alkaline phosphatase enzyme. Activities of digestive and metabolic enzymes were observed from day 3 to 5 DDE in all treatments but there were no significant differences between days and treatments. Enzyme activities showed the same pattern of temporal change observed in other species, however, values were higher. The larvae survived until 5 DDE except in combination treatment (*Tetraselmis suecica* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*). In this treatment significant differences were observed in the activity of lipase ($P=0.03$) and alkaline phosphatase ($P=0.001$) between days, still significantly higher specific activity of lipase 1371.31 ± 658.29 (U mg^{-1} de proteína) and alkaline phosphatase 206.03 ± 12.70 (U mg^{-1} de proteína) in day 6. The enzymatic activity of *Tetraselmis suecica* and *Pseudodiaptomus euryhalinus* was quantified, obtaining a higher specific activity alkaline phosphatase, and *Pseudodiaptomus euryhalinus* in *Tetraselmis suecica* in trypsin. There were no significant differences in the growth of larvae between days ($P=0.96$) and treatments ($P=0.99$). It is concluded that the presence of *Tetraselmis suecica* did not increase enzyme activity in the first days of development of the larvae, however, an effect of the microalgae in the intake of the preys was observed. Feeding incidence was higher in the Combination treatment than in the treatment *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Larvas de <i>Lutjanus guttatus</i> (aumento 4x), a) Larva pos – Eclosión, b) Larva vitelina 1 DDE, c) Larva al inicio de la alimentación exógena 3 DDE, Larvas con presencia de alimento en su tracto digestivo 4 DDE d) Tratamiento de Microalga (<i>Tetraselmis suecica</i>), e) Tratamiento de Nauplios (<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>), f) Tratamiento Combinación (<i>Tetraselmis suecica</i> y nauplios de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>	30
Figura 2. Actividad específica de la lipasa (U/mg de proteína) registrada en larvas de <i>Lutjanus guttatus</i> , los primeros días después de la eclosión en los cuatro tratamientos.....	31
Figura 3. Actividad específica de tripsina (U/mg de proteína) registrada en larvas de <i>Lutjanus guttatus</i> , los primeros días después de la eclosión en los cuatro tratamientos.....	33
Figura 4. Actividad específica de quimotripsina (U/mg de proteína) registrada en larvas de <i>Lutjanus guttatus</i> , los primeros días después de la eclosión en los cuatro tratamientos.	36
Figura 5. Actividad específica de fosfatasa alcalina (U/mg de proteína) registrada en larvas de <i>Lutjanus guttatus</i> , los primeros días después de la eclosión en los cuatro tratamientos.....	37
Figura 6. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de a) Microalga (<i>Tetraselmis suecica</i>) y b) Nauplio (<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>).....	40
Figura 7. Longitud promedio de larvas de <i>Lutjanus guttatus</i>	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia alimenticia de larvas del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* que presentan alimento en su tracto digestivo en los días 3, 4, 5 y 6 después de la eclosión y bajo los siguientes tratamientos: Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (*Tetraselmis suecica* /nauplio de *Pseudodiaptomus euryhalinus*).....29

Tabla 2. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de lipasa durante los primeros días de desarrollo larvario de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* bajo 4 tratamientos: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (*Tetraselmis suecica* /nauplio de *Pseudodiaptomus euryhalinus*).....32

Tabla 3. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de tripsina durante los primeros días de desarrollo larvario de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* bajo 4 tratamientos: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (*Tetraselmis suecica* /nauplio de *Pseudodiaptomus euryhalinus*).....34

Tabla 4. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de quimotripsina durante los primeros días de desarrollo larvario de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* bajo 4 tratamientos: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (*Tetraselmis suecica* /nauplio de *Pseudodiaptomus euryhalinus*).....35

Tabla 5. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de fosfatasa alcalina durante los primeros días de desarrollo larvario de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* bajo 4 tratamientos: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (*Tetraselmis suecica* /nauplio de *Pseudodiaptomus euryhalinus*).....38

ABREVIATURAS

EPA	Ácido eicosapentaenoico
AA	Ácido araquidónico
DHA	Ácido docosahexaenoico
PUFA	Por sus siglas en inglés ácidos grasos poliinsaturados
mg	Miligramos
g	Gramos
ej.	Ejemplo
DDE	Días después de la eclosión
mL	Mililitros
L	Litros
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros
mM	Milimoles
min	Minutos
desv est	Desviación estándar
U	Unidad
mm	Milímetros

GLOSARIO

Absorción: Es la atracción y retención de alguna sustancia (Tucker, 1998).

Alimentación: Se define como el proceso de captura e ingesta del material de origen biológico necesario para el funcionamiento de los organismos vivos. Estos compuestos contienen cantidades variables de agua, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y otros compuestos, incluyendo los que imparten aroma, sabor y color (Bdai, 1988).

Alimento endógeno: Alimento proveniente de la parte interna del mismo cuerpo (ej. vitelo) (Tucker, 1998).

Alimento exógeno: Alimento de origen externo (ej. Alimento vivo) (Tucker, 1998).

Eclosión.- Proceso en el cual se rompe el corion o envoltura del huevo y emerge la larva vitelina (Balon, 1984).

Enzima: Proteína que cataliza una reacción química específica (Alberts *et al.*, 1996).

Glóbulo de aceite: Lisosomas modificados que adquieren forma esférica y que se forman al fusionarse las vesículas de vitelo, muchas especies presenta uno o más glóbulos en, o cerca de la masa vitelina. Sirve inicialmente como una estructura de flotación o equilibrio y que al consumirse es utilizado como fuente de energía (Kamler, 2008).

Glucógeno: Polisacárido compuesto exclusivamente por unidades de glucosa, utilizado para almacenar energía en las células animales (Alberts *et al.*, 1996).

Carbohidrato complejo (polisacárido) que mediante hidrólisis se libera glucosa (Curtis & Barnes, 2001).

Huevo: En peces su desarrollo comprende dos fases del desarrollo embrionario; segmentación y embrión. Inicia desde que es fecundado el ovocito y termina en el momento de la eclosión (Balon, 1984).

Incidencia alimenticia: Proporción de larvas que presentan alimento en el tubo digestivo (Yin & Blaxter, 1987).

Nauplio: La forma larval más simple de los crustáceos, se presenta en algunos miembros de todas las clases incluidos copépodos y artemias (Tucker, 1998).

Ontogenia: Comprende la serie de cambios morfofisiológicos que ocurren durante el ciclo de vida de los animales, incluyendo a los peces (Balon, 1984).

Proteína: Principal constituyente macromolecular de las células. Polímero de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, siguiendo una secuencia determinada (Alberts *et al.*, 1996).

Sustrato: Compuesto específico sobre el cual actúa una enzima (Curtis & Barnes, 2001).

Vitelo: Sustancia nutritiva del embrión al iniciarse el desarrollo, que se encuentra acumulado en la célula sexual femenina; sus componentes principales son: proteínas, fosfolípidos y en menor grado grasas neutras y carbohidratos (fosfoglucolipoproteína) (Balinsky, 1983).

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la acuicultura de peces marinos se ha consolidado como una alternativa con amplio potencial de desarrollo y con grandes expectativas económicas, sin embargo dista mucho de convertirse en una solución de los problemas alimenticios de los países en vías de desarrollo (Rana, 1997). En años recientes se ha logrado el desarrollo y optimización de la tecnología del cultivo en jaulas, así como al mejoramiento de las técnicas de producción de juveniles. Gracias a estos avances, se ha incrementado el número de especies sobre las cuales se desea desarrollar tecnología de cultivo que permita llevar estas nuevas especies a una escala industrial. Sin embargo, cuando se trata de desarrollar tecnologías para el cultivo de nuevas especies, la obtención de juveniles de forma constante y en las cantidades adecuadas para que este negocio sea rentable y atractivo para los inversionistas sigue siendo un reto (Bass *et al.*, 1992; Álvarez-Lajonchere *et al.*, 1994).

Entre las especies de peces marinos más importantes en la acuicultura se encuentran especies de la familia Lutjanidae denominados lutjánidos o pargos, los cuales han sido desovados espontánea o artificialmente en cautiverio, aunque la principal dificultad estriba en que las larvas mueren durante los primeros días después de eclosionar, o durante la metamorfosis (Emata *et al.*, 1994, Avilés-Quevedo *et al.*, 1996, Leu *et al.*, 2003, Ibarra *et al.*, 2004, Ogle & Lotz, 2006). Los pargos se consideran especies con potencial para la acuicultura comercial (Tucker & Jory, 1991; Bennetti & Wilson, 1996; Leu *et al.*, 2003; Dumas *et al.*, 2004; Ogle & Lotz, 2006). *Lutjanus guttatus* es una de las especies que presenta características interesantes para la acuicultura (Cano, 2003; Ibarra *et al.*, 2004). Se ha reportado que esta especie acepta alimento en forma de pienso, se puede mantener en jaulas sin presentar un comportamiento agresivo (Olivares & Boza, 1999), y es posible controlar su reproducción (Valverde & Boza, 1999; Cano, 2003). Además, el pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) es una de las especies consideradas como un importante recurso pesquero con un alto valor comercial en los mercados tanto nacionales como internacionales (Davis *et al.*, 2000). En el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán (CIAD) se

ha demostrado la factibilidad de su cultivo (Ibarra & Duncan 2007; Duncan *et al.*, 2008; García-Ortega, 2009; Ibarra-Castro & Álvarez-Lajonchère, 2009).

Los Lutjanidos son larvas que presentan un desarrollo indirecto. En el momento de la eclosión, las larvas presentan un desarrollo incipiente. El sistema digestivo se observa como un simple tubo recto y corto sin diferenciación. Además, las larvas tienen desventajas durante este periodo ya que fisiológicamente su sistema digestivo no está totalmente desarrollado. La actividad enzimática es relativamente baja al inicio de la alimentación exógena y se incrementa gradualmente durante el periodo larvario, hasta que se desarrolla totalmente el sistema digestivo (ej., estómago funcional con glándulas gástricas) y se da la secreción de ácido clorhídrico y pepsina (Walford & Lam, 1993). La falta de desarrollo a nivel digestivo representa un limitante para que se desarrolle con éxito el cultivo larvario de estas especies. Es por eso que el inicio de la alimentación exógena es un paso crucial ya que se debe satisfacer los requerimientos nutrimentales, mediante una alimentación apropiada que es indispensable para alcanzar la transformación a la etapa juvenil.

Todas las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal son complementarias, ya que en combinación logran realizar la digestión total de los nutrientes y la liberación de los monómeros que los componen, para así permitir su absorción y transporte al interior de las células epiteliales (Zambonino-Infante & Cahu, 2001). Cada enzima se presenta en diferentes tiempos del desarrollo larval y su propia actividad ayuda a determinar la capacidad digestiva de las larvas (Zambonino-Infante & Cahu, 2001).

El estudio de la actividad enzimática es importante ya que se ha comprobado que la presencia y actividad de algunas enzimas es un buen indicador del estado nutricional de la larva, y pueden ser relevantes para establecer el momento óptimo para iniciar el destete o adecuación alimentaria (Ueberschär, 1993). La información obtenida permite también realizar comparaciones del desarrollo larvario entre especies con un potencial acuícola, e incluso la posibilidad de utilización de dietas artificiales para reducir los costos de producción en los criaderos.

El propósito del presente estudio es evaluar si la presencia de microalga *Tetraselmis suecica* es capaz de aumentar la actividad enzimática del tracto

digestivo de las larvas de Pargo Lunarejo (*Lutjanus guttatus*) mediante la evaluación de enzimas digestivas participantes tanto en la digestión como en la absorción del alimento.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales problemas del cultivo de peces marinos es la alta mortalidad de las larvas en los primeros días de desarrollo lo cual se explica en parte por un desarrollo morfológico incipiente de los sistemas sensorial y digestivo (Walford y Lam, 1993) así como fisiológico. También uno de los factores que afecta significativamente la supervivencia y crecimiento de las larvas en el inicio de la alimentación exógena es la ausencia o inadecuada disponibilidad de alimento, provocando que estos primeros días de cultivo sean considerados una etapa crítica en la producción (Moguel – Hernández, 2010).

En este trabajo, se realizó un experimento dirigido hacia la evaluación del efecto de una microalga la *Tetraselmis suecica* sobre la fisiología digestiva de las larvas en los primeros días de desarrollo. Para eso, se utilizaron cuatro regímenes alimentarios: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplio (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) y una Combinación la cual consiste en la mezcla de microalga y nauplio. Se evaluaron enzimas digestivas participantes tanto en la digestión como en la absorción del alimento.

III.ANTECEDENTES

Las larvas de peces, más concretamente las de peces marinos, son las formas funcionales e independientes más pequeñas de los vertebrados. A pesar de esto poseen tasas de crecimiento muy elevadas y una progresiva diferenciación durante la etapa larvaria hasta completar el desarrollo de sus órganos y funciones en las fases juvenil y adulta (Blaxter, 1988). Para llevar a cabo con eficiencia todos estos cambios, la larva debe estar capacitada para ingerir (acción que implica la búsqueda y captura del alimento) y procesar (digestión, absorción y metabolismo) el alimento. Balon (1975) distingue cinco periodos a lo largo del desarrollo de un pez: embrionario, larval, juvenil, adulto y senescente. En todas las especies la duración de cada una de estas fases está influenciada tanto por factores ambientales (temperatura del agua, fotoperiodo) como nutricionales (cantidad y calidad del alimento). El periodo larval incluye cuatro estadios de desarrollo: larva vitelina, larva pre-flexión, larva flexión y larva post-flexión (Kendall *et al.*, 1984). Cada estadio de desarrollo presenta características asociadas a cambios en las diferentes prioridades durante el crecimiento. De esta forma, durante los estadios de larva vitelina y larva pre-flexión, la prioridad es incrementar las posibilidades de supervivencia a través de la capacidad alimenticia y de evasión de depredadores, lo cual se ve reflejado en una mayor diferenciación de estructuras asociadas a estas funciones (Zavala- Leal *et al.*, 2011). La larva flexión se caracteriza por presentar un mayor grado de funcionalidad de los órganos y estructuras desarrolladas anteriormente. Finalmente, durante el estadio de larva post-flexión se presentan los cambios más agudos con respecto a la funcionalidad de los órganos ya desarrollados (Zavala- Leal *et al.*, 2011).

Las larvas de la mayoría de los peces marinos eclosionan con un sistema digestivo poco desarrollado que consiste en un simple tubo recto y corto sin mayor diferenciación. Cuando las reservas endógenas del pez se han agotado, inicia la alimentación exógena y la larva tiene que adiestrarse rápidamente para alimentarse de presas vivas. El inicio de la alimentación exógena es un paso crucial para continuar un desarrollo adecuado y satisfacer los requerimientos nutrimentales, mediante una alimentación apropiada que es indispensable para alcanzar la

transformación a la etapa juvenil. Durante la etapa larval, el desarrollo del canal alimentario sufre cambios morfológicos, fisiológicos e histológicos sincronizados por procesos genéticos y ambientales (Govoni, 1980). El desarrollo del sistema digestivo involucra la apertura de la cavidad bucal, la formación de la conexión entre el esófago y el intestino, y la activación funcional del hígado y el páncreas, para permitir a la larva la ingestión, la digestión y la asimilación del primer alimento exógeno antes de que el saco vitelino sea completamente reabsorbido (Ostaszewska, 2002; Sánchez *et al.*, 2005). El tamaño de la boca está relacionado con la cantidad y el tipo de presas consumidas por la larva, además otras características morfológicas asociadas al aparato mandibular, como presencia de faringe succionadora y boca protráctil. Igualmente los ojos pigmentados, el sistema digestivo funcional (hígado y páncreas) y una buena capacidad natatoria favorecen la captura, la ingestión y la asimilación de las presas (Meza & Figueroa, 2002).

En cultivo, la alimentación de las larvas se ha reducido a un pequeño número de presas como microalgas (2-20 μm), rotíferos (50-250 μm) (Civera *et al.*, 2004) y copépodos (nauplios 50-80 μm , adultos de 200 a 300 μm). Según Muller-Feuga (2000) las microalgas son necesarias para la nutrición de larvas durante un breve periodo, ya sea para consumo directo en el caso de los moluscos y camarones peneidos o indirectamente como alimento para larvas de peces. Los géneros de microalga más utilizados en cultivos marinos son *Chlorella* sp, *Tetraselmis* sp, *Isochrysis* sp, *Pavlova* sp, *Phaeodactylum* sp, *Cheatoceros* sp, *Nannochloropsis* sp, *Skeletonema* sp y *Thalassiosira* sp. Está comprobado que la combinación de las diferentes especies de microalgas proporciona una nutrición más equilibrada que una dieta monoalgal (Spolaore *et al.*, 2006). El contenido de proteínas y vitaminas, es un factor importante para determinar el valor nutricional de las microalgas. Además, el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (por ejemplo el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido araquidónico (AA), y ácido docosahexaenoico (DHA) es de gran importancia).

En peces, al utilizar microalgas en los cultivos con la técnica de agua verde se han detectado varios efectos benéficos como el de estabilizar la calidad de agua en sistemas de cultivo estáticos, permitir que el valor nutritivo del alimento vivo en los tanques de cultivo se mantenga (Kraul, 1989), ayudar a incrementar el éxito de

alimentación al producir un contraste mayor con la presa, además de tener un efecto de control microbiano en el tanque al consumir los nutrientes. Makridis *et al.* (2006) y Rocha *et al.* (2008) comprobaron que el uso de agua verde en el cultivo de peces marinos mejora la supervivencia, crecimiento y la ingestión de alimento. Cahu *et al.* (1998) probaron *Isochrysis galbana* en el cultivo de *Dicentrarchus labrax*, obteniendo al día 32, 18% más de supervivencia que en ausencia de microalga. Se observa un incremento en la actividad de la enzima tripsina y al día 26, un aumento en las actividades de la fosfatasa alcalina y maltasa. Así también Reitan *et al.*, (1993) trabajo con *Scophthalmus maximus* y *Hippoglossus hippoglossus*, donde suministro *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis* sp. con rotífero, para estudiar la tasa de crecimiento y supervivencia en agua clara y en agua con microalgas, encontrando como resultado una tasa de crecimiento del 0.15 día⁻¹ en agua clara y 0.25 día⁻¹ en presencia de microalga, así como una supervivencia del 4-18% en agua clara y del 28-55% en presencia de microalga., Rocha *et al.* (2008) usaron 3 tipos de microalgas (*Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata*), seguido de rotíferos y *Artemia* en cultivos de *Sparus aurata* L. y *Solea senegalensis kaup*, y observan que la presencia de microalga favorece la captura de presas grandes. Reitan *et al.* (1994) observaron en *Scophthalmus maximus* e *Hippoglossus hippoglossus* alimentados con *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis* sp. que la ingesta de esas dos microalgas se reflejaba en la asimilación del carbono 14, con una diferencia significativa entre especies de Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) 1-5% y turbot (*Scophthalmus maximus*) 69 ± 30 %. Skjermo & Vadstein. (1993) comprobaron que la microalga ingerida favorece el establecimiento temprano de la flora intestinal en larvas de *Hippoglossus hippoglossus*.

Tetraselmis suecica es una de las especies de microalgas más utilizadas en acuicultura y es considerada una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Fábregas *et al.*, 2001). Además, presenta una riqueza destacable en cuanto a su composición bioquímica, aunque ésta depende de las condiciones de operación, la composición del medio y el sistema de cultivo. En cultivos heterotróficos, *T. suecica* tiene una composición celular proximal de proteína del 10.5%, carbohidratos 51.9% y de lípidos 14% (Azma *et al.*, 2009). Cuando se

aplican diferentes tasas de renovación (del 10 al 50%) el contenido de proteína varía desde un 13% a un 22%, el de carbohidratos desde un 6% a 42% y el de lípidos se mantiene más constante, con un contenido que va desde un 8.9% hasta un 10.8% (Fábregas *et al.*, 2001). Otros autores que han producido biomasa de esta microalga en cultivo semicontinuo, obtuvieron una composición de 45% de proteína, 13% de carbohidratos y 32% de lípidos (Chini-Zittelli *et al.*, 2006). Se observa además que el contenido de los ácidos grasos alcanza un promedio del 4.6% del peso celular (Seixas *et al.*, 2008), donde el 2% corresponde a ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's, por sus siglas en inglés). Los ácidos grasos presentes en la célula se muestran en el siguiente orden de abundancia: 16:0 (palmítico) > 18:1 ω -9 (oleico) > 18:3 ω -3 (linolénico) > 16:4 ω -3 > 18:2 ω -6 (linoleico) > 20:5 ω -3 (ácido eicosapentanoico, EPA) > 18:4 ω -3 (estearidónico), siendo el 16:0 el ácido graso saturado más abundante y el 18:3 ω -3 el ácido graso poliinsaturado más abundante (Otero & Fábregas 1997; Mendoza *et al.*, 2010).

T. suecica, además de ser rica en proteínas, lípidos y carbohidratos, contiene α -tocoferol (Vitamina. E), carotenoides (como fucoxantina y β -caroteno) y como toda planta verde, clorofila. La cantidad de todos estos componentes también varía en función de las condiciones y el sistema de cultivo (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003). *T. suecica* contiene también esteroides de 28 átomos de carbono con cantidades de hasta 29 mg g⁻¹ de peso seco, siendo los principales el campesterol (24- metilcolesterol) y el 24-metilen-colesterol, que representan más del 90% del total de los esteroides presentes en esta microalga (Fábregas *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1982; Patterson *et al.*, 1993). Se ha aprovechado la composición de ácidos grasos y esteroides que contiene *T. suecica* para usarlos como marcadores en la cadena alimenticia, ya que al ser utilizada como alimento vivo en acuicultura permite seguir el perfil de estos compuestos a través de la cadena trófica.

Las microalgas del género *Tetraselmis* han sido utilizadas ampliamente en el cultivo de peces marinos por su facilidad de cultivo y alto valor nutricional. El-Dakar *et al.* (2001), Makridis *et al.* (2006) así como Mohamed & El-Sayed (2012) han comprobado que en el cultivo de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* mejora el valor nutricional del alimento vivo e incrementa la supervivencia larvaria, aunque

el mecanismo de acción aun no es claro. Existe la posibilidad que sea simplemente un acción mecánica ya que Hjelmeland *et al.*, (1988), comprobó que al suministrar esferas de poliestireno en lugar de alimento vivo, se observó actividad de tripsina en larvas de *Clupea harengus*. Esta actividad sin embargo fue significativamente menor a la actividad observada en los tratamientos con alimento vivo.

Así como la aplicación de las microalgas en los cultivos es primordial, también la aplicación de presas como los copépodos, ya que a diferencia de las especies de rotíferos y *Artemia*, presentan calidades nutricionales superiores, esto debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (Kraul, 1989; Carli *et al.*, 1995; Tucker, 1998; FAO, 2006). Además de tener un valor nutricional alto, los copépodos pueden ser administrados, como nauplios o copepoditos desde la primera alimentación, su típico movimiento en zig zag, seguido por una fase de movimientos suaves, son un estímulo visual importante para muchos peces que prefieren a los copépodos más que a los rotíferos (Lavens & Sorgeloos, 1996).

Una de las primeras aproximaciones para evaluar la capacidad digestiva de las larvas de peces marinos es por medio del estudio de la ontogenia y caracterización enzimática. Estos estudios permiten identificar el momento en que las larvas presentan cada tipo de actividad enzimática y por consiguiente, inferir la capacidad de digerir eficientemente los nutrientes presentes en el alimento.

Algunas enzimas digestivas como la fosfatasa alcalina, están involucradas en los procesos de absorción de los monómeros liberados durante la digestión de los nutrientes en el intestino medio (Lazo *et al.*, 2000). La tripsina, por otro lado, tiene una particular importancia ya que es la responsable de activar enzimas digestivas intestinales. Las lipasas son las encargadas de fraccionar las grasas (triglicéridos) a componentes más simples (ácidos grasos) para que después puedan absorberse en el intestino, la amilasa por su parte, generalmente presenta una actividad alta en los primeros estadios del desarrollo larvario dado que es utilizada en la catálisis del glucógeno en las larvas (Valverde- Chavarría, 2002).

La actividad de las enzimas digestivas durante los primeros días de desarrollo ha sido reportada en especies como *Solea senegalensis* (Martínez *et al.*,

1999); *Oreochromis niloticus* (Tengjaroenkul *et al.*, 2002); *Hippoglossus hippoglossus* (Gawlicka *et al.*, 2000); *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004; Zacarias-Soto *et al.*, 2006); *Salminus brasiliensis* (Vega-Orellana *et al.*, 2006); *Melanogrammus aeglefinus* y *Gadus morhua* (Perez-Casanova *et al.*, 2006); *Sphoeroides annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006); *Paralichthys olivaceus* (Bolasina *et al.*, 2006), *Pagellus erythrinus* L. (Suzer *et al.*, 2006), *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 2002), *Lutjanus guttatus* (Moguel-Hernández *et al.*, 2013), *Lutjanus guttatus* (Abdo-de la Parra *et al.*, 2010), *Pleuronectes americanus* (Murray *et al.*, 2004). En *Lutjanus guttatus*, Galaviz *et al.* (2012) estudiaron la expresión de la actividad de tripsina y pepsina, se detectó actividad de tripsina y tripsinógeno en el momento de la eclosión, dicha actividad aumentó con el desarrollo larval y el cambio de alimentación, se observaron niveles máximos de expresión de tripsinógeno a los 25 DDE, cuando las larvas de *Lutjanus guttatus* fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* y la actividad máxima de tripsina se detectó a los 35 DDE, después de ser alimentadas las larvas con una dieta artificial, detectando el pepsinógeno a los 18 DDE dos días antes de la actividad de pepsina.

Muchos estudios se han realizado con el único fin de conocer como es el desarrollo del tracto digestivo de larvas, como se lleva a cabo el desarrollo de sus órganos, evaluar el desarrollo de la capacidad digestiva durante el desarrollo larval, lo anterior apoyado por estudios de histología, histoquímica y de transcripción, tratando de ver cómo es su desarrollo antes y después de suministrar alimento vivo y usando microdietas formuladas.

IV.JUSTIFICACIÓN

Uno de los grandes problemas para el desarrollo del cultivo del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* se encuentra en la etapa de larvicultura, ya que altas mortalidades se observan en los primeros días de cultivo. Las larvas de peces marinos son, generalmente, organismos delicados cuya supervivencia depende de una adecuada combinación de numerosos factores, entre otros la presencia de una presa con buena calidad nutricia y de tamaño adecuado. El uso de microalgas representa un importante soporte trófico para la acuicultura, tanto cualitativa como cuantitativamente en diversos aspectos y especies objeto de cultivo. Factores como la fase de cultivo, disponibilidad de nutrientes, la irradiancia y la temperatura suelen modificar la composición bioquímica de las microalgas y eso permite manejar sus cultivos con la finalidad de conseguir condiciones nutricionales óptimas.

Bajo este marco, se realizó un experimento utilizando diferentes tratamientos, con el propósito de comprobar si el uso de la microalga *Tetraselmis suecica* en los cultivos larvarios de *Lutjanus guttatus* induce una mayor actividad enzimática digestiva y un mayor crecimiento de las larvas.

V.HIPÓTESIS

La microalga *Tetraselmis suecica*, en la primera alimentación de larvas del pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) será ingerida y causará un aumento de la actividad de enzimas digestivas durante los primeros días de desarrollo.

VI.OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la microalga *Tetraselmis suecica* sobre el crecimiento y la actividad de las enzimas digestivas durante el desarrollo de las larvas del Pargo Lunarejo (*Lutjanus guttatus*).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la actividad enzimática de *Tetraselmis suecica* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*.
- Evaluar y comparar el efecto de los regímenes alimentarios sobre el crecimiento de las larvas.
- Cuantificar por métodos fluorométricos la actividad de fosfatasa alcalina, lipasa, tripsina y quimotripsina durante el desarrollo de las larvas de *Lutjanus guttatus*, sometidas a cuatro diferentes tratamientos.

VII.METODOLOGÍA

VII.1. Cultivo Larvario

La totalidad de los experimentos se desarrolló en el CICIMAR, seguido de los análisis enzimáticos los cuales se desarrollaron en el CIBNOR. Se contó con un desove espontáneo de 230 mL (575,000 huevos) del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* el cual fue donado por el Dr. Leonardo Ibarra (CIAD Mazatlán), este fue enviado vía aérea a La Paz y al recibirlo se midió el oxígeno y temperatura para ver si el desove venía en condiciones óptimas para su cultivo.

Los huevos viables fueron incubados en tanques cónicos de 100 L con flujo de agua constante. Las larvas eclosionadas se sembraron en 16 tanques de 100 L a una densidad de 100 larvas L⁻¹, manteniéndose un flujo de aire constante. Se mantuvo una temperatura de 25 ± 0.5 °C en los tanques, con un fotoperiodo de luz (24:0 Luz: Oscuridad).

VII.2. Inicio de la Alimentación Exógena

La primera alimentación ocurrió el tercer día después de la eclosión. Se utilizaron cuatro tratamientos, cada uno tuvo cuatro réplicas, los tratamientos fueron: 1.- Inanición, 2.- *Tetraselmis suecica*, 3.- Nauplios de *Pseudodiaptomus euryhalinus* y 4.- Nauplios de *Pseudodiaptomus euryhalinus* y *Tetraselmis suecica*.

A los tanques de inanición no se les suministro alimento durante la duración del experimento. En los tratamientos con la microalga *Tetraselmis suecica* se administró la microalga a cada tanque a una concentración de 15 X 10³ cel mL⁻¹ y con poca aireación. Los copépodos fueron previamente cultivados en las instalaciones de la UPIMA del CICIMAR y se recolecto la cantidad necesaria de nauplios para tener una densidad de 3 nauplios mL⁻¹ en los tanques de cultivo.

Se realizaron muestreos los días 1, 2, 3, 4, 5 y 6 después de la eclosión. Se tomaron, 30 larvas (por tanque) por día de muestreo para tomar fotografías digitales y posteriormente evaluar el crecimiento y la incidencia alimenticia. Las fotografías fueron tomadas con el programa Image Pro Plus versión 6.0 con un estereoscopio OLYMPUS SZ-CTV, con una lupa OLYMPUS SZ40. Adicionalmete, 160 larvas (por

tanque) fueron muestreadas para realizar el análisis enzimático por fluorescencia. Estas larvas fueron concentradas en microtubos de 1.5 mL y se almacenaron en un ultracongelador a -70 °C para su posterior análisis.

VII.3. Análisis Bioquímicos

Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología Comparada del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Previo al análisis de las muestras, las técnicas bioquímicas fueron estandarizadas con base al tamaño y tipo de muestra, utilizando muestras de larvas de huachinango (*Lutjanus peru*), las cuales son similares en tamaño a las del pargo lunarejo. Los análisis bioquímicos de proteínas y enzimas se hicieron por cuadruplicado para cada replica de cada tratamiento. Empleando la técnica de fluorescencia de la cual hay pocas referencias, la cual es 50 veces más sensible que la técnica de espectrofotometría la cual tiene un límite de detección de 100 ng/mL. Para la cuantificación de las enzimas el blanco de reacción se preparó siguiendo la misma metodología utilizada para las muestras, sustituyendo el extracto enzimático por agua Milli Q.

VII.3.1. Obtención del extracto

El extracto enzimático se obtuvo a partir de 20 larvas, las muestras se pusieron en un baño de hielo, se les agregaron 200 µL de agua MilliQ y se homogeneizaron con un pistilo de plástico. El homogenado se centrifugó y se almaceno en un ultracongelador a -70° C para su posterior análisis. Para medir la actividad enzimática de las muestras de *Tetraselmis suecica* y nauplios de *Pseudodiaptomus euryhalinus* se colocó un volumen de 1.8 mL en 4 tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min a 5 °C, posteriormente se decantó el sobrenadante y al botón o pellet se le agregó un volumen conocido de agua Milli Q de 20 µL para después concentrarlo en un solo tubo y mezclarlo con un homogenizador de tejidos FAST PREP-24 (15800) a una velocidad de 3000 ciclos segundo⁻¹, dos ciclos de 20 segundos cada uno. Ya que se obtuvo el homogenado se volvió a centrifugar con las mismas condiciones que

se usaron para las muestras de larvas, se recuperó el sobrenadante y se conservó en un ultracongelador a -70°C hasta el momento del análisis enzimático.

VII.3.2. Concentración de Proteínas

La curva de calibración se llevó a cabo a partir de una solución estándar de albumina bovina (1mg mL^{-1}), la concentración de proteínas se determinó con base en la técnica de análisis de Bradford, el cual consiste en colocar $10\ \mu\text{L}$ del extracto problema por cuadruplicado y $200\ \mu\text{L}$ del reactivo de Bradford (dil 1:5 en $\text{H}_2\text{O MilliQ}$) en cada pocillo de la microplaca, después se agita, se incuba por 5 min y se lee a absorbancia a $595\ \text{nm}$ en un lector de placas Multiskan Ascent Labsystems. El blanco de reacción se preparó siguiendo la misma metodología que las muestras, sustituyendo el extracto problema por agua Milli Q.

VII.3.3. Determinación de Tripsina (EC 3.4.21.4.)

El método de fluorescencia consistió en colocar por triplicado en cada pocillo de una microplaca color negro $10\ \mu\text{L}$ del extracto enzimático, $5.2\ \mu\text{L}$ del sustrato Boc-Gln-Ala-Arg-7 amido-4 Methylcoumarin hydrochloride (B4153, SIGMA) a una concentración de $0.8\ \text{mM}$ en DMSO y $194.8\ \mu\text{L}$ del buffer Tris-HCl $50\ \text{mM}$ + CaCl_2 $10\ \text{mM}$, a un pH 7.5. Las placas se incubaron 40 minutos a una temperatura de 30°C y las absorbancias se leyeron cada 2 minutos a una emisión de $460\ \text{nm}$ y una excitación de $355\ \text{nm}$. El blanco de reacción se preparó siguiendo la misma metodología que las muestras, sustituyendo el extracto enzimático por agua Milli Q (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011).

VII.3. 4. Determinación de Quimotripsina (EC 3.4.21.1)

El método de fluorescencia consistió en colocar por triplicado en cada pocillo de una microplaca color negro $10\ \mu\text{L}$ del extracto enzimático, $5.2\ \mu\text{L}$ del sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-7 amido-4-Methyl-coumarin (S9761, SIGMA) a una concentración de $0.8\ \text{mM}$ en DMSO y $194.8\ \mu\text{L}$ del buffer Tris-HCl $50\ \text{mM}$ + CaCl_2 $10\ \text{mM}$, a un pH 7.5. . Las placas se incubaron 40 minutos a una temperatura de 30°C y las absorbancias se leyeron cada 2 minutos a una emisión de $460\ \text{nm}$ y una excitación de $355\ \text{nm}$. El blanco de reacción se preparó siguiendo la misma

metodología que las muestras, sustituyendo el extracto enzimático por agua Milli Q (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011).

VII.3. 5. Determinación de Lipasa (EC 3.1.1.3)

El método de fluorescencia consistió en colocar por triplicado en cada pocillo de una microplaca color negro 20 μL del extracto enzimático, 2.6 μL del sustrato 4 Metillumbelliferyl Heptanoate (M2514, SIGMA) a una concentración de 40 mM en DMSO y 237.4 μL del buffer de fosfato 0.1 M a un pH 7.5. Las absorbancias se leyeron a una emisión de 460 y a una excitación de 355 nm, obteniendo lecturas cada 30 segundos por 60 minutos y se incubo a una temperatura de 37 °C. El blanco de reacción se preparó siguiendo la misma metodología que las muestras, sustituyendo el extracto enzimático por agua Milli Q (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011).

VII.3.6. Determinación de Fosfatasa Alcalina (EC 3.1.3.1)

El método de fluorescencia consistió en colocar por triplicado en cada pocillo de una microplaca color negro 10 μL del extracto enzimático, 50 μL del sustrato DiFMUP 6,8 Didluoro-4 methyllumbelliferyl phosphate (Molecular Probes D- 6567) a una concentración de 10 mM en DMSO y 140 μL del buffer 100 mM Glicina, 1mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 , pH 10.4. Las absorbancias se leyeron a una emisión de 460 nm y a una excitación de 355 nm, obteniendo lecturas cada 30 segundos por 90 minutos y se incubo a temperatura ambiente, protegido de la luz. El blanco de reacción se preparó siguiendo la misma metodología que las muestras, sustituyendo el extracto enzimático por agua Milli Q (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011).

VII.4. Análisis Estadísticos

Para cada enzima se aplicó la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $\alpha=0.05$), posteriormente se realizó un análisis de varianza de dos vías (factores: tratamiento y día). Se incluyeron solamente los días 3, 4 y 5. Se llevó a cabo también un análisis de varianza de una vía para el tratamiento Combinación incluyendo el día 6. Todas las pruebas se realizaron mediante el software estadístico STATISTICA Six Sigma 7.

VIII.RESULTADOS

VIII.1. Actividad enzimática digestiva

Al momento de la eclosión, las larvas presentaron un sistema digestivo indiferenciado, el cual es un tubo recto (Fig. 1a). La boca y el ano estaban cerrados. Durante la absorción del saco vitelino (días 2 - 3 DDE), el sistema digestivo comienza a diferenciarse en bucofaringe, esófago, intestino y glándulas digestivas (hígado y páncreas) (Fig. 1b). Entre el día 3 y 4 DDE, las larvas abrieron su boca y el intestino posterior era separado de su sección anterior por la válvula intestinal, lo cual indica que las larvas ya están listas para comenzar con su alimentación exógena (Fig. 1c). De hecho, en este estudio se pudo observar en larvas, presencia de presas como microalgas (tratamiento *Tetraselmis*) desde el día 3 DDE. En general, la incidencia alimenticia fue baja en el tratamiento de microalgas (Fig.1d) y nauplios de copépodos (Fig. 1e). Sin embargo, fue mayor en el tratamiento de combinación (Fig. 1f) (Tabla 1).

Tabla 1. Incidencia alimenticia de larvas del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* que presentan alimento en su tracto digestivo en los días 3, 4, 5 y 6 después de la eclosión, bajo los siguientes tratamientos: Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (microalga/nauplio). Los valores representan el promedio (\pm desv est).

Tratamientos	Días después de la eclosión			
	3	4	5	6
Microalga	0.25 (0.5)	1 (1.41)	1.75 (1.70)	
Nauplios	2.25 (2.62)	5.75 (1.70)	2 (1.41)	
Combinación	6.25 (2.21)	10.25 (4.03)	5 (2.16)	11.75 (9.32)

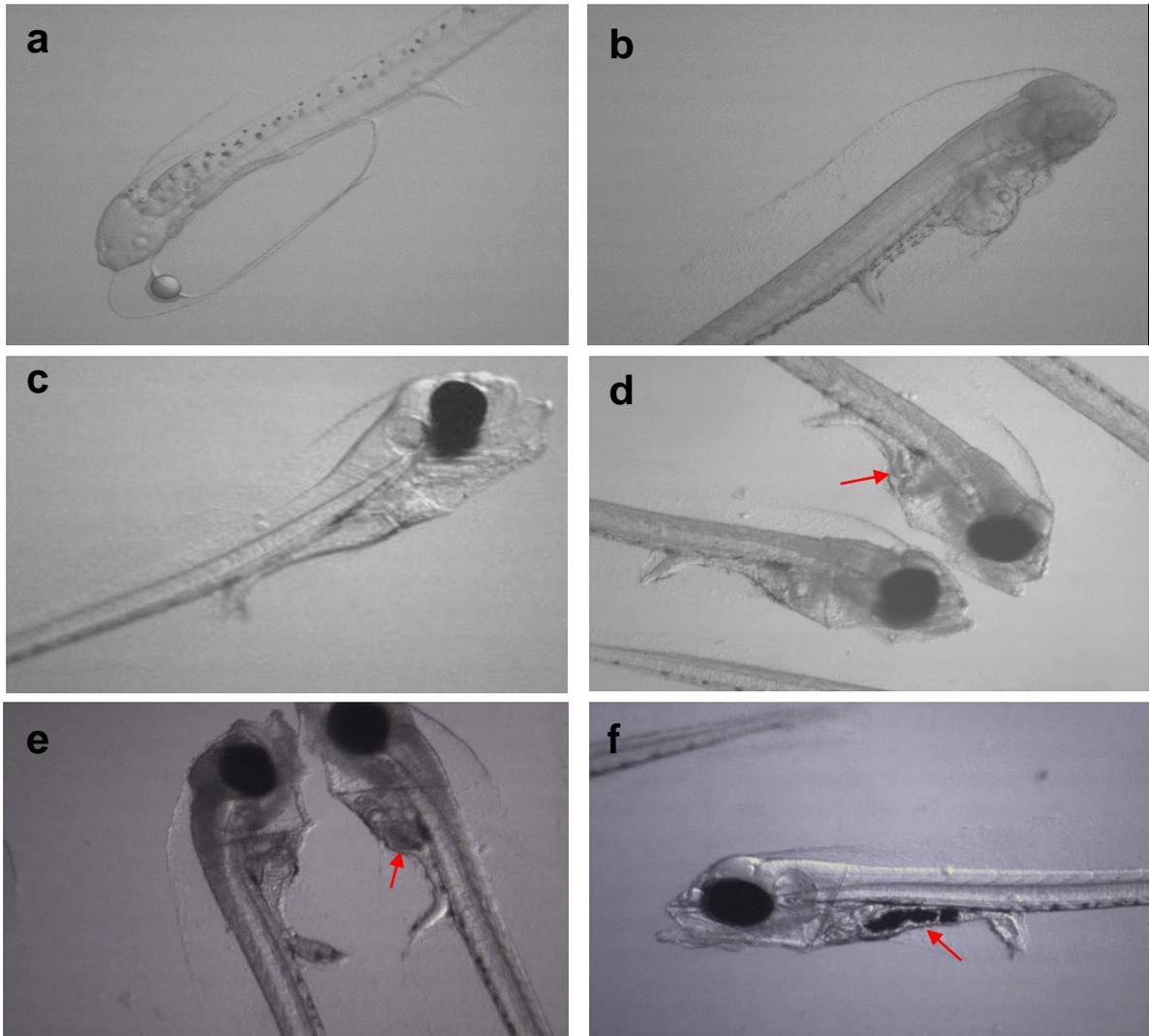


Figura 1. Larvas de *Lutjanus guttatus* (aumento 4x), a) Larva post-eclosión, b) Larva vitelina 1 DDE, c) Larva al inicio de la alimentación exógena 3 DDE, Larvas con presencia de alimento en su tracto digestivo 4 DDE d) tratamiento de Microalga (*Tetraselmis suecica*), e) tratamiento de Nauplios (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), f) tratamiento Combinación (microalga/nauplios).

LIPASA

Después de que el saco vitelino fue totalmente absorbido la actividad específica de lipasa fue disminuyendo hasta el día 5 DDE en cada uno de los tratamientos. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los días ($p=0.08$) ni entre los tratamientos ($p= 0.93$) (Fig. 2; tabla 2). En el tratamiento de Combinación, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los días ($p= 0.03$).

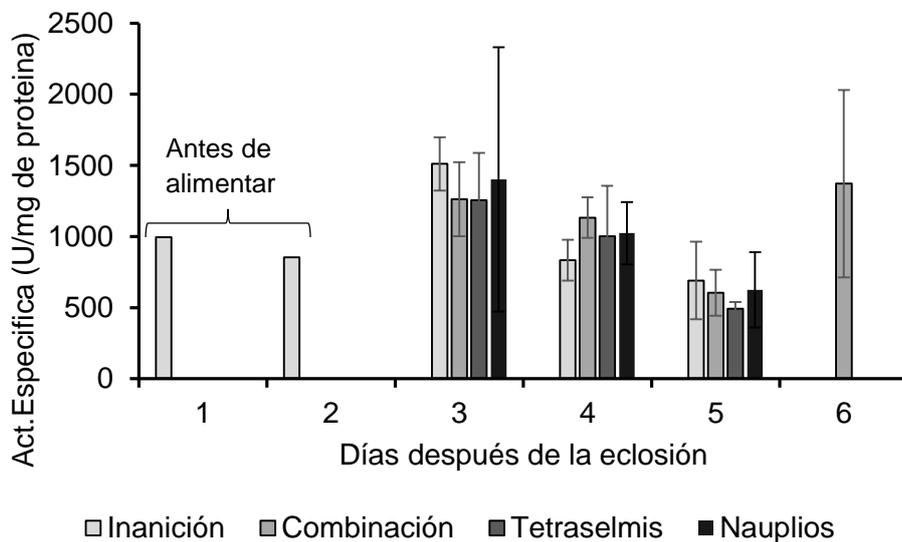


Figura 2. Actividad específica de la lipasa (U/mg de proteína) registrada en larvas de *Lutjanus guttatus*, los primeros días después de la eclosión en los cuatro tratamientos.

Tabla 2. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de lipasa durante los primeros días de desarrollo larvario de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* bajo 4 tratamientos: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (microalga/nauplio). Los valores representan el promedio (\pm desv est). Las letras desiguales en la línea del tratamiento 4 indican diferencias significativas.

Días después de la eclosión						
Tratamientos	1	2	3	4	5	6
	995.22*	852.94*				
Inanición			1510.51 (187.98) ^A	833.44 (144.66) ^A	690.91 (272.93) ^A	
Microalga			1255.71 (333.23) ^A	1002.51 (354.07) ^A	491.91 (48.27) ^A	
Nauplios			1401.75 (929.05) ^A	1023.38 (218.48) ^A	624.89 (264.29) ^A	
Combinación			1262.58 (260.49) ^{Aa}	1132.99 (142.38) ^{Aa}	604.82 (161.87) ^{Ab}	1371.31 (658.29) ^{ab}

*(Antes de Alimentación): Las muestras fueron colectadas de una sola tolva por lo que no hay replicas y no se incluyeron en los estadísticos. Las letras mayúsculas similares indican que no hay diferencia significativa entre días y tratamientos ($p > 0.05$), mientras que las letras minúsculas diferentes en el tratamiento Combinación, muestran una diferencia significativa entre los días ($p < 0.05$).

TRIPSINA y QUIMOTRIPSINA

No se observaron diferencias significativas en la actividad específica de tripsina ($p > 0.05$) entre días ($p=0.17$) y tratamientos ($p=0.78$), al igual que para la actividad específica de quimotripsina tampoco se observaron diferencias significativas en los días ($p=0.10$) ni tratamientos ($p=0.96$) (Fig. 3 y 4; tablas 3 y 4). Sin embargo se pudo observar una tendencia a la disminución para la tripsina desde el día 3 hasta el día 5 excepto en el tratamiento de combinación. La actividad específica de la quimotripsina presentó valores muy bajos en todos los tratamientos y no se detectó actividad los dos primeros días de desarrollo. Tampoco se detectó actividad para el tratamiento de inanición y de combinación en el día 5. No se presentaron diferencias significativas en la actividad específica de la tripsina ($p=0.08$) y quimotripsina ($p=0.13$) entre los días (3, 4, 5 y 6) para el tratamiento combinación (Tabla 3).

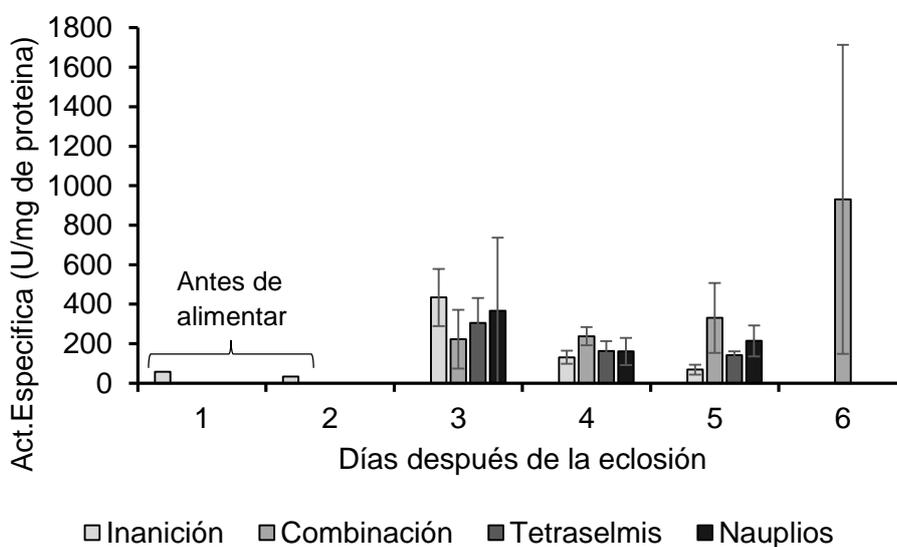


Figura 3. Actividad específica de tripsina (U/mg de proteína) registrada en larvas de *Lutjanus guttatus*, los primeros días después de la eclosión en los cuatro tratamientos.

Tabla 3. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de tripsina durante los primeros días de desarrollo larvario de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* bajo 4 tratamientos: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (microalga/nauplio). Los valores representan el promedio (\pm desv est).

Tratamiento	Días después de la eclosión					
	1	2	3	4	5	6
	58.08*	33.59*				
Inanición			433.79 (145.15) ^A	131.44 (32.95) ^A	68.98 (25.26) ^A	
Tetraselmis			304.71 (126.36) ^A	163.27 (49.14) ^A	141.90 (19.22) ^A	
Nauplios			366.04 (371.25) ^A	160.78 (69.07) ^A	213.99 (78.69) ^A	
Combinación			222.75 (148.06) ^{Aa}	238.08 (46.43) ^{Aa}	330.54 (177.43) ^{Aa}	931.40 (782.68) ^a

*(Antes de Alimentación): Las muestras fueron colectadas de una sola tolva por lo que no hay replicas y no se incluyeron en los estadísticos. Las letras mayúsculas similares indican que no hay diferencia significativa entre días y tratamientos ($p > 0.05$), mientras que las letras minúsculas similares en el tratamiento Combinación, indican que no hay una diferencia significativa entre los días ($p > 0.05$).

Tabla 4. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de quimotripsina durante los primeros días de desarrollo larvario de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* bajo 4 tratamientos: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (microalga/nauplio). Los valores representan el promedio (\pm desv est).

Tratamiento	Días después de la eclosión					
	1	2	3	4	5	6
Inanición			51.50 (10.41) ^A	11.72 (0.91) ^A		
Microalga			29.94 (13.60) ^A	18.85 (4.54) ^A	11.20 (1.93)	
Nauplios			27.92 (20.02) ^A	22.81 (4.89) ^A	11.98*	
Combinación			35.44 (13.12) ^{Aa}	18.72 (5.85) ^{Aa}		158.76 (173.13) ^a

* Las muestras fueron colectadas de una sola tolva por lo que no hay replicas y no se incluyeron en los estadísticos. Las letras mayúsculas similares indican que no hay diferencias significativas entre días y tratamientos ($p > 0.05$), mientras que las letras minúsculas similares en el tratamiento Combinación, indica que no hubo diferencia significativa entre los días ($p > 0.05$).

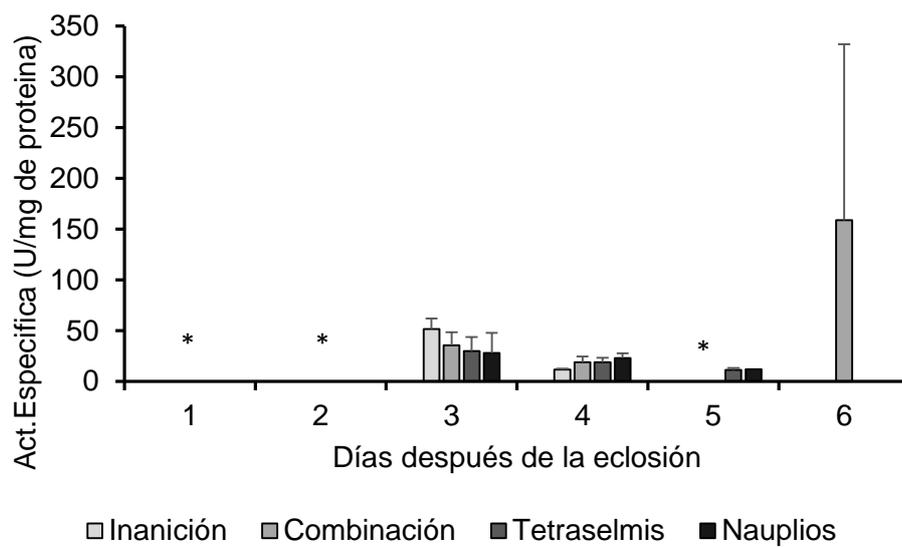


Figura 4. Actividad específica de quimotripsina (U/mg de proteína) registrada en larvas de *Lutjanus guttatus*, los primeros días después de la eclosión en los cuatro tratamientos., (*) actividad no detectada.

FOSFATASA ALCALINA

No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre días ($p=0.66$) y tratamientos ($p=0.47$) para la actividad de fosfatasa alcalina (Fig. 5; tabla 5). En el tratamiento de combinación, se presentaron diferencias significativas entre los días ($p=0.001$) siendo la actividad significativamente más alta en los días 4 y 5 mientras que en el día 6 se presentó la actividad significativamente más baja.

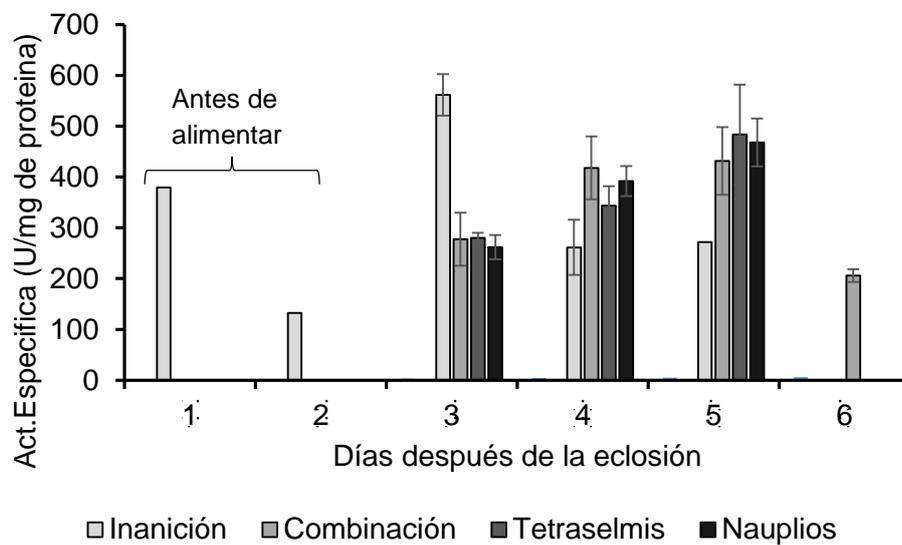


Figura 5. Actividad específica de fosfatasa alcalina (U/mg de proteína) registrada en larvas de *Lutjanus guttatus*, los primeros días después de la eclosión en los cuatro tratamientos.

Tabla 5. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de fosfatasa alcalina durante los primeros días de desarrollo larvario de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* bajo 4 tratamientos: Inanición, Microalga (*Tetraselmis suecica*), Nauplios de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), Combinación (microalga/nauplio). Los valores representan el promedio (\pm desv est). Las letras desiguales en la línea del tratamiento 4 indican diferencias significativas.

Días después de la eclosión						
Tratamientos	1	2	3	4	5	6
	379.36*	132.61*				
Inanición			561.74 (40.85) ^A	261.55 (54.62) ^A	271.84*	
Microalga			280.33 (9.67) ^A	343.83 (37.86) ^A	483.65 (98.01) ^A	
Nauplios			261.75 (24.05) ^A	392.09 (29.48) ^A	467.92 (47.22) ^A	
Combinación			277.54 (51.96) ^{Aa}	417.97 (61.83) ^{Ab}	431.59 (66.55) ^{Ab}	206.03 (12.70) ^c

* Las muestras fueron colectadas de una sola tolva por lo que no hay replicas y no se incluyeron en los estadísticos, día 1 y 2 (Muestras tomadas antes de alimentación). Las letras mayúsculas similares indican que no hay diferencia significativa entre días y tratamientos ($p > 0.05$), mientras que las letras minúsculas diferentes en el tratamiento Combinación, muestran una diferencia significativa entre los días ($p=0.001$).

VIII.2. Actividad enzimática de *Tetraselmis suecica* y nauplios de *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

Tetraselmis suecica mostró una mayor actividad específica de fosfatasa alcalina 59795 ± 6292 (U/mg de proteína) (media \pm desvest) y lipasa 25155 ± 50 (U/mg de proteína) en comparación con tripsina 1412 ± 916 (U/mg de proteína) y quimotripsina 297 ± 29 (U/mg de proteína) (Fig. 6a).

El nauplio *Pseudodiaptomus euryhalinus*, presentó una mayor actividad específica de tripsina 66789 ± 3494 (U/ mg de proteína), seguida de fosfatasa alcalina 17083 ± 486 (U/ mg de proteína), lipasa 8461 ± 179 (U/ mg de proteína) y quimotripsina 408 ± 27 (U/ mg de proteína) (Fig. 6b).

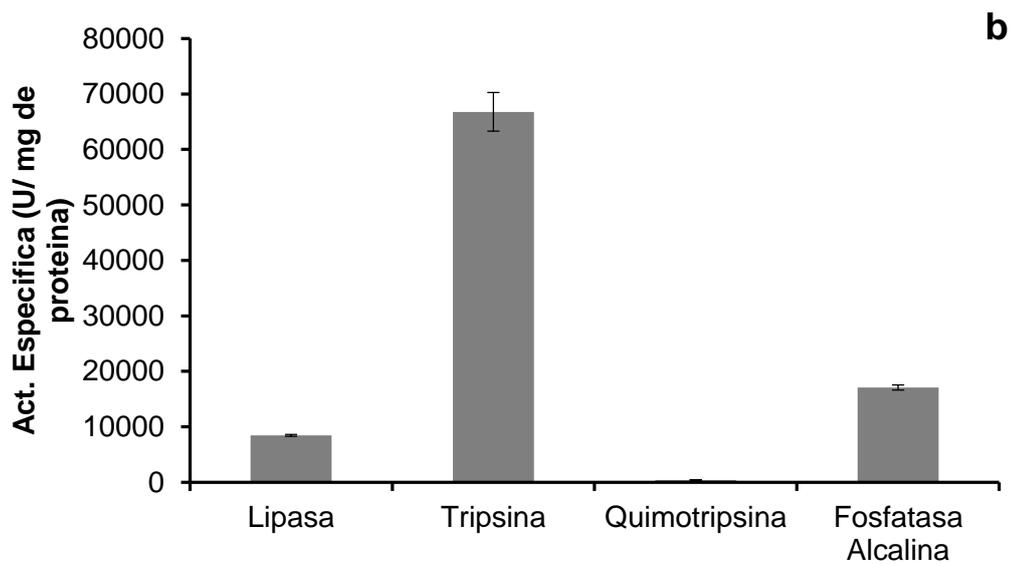
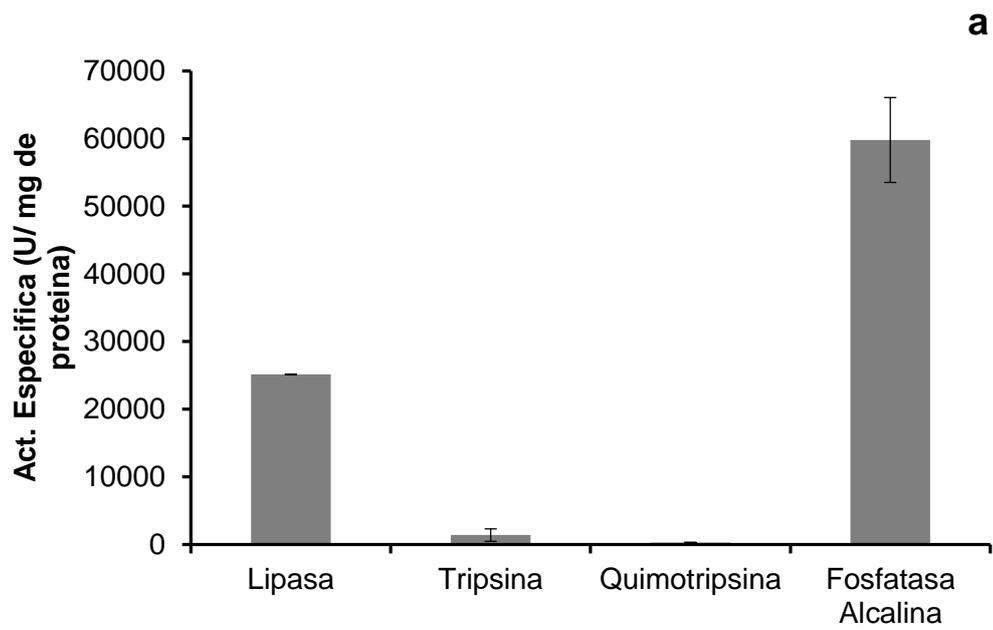


Figura 6. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de a) Microalga (*Tetraselmis suecica*) y b) Nauplio (*Pseudodiaptomus euryhalinus*).

VIII.3. Efecto de los regímenes alimentarios sobre el crecimiento de las larvas.

La longitud de las larvas de *Lutjanus guttatus* al momento de la eclosión fue de 1.8 ± 0.1 mm, mientras que en el día 3 DDE que es el día en que se agotaron las reservas del saco vitelino y se empezó con la alimentación exógena, los tratamientos presentaron la siguiente longitud promedio: Inanición 2.65 mm, Combinación 2.60 ± 0.01 mm, *Tetraselmis suecica*: 2.67 ± 0.06 y *Pseudodiaptomus euryhalinus*: 2.58 ± 0.01 mm. Las larvas sometidas a los tratamientos de Inanición, *Tetraselmis suecica* y *Pseudodiaptomus euryhalinus* solo sobrevivieron hasta el día 5, presentando las siguientes longitudes, Inanición 2.17, *Tetraselmis suecica* 2.27 ± 0.05 mm y *Pseudodiaptomus euryhalinus* 2.30 ± 0.03 mm. Mientras que se presentaron larvas vivas en el tratamiento Combinación hasta el día 6 con una longitud promedio de 2.76 ± 0.08 mm. No se presentaron diferencias significativas entre días ni tratamientos ($p > 0.05$), (Fig.7).

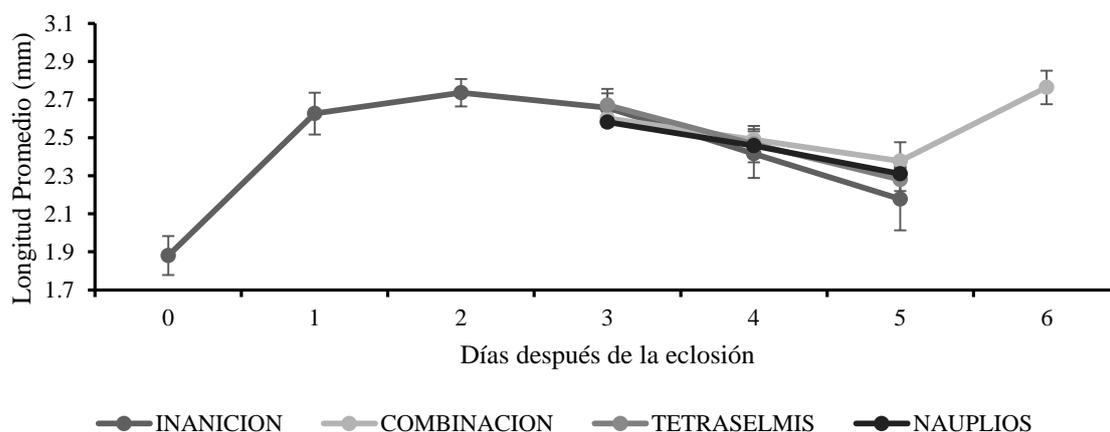


Figura 7. Longitud promedio de larvas de *Lutjanus guttatus*, tratamientos: Inanición, Combinación, Tetraselmis y Nauplios.

IX. DISCUSIÓN

En nuestro trabajo, a pesar de que se corroboró el consumo de la microalga *Tetraselmis suecica*, no se observó ningún aumento de las actividades enzimáticas digestivas de las larvas de pargo lunarejo. Sin embargo, no se observó supervivencia de las larvas más allá del día 6. Cahu *et al.* (1998) en un estudio con larvas de *Dicentrarchus labrax* observaron que del día 8-16 DDE la presencia de la microalga *Isochrysis galbana* favoreció un aumento en la actividad de tripsina y quimotripsina; y en el día 26 DDE, la actividad de fosfatasa alcalina y maltasa, fueron significativamente mayores en las larvas mantenidas en agua de mar en presencia de microalga, comparadas con las larvas creadas en agua clara. Estos autores sugirieron que la presencia de microalga facilita la aparición de funciones hidrolíticas de las membranas celulares y mejora la supervivencia, lo cual fue relacionado con el desarrollo temprano de las membranas de borde de cepillo, por lo que concluyeron que la presencia de microalga en el cultivo, es causante de la activación de enzimas digestivas, tanto en el páncreas como a nivel intestinal.

La adición de microalga al agua de cultivo es una técnica conocida como “agua verde” ha sido también relacionada con una mejora de la supervivencia, y el crecimiento (Naas *et al.*, 1992; Reitan *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1998; Lazo *et al.*, 2000; Skiftesvik *et al.*, 2003; Faulk & Holt, 2005). Reitan *et al.* (1993) estudio en *Scophthalmus maximus* e *Hippoglossus hippoglossus* la tasa de crecimiento y supervivencia, en ausencia y presencia de las microalgas *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis* sp. y con rotífero, obteniendo una tasa de crecimiento del 0.25/día en presencia de microalga y 0.15/día en ausencia de microalga, con una supervivencia de 28-55% con microalga y 4-18% sin microalga. Se atribuye al hecho de que la captura de la presa sea mucho más eficiente debido a un aumento en el contraste de la presa. Este aumento de incidencia alimenticia se observó en nuestro estudio siendo más alta en el tratamiento de combinación donde el copépodo fue ofrecido junto con la microalga.

La microalga también juega un papel nutricional como lo demostraron Reitan *et al.* (1994), esta asimilación puede ser diferente entre las especies ya que se observó en *Scophthalmus maximus* y en *Hippoglossus hippoglossus* una asimilación

de 1-5% y $69 \pm 30\%$, en el carbono 14, respectivamente. No se observó diferencia en el crecimiento entre los tratamientos y días. Se menciona en la literatura que las larvas de peces marinos en los primeros días de desarrollo crecen poco ya que la prioridad está en desarrollar los tejidos y órganos que van a permitir digerir y asimilar el alimento ingerido. Moguel *et al.* (2013) observan también un crecimiento muy lento en los primeros días de cultivo de *Lutjanus guttatus*. Galaviz *et al.* (2012) reporta en el pargo lunarejo que en los primeros días de desarrollo, el sistema digestivo comienza a diferenciarse en bucofaringe, un esófago corto y el intestino. Están presentes también las glándulas accesorias (hígado y páncreas). La boca y el ano se encuentran abiertos entre el día 3 y 4 DDE, los ojos pigmentados y el intestino posterior está separado del intestino anterior por una válvula.

Durante este período, Galaviz *et al.*, (2012) reporta que el hígado continuó su diferenciación y aparece como una masa compacta de tejido de hepatocitos poliédricos concéntricos núcleos. Además, varios grupos pequeños de las células pancreáticas basófilas (páncreas exocrino) que contiene gránulos de zimógeno acidófilos ya son visibles. En el presente estudio no se realizó un análisis histológico del sistema digestivo, solo se corroboró con base en observaciones en un estereoscopio ojos pigmentados, la abertura de la boca, la abertura del ano y diferenciación del sistema digestivo, por lo que se asume que las larvas contaban con el desarrollo del sistema digestivo adecuado para empezar con la alimentación exógena al día 3.

El patrón general de la actividad enzimática en los primeros días presentó similitudes con otras especies de peces marinos como la dorada *Sparus aurata* (Sarasquete *et al.*, 1995), el halibut de California *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004), pescado globo diana *S. annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006), la lubina europea *Dicentrarchus labrax* (Giffard-Mena *et al.*, 2006) el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Moguel - Hernández, 2010) y en la misma especie *Lutjanus guttatus* (Galaviz *et al.*, 2012). Sin embargo, los valores de actividad de todas las enzimas estudiadas fueron muy superiores a lo reportado en la literatura para la misma especie y para otras especies. Es importante mencionar que el presente estudio se realizó con una técnica poco usada hasta el momento. Esta técnica usa

la fluorescencia y permite trabajar con un número pequeño de larvas. Además es una técnica 50 veces más sensible que la técnica de espectrofotometría, por lo que los resultados están por encima de los resultados reportados usando técnicas colorimétricas.

La actividad enzimática de lipasa se incrementó desde el 1 DDE hasta el 3 DDE. Este incremento en la actividad enzimática de lipasa se ha observado en *Dentex dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) y *Paralabrax maculatofasciatus* (Alvarez-Gonzalez, 2003). Moguel-Hernández (2010) observó que la actividad enzimática de lipasa en las larvas de *Lutjanus peru* cuando la larva todavía presenta el glóbulo de aceite se debe a la acción de esta enzima sobre los triacilgliceroles presentes en el glóbulo de aceite. Alvarez-Gonzalez (2003) menciona la posible presencia de dos tipos de lipasas, las primeras apuntalan la absorción del vitelo y el glóbulo de aceite. En los primeros tres días después de la eclosión, se tuvo un incremento de la actividad de lipasa en los cuatro tratamientos, al cual se le atribuye la absorción del vitelo y la gota de aceite, el descenso que se tiene de actividad específica de lipasa en los días 4 y 5 DDE en los tratamientos de inanición, *Tetraselmis*, nauplios y combinación, se debe a la desaparición de la gota de aceite. El segundo tipo de lipasa es secretada directamente por el páncreas una vez que se ha absorbido el vitelo. Estas lipasas hidrolizan las grasas provenientes del alimento exógeno (Alvarez-Gonzalez, 2003). El incremento observado en el día 6 en el tratamiento de combinación se atribuye a la hidrólisis de las grasas provenientes del alimento exógeno, tal y como se muestra en la tabla 1, donde se puede observar que en el día 6 las larvas ingirieron alimento.

Las fosfatasas son hidrolasas con una variedad de funciones, incluyendo la hidrólisis de fosfatos inorgánicos utilizados para producir energía; el transporte de nutrientes a través de las membranas en las células; la facilitación de acciones enzimáticas que modifican las cadenas de aminoácidos laterales y mejoramiento de la absorción y del transporte de nutrientes desde el lumen hacia los enterocitos. Baglole *et al.*, (1998) informaron de la presencia de actividad de la fosfatasa alcalina en las microvellosidades de los enterocitos en *P. ferruginea* y *P. americanus* a los 3 DDE. Fosfatasas alcalinas y ácidas se han detectado en la dorada (*Pagrus pagrus*) desde el momento de la apertura de la boca (Cara *et al.*, 2003), mientras

que en *C. urophthalmus*, esta actividad se registró después de 3 DDE. En nuestro estudio la actividad se detectó en la larva vitelina.

Se detectó actividad de lipasa y fosfatasa alcalina en la microalga *Tetraselmis suecica*. Esta microalga se usa como marcador en la cadena alimenticia debido a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que contiene (Fábregas *et al.*, 2001). Por otro lado, la presencia de actividad de fosfatasa alcalina se debe a la síntesis de proteínas y transporte de nutrientes en la cual está involucrada esta enzima. En cuanto a la actividad enzimática detectada en el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*, se registró una elevada actividad de tripsina, fosfatasa alcalina y lipasa las tres asociadas con los procesos digestivos.

X. CONCLUSIONES

- En el tratamiento de microalga *Tetraselmis suecica* no se registró un aumento en la actividad de las enzimas estudiadas en los primeros días de desarrollo de la larva de *Lutjanus guttatus*. Sin embargo, tuvo un efecto sobre la ingestión de presa ya que la incidencia alimenticia fue más elevada en el tratamiento de combinación (microalga/nauplios), que en el tratamiento con nauplios en ausencia de microalgas. Lo que permitió probablemente que las larvas en el tratamiento de combinación sobrevivan hasta el día 6.
- El uso de la técnica de fluorescencia ha permitido detectar actividad enzimática en una cantidad muy pequeña de muestra y se distingue por su sensibilidad elevada ya que generó resultados muy altos de actividad enzimática.

XI. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten hacer las siguientes recomendaciones acerca de futuros trabajos sobre el efecto del alimento vivo y caracterización enzimática en larvas de peces.

Debido a que la técnica de Fluorescencia es más sensible y ocupa menos muestra que la técnica de Espectrofotometría, debería llevarse a cabo un experimento para comparar la eficiencia de ambas técnicas.

Como Cahu *et al.* (1998) encontraron un aumento de la actividad enzimática usando la microalga *Isochrysis galbana* en los cultivos, se recomienda desarrollar un experimento con esta microalga. Sin embargo como este aumento se observó a los 18 días es conveniente desarrollar el experimento con una especie con la cual la tecnología está desarrollada y así asegurar poder llegar a los 45 días de cultivo teniendo completas todas las muestras necesarias.

El hecho de realizar el experimento con una especie que no presenta dificultad en el cultivo larvario permitirá también tener muestras necesarias para llevar, además de los análisis enzimáticos, un análisis histológico del sistema digestivo y a la mejor de expresión genética de estas enzimas.

XII.REFERENCIAS

- Abdo-de la Parra, M. I., L.E. Rodríguez-Ibarra, F. Campillo-Martínez, G. Velasco-Blanco, N. García-Aguilar, L.S. Alvarez-Lajonchere & D. Voltolina. 2010. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Biología Marina y Oceanografía*, 45 (1): 141-146.
- 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 de Doctorado. CICIMAR-IPN. México. 179 pp.
- Alvarez- Lajonchere L., L. Pérez, E. Torres & O.G. Hernández. 1994. Producción de Juveniles de Patao *Eugerres brasilianus* (Pises, Gerridae) en Santa Cruz del Sur, Camaguey. *Re. Cub. Invest. Pesq.*18:25-27.
- Aviles-Quevedo A, Reyes L, Valdez S, Hiraes O, Rodriguez R, McGregor U, Lizawa M. 1996. Manejo de reproductores y producción de huevos de pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) bajo condiciones de cultivo. 244-247, In: Silva, A. & G. Merino (Eds.), *Acuicultura en Latinoamerica*. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2°Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile. Coquimbo, Chile.
- Azma M., R. A. Rahim, R. Mohames & A. B. Ariff. 2009. Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and biofuel production. *International Advanced of Technology Congress*. Malaysia.
- Baglolle, C.J.,G.P. Goff & G.M. Wright. 1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *J Fish Biol.* 53:767–784.
- Balon, E.K. 1975. Terminology of intervals in fish development. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 32: 1663-1670.

- Bass, P., C.S. Tamaru & C.S. Lee. 1992. The use of elevated temperatures to shorten the hatchery phase of striped mullet, *Mugil Cephalus* larvae. In: Aquaculture 92: Growing Toward The 21st Century, Orlando, FL (USA), 21-25 mayo 1992, 36 p.
- Benetti, D. & E. Wilson. 1996. Estado actual y perspectivas del cultivo de peces marinos en el Ecuador. In: Silva A, Merino G (Eds.), Acuicultura en Latinoamerica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2° Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile. Coquimbo, Chile, 5-14 pp.
- Blaxter, J.H.S. 1988. Pattern and variety in development. 1-58, In: *Fish Physiology*, vol XIA. Hoar, W.S. & D. J. Randall, (Eds.). Academic Press, San Diego.
- Bolasina, S., A. Pérez & Y. Yamashita. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 252: 503-515.
- Cahu, C.L., J. L. Zambonino Infante, A. Péres, P. Quazuguel & M.M. Le Gall. 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. *Aquaculture*, 161: 479-489.
- Cano, A. 2003. Reproduction in captivity and cultivation of the Pacific rose spotted snapper *Lutjanus guttatus* in the Republic of Panama. *World Aquaculture Society*, 153 pp.
- Cara, J. B., F.J. Moyano, S. Cardenas, C. Fernandez-Diaz & M. Yufera. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J Fish Biol.* 63:48–58.
- Carballo-Cárdenas, E.C., P.M. Tuan, M. Janssen & R.H. Wijffels. 2003. Vitamin E (α -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20: 139-147.

- Carli, A., G.L. Mariottini & L. Pane. 1995. Influence of nutrition on fecundity and survival in *Trigriopus fulvus* fisher (Copepoda: Harpacticoida). *Aquaculture*, 134:113-119.
- Chini-Zittelli, G., L. Rodolfi, N. Biondi & N. R. Tredicci. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261:932-943.
- Civera, R., C. Álvarez & F. Moyano. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. VII memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México.
- Davis, D.A., K. L. Bootes & C. R. Arnold. 2000. Snapper (Family Lutjanidae) culture. 884- 889, In: Stickney RR (Eds). Encyclopedia of aquaculture. John Wiley & Sons, New York.
- Dumas, S., M. Rosales-Velasquez, M. Contreras-Olguin, D. Hernandez- Ceballos & N. Silverberg. 2004. Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*, *Aquaculture*, 234: 615-623.
- Duncan, N. J., L. Ibarra-Castro & R. Álvarez-Villaseñor. 2008. Effect of the dusk photoperiod from light to dark on the incubation period of eggs of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner). *Aquaculture Research* 39: 422-433.
- El-Dakar, A.Y., S.M. Shalaby, G.D. Hassanein & S.I. Ghoneim. 2001. Use of Rotifers Cultured on Different Microalgal Species in Larval Feeding of Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Asian Fisheries Science*, 14: 43-52.
- Emata, A., B. Eullaran & T. Bagarinao. 1994. Induced spawning and early life description of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*, 121: 381-387.

- Fábregas, J., A. Otero, A. Domínguez & M. Patiño. 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *J Mar Biotechnol.* 3:256–263.
- Fábregas, J., J. Aran, E. D. Morales, T. Lamella & A. Otero. 1997. Modification of sterol concentration in marine microalgae. *Phytochemistry* 46:1189–1191.
- FAO. 2006. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura: FAO Documentos Técnicos de Pesca N° 500. Roma.
- Faulk, C. K. & G. J. Holt. 2005. Evaluation of Fatty Acid Enrichment of Live Food for Yellowtail Snapper *Ocyurus chrysurus* Larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36 (3): 271-281.
- Galaviz, M. A., A. García-Ortega, E. Gisbert, L.M. López & A. García- Gasca. 2012. Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comp Biochem Physiol* 161B:9–16.
- García-Gasca, A., M. A. Galaviz, J. N. Gutiérrez & A. García-Ortega. 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.
- 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 (1): 69- 80.
- Gawlicka, A., B. Parent, M. H. Horn, N. Ross, I. Opstad & O. J. Torrissen. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184: 303-314.

- Giffard-Mena, I., G. Charmantier, E. Grousset, F. Aujoulat, R. Castille. 2006. Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: implication in osmoregulation. *Dev. Growth Differ.* 48, 139–151.
- Gisbert, E., R. H. Piedrahita & D. E. Conklin. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232: 455-470.
- Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis & A. Estévez. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*, 287: 381-387.
- Govoni, J. J. 1980. Morphological, histological, and functional aspects of alimentary canal and associated organs development in larval, *Leiostomus xanthurus*. *Reviews of Canadian Biology*, 39:69-80.
- Hjelmeland, K., B. H. Pedersen & E. M. Nilssen. 1988. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacean prey. *Marine Biology*, 98: 331-335.
- Ibarra, L., S. Dumas & N. Duncan. 2004. Gonad development and LHRHa induced spawning in female spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. In: 5th International Symposium on Fish Endocrinology. 5-9 September. Castellon España.
- Ibarra-Castro, L. & L. Álvarez-Lajonchère. 2009. Improved induced-spawning protocol for the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*). *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh*, 61(2): 121-133.
- Ibarra-Castro, L. & N. Duncan. 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 272: 737-746.
- Kendall, Jr .A.W., E.H. Ahlstrom & H.G. Moser. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. En: Moser, H.G. (Ed.). *Ontogeny and systematics*

of fishes. American Society of Ichthyology and herpetology. Allens Press Inc., Lawrence, Kansas, 11-23.

Kraul, S. 1989. Production of live prey for marine fish larvae. *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti. AQUACOP IFREMER. *Actes de colloque*, 9: 595-607.

Lavens, P. & P. Sorgeloos. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Artemia Reference Center. University of Ghent. Belgica. 375 pp.

Lazo, J.P., M.T. Dinis, G.J. Holt, C. Faulk & C.R. Arnold. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: towards eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 188: 339-351.

Leu, M. Y., I. H. Chen & L. S. Fang. 2003. Natural spawning and rearing of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*, larvae in captivity. *Israeli J. Aquacult./Bamidgeh*, 55: 22-30.

Lin, D. S., A. M. Ilias, W.E. Connor, R. S. Caldwell, H. T. Cory, G. Doyle-Daves. 1982. Composition and biosynthesis of sterols in selected marine phytoplankton. *Lipids* 17(11):818-824.

Makridis, P., R. Alves-Costa & M. Teresa-Dinis. 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia* Metanauplii. *Aquaculture*, 255: 76-81.

Martínez, I., F. J. Moyano, C. Fernández-Díaz & M. Yúfera. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 21: 317-323.

Mendoza, H., A. De la Jara, D. Carmona & P. K. Freijanes. 2010. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquaculture International*, 18:189-199.

- Meza, O. & G. Figueroa. 2002. Crecimiento, Supervivencia y Desarrollo mandibular en Larvas del Pez Blanco *Chirostom humboldtianum* (Valenciennes) (Atheriniformes: Atherinopsidae), bajo condiciones de Laboratorio. *CIVA*, 606-616.
- Moguel- Hernández, I. 2010. Caracterización bioquímica y fisiología de embriones y larvas vitelinas del huachinango del pacifico *Lutjanus peru*: Implicaciones en la calidad de los desoves. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 94 pp.
- Moguel- Hernandez, I., R. Peña, H. Nolasco- Soria, S. Dumas & I. Zavala-Leal. 2013. Development of digestive enzyme activity in spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) larvae. *Fish Physiol Biochem* 40, 839-848.
- Mohamed, H. Hanan –Khairy & H. S. El-Sayed. 2012. Effect of enriched *Brachionus plicatilis* and *Artemia salina* nauplii by microalga *Tetraselmis chuii* (Bütcher) grown on four different culture media on the growth and survival of *Sparus aurata* larvae. *African Journal of Biotechnology*, 11(2): 399-415.
- Muller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: Situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12: 527-534.
- Murray, H.M., J. C. Perez-Casanova, J. W. Gallant, S. C. Johnson, S. E. Douglas. 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in Winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 53–59.
- Naas, K.E., T. Næss & T. Harboe. 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture*, 105: 143-156.

- Ogle, J. T. & J. M. Lotz. 2006. Characterization of an experimental indoor larval production system for red snapper. *North American Journal of Aquaculture*, 68: 86-91.
- Olivares, O. P. & J. B. Boza. 1999. Crecimiento de juveniles de pargo mancha (*Lutjanus guttatus*) utilizando alimento granulado en condiciones de laboratorio. *UNICIENCIA* 16: 45-48.
- Ostaszewska, T. 2002. The sequential differentiation and formation of hepatic and pancreatic structures in asp (*Aspius aspius L.*) LARVAE. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries*. 5(1). Available Online <http://www.ejpau.media.pl> 2002.
- Otero, A. & J. Fábregas. 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159:111-123.
- Patterson, G. W., E. Tsitsa-Tzardis, G. H. Wikfors, P. K. Gladu, D. J. Chitwoodh & D. Harrison. 1993. Sterols of *Tetraselmis* (Prasinophyceae). *Comp. Biochem. Physiol* 105(2): 253-256.
- Perez-Casanova, J. C., H. M. Murray, J. W. Gallant, N. W. Ross, S. E. Douglas & S. C. Johnson. 2006. Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 251: 377-401.
- Rana, K.J., 1997. Trends in global production, 1984-1995. 163, In: *FAO inland water resources and aquaculture service, fishery resources division (ed.) Review of the state of world aquaculture*. *FAO Fisheries Circular*. N0. 886, Rev.1. Rome, FAO.

- Reitan, K.I., S. Bolla & Y. Olsen. 1994. A study of the mechanism of algal uptake in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J. Fish Biol.* 44, 303-310.
- Reitan, K.I., J.R. Rainuzzo, G. Die, Y. Olsen. 1993. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture*, 118, 257-275.
- Reitan, K.I., J. R. Rainuzzo, G. Øie & Y. Olsen. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155, 207–221.
- Ribeiro, L., J. L. Zambonino-Infante, C. Cahu, M.T. Dinis. 2002. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* postlarvae fed *Artemia* and a compound diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(1):61–69.
- Rocha, R. J., L. Ribeiro, R. Costa & M.T. Dinis. 2008. Does the presence of microalgae influence fish larvae prey capture? *Aquaculture*, 39: 362-369.
- Sánchez, M., J. Ortiz, S. Cárdenas & C. Sarasquete. 2005. Organogénesis larvaria de la hurta, *Pagrus auriga*: aproximación histológica e histoquímica del tracto digestivo. En: Libro de Resúmenes del X Congreso Nacional de Acuicultura, Gandía (Valencia). Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia, 426-427 p.
- Sarasquete, M.C., A. Polo & M. Yufera. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 130, 79–82.
- Seixas, P., M. Rey-Méndez, L. M. P. Valente & A. Otero. 2008. Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*, 283:83–91.
- Skiftesvik, A.B., H.I. Browman & J.F. St-Pierre. 2003. Life in green water: the effect of microalgae on the behaviour of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. 97-

103, En: Browman, H.I. & A.B. Skiftesvik (Eds.). The big fish bang. Institute of Marine Research, Bergen, Norway.

Skjermo, J. & O. Vadstein. 1993. The effect of microalgae on skin and gut bacterial flora of halibut larvae. 61-67, En: Reinertsen, H., L. A. Dahle, L. Jorgensen, K. Tvinnereim (Eds), Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology, Trondheim, Norway, A.A. Balkema, Rotterdam.

Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran & A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101:87-96.

Suzer, C., S. Saka & K. Firat. 2006. Effects of illumination on early life development and digestive enzyme activities in commonpandora *Pagellus erythrinus* L. larvae. *Aquaculture*, 260, 86–93.

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.

Toledo-Cuevas, E.M., F.J. Moyano López, D. Tovar Ramírez, C. A. Strussmann, C.A. Álvarez- González, C.C. Martínez- Chávez & C. A. Martínez-Palacios. 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture*, 42, 776-786.

Tucker, J. & D. Jory. 1991. Marine fish culture in the Caribbean region. *World Aquacult.* 22: 10-25.

Tucker, J. W. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academia Publisher, 750 pp.

Ueberschär, B. 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. En: Walther, B. T. & H. J. Fuhn (Eds.). *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. Univ. of Bergen, Norway.

- Valverde, S. & J. A. Boza. 1999. Inducción al desove en hembras del pargo mancha, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). UNICIENCIA 15-16: 65-69.
- Valverde-Chavarría, S. 2002. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (Sciaenidae), y selección de fuentes proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y educación superior de Ensenada. 1-27.
- Vega-Orellana, O. M., D. M. Fracalossi & J. K. Sugai. 2006. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture*, 252: 484-493.
- Walford, J. & T. J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 109:187-205.
- Zacarias-Soto, M., J. B. Muguet & J. P. Lazo. 2006. Proteolytic activity in California halibut larvae (*Paralichthys californicus*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(2): 175-185.
- Zambonino-Infante, J. L. & C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part c*, 130: 477-487.
- Zavala-Leal, I., S. Dumas-Lepage & R. Peña- Martínez. 2011. Organogénesis Durante el Periodo Larval en Peces. *CICIMAR Océánides*, 26(2):19-30.