



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



Facultad de Ciencias Marinas

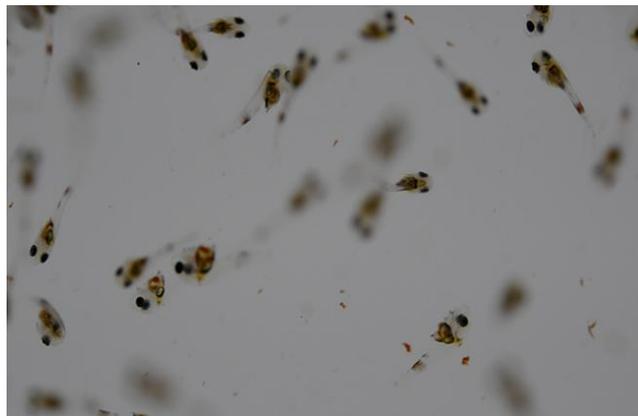
Instituto de Investigaciones Oceanológicas

Posgrado en Oceanografía Costera

Como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

"Efecto del enriquecimiento de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia* sp. con taurina sobre el crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Totoaba macdonaldi*"



Presenta:

JULIO CESAR SEGOVIA SALAS

Ensenada, Baja California. junio del 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas

Posgrado en Oceanografía Costera

Tesis

"Efecto del enriquecimiento de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia* sp. con taurina sobre el crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Totoaba macdonaldi*"

Como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Presenta

JULIO CESAR SEGOVIA SALAS

APROBADA POR:

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza

Director de Tesis

Dr. Conal David True

Codirector de Tesis

Dra. Lus Mercedes López Acuña

Sinodal

M.C. Gerardo Sandoval Garibaldi

Sinodal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas

Posgrado en Oceanografía Costera

Tesis

"Efecto del enriquecimiento de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia* sp. con taurina sobre el crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Totoaba macdonaldi*"

Como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

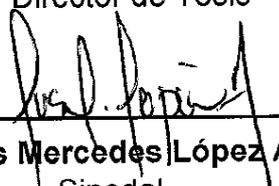
Presenta

JULIO CESAR SEGOVIA SALAS

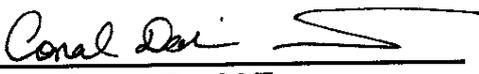
APROBADA POR:



Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza
Director de Tesis



Dra. Lus Mercedes López Acuña
Sinodal



Dr. Conal David True
Codirector de Tesis



M.C. Gerardo Sandoval Garibaldi
Sinodal

Agradecimientos

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para alcanzar esta meta.

Al posgrado en Oceanografía Costera de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, por brindarme las herramientas adecuadas para obtener estos resultados.

A la unidad de biotecnología en piscicultura (UBP) de la UABC y su personal que la ópera, por haberme enseñado muchos procesos del cultivo larvario de totoaba, así también, realizar mi bioensayo en sus instalaciones.

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza, gracias por apoyarme en todo este tiempo para poder alcanzar esta meta, gracias por su apoyo incondicional tanto en lo escolar como en lo personal, su forma de transmitir ánimos hacia los estudiantes lo hacen un maestro de verdad, por usted me encuentro en este punto tan importante en mi vida. Su gran conocimiento en larvicultura me ayudó a tener mejor visión sobre esta área.

Dr. Conal David True, gracias por su apoyo y jalones de orejas, sobre todo por su gran conocimiento en el cultivo de totoaba y su amistad.

Dra. Lus M. López Acuña, por su gran conocimiento que me ha transmitido de la Nutrición Acuícola, es una persona excepcional y siempre apoyando de la mejor manera a nosotros los estudiantes, muchas gracias.

Dr. José Ángel Olivas Valdez, usted fue el último que me brindó la mano para culminar esta gran investigación, gracias por darme las herramientas, pero sobre todo enseñarme como se comprende todo lo estadístico.

M.C. Gerardo Sandoval Garibaldi, Gracias por su conocimiento en larvas de totoabas y sobre todo gracias por su amistad.

Dr. Samuel Sánchez Serrano, gracias por brindarme todas las herramientas para realizar histología en larvas, su amistad y ánimos que me daba para no rendirme, muchas gracias.

Al grupo de Nutrición Acuícola de la Facultad de ciencias marinas, por brindarme su apoyo en realizar mis análisis enzimáticos en sus instalaciones, a todo su grupo que siempre está ahí apoyando a los estudiantes, en especial a Samantha Victoria

Cota, porque fue vital para realizar mis análisis de las dietas y enzimas digestivas sobre todo gracias por brindarme tu amistad. Dra. Idaly Trejo Escamilla y Dra. Paola Pérez Arvízu, gracias por tenerme la paciencia y enseñarme las herramientas para alcanzar esta meta.

Gracias a todos los académicos, administrativos y personal de servicio de la facultad de ciencias marinas.

No puedo culminar sin agradecer a todas esas personas que me apoyaron y pusieron su granito de arena en todo este tiempo para alcanzar esta meta, Andrés Vázquez, Jesse Romo, Diego Spears, Angyell meza, Rebeca Ramírez, Alan Valverde, Daniela Garza, Alina Gómez y Shaula Castro. Esta investigación no se habría hecho sin su gran dedicación y esmero.

Gracias a mis amigos Nedel, Roberto, Terán, Omar, Ramiro, Lázaro, Alejandro, Michel, Ramón, Estefana, Julio, Niquete, Javier y Gretel por soportarme en mis tristezas y alegrías en todo este tiempo, sobre todo siempre creer en mí y su apoyo incondicional. Gracias a mis hermanos del rugby por recibir esos golpes de desahogo que les daba en los entrenamientos.

Por último gracias a todas esas personas que siempre estuvieron cerca de mí y me apoyaron.

Dedicatoria

A mis padres y hermano, sin su apoyo no llegaría a este punto tan importante en mi vida.

A mi familia y amigos que siempre me apoyaron.

INDICE

1.0 RESUMEN.....	1
1.1 Palabras claves.....	2
2.0 INTRODUCCION.....	3
3.0 Materiales y método.....	7
3.1 Diseño experimental	7
3.2 Diseño experimental.....	8
3.3 Enriquecimiento de alimento vivo.....	8
3.3.1 Enriquecimiento de rotíferos.....	8
3.3.2 Enriquecimiento de Artemia.....	9
3.4 Muestreo de larvas.....	9
3.5 Análisis de Actividad Enzimática.....	10
3.5.1 Cuantificación de las proteínas solubles.....	11
3.5.2 Proteasas alcalinas y acidas (pepsina).....	11
3.5.3 Tripsina y Quimotripsina.....	11
3.6 Preparación de tejidos para muestras histológicas.....	12
3.7 Análisis bioquímico	13
3.8 Análisis estadístico.....	14
4.0 Resultados	14
4.1 Crecimiento (longitud y peso).....	14
4.2 Supervivencia.....	15
4.3 Análisis de enzimas digestivas.....	15
4.3.1 Proteasas Alcalinas Totales.....	15
4.3.2 Proteasas Acidas (pepsina).....	16
4.3.3 Tripsina.....	16
4.4 Histología del desarrollo del sistema digestivo.....	17
5.0 Discusiones.....	18
5.1 Crecimiento y supervivencia.....	18

5.2 Enzimas e histología.....	20
6.0 Conclusión.....	21
7.0 Bibliografía.....	22
8.0 Leyendas de figuras.....	29
9.0 Leyendas de tablas.....	30

Resumen

En el cultivo de peces marinos, una de las etapas más críticas es la larvicultura, etapa donde ocurre las mayores mortalidades, debido a que cuando las larvas consumen por completo el saco vitelino y gota de aceite deben de estar preparadas para el inicio de la alimentación exógena, por lo general, comprende de presas de alimento vivo como rotíferos y Artemia. Sin embargo, a pesar de contener altos nivel de proteína carecen de ciertos micronutrientes que los organismos necesitan para un óptimo crecimiento y desarrollo adecuado. Durante los últimos años, se han evaluado los efectos de la adición de varios tipos de suplementos o enriquecedores, recibiendo la atención la taurina como fuente exógena para potenciar el crecimiento, salud y por ende los parámetros de rendimiento en las especies de peces marinos en cultivo desde etapa larvaria hasta la de engorda. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto que presenta la taurina en el crecimiento, sobrevivencia y actividad enzimática durante el desarrollo temprano de *Totoaba macdonaldi* en cultivo intensivo. El tratamiento que mostró mayor crecimiento corresponde al de enriquecimiento con 600 mg/l de taurina. Los resultados muestran que conforme aumenta el nivel de taurina en la dieta las enzimas digestivas como las proteasas alcalinas totales, proteasas ácidas tipo pepsina, tripsina aumentan en su nivel de actividad, lo que por ende resultó en una mejor utilización de los nutrientes presentes en el alimento vivo, corroborándose a nivel del desarrollo del sistema digestivo donde la evidencia histológica muestra que la maduración de los órganos encargados de la digestión como las glándulas gástricas ya están presentes de

forma incipiente a partir del día post eclosión (DPE) 18, completando su transformación para el (DPE) 24 en especial en los tratamientos 400 y 600 mg/l Tau.

Abstract

The main critical stage in fish marine farming is larval culture, stage where the highest mortality rate is present, this is mainly because the larvae consumes its yolk sac and oil drop in its totality, preparing them for the start of live feeding to eat live feeding with is mainly composed of prey such as Rotifers and Artemia. There is a high nutritional value to these organisms but they lack some essential micronutrients that the organism needs for their optimal growth and development. Over the last years there has been a great deal of evaluation done of the addition supplements and enrichments, receiving the late attention to the addition of taurine as an hexogen source to potentized growth, development, overall health and thus the overall performance in fish farming during its larval and juvenile stages. The objective of the present investigation is to determine the overall impact of taurine on the growth and enzymatic activity in the early development of *Totoaba macdonaldi* in intensive rearing systems. The enrichment that showed a bigger growth was the one with a concentration of 600mg/L. According to several authors, taurine increases the growth and development, thus making the larval farming stage shorter and more efficient, decreasing the overall cost of live feed. The results also show that as the taurine levels increase in the diet, digestive enzymes such as total alkaline proteases, acid protease pepsin type and trypsin increase in their activity levels, resulting in a better utilization of the nutrients present in live

feed, corroborating itself with the development of the digestive system were the histological evidence shows a significant maturation of digestive organs such as the gastric gland which is incipient since dph 18, completing its transformation at dph 24 specially when treated with 400 and 600mg/L.

Introducción

El alto impacto de las pesquerías sobre las especies de importancia comercial dado su valor económico y nutricional como fuente de proteína de calidad para consumo humano ha generado la disminución de los individuos en su hábitat natural junto con otras especies capturadas de manera incidental, ante esta situación el desarrollo de biotecnologías que promuevan e intensifiquen la adquisición de un número mayor de crías para fines de repoblación y producción en cautiverio mediante la utilización de técnicas de cultivo en cuerpos de agua abiertos o cerrados bajo diferentes escalas de producción como extensivo, semi-intensivo e intensivo se ha venido desarrollando por medio de la acuicultura (Castello, 1993). La acuicultura ha participado en el aumento de la producción mundial de pescados y mariscos a escalas que llegan a ser cada vez de mayor volumen que las que se podrían obtener por las pesquerías, debido a que las principales zonas de captura mundial se encuentran en un estado de sobreexplotación, desequilibrio y sin posibilidades de recuperación (FAO, 2016). El éxito de un cultivo de peces marinos a escala intensiva se basa en la producción de larvas de peces marinos en masa, sin embargo, se encuentra limitado debido a diferentes factores tales como: genéticos, calidad de huevo y nutricionales, mismos que se reflejan en bajo porcentajes de tasa de eclosión y falta de nutrientes esenciales en el alimento vivo y micro dietas suministrados a las larvas de peces en desarrollo (Izquierdo y Koven, 2011; Eryalcin, 2016). El alimento vivo es fundamental en las primeras etapas de desarrollo de la mayoría los de peces marinos que carecen de un estómago funcional al inicio de su etapa de vida;

debido a que es el alimento vivo el encargado en aportar de forma exógena enzimas digestivas y nutrientes de fácil digestión. Sin embargo, es conocido que los rotíferos y Artemias carecen de ciertos nutrientes esenciales indispensables para el desarrollo de la larva como lo son: los ácidos grasos poli insaturados (PUFA), aminoácidos esenciales (EAA), vitaminas, minerales y otros micronutrientes, por lo cual es de suma importancia el enriquecimiento de este tipo de alimento durante la etapa larvaria (Rotman et al., 2016). En estudios recientes se ha estudiado a la taurina como uno de los elementos importantes en el desarrollo de las etapas iniciales de peces con desarrollo rápido ó cadena alimenticia propiamente de origen carnívoro, debido a sus diversas funciones: función biliar, osmo-regulación, función renal, estimulador alimenticio, sistema digestivo y promotor de crecimiento (Salze et al., 2015). La mayoría de las especies de las larvas de peces en el medio natural se alimentan de copépodos, en el cual su composición nutricional tiene un contenido de taurina entre 0.58–0.83% (Katagiri et al, 2016), mientras que los alimentos vivos tradicionales contienen niveles aparentemente muy bajos: rotíferos 0.11–0.19% (Yamamoto et al., 2008), y Artemias 0.09–0.20% (Salze et al., 2011), por lo que se considera que la suplementación de taurina en el alimento vivo para la primera alimentación exógena es indispensable. La taurina es el nombre común del ácido 2-aminoetanosulfónico, un ácido amino sulfónico que no se incorpora a las proteínas, sino que reside en el grupo de aminoácidos libres (Hamre et al., 2013). La taurina desempeña un papel crítico en muchas funciones biológicas importantes y, en los teleósteos, participa en la conjugación de sales biliares, la osmorregulación, la estabilización de la membrana, la modulación de los

neurotransmisores, la función antioxidante y el desarrollo temprano de los sistemas visuales, neuronales y musculares (Huxtable, 1992; Salze y Davis, 2015).

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es una especie perteneciente a la familia *Sciaenidae* también conocida como curvinas, Esta especie tuvo una gran importancia en la pesca del golfo de California en los primeros 70 años del siglo XX (Flanagan y Hendrickson, 1976), y fue la causa del desarrollo de pueblos y comunidades en el alto golfo de California, sin embargo, la sobrepesca por el gran valor que tenía su vejiga natatoria o "Buche" más la reducción del flujo de agua de la desembocadura del río Colorado fueron probables causas a que colapsara la pesquería la cual se llevó a una veda permanente desde el año de 1974 hasta la actualidad (True et al., 2012), es una especie dentro de la lista 059 en peligro de extinción. En la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) desde hace 25 años se ha desarrollado la biotecnología de esta especie, así también, ha realizado diversos estudios de reproducción, genética y fisiología de totoaba, así también se han realizado diversos estudios de nutrición en esta especie, donde se utilizó taurina como suplemento en la dieta (Bañuelos Vargas et al., 2014; López et al., 2015; Trejo et al., 2016; Budy et al., 2017), de igual manera, se han realizado estudios en la etapa larvaria (Mata-Sotres et al., 2015; Galaviz et al., 2015, 2019) el cual estos estudios han ayudado al desarrollo del cultivo de esta especie en el noroeste de México. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la taurina como

suplemento en la dieta de alimento vivo (rotífero y Artemia) en el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *Totoaba macdonaldi*.

Justificación

- Mejorar el crecimiento y la sobrevivencia de larvas de Totoaba.

- Bajar riesgos de producción en el cultivo larvario.

- Aplicar este protocolo en centros de producción de Totoaba.

Hipótesis

Los rotíferos y Artemias enriquecidos con taurina, aumentaran el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia en larvas de totoaba.

Objetivos

General

Evaluar el efecto de la taurina como suplemento en la dieta de alimento vivo (rotífero y Artemia) en el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *Totoaba macdonaldi*.

Específicos

- Evaluar el crecimiento y sobrevivencia en larvas de totoaba alimentados con dietas (rotífero y Artemia) enriquecidos con diferentes niveles de taurina.

- Evaluar la actividad de las principales enzimas digestivas relacionadas en la digestión de nutrientes de los primeros estadios larvarios de totoaba.
- Evaluar el desarrollo del sistema digestivo en larvas alimentadas con diferentes niveles de taurina en la dieta.

1 **Efecto del enriquecimiento de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia* sp.**
2 **con taurina sobre el crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Totoaba***
3 ***macdonaldi***

4 Julio C. Segovia

5
6
7 **1.0. Resumen**

8
9 En el cultivo de peces marinos, una de las etapas más críticas es la larvicultura,
10 etapa donde ocurre las mayores mortalidades, debido a que cuando las larvas
11 consumen por completo el saco vitelino y gota de aceite deben de estar
12 preparadas para el inicio de la alimentación exógena, por lo general, comprende
13 de presas de alimento vivo como rotíferos y Artemia. Sin embargo, a pesar de
14 contener altos nivel de proteína carecen de ciertos micronutrientes que los
15 organismos necesitan para un óptimo crecimiento y desarrollo adecuado. Durante
16 los últimos años, se han evaluado los efectos de la adición de varios tipos de
17 suplementos o enriquecedores, recibiendo la atención la taurina como fuente
18 exógena para potenciar el crecimiento, salud y por ende los parámetros de
19 rendimiento en las especies de peces marinos en cultivo desde etapa larvaria
20 hasta la de engorda. El objetivo de la presente investigación fue determinar el
21 efecto que presenta la taurina en el crecimiento, sobrevivencia y actividad
22 enzimática durante el desarrollo temprano de *Totoaba macdonaldi* en cultivo
23 intensivo. El tratamiento que mostró mayor crecimiento corresponde al de
24 enriquecimiento con 600 mg/l de taurina. Los resultados muestran que conforme
25 aumenta el nivel de taurina en la dieta las enzimas digestivas como las proteasas
26 alcalinas totales, proteasas ácidas tipo pepsina, tripsina aumentan en su nivel de

27 actividad, lo que por ende resultó en una mejor utilización de los nutrientes
28 presentes en el alimento vivo, corroborándose a nivel del desarrollo del sistema
29 digestivo donde la evidencia histológica muestra que la maduración de los órganos
30 encargados de la digestión como las glándulas gástricas ya están presentes de
31 forma incipiente a partir del día post eclosión (DPE) 18, completando su
32 transformación para el (DPE) 24 en especial en los tratamientos 400 y 600 mg/l
33 Tau.

34

35

36 **1.1 Palabras clave:** Taurina, rotífero, Artemia, enzimas digestivas, larva, totoaba

37

38 **2.0 Introducción**

39 El éxito en la producción de larvas de peces marinos se encuentra limitado debido
40 a diferentes factores como: genéticos, calidad de huevo y nutricionales, mismos
41 que se reflejan en bajo porcentajes de tasa de eclosión, desarrollo óptimo de las
42 larvas y problemas morfológicos y es debido a la falta de nutrientes esenciales en
43 el alimento vivo y micro dietas suministrados a las larvas de peces en desarrollo
44 (Izquierdo y Koven, 2011). Desde el punto de vista nutricional y de manera
45 particular en la alimentación exógena una de las posibles causas de las altas
46 tasas de mortalidad en los primeros días de vida se debe al inadecuado valor
47 nutricional del alimento vivo utilizado que comúnmente en la larvicultura se refiere
48 a la suplementación de rotíferos y artemias. El alimento vivo es fundamental en las
49 primeras etapas de desarrollo de la mayoría los de peces marinos que carecen de
50 un estómago funcional al inicio de su etapa de vida; debido a que es el alimento
51 vivo el encargado en aportar de forma exógena enzimas digestivas y nutrientes de
52 fácil digestión. Sin embargo, es conocido que los rotíferos y artemias carecen de
53 ciertos nutrientes esenciales indispensables para el desarrollo de la larva como lo
54 son: los ácidos grasos poli insaturados (PUFA), aminoácidos esenciales (EAA),
55 vitaminas, minerales y otros micronutrientes, por lo cual es de suma importancia el
56 enriquecimiento de este tipo de alimento durante la etapa larvaria (Rotman et al.,
57 2016).

58 Recientemente se ha estudiado a la taurina como otro de los elementos
59 importantes en el desarrollo de las etapas iniciales de peces con desarrollo rápido
60 o cadena alimenticia propiamente de origen carnívoro, debido a sus diversas
61 funciones: función biliar, osmo-regulación, función renal, estimulador alimenticio,

62 sistema digestivo y promotor de crecimiento (Salze et al., 2015). Muchas de las
63 larvas de peces en el medio natural se alimentan de copépodos, en el cual su
64 composición nutricional tiene un contenido de taurina entre 0.58–0.83% (Katagiri
65 et al., 2016), mientras que los alimentos vivos tradicionales contienen niveles
66 aparentemente muy bajos: rotíferos 0.11–0.19% (Yamamoto et al., 2008), y
67 Artemias 0.09–0.20% (Salze et al., 2011), por lo que se considera que su posible
68 suplementación en estas etapas de cultivo sea adecuado.

69 La taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico, CAS 107-35-7) es un ácido orgánico el
70 cual se describió por primera vez a partir de la bilis de un buey (Tiedemann y
71 Gmelin, 1827). La taurina es una molécula simple, que contiene un grupo
72 sulfonato ácido, un grupo amino básico y dos carbonos intermedios. Es por eso un
73 aminoácido, aunque sea un β -aminoácido: el grupo amino está unido al carbono
74 adyacente al que contiene el grupo ácido, es decir, el segundo carbono. A
75 comparación con los α -aminoácidos en donde el grupo amino está unido al mismo
76 carbono que contiene el grupo ácido, es decir, el primer carbono (Bittner et al.,
77 2005; Lähdesmäki, 1987). Entre las diversas funciones de taurina y sus efectos
78 fisiológicos en los organismos predominan la asimilación y absorción de lípidos
79 debido a la conjugación con sales biliares, estabilizador de membranas,
80 osmorregulación, atractabilidad de la dieta, estimulador alimenticio y posible
81 regulador de la actividad de enzimas digestivas y metabólicas (Huxtable, 1992; El
82 Idrissi y Trenkner, 2004; Kim et al., 2007). Diversos estudios en numerosas
83 especies de peces marinos como el jurel *Seriola Dumerili*, pargo rojo (*Pagrus*
84 *Pagrus*), atún rojo (*Thunnus Orientalis*) y el atún de aleta amarilla (*Thunnus*
85 *albacares*), se ha observado que la taurina es un nutriente esencial, en especial

86 durante las primeras etapas de desarrollo (Pinto et al., 2010; Matsunari et al.,
87 2013; Kim et al., 2014; Takeuchi, 2014; Hawkyard et al., 2015; Katagiri et al.,
88 2016). Existe evidencia reciente que las larvas de peces marinos tienen mejor
89 desarrollo al ser alimentadas con rotíferos y Artemias enriquecidos con taurina; sin
90 embargo, se desconoce si estos beneficios son debido a un rápido desarrollo del
91 sistema digestivo de las larvas o bien si las secreciones de enzimas digestivas
92 importantes durante las primeras etapas de desarrollo tienen mayor actividad. En
93 los últimos años el estudio de las etapas de la ontogenia temprana se ha
94 centrado en las enzimas digestivas de peces marinos y de agua dulce. Estos
95 estudios nos ayudan a conocer las necesidades fisiológicas nutricionales que
96 requiere el organismo ya que el cambio de la capacidad digestiva determina el tipo
97 de nutrientes que pueden ser digeridos y absorbidos a lo largo de su desarrollo
98 (Gisbert et al., 2013; Hamre et al., 2013; Rønnestad et al., 2013). Al probar
99 diferentes regímenes de alimentación durante la ontogenia no solo se puede
100 utilizar como un indicador del desarrollo larvario la maduración intestinal, sino
101 también la supervivencia y el rendimiento (Zambonino-Infante et al., 2008). En
102 particular, las transiciones de la alimentación endógena a exógena, así como la
103 transformación morfológica de la larva al juvenil se consideran eventos clave
104 durante los cuales los protocolos de alimentación deben adaptarse a las
105 capacidades digestivas de un organismo en desarrollo. Por lo tanto, la
106 comprensión de la ontogenia de las enzimas digestivas es fundamental para
107 determinar el momento más apropiado para comenzar con el destete y la
108 optimización de las dietas compuestas, así como los protocolos de alimentación, lo
109 que eventualmente llevará a mejorar las tasas de crecimiento, la supervivencia y la

110 calidad misma de las larvas (Zambonino-Infante et al., 2008 ; Hamre et al., 2013 ;
111 Rønnestad et al., 2013)

112 La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es una especie perteneciente a la familia
113 Sciaenidae también conocida como curvinas, Esta especie tuvo una gran
114 importancia en la pesca del golfo de california en los primeros 70 años del siglo XX
115 (Flanagan et al., 1976), y fue la causa del desarrollo de pueblos y comunidades en
116 el alto golfo de California, sin embargo, la sobrepesca por el gran valor que tenía
117 su vejiga natatoria o "Buche" más la reducción del flujo de agua de la
118 desembocadura del rio colorado fueron probables causas a que colapsara la
119 pesquería la cual se llevó a una veda permanente desde el año de 1974 hasta la
120 actualidad (CITES, 2005; True et al., 2012), es una especie dentro de la lista 059
121 en peligro de extinción. En la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en
122 la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) desde hace 25 años se ha
123 desarrollado la biotecnología de esta especie, así también, ha realizado diversos
124 estudios de reproducción, genética y fisiología de totoaba, así también se han
125 realizado diversos estudios de nutrición en esta especie, donde se ha utilizado
126 taurina como suplemento en la dieta (Bañuelos Vargas et al., 2014; López et al.,
127 2015; Trejo et al., 2016; Budy et al., 2017), de igual manera, se han realizado
128 estudios en la etapa larvaria (Mata-Sotres et al., 2015; Galaviz et al., 2015, 2019;)
129 el cual estos estudios han ayudado al desarrollo del cultivo de esta especie en el
130 noroeste de México. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la taurina
131 como suplemento en la dieta de alimento vivo (rotífero y artemia) en el crecimiento
132 y sobrevivencia de las larvas de *Totoaba macdonaldi*.

133 **3.0. Materiales y Métodos**

134 **3.1. Diseño experimental**

135 Huevos fertilizados de totoaba fueron obtenidos a partir de la reproducción
136 controlada de la especie en cautiverio en la Unidad de Biotecnología en
137 Piscicultura (UBP) de la Universidad Autónoma de Baja California. Se colocaron
138 en un tanque de eclosión de 2.2 mt³ en un sistema de recirculación con
139 temperatura de 24 ±1 °C, salinidad de 34 ups, O₂ >6 mg/l y un fotoperiodo 12:12.
140 Las larvas recién eclosionadas se trasladaron el día 0 (DPE 0) post eclosión a 15
141 tanques de fibra de vidrio de 100 L de capacidad con una densidad de 50 L/l en el
142 mismo sistema de recirculación. Diferentes niveles por triplicado de taurina (0, 200,
143 400, 600 y 800 mg/L) fueron asignados de forma aleatoria a cada tanque
144 experimental en un diseño completamente aleatorio, conformando un total de 15
145 tanques experimentales. El protocolo de alimentación y cultivo larvario se realizó
146 de acuerdo a lo reportado por (Galaviz et al, 2015) que consistió en empezar
147 alimentar a las larvas al 4DPE cuando las larvas abrieron la boca, inflaron la
148 vejiga natatoria y absorbieron su saco vitelino. La primera alimentación exógena
149 se realizó cuatro veces al día (07:00, 11:00, 15:00 y 20:00 h). La alimentación
150 consistió en suministrar rotíferos (*Brachionus plicatillis*) del DPE 4 al DPE 14,
151 seguido por metanauplios de Artemia (Salt Creek Inc, Salt Lake City, UT, USA)
152 iniciando el DPE 12 y terminando al dpe 26.

153 **3.2. Diseño experimental**

154 **3.3. Enriquecimiento de alimento vivo**

155 El método que se utilizó para enriquecer al rotífero y/o a la Artemia fue el de
156 colocarlos en una disolución, el cual consistió en disolver la cantidad apropiada de

157 taurina en el medio de cultivo donde se enriquecen los rotíferos y Artemias, de
158 acuerdo con el método descrito por (Matsunari et al., 2013; Kim et al., 2014; Katagiri
159 et al., 2016) utilizado para diferentes especies de larvas de peces marinos.

160 **3.3.1. Enriquecimiento de rotíferos**

161 Los rotíferos se tomaron diariamente del cultivo de producción que tiene la UBP, el
162 cual se cultivaron por el método de lotes, los rotíferos se alimentaban con pasta
163 Rotigrow plus y levadura para hornear. Los rotíferos para enriquecer se colocaron
164 en 5 tanques con un volumen de 38 litros cada uno. Cada tanque fue sembrado a
165 una densidad de 500 rot/mL, fueron enriquecidos con diferente concentración de
166 taurina y enriquecedor comercial ORI-GREEN de SKRETTING (la concentración y
167 el tiempo del enriquecedor comercial se basó en el protocolo del proveedor), el
168 tiempo de enriquecimiento para rotíferos fue de 8 horas.

169 **3.3.2. Enriquecimiento de Artemias**

170 Las artemias se tomaron del cultivo de producción que tiene la UBP, se colocaron
171 en 5 tanques con un volumen de 40 litros a una densidad de 300 art/ml. Cada
172 contenedor fue enriquecido con diferente concentración de taurina y enriquecedor
173 comercial ALGAMAC 3050 (la concentración del enriquecedor comercial se basó
174 en el protocolo del proveedor) el tiempo de enriquecimiento para Artemia fue de 8
175 horas.

176

177 **3.4. Muestreo de larvas**

178 Los muestreos se realizaron en días estratégicos de cultivo (8, 13, 18, 22, 24 y 26
179 dpe), abarcando principalmente los cambios en la alimentación. Cada muestreo
180 fue realizado por mañana antes de la primera alimentación. Después del

181 muestreo, las larvas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de anestesia
182 (Tricaine methanesulfonate-MS 222), lavadas y enjuagadas con agua destilada
183 para remover el exceso de sales y otras partículas que pudieron estar adheridas a
184 las larvas. En cada muestreo se tomarán 30 larvas de cada tanque para la
185 obtención de longitud y peso, otras 100 larvas fueron muestreadas para análisis
186 bioquímico y fueron preservadas en un crio congelación a -80 °C para
187 posteriormente hacer el análisis de actividad enzimática. Adicionalmente se
188 muestrearon 30 larvas por tanque que fueron preservadas en para-formaldehído al
189 4% con solución amortiguadora de buffer de fosfatos para su posterior análisis
190 histológico. La longitud de las larvas se determinó por medio de fotografía digital
191 directa al microscopio y con ayuda del programa motic imágenes plus 2.0. Para
192 determinar el peso de las lavas se utilizó una balanza analítica VELAB: modelo:
193 VE-204 (d=0.01 mg), se colocaron 10 larvas en cubreobjetos previamente puesto
194 a peso estándar y se metieron a la estufa para eliminar humedad, después se
195 sacaron y se dejaron en un desecador por 15 minutos, posteriormente se pesaron
196 en una balanza analítica para determinar por diferencia el peso de cada grupo de
197 larvas.

198 **3.5. Análisis de Actividad Enzimática**

199 El análisis de actividad enzimática de cada uno de los tratamientos se realizó
200 mediante métodos de espectrofotometría usando tres diferentes pools de larvas
201 por muestreo de cada tratamiento (replicas). Del DPE 4 al DPE 8 se tomaron 100
202 larvas por tanque, en el DPE 13 se tomaron 50 larvas, en los DPE 18, 22, 24 y 26
203 se tomaron 10 larvas por tanque. El procedimiento consistió en coleccionar el número
204 de larvas del tanque en tubos eppendorf de 1.5 ml de volumen, se enjuagaron con

205 agua destilada para eliminar sales del organismo y se guardaron en un contenedor
206 con hielo seco para no degradar la composición del organismo, después de
207 colectar la muestra de larvas de los 15 tanques se almacenaron en un ultra
208 congelador a -80 °C.

209 La preparación de los homogenizados enzimáticos se realizaron de dos formas
210 diferentes las larvas del DPE 4, 8, y 13 se maceraron de cuerpo completo,
211 mientras las larvas del DPE 18, 22, 24 y 26 se cortaron cabeza y cola, dejando
212 solo el sistema digestivo. Las larvas se colocaron en un tubo eppendorf y se
213 maceraron con un pistilo, una vez homogenizado se agregaron 200 µl de buffer
214 Trisma®, posteriormente se centrifugo a una temperatura de 4°C a 14 000 RPM
215 durante 30 minutos. Todo el procedimiento fue realizado a 4 °C. Finalmente, el
216 sobrenadante de los tubos eppendorf se separó en alícuotas de 50 µl y se
217 almacenaron en el ultra congelador a -80°C para utilizarlos en diferente análisis
218 enzimático.

219 **3.5.1. Cuantificación de las proteínas solubles**

220 La cuantificación de la proteína soluble se utilizó el método de Bradford (1976).
221 Las muestras se diluyeron en una proporción de 1:8, el cual fue diluido 10 µl de
222 muestra en 70 µl de agua destilada. Teniendo el homogenizado se le añadió 200
223 µl de albumina de suero bovino (BSA). Finalmente se leyeron las muestras en el
224 espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go a una longitud de onda de 595
225 nm.

226 **3.5.2. Proteasas alcalinas y acidas (pepsina)**

227 Para la actividad tipo proteasa alcalina fue estimada por el método de Walter
228 (1984) se utilizó como substrato caseína al 0.5% en una solución tampón Tris/HCl

229 50 mmol L⁻¹ a pH 9. La proteasa ácida (actividad pepsina) fue medida con la
230 técnica de Anson (1938), se utilizó como sustrato hemoglobina al 0.5% en solución
231 tampón Glicina/ HCl 0.1 mol L⁻¹, pH 2. Las mezclas se incubaron a 37°C durante
232 30 minutos, se detuvo la reacción adicionando 0.5 ml de ácido tricloroacético
233 (TCA, 20%), fue centrifugado a 14, 000 rpm durante 15 minutos y la absorbancia
234 de los productos de reacción fue medida a 280 nm. La unidad de actividad
235 enzimática es definida como 1 µg de tirosina liberada por minuto, esto con base en
236 el coeficiente de extinción molar (0.005).

237 **3.5.3. Tripsina y Quimotripsina**

238 La cuantificación de la actividad de la enzima Quimotripsina se basó en la
239 metodología de Del Mar (1979), utilizando un sustrato SAPNA (N-Succinyl-Ala-Ala-
240 Pro-Phe p-nitroanilide) con pH 8 al 1 mM. Para evaluar la actividad de la enzima
241 tripsina se realizó la metodología de Erlanger et al. (1961) se utilizó BAPNA (Nα-
242 Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride al 1mM) a un pH 8. Todas las
243 muestras se corrieron en micro placa, se analizaron por triplicado y un blanco
244 agregando 10 µl de extracto enzimático mientras que al blanco se le agrego agua
245 destilada y 200 µl de sustrato enzimático BAPNA y SAPNA respecto a cada
246 enzima, posteriormente se homogenizaron por medio de pipeteo y se colocaron en
247 una incubadora a 37°C durante 30 minutos, por último, se leyeron en un
248 espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go a 410 nm. Para ambas
249 enzimas, una unidad de actividad enzimática fue definida como 1µmol p-
250 nitroanilide relacionado por minuto, usando el coeficiente de extinción molar (CEM)
251 de 8.8.

252 Para el cálculo de la actividad específica individual de los extractos fue
253 determinada utilizando las siguientes ecuaciones: 1) Unidades $\cdot \text{ml}^{-1} = [\Delta \text{abs} \times$
254 volumen final de reacción (ml)]. [CEM x tiempo (min) x volumen del extracto (ml)] ;
255 2) Unidades $\cdot \text{mg de proteína}^{-1} = [\text{Unidades por ml}] \cdot [\text{mg de proteína soluble}]^{-1}$; 3)
256 Unidades $\cdot \text{larva}^{-1} = [\text{Unidades por ml}] \cdot [\text{número de larvas por ml}]^{-1}$. Donde: Δabs es
257 el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda, CEM es el
258 coeficiente de extinción molar para el producto de reacción ($\text{ml} \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

259

260 **3.6. Preparación de tejidos para muestras histológicas**

261 A partir de las larvas que se almacenaron para realizar la histología, se procedió a
262 su deshidratación en diferentes concentraciones de Etanol (Fisher ChemAlert®)
263 con ayuda de un histoquinete (Tissue-tek II, mod. 4640B) por medio del protocolo
264 de deshidratación de tejidos de Sánchez Serrano, 2005.

265 Posteriormente las larvas se embebieron en parafina (Paraplast X-TRA) y se
266 cortaron en un micrótopo (Leica RM2125 RTS) a un grosor de $5\mu\text{m}$. Los cortes se
267 montaron en porta objetos (Gold Seal®) a baño maría con grenetina grado
268 analítico para realizar la desparafinación. Posteriormente se tiñeron con la técnica
269 Hematoxilina-Eosina.

270 Las cortes de las muestras de larvas de totoaba se observaron en un microscopio
271 invertido izzi a una magnificación de 5x, 10x, 20x y fotografiadas con la ayuda de
272 una cámara al microscopio y el programa AxioVision 4.8.2 SP3 (08-2013). Se
273 observó en específico el desarrollo del sistema digestivo (intestinos, hígado,

274 páncreas y estomago) de las larvas del día 8 al día 26 para identificar la
275 maduración de este sistema.

276 **3.7. Análisis bioquímico**

277 El perfil químico proximal se determinó de la dieta utilizada en el ensayo (rotíferos
278 y Artemias) enriquecidos con diferentes niveles de taurina. La composición de
279 proteínas, lípidos, cenizas y humedad en dietas se analizaron de acuerdo a los
280 métodos aprobados por la (AOAC 2000). Proteínas totales se determinó en un
281 VAPODEST® 197 450 Gerhardt Analytical Systems. Se tituló el volumen
282 capturado de la digestión con HCl por diferencias de pH con un dosificador
283 automático (TITRON), el contenido de nitrógeno se multiplico por un factor de
284 proteína cruda de 6.25. Métodos gravimétricos fueron utilizados en la
285 determinación del contenido de lípidos, humedad y ceniza. Los lípidos totales
286 fueron determinados de acuerdo al método de (Folch, 1957) por extracción con
287 diclorometano: metanol (2:1; v/v), la humedad se determinó después de evaporar
288 el contenido de agua a 105°C por 12 horas y el de cenizas tras calcinar la muestra
289 a 550°C durante 6 horas.

290 **3.8. Análisis estadístico**

291 Para los resultados biométricos (peso y longitud), así como para los índices
292 biológicos (actividad enzimática y proximales de dietas), se realizó un análisis de
293 varianza de una vía (ANOVA), con la prueba de comparaciones de varianzas de
294 Welch y con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, con previa revisión de los
295 supuestos estadísticos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Todos los
296 análisis fueron realizados con el software Statistix 8.0 para Windows.

297 **4.0. Resultados**

298 **4.1. Crecimiento (longitud y peso)**

299 El incremento en peso húmedo (mg) y longitud (mm) en larvas de totoaba *T.*
300 *macdonaldi* alimentadas con dietas enriquecidas con diferentes niveles de taurina
301 es mostrado en la figura 1 y 2. El tratamiento con mayor crecimiento en peso
302 húmedo fue el de 600 mg/l de taurina con un peso final en miligramo de $34.37 \pm$
303 3.60 , obteniendo una diferencia significativa en el día 26 DPE ($P=0.0568$) mientras
304 el tratamiento con menor crecimiento fue el tratamiento control de 0 mg/l con un
305 peso final de 21.08 ± 5.96 . Figura 1. La longitud (mm) de las larvas de peces
306 aumenta conforme los niveles de taurina en la dieta, excepto las larvas del
307 tratamiento de 800 mg/l de taurina. El tratamiento con mayor crecimiento en
308 longitud fue el de 600 mg/l de taurina con una talla de 12.4 ± 1.7 milímetros,
309 presentando diferencia significativa en el día 26 DPE ($P=0.0515$), el tratamiento
310 con menor crecimiento en talla fue el de 0 mg/l de taurina (control) con $11.01 \pm$
311 1.89 milímetros. Figura 2.

312 **4.2 Supervivencia**

313 La utilización de taurina en el enriquecimiento del alimento vivo (rotífero y Artemia)
314 como alimento para las larvas de los peces, ha mostrado que acelera el
315 crecimiento de las larvas de peces, así mismo que existe mejor supervivencia en
316 los organismos. El tratamiento con mayor supervivencia fue el de 200 mg/litro de
317 taurina con un porcentaje de $65.39 \% \pm 2.09$, mientras el tratamiento que obtuvo
318 menor supervivencia fue el de $400 \text{ mg/l} \pm 5.27$. con una diferencia significativas
319 ($P=0.0481$) Tabla 1.

320

321 **4.3. Análisis de enzimas digestivas**

322 **4.3.1. Proteasas Alcalinas Totales**

323 La actividad de proteasas alcalinas totales en los diferentes tratamientos a
324 diferentes días post eclosión es presentada en la tabla III.

325 Los niveles de actividad enzimática de proteasas alcalinas totales al dpe 8, 13, 22,
326 24 y 26 presentó fluctuaciones durante el estudio experimental, sin presentar
327 diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0.05$). Sin embargo, al dpe 18
328 diferencias significativas fueron observadas ($P=0.0457$) entre los tratamientos,
329 presentándose mayor nivel de actividad en el tratamiento (600 mg/l Tau), mientras
330 que el menor nivel de actividad fue observado en el tratamiento (800 mg/l Tau)
331 Tabla III.

332

333 **4.3.2 Proteasas Acidas (pepsina)**

334 La actividad de proteasas acidas tipo pepsina en los diferentes tratamientos a
335 diferentes días post eclosión es presentada en la tabla IV.

336 Los niveles de proteasas acidas fue incrementando conforme el desarrollo de larva
337 sin importar el nivel de taurina en la dieta en especial en los días post eclosión 8-
338 18. Sin embargo, una vez alcanzando la maduración del sistema digestivo y la
339 formación de glándulas gástricas que son indicativo de la formación de un
340 estómago funcional en la larva, diferencias significativas fueron observadas al
341 DPE 22 ($P=0.0431$), presentándose mayor nivel de actividad en el tratamiento
342 (600 mg/l Tau), mientras que el menor nivel de actividad fue observado en el
343 tratamiento (200 mg/l Tau).

344 **4.3.3. Tripsina**

345 La actividad de tripsina en los diferentes tratamientos a diferentes días post
346 eclosión es presentada en la tabla V.

347 El nivel de actividad de tripsina aumenta conforme el desarrollo de la larva a los
348 diferentes DPE, sin embargo, se observan diferencias significativas ($P=0.016$)
349 entre los diferentes tratamientos al DPE 13., presentándose mayor actividad de
350 tripsina en el tratamiento (200 mg/L Tau), mientras que el menor nivel fue
351 presentado en el tratamiento (800 mg/L Tau), sin embargo, los tratamientos (200,
352 400 y 600 mg/L Tau) no presentaron diferencias significativas entre ellos.
353 Resultados similares fueron observados en los DPE 22, 24 y 26, donde los
354 tratamientos de (400 y 600 mg/L Tau) presentaron los mayores niveles de
355 actividad de tripsina.

356

357 **4.4. Histología del desarrollo del sistema digestivo**

358 Al DPE 8 el tracto digestivo de larvas de totoaba se desarrolló en longitud y
359 complejidad. Sin embargo, el pliegue transversal del esófago se ve mejor
360 desarrollado en las larvas con mayor nivel de taurina en la dieta, al igual que un
361 mayor número de células caliciformes que cubren el pliegue del esófago. Así
362 mismo, se observa mayor plegamiento de la mucosa intestinal, aumenta el nivel
363 de plegamiento de la parte posterior del intestino, siendo más prominente que la
364 anterior. Estas observaciones se presentaron con mayor claridad en los
365 tratamientos (400 y 600 mg/L Tau), Figura 3.

366 Al DPE 13 y 18, el hígado incremento en talla y ha logrado su forma globular en
367 cada uno de los tratamientos, los hepatocitos no mostraron inclusiones lipídicas y

368 conservaron una forma poligonal con núcleos centrales y un citoplasma
369 eosinofílico ligero en todos los tratamientos, excepto el tratamiento con 800 mg/L
370 Tau, que presenta un desarrollo del hígado con algunas inclusiones lipídicas que
371 rodean parte del estómago primordial. Así mismo, el páncreas en forma exocrino
372 está presente en cada uno de los tratamientos, principalmente embebido entre el
373 intestino anterior, sin embargo, diferencias notables se pueden observar en la
374 Figura C, D y E (400, 600 y 800 mg/L Tau) donde el desarrollo y maduración del
375 sistema digestivo es diferente con respecto a las imágenes A y B que
376 corresponden a los tratamientos (0 y 200 mg/L Tau). En este periodo la
377 característica más relevante a nivel histológico es probablemente la aparición de
378 un grupo de células cuboides no diferenciadas entre el esófago y el intestino anterior
379 y posterior a la vejiga natatoria en los tratamientos 600 y 800 mg/L Tau. Figura 4 y
380 5.

381 Al DPE 24, se observa que los grupos de células cuboidales que se describieron al
382 DPE 18 se desarrollarían en glándulas gástricas alrededor a lo largo de números
383 pliegues longitudinales y rodeados por una capa delgada de musculatura circular y
384 tejido conectivo. Es evidente la transformación de larva a juvenil que ha
385 presentado el organismo en estudio, principalmente se observa todo un estómago
386 formado con escamas de glándulas gástricas que rodean el estómago de manera
387 interna en especial los tratamientos 400 y 600 mg/L Tau. Figura 6.

388 **5.0. Discusiones**

389 **5.1. Crecimiento y sobrevivencia**

390 El crecimiento de las larvas de peces varía dependiendo la especie, ya que
391 algunas presentan un alto metabolismo a comparación de otras, otro de los

392 factores es el estrés que se le da en el cultivo como la temperatura, niveles de
393 oxígeno, parámetros fisicoquímicos del agua, intensidad de luz y claro está la
394 alimentación. La taurina ha demostrado que es un nutriente esencial para los
395 peces marinos debido a que en la etapa larval presentan mayor crecimiento al
396 enriquecer el alimento vivo (Salze et al., 2015) en larvas de jurel (*Seriola dumerilii*)
397 y (Rotman et al., 2016) con larvas de jurel (*Seriola Lalandi*) ambos enriquecieron al
398 alimento vivo (rotífero y Artemia) con taurina con el método de disolución,
399 utilizaron 4 enriquecimientos: 0, 200, 400 y 800 mg de taurina/litro de agua
400 obteniendo como resultado que el enriquecimiento con 800 mg/ litro obtuvo mayor
401 crecimiento y sobrevivencia en comparación de 0, 200, 400 mg/litro. Estas
402 especies de peces en etapa larval su consumo de alimento vivo es alto a
403 comparación a las larvas de *Totoaba macdonaldi*.

404 Kim et al., 2014, trabajaron con el efecto de la taurina en la mejora de la dieta,
405 sobre el crecimiento y el desarrollo del pargo rojo (*Pagrus Pagrus*), utilizando
406 rotíferos enriquecidos con 0 mg/l y 800 mg/l por método de disolución, obteniendo
407 como resultado en las larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con 800 mg/l
408 mayor crecimiento y mayor correlación proteína/DNA. (Katagiri et al., 2016) trabajó
409 el efecto del enriquecimiento de rotíferos (*Brachionus sp.*) con taurina sobre el
410 crecimiento de las larvas de atún rojo (*Thunnus Orientalis*) y el atún de aleta
411 amarilla (*Thunnus albacares*), utilizando rotíferos enriquecidos con taurina con el
412 método de disolución a 0 mg/l y 800 mg/l, obteniendo como resultado que las
413 larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos a 800 mg/l tuvieron un mayor
414 desarrollo del notocordio.

415 (Kim et al., 2014; Katagiri et al., 2016), en sus estudios trabajaron solo con 2
416 concentraciones de enriquecimiento de rotíferos dejando duda si existiera alguna
417 diferencia significativa utilizando enriquecimiento de taurina con 200,400 y 600
418 mg/l a diferencia de (Matsunari et al., 2013; Rotman et al., 2016.) que ampliaron
419 los niveles de concentraciones de enriquecimiento de taurina. Todos los autores
420 pasados concluyeron que la taurina es un nutriente esencial que ayuda a acelerar
421 el crecimiento de las larvas así mismo favorece a obtener mejor sobrevivencia. En
422 el presente estudio se enriqueció a rotíferos y Artemiaa con cinco diferentes
423 concentraciones de enriquecimiento de taurina (0, 200, 400, 600 y 800 mg/L) para
424 la alimentación de larvas de totoaba y se observó un aumento en crecimiento tanto
425 en longitud y peso húmedo en las larvas alimentadas con rotíferos y Artemias
426 enriquecidas e 600 mg/litro de taurina, obteniendo diferencia significativa a
427 comparación de las otras cuatro concentraciones. En estudios anteriores, en
428 especies como jurel, atún, dorada entre otros, los mejores resultados se
429 observaron al enriquecer rotíferos y Artemias con la mayor concentración de
430 taurina (800 mg/L). Es probable que la diferencia en concentración utilizada en el
431 presente estudio con respecto a los anteriores se deba al metabolismo de las
432 larvas de totoaba, ya que poseen un metabolismo menor a las otras especies.

433 **5.2. Enzimas e histología**

434 El desarrollo del sistema digestivo de las larvas de totoaba presentan similitudes
435 con otros peces marinos. especies como la dorada *Sparus aurata* (Sarasquete et
436 al., 1995), lubina manchada *P. maculatofasciatus* (Peña et al., 2003), lenguado
437 *Paralichthys californicus* (Gisbert et al., 2004), botete *S. annulatus* (García-Gasca
438 et al., 2006), curvina blanca *Atractoscion nobilis* y pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*

439 (Galaviz et al., 2011, 2012). En la totoaba, el plegamiento de la mucosa intestinal y
440 la diferenciación de enterocitos, así como la morfogénesis de la bucofaringe,
441 esófago y recto, se produjo entre 3 y 5 DPE, coincidiendo con la apertura de la
442 boca y el ano (4 DPE), la diferenciación de enterocitos indica que el intestino es
443 adecuado para la absorción de nutrientes al inicio de la alimentación exógena
444 Según (Segner et al., 1994), Las larvas de *Totoaba macdonaldi* presentaron un
445 crecimiento exponencial desde el día de su eclosión hasta el día 26 DPE. El
446 estudio realizado por (Galaviz et al., 2015) describe que las enzimas digestivas se
447 presentan desde que eclosiona las larvas, debido a que estas fueron alimentadas
448 hasta el 4 DPE ya que absorbieron su saco vitelino la tripsina y Quimotripsina en
449 estos días está inactiva, se comienza activar después que abren la boca. En
450 nuestro estudio a actividad enzimática aumentó conforme pasaban los DPE
451 debido a que los organismos comienzan a alimentarse con alimento exógeno. Las
452 enzimas alcalinas (proteasas alcalinas totales y tripsina) fueron en aumento
453 conforme pasaban los DPE hasta llegar a un punto donde comenzaron a disminuir
454 en el 24 DPE, este punto coincide con el aumento de la actividad enzimática de
455 pepsina a partir del día 18 DPE, esto se corrobora con las imágenes de histología
456 del tracto digestivo donde se observa presencia de glándulas gástricas a partir del
457 día 18 DPE, el cual se dice que la larva presenta un estómago en maduración.
458 Galaviz et al., 2015 describe que a partir del día 16 DPE se observa las glándulas
459 drásticas, pero que no es hasta el día 22 al 24 DPE donde tienen un estómago
460 maduro y funcional. La etapa del destete se observó el aumento de la actividad
461 enzimática de pepsina y la disminución de tripsina y Quimotripsina de los días 22
462 al 26 DPE.

463 La actividad de las enzimas digestivas pancreáticas no se vio afectada
464 significativamente por los diferentes niveles de taurina. Los cortes histológicos se
465 observan de los días 4 al 13 donde no se presenta un estómago funcional, el
466 funcionamiento del intestino anterior, central y posterior sustituye al estómago para
467 la degradación del bolo alimenticio y su absorción por medio del bello intestinal.

468

469 **6.0. Conclusión**

470 La taurina es un micronutriente esencial para las larvas de totoaba, conforme
471 aumenta el porcentaje de taurina en el alimento tiene mayor crecimiento, así
472 mismo su sistema digestivo tiene mayor desarrollo y alcanza una madurez en
473 menor tiempo, ayudando a comenzar la transición de alimento vivo a micro
474 particulado.

475

476 **7.0 Bibliografía**

- 477 - Bañuelos-Vargas, I., L. M. López, A. Pérez-Jiménez yand H. Peres (2014).
478 "Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine
479 supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of
480 totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*)." *Comparative Biochemistry and*
481 *Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 170: 18-25.
- 482 - Bittner, S., Win, T., Gupta, R., 2005. γ -L-glutamyltaurine. *Amino Acids* 28
483 (4), 343–356
- 484 - Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of
485 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal*
486 *Biochem* 72:248–254.
- 487 - Budi-Satriyo, T., M. A. Galaviz, G. Salze and L. M. López (2017).
488 "Assessment of dietary taurine essentiality on the physiological state of juvenile
489 *Totoaba macdonaldi*." *Aquaculture Research* 48(11): 5677-5689.
- 490 - Davis-Bruno, K., Tassinari, M.S., 2011. Essential fatty acid supplementation
491 of DHA and ARA and effects on neurodevelopment across animal species: a
492 review of the literature. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 92, 240–250.
- 493 - El Idrissi, A., Trenkner, E., 2004. Taurine as a modulator of excitatory and
494 inhibitory neurotransmission. *Neurochem. Res.* 29, 189–197.
- 495 - FAO (2016). *El estado mundial de pesca y acuicultura 2016*. Roma.
- 496 - Flanagan CA y Hendrickson JR. (1976) Observations on the commercial
497 fishery and reproductive biology of the totoaba *Cynoscion macdonaldi*, in the
498 northern Gulf of California., *Fishery Bulletin*, 74, 531-544

- 499 - Galaviz M, García-Gasca A, Drawbridge M, Alvarez-Gonzalez CA, Lopez
500 LM .(2011) Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass,
501 *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 318:162–168.
- 502 - Galaviz M, García-Ortega A, Gisbert E, López LM, García-Gasca A (2012)
503 Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the
504 spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*). *Comp Biochem Physiol B*161:9–16.
- 505 - Galaviz, M. A., LopezLópez, L. M., Garcia, Gasca A., Alvarez Gonzalez, C.
506 A., True, C. D., & Gisbert, E. (2015). Digestive system development and study of
507 acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular
508 approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiology and*
509 *Biochemistry*, 41, 1117–1130.
- 510 - García-Gasca A, Galaviz M, Gutiérrez JN, García-Ortega A (2006)
511 Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs
512 and larvae of the bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture*
513 256:366–376.
- 514 - Gisbert E, Piedrahita RH, Conklin DE (2004) Ontogenetic de-velopment of
515 the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on
516 feeding practices. *Aquaculture* 232:455–470
- 517 - Gisbert, E., Morais, S., Moyano, F.J., 2013. Feeding and digestion. In: Qin,
518 J.G. (Ed.), *Larval Fish Aquaculture*. Nova Science Publishers, New York, pp. 73–
519 123.
- 520 - Hamre, K., Yufera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceicao, L.E.C.,
521 Izquierdo, M., 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and
522 bottlenecks for advances in larval rearing. *Rev. Aquacult.* 5, S26–S58

- 523 - Huxtable, R.J., 1992. Physiological action of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101–
524 163. Izquierdo, M., Koven, W., 2011. Lipids. In: Holt, G.J. (Ed.), *Larval Fish*
525 *Nutrition*. WileyBlackwell, John Wiley & Sons, Inc., U.K., pp. 47–82 (435 pp.).
- 526 - Katagiri, R., Sasaki, T., Diaz, A., Ando, M., Margulies, D., Scholey, V. P., &
527 Sawada, Y. (2016). Effect of taurine enrichment in rotifer (*Brachionus* sp.) on
528 growth of larvae of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel)
529 and yellowfin tuna *T. albacares* (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research*, 1-
530 19.
- 531 - Kim, S.-K., Matsunari, H., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Murata, Y., Ishihara,
532 K., 2007. Effect of different dietary taurine levels on the conjugated bile acid
533 composition and growth performance of juvenile and fingerling Japanese flounder
534 *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 273, 595–601
- 535 - Kim, Y. S., Sasaki, T., Awa, M., Inomata, M., Honryo, T., Agawa, Y., Ando,
536 M., & Sawada, Y. (2016). Effect of dietary taurine enhancement on growth and
537 development in red sea bream *Pagrus major* larvae. *Aquaculture Research*, 47,
538 1168-1179.
- 539 - Koven, W., A. Peduel, M. Gada, O. Nixon and M. Ucko (2016). "Taurine
540 improves the performance of white 698 grouper juveniles (*Epinephelus Aeneus*)
541 fed a reduced fish meal diet." *Aquaculture* 460: 8-14.
- 542 - Lähdesmäki, P., 1987. Biosynthesis of taurine peptides in brain cytoplasmic
543 fraction in vitro. *Int. J. Neurosci.* 37 (1–2), 79–84.
- 544 - López, L.M., Flores-Ibarra M., Banuelos-Vargas, I., Galaviz M.A., True C.D.
545 (2015). "Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine
546 supplementation on growth performance, hematological and biochemical status,

547 and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*).¹ *Fish Physiol*
548 *Biochem* 41(4):921-936.

549 - Matsunari, H., Hashimoto, H., Iwasaki, T., Oda, K., Masuda, Y., Imaizumi,
550 H., Teruya, K., Furuita, K., Yamamoto, T., Hamada, K. & Mushiake, K. (2013).
551 Effect of feeding rotifers enriched with taurine on the growth and survival of larval
552 amberjack *Seriola dumerili*. *Fisheries science*, 79(5), 815-821.

553 - Militante, J.D., Lombardini, J.B., 2002. Taurine: evidence of physiological
554 function in the retina. *Nutr. Neurosci.* 5, 75–90.

555 - Oliveira, M.W.S., Minotto, J.B., de Oliveira, M.R., Zanotto-Filho, A., Behr,
556 G.A., Rocha, R.F., Moreira, J.C.F., Klamt, F., 2010. Scavenging and antioxidant
557 potential of physiological taurine concentrations against different reactive
558 oxygen/nitrogen species. *Pharmacol. Rep.* 62, 185–193.

559 - Peña R, Dumas S, Villalejo-Fuerte M, Ortiz-Galindo J (2003) Ontogenetic
560 development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax*
561 *maculatofasciatus* larvae. *Aquacultur* 219:633–644

562 - Pinto, W., Figueira, L., Ribeiro, L., Yúfera, M., Dinis, M.T., Aragão, C., 2010.
563 Dietary taurine supplementation enhances metamorphosis and growth potential of
564 *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture* 309 (1–4), 159–164.

565 - Rotman, F., Stuart, K., & Drawbridge, M. (2016). Effects of taurine
566 supplementation in live feeds on larval rearing performance of California yellowtail
567 *Seriola lalandi* and white seabass *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture Research*, 1-8.

568 - Rønnestad, I., Yufera, M., Ueberschar, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Boglione,
569 C., 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current
570 knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev. Aquac.* 5, S59–S98.

571 - Salze, G.; Craig, S.R.; Smith, B.H.; Smith, E.P.; McLean, E. (2011).
572 Morphological development of larval cobia *Rachycentron canadum* and the
573 influence of dietary taurine supplementation. *J. Fish Biol*, 78, 1470–1491.

574 - Salze, G.P., Davis, D.A., 2015. Taurine: a critical nutrient for future fish
575 feeds. *Aquaculture* 437, 215–229.

576 - Sánchez-Serrano, S. (2005). Determinación de la carga parasitaria de la
577 *Sardina Monterrey Sandinops sagax* (Jenyns ,1842) desembarcada en el Puerto
578 de el Sauzal, Baja California. CICESE. Ensenada México. pp. 92-93.

579 - Schaffer, S.W., Jong, C.J., Ramila, K.C., Azuma, J., 2010. Physiological
580 roles of taurine in heart and muscle. *J. Biomed. Sci.* 17 (Suppl. 1), S2.

581 - Sarasquete MC, Polo A, Yufera M (1995) Histology and his-tochemistry of
582 the development of the digestive system of larval gilthead sea bream *Sparus*
583 *aurata* L. *Aquaculture* 130:79–82

584 - Segner H, Storch V, Reinecke M, Kloas W, Hanke W (1994) The
585 development of functional digestive and metabolic organs in turbot *Scophthalmus*
586 *maximus*. *Mar Biol* 119:471–486.

587 - Takeuchi, T., Park, G.S., Seikai, T., Yokoyama, M., 2014. Taurine content in
588 Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* T. & S. and red sea bream *Pagrus major*
589 T. & S. during the period of seed production. *Aquac. Res.* 32 (Suppl. 1), 244–248.

590 - Tiedemann, F., Gmelin, L., 1827. Einige neue Bestandtheile der Galle des
591 Ochsen. *Ann. Phys.* 85 (2), 326–337

592 - Trejo-Escamilla, I., M. A. Galaviz, M. Flores-Ibarra, C. A. Álvarez González
593 and L. M. López (2016). "Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in
594 the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth

595 performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and
596 biochemistry parameters." *Aquaculture Research* 48(8): 4038-4057

597 - True et al.,(2012). Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba*
598 *macdonaldi*. Universidad autónoma de Baja California. Tesis de Doctorado. 1-33.

599 - Yamamoto, T., Teruya, K., Hara, T., Hokazono, H., Hashimoto, H., Suzuki,
600 N., Iwashita, Y.,Matsunari, H., Furuita, H., Mushiake, K., 2008. Nutritional
601 evaluation of live food organisms and commercial dry feeds used for seed
602 production of amberjack *Seriola dumerili*. *Fish. Sci.* 74 (5), 1096–1108.

603 - Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutierrez,
604 J., Cahu, C.L.,2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine
605 fish larvae. In:Cyrino, J.E.P., Bureau, D.P., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and*
606 *Digestive Functions of Fishes*. Science Publishers, New Hampshire, pp. 281–348

607

608 **8.0 Leyendas de Figuras**

609 **Figura 1.** Crecimiento (mg) promedio y desviación estándar durante los días de
610 cultivo. Los 5 tratamientos se observan en la gráfica, las flechas indican los días
611 que se alimentó las larvas con los diferentes alimentos durante el desarrollo larval.

612 Crecimiento (milímetros) promedio y desviación estándar durante los días de
613 cultivo. Los 5 tratamientos se observan en la gráfica, las flechas indican los días
614 que se alimentó las larvas con los diferentes alimentos durante el desarrollo larval.

615

616 **Figura 2.** Secciones sagitales de larvas de totoaba al DPE 8. (A) 0 mg/L Tau, (B)
617 220 mg/L Tau, (C) 400 mg/L Tau, (D) 600 mg/L Tau y (E) 800 mg/L Tau. (ar) arcos
618 branquiales, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (db) ducto biliar, (du) ducto urinario(e)
619 esófago, (fm) fibras musculares, (h) hígado, (la) intestino anterior, (im) intestino
620 medio, (ip) intestino posterior, (N) notocordio, (o) ojo, (pe) páncreas exocrino, (r)
621 recto, (vn) vejiga natatoria.

622

623 **Figura 3.** Secciones sagitales de larvas de totoaba al dpe 13. (A) 0 mg/L Tau, (B)
624 220 mg/L Tau, (C) 400 mg/L Tau, (D) 600 mg/L Tau y (E) 800 mg/L Tau. (ar) arcos
625 branquiales, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (db) ducto biliar, (du) ducto urinario(e)
626 esófago, (fm) fibras musculares, (h) hígado, (la) intestino anterior, (im) intestino
627 medio, (ip) intestino posterior, (N) notocordio, (o) ojo, (pe) páncreas exocrino, (r)
628 recto, (vn) vejiga natatoria.

629

630 **Figura 4.** Secciones sagitales de larvas de totoaba al dpe 18. (A) 0 mg/L Tau, (B)
631 220 mg/L Tau, (C) 400 mg/L Tau, (D) 600 mg/L Tau y (E) 800 mg/L Tau. (ar) arcos

632 branquiales, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (db) ducto biliar, (du) ducto urinario(e)
633 esófago, (est) estómago, (fm) fibras musculares, (ggi) glandulas gastricas
634 incipientes, (h) hígado, (la) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino
635 posterior, (N) notocordio, (o) ojo, (pe) páncreas exocrino, (r) recto, (vn) vejiga
636 natatoria.

637

638 **Figura 5.** Secciones sagitales de larvas de totoaba al dpe 24. (A) 0 mg/L Tau, (B)
639 220 mg/L Tau, (C) 400 mg/L Tau, (D) 600 mg/L Tau y (E) 800 mg/L Tau. (ar) (ar)
640 arcos branquiales, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (db) ducto biliar, (du) ducto
641 urinario(e) esófago, (est) estómago, (fm) fibras musculares, (ggi) glandulas
642 gastricas incipientes, (h) hígado, (la) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip)
643 intestino posterior, (N) notocordio, (o) ojo, (pe) páncreas exocrino, (r) recto, (vn)
644 vejiga natatoria.

645

646 **9.0 Leyendas de tablas**

647 **Tabla I.** Porcentaje de sobrevivencia obtenida en el presente estudio.

648 Superíndices representan diferencias significativas.

649 **Tabla II.** - Análisis proximales del alimento (rotífero y Artemia) enriquecidos con
650 diferentes niveles de taurina.

651 **Tabla III.** Niveles de actividad de proteasas acidas totales (mU/mg proteína)
652 presentadas en diferentes días post eclosión a diferentes concentraciones de
653 taurina en la dieta en larvas de totoaba. Superíndices representan diferencias
654 significativas.

655

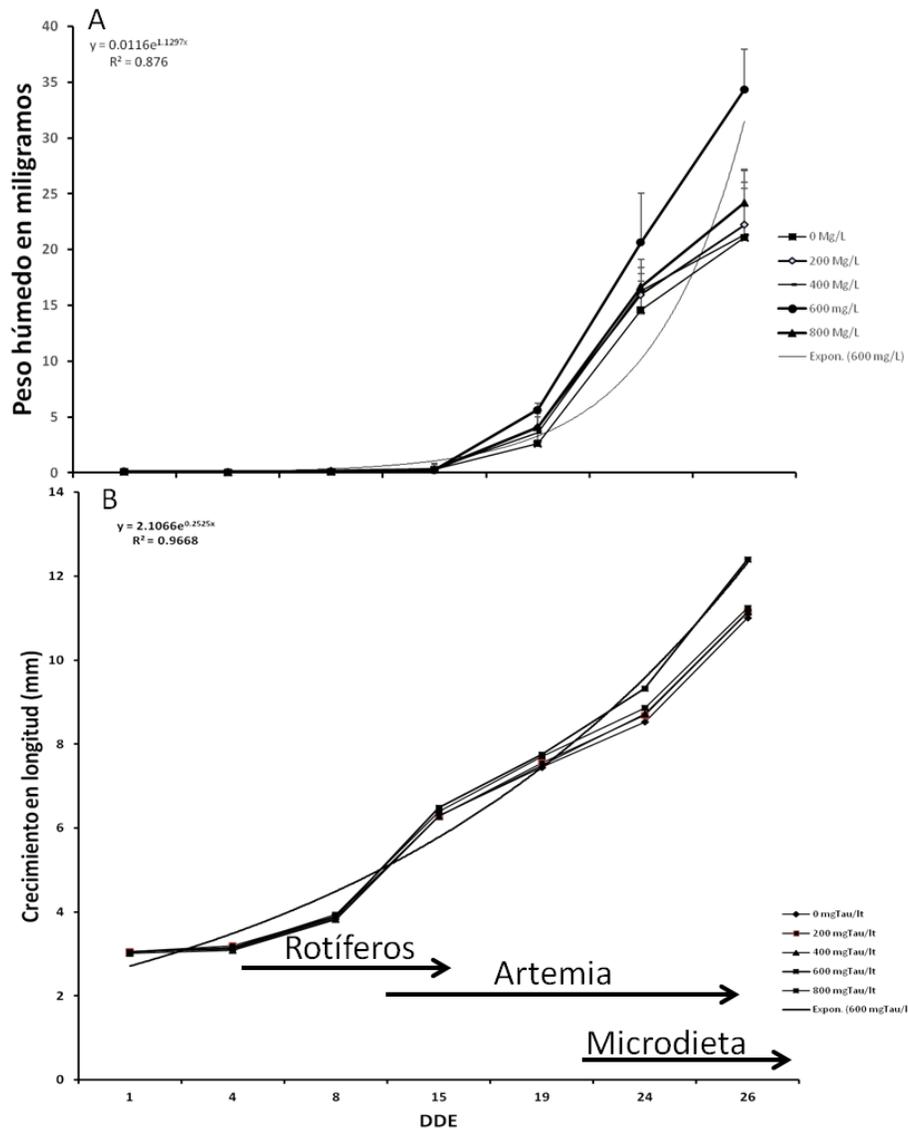
656 **Tabla IV.** Niveles de actividad de proteasas alcalinas totales presentadas en
657 diferentes días post eclosión a diferentes concentraciones de taurina en la dieta en
658 larvas de totoaba. Superíndices representan diferencias significativas.

659

660 **Tabla V.** Niveles de actividad de tripsina presentadas en diferentes días post
661 eclosión a diferentes concentraciones de taurina en la dieta en larvas de totoaba.
662 Superíndices representan diferencias significativas.

663

664 Figura 1.

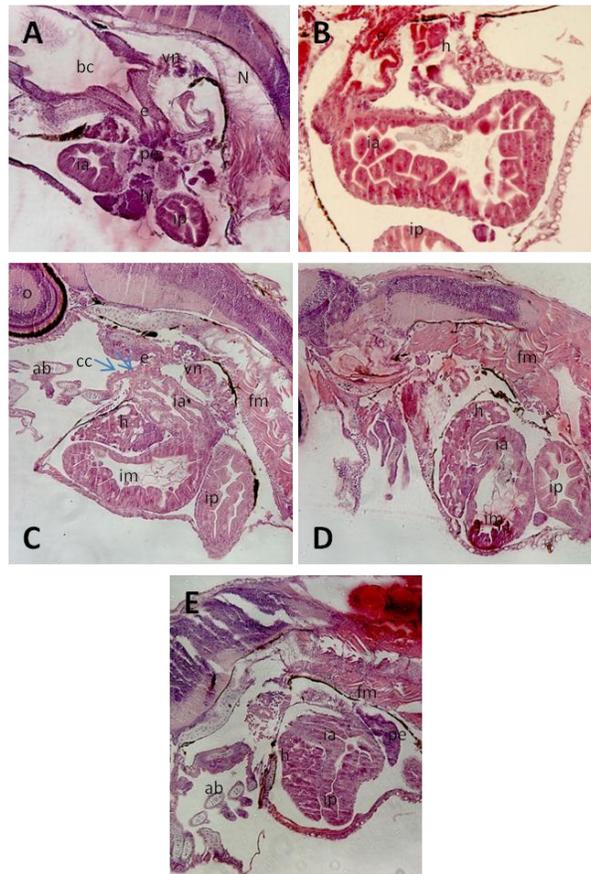


665

666

667 Figura. 2

DPE 8

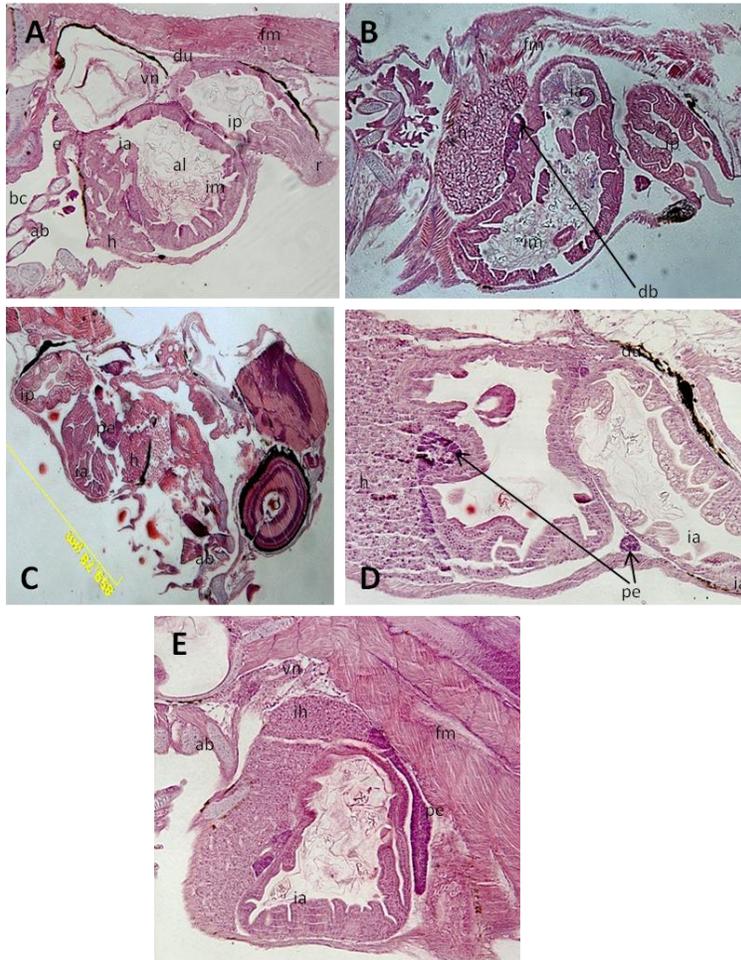


668

669

670 **Figura 3.**

DPE 15



671

672

673

674

675

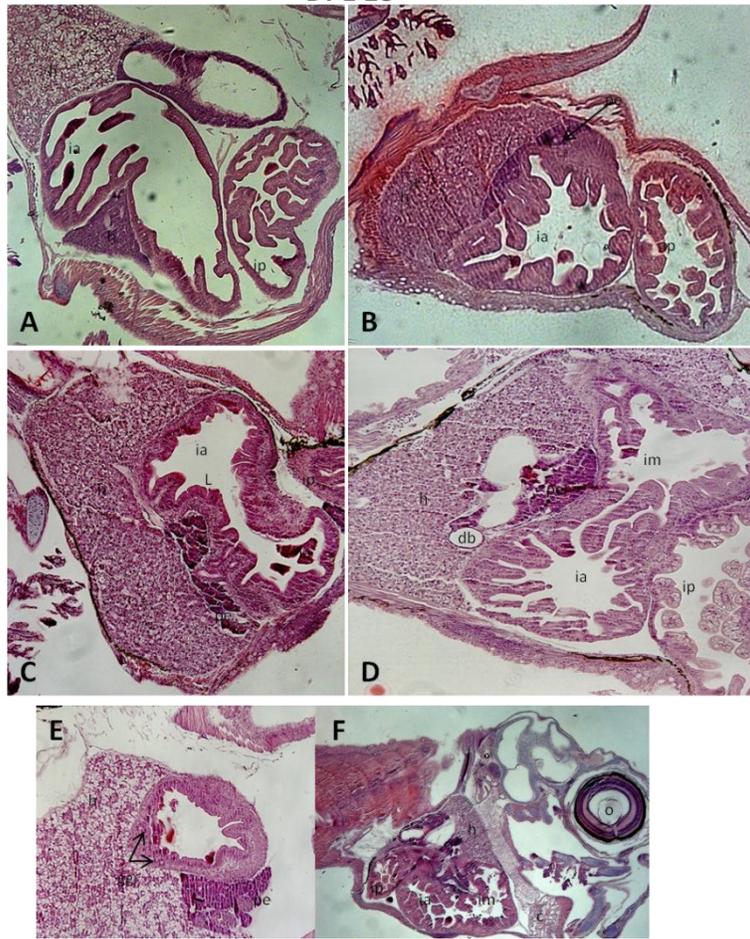
676

677

678

679 **Figura 4.**

DPE 18



680

681

682

683

684

685

686

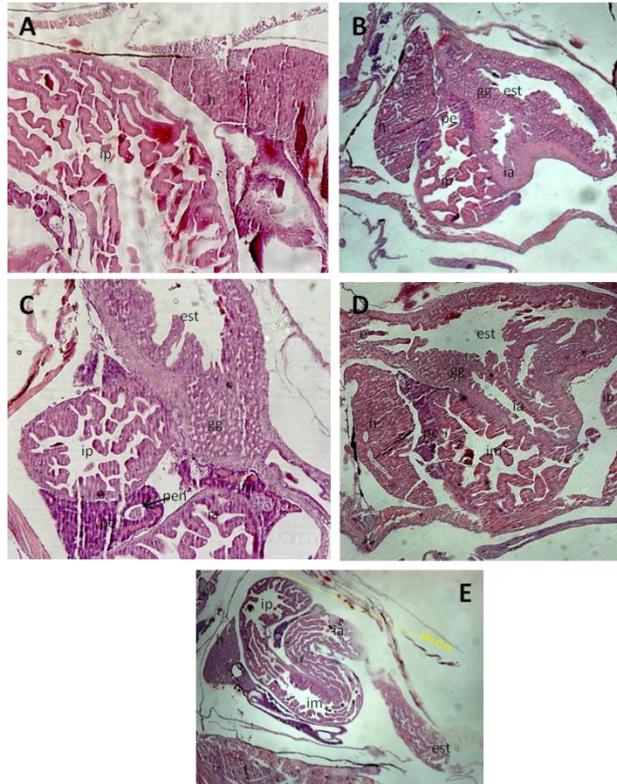
687

688

689

690 **Figura 5.**

DPE 24



691

692

693 **Tabla I.**

Tratamiento	%
Taurina/L	Sobrevivencia
0 mg/L	58.96 ± 3.72^{bc}
200 mg/L	65.39 ± 2.09^{ab}
400 mg/L	52.51 ± 5.27^c
600 mg/L	59.32 ± 7.68^{bc}
800 mg/L	71.81 ± 0.49^a

694

695

696

697

698

699

700

Tabla II.	Proteína	Lípidos	Humedad	Cenizas	Total	ELN
R0	49.02±0.54 ^b	7.1±0.07 ^b	9.42±0.46 ^a	33.69±0.26 ^a	99.27	0.73
R200	51.15±0.61 ^a	7.0±0.02 ^b	6.05±0.40 ^c	31.06±0.24 ^c	95.27	4.73
R400	46.41±0.60 ^d	7.2±0.02 ^b	9.32±0.77 ^{ab}	33.47±0.38 ^a	96.40	3.60
R600	47.40±0.13 ^c	7.7±0.28 ^{ab}	6.71±0.27 ^c	32.48±0.05 ^b	94.31	5.69
R800	49.88±0.13 ^b	8.2±0.29 ^a	8.13±0.11 ^b	32.45±0.10 ^b	98.70	1.30
A0	54.31±0.35 ^a	21.8±0.21 ^b	4.04±0.74 ^a	16.54±0.09 ^b	96.66	3.34
A200	54.56±0.85 ^a	21.1±0.06 ^b	1.93±0.98 ^a	20.49±0.27 ^a	98.11	1.89
A400	54.61±0.50 ^a	21.6±0.29 ^b	2.72±0.74 ^a	17.65±0.18 ^b	96.56	3.44
A600	54.45±0.02 ^a	21.6±0.27 ^b	3.70±0.10 ^a	18.44±1.34 ^{ab}	98.17	1.83
A800	54.09±1.12 ^a	23.5±0.92 ^a	2.59±1 ^a	18.95±1.84 ^{ab}	99.11	0.89

701

702 **Tabla III.**

Tratamientos mg/Lt Tau	8	13	18	22	24	26
0	0.75±0.81 ^a	1.08±0.75 ^{ab}	1.05±0.08 ^a	0.80±0.17 ^b	0.93±0.08 ^a	0.84±0.57 ^b
200	1.01±0.64 ^a	1.42±0.40 ^a	1.10±0.12 ^a	1.50±0.52 ^a	1.38±0.63 ^a	0.99±0.18 ^b
400	0.65±0.29 ^a	0.68±0.34 ^{ab}	0.83±0.25 ^{ab}	1.33±0.19 ^a	1.59±0.28 ^a	1.16±0.25 ^{ab}
600	0.23±0.06 ^a	0.82±0.36 ^{ab}	1.12±0.03 ^a	1.25±0.07 ^{ab}	1.56±0.28 ^a	1.69±0.27 ^a
800	0.60±0.55 ^a	0.39±0.30 ^b	0.65±0.29 ^b	1.05±0.17 ^{ab}	0.93±0.39 ^a	0.94±0.18 ^b

703

704 **Tabla IV.**

Tratamientos mg/Lt Tau	8	13	18	22	24	26
0	1.20±0.01 ^a	0.60±0.2 ^a	0.99±0.01 ^a	4.23±2.2 ^{ab}	3.50±0.6 ^b	2.89±1.17 ^a
200	0.37±0.09 ^b	0.64±0.16 ^a	1.05±0.61 ^a	1.69±0.68 ^c	4.42±2.2 ^{ab}	4.87±1.3 ^b
400	1.06±0.6 ^a	0.69±0.1 ^a	0.93±0.2 ^a	3.01±1.4 ^a	6.16±1.03 ^a	3.90±1.4 ^a
600	0.28±0.1 ^b	0.73±0.2 ^a	0.89±0.4 ^a	5.38±0.04 ^a	6.83±1.3 ^a	5.92±0.8 ^b
800	0.64±0.2 ^{ab}	0.50±0.03 ^a	0.73±0.3 ^a	3.22±0.55 ^{abc}	5.32±1.0 ^{ab}	3.28±0.8 ^{ab}

705

706

707

708 **Tabla V.**

Tratamientos mg/Lt Tau	8	13	18	22	24	26
0	1.09±0.04 ^a	2.55±0.15 ^b	6.64±1.11 ^a	6.88±0.81 ^b	6.39±1.77 ^b	8.02±0.95 ^{ab}
200	1.77±0.66 ^a	5.18±0.48 ^a	6.28±1.14 ^a	2.68±0.92 ^c	6.62±0.75 ^b	6.07±0.86 ^{bc}
bc400	0.97±0.38 ^a	4.48±1.19 ^a	8.12±0.48 ^a	14.69±0.55 ^a	11.22±0.81 ^a	4.36±0.34 ^c
600	0.71±0.60 ^a	3.86±0.01 ^{ab}	8.19±0.88 ^a	5.64±2.08 ^{bc}	9.03±0.99 ^{ab}	10.83±2.28 ^a
800	0.82±0.76 ^a	2.44±0.30 ^b	5.88±1.00 ^a	7.50±0.48 ^b	8.82±0.17 ^{ab}	5.79±0.47 ^{bc}

709

710

711

712

713

714

715