



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Marinas



“Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo ontogénico de larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) alimentados con diferentes protocolos”.

Biotechnología en acuicultura

Presenta:

Julio Cesar Mercado Jiménez

Ensenada Baja California Octubre del 2016

**ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS DURANTE EL DESARROLLO
ONTOGÉNICO DE LARVAS DE BOTETE DIANA (*Spherooides annulatus*)
ALIMENTADOS CON DIFERENTES PROTOCOLOS**

Tesis profesional

Que para obtener el Título de

Biotechnólogo en Acuicultura

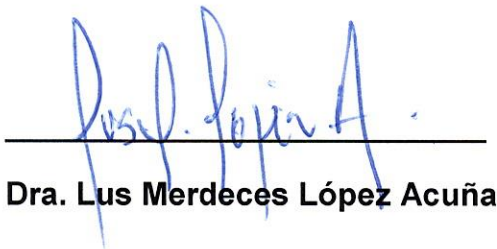
Presenta:

JULIO CESAR MERCADO JIMÉNEZ

Aprobado por:



Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza



Dra. Lus Mercedes López Acuña



Dr. Conal David True

**ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS DURANTE EL DESARROLLO
ONTOGÉNICO DE LARVAS DE BOTETE DIANA (*Sphoeroides annulatus*)
ALIMENTADOS CON DIFERENTES PROTOCOLOS**

Tesis profesional

Que para obtener el Título de

Biotechnólogo en Acuicultura

Presenta:

JULIO CESAR MERCADO JIMÉNEZ

Aprobado por:



Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza



Dra. Lus Mercedes López Acuña



Dr. Conal David True

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Marinas y a la Universidad Autónoma de Baja California por su gran apoyo durante el tiempo que estuve cursando la licenciatura ya que sin ese impulso que me dieron nunca hubiera logrado generar las experiencias de vida que me llevo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán en acuacultura y manejo ambiental y a todas las personas que estuvieron involucradas para que este trabajo se llevará a cabo.

Al Dr. Leonardo Ibarra Castro por su gran apoyo, consejos y valiosas enseñanzas en el manejo de peces marinos, a la M. en C. Ma. Isabel Abdo de la Parra, M. en C. L. Estela Rodríguez Ibarra por haberme apoyado y proporcionar los peces para el trabajo.

A mi director de tesis, Dr. Mario Galaviz Espinoza por el apoyo durante la carrera y el impulso a la realización de éste trabajo. A la Dra. Lus Mercedes López Acuña y a todo el equipo del laboratorio de Nutrición Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas, así como al maestro Honorio Cruz López por su gran ayuda para entender la metodología en el procesamiento de las muestras.

DEDICATORIA

A toda mi familia pero en especial a mis padres Carlos Alberto Mercado y María Guadalupe Jiménez por haberme apoyado incondicionalmente en mis estudios y creer en mí, es la mejor herencia que me pudieron dar y de la cual les estaré agradecido toda la vida.

A todos mis amigos que siempre estuvieron apoyándome y creyendo en mi potencial para la culminación de este trabajo.

ÍNDICE	Página
Resumen/Abstract.....	7
1.0. Introducción.....	11
2.0. Antecedentes.....	15
3.0. Justificación.....	20
4.0. Objetivo General.....	20
5.1. Objetivos Específicos.....	21
5.0. Material y Métodos.....	21
5.1. Enumeración de variables y metodología.....	21
5.2. Transferencia a los tanques de cultivo.....	23
5.3. Medición de variables.....	23
5.4. Cultivo larvario.....	24
5.5. Colecta de muestras para análisis bioquímico.....	27
5.6. Preparación de extractos enzimáticos.....	27
5.7. Determinación de proteína soluble.....	28
5.8. Cuantificación de la actividad proteolítica.....	29
6.8.2. Actividad tipo Tripsina.....	29
6.8.3. Actividad tipo Quimotripsina.....	29
6.8.4. Actividad tipo leucina aminopeptidasa.....	30
6.8.5. Calculo de actividades específicas.....	30
6.9. Análisis estadístico.....	32
7.0. Resultados	33

7.1. Porcentaje de fertilización.....	34
7.2. Porcentaje de eclosión y supervivencia.....	34
7.3. Actividades enzimáticas.....	34
7.3.1. Tripsina.....	34
7.3.2. Quimotripsina.....	35
7.3.3. Leucina aminopeptidasa.....	36
8.0. Discusiones.....	38
9.0. Conclusión.....	41
10,0. Recomendaciones futuras.....	41
11.0. Referencias.....	43
12.0. Anexos.....	49

Resumen

El botete diana *Sphoeroides annulatus* es un pez marino con un alto valor en el mercado nacional e internacional que presenta amplia tolerancia a variaciones ambientales, sin embargo, uno de los principales factores que influye en la supervivencia y crecimiento de las larvas de ésta especie y de otros peces marinos en cultivo, es la calidad y disponibilidad del alimento suministrado durante la primera alimentación exógena y deshabitación alimenticia (cambio por completo de alimento vivo a alimento formulado). En la actualidad, los esfuerzos de investigación se dirigen a estudiar la evolución de la fisiología digestiva de las larvas, con el objetivo de mejorar las estrategias de alimentación de acuerdo a su desarrollo, todo esto, con el propósito de aumentar la producción en toneladas y número de organismos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo ontogénico de larvas de botete diana alimentado bajo diferentes protocolos de cultivo controlado. El muestreo de larvas se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción y Cultivo de Peces Marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Mazatlán (CIAD). Tres lotes de huevos fertilizados se incubaron a una densidad máxima de 10,000 huevos por litro en un tanque de 600 L. Todos los protocolos de cultivo larvario se realizaron con la técnica de agua verde, por lo que a partir de la transferencia y hasta 40 días después de la eclosión (DDE) (dependiendo el tratamiento) se añadieron a los tanques de cultivo una mezcla de 80,000 células ml^{-1} de *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis sp*, así mismo se adicionaron rotíferos y artemias enriquecidas con ácidos grasos. Se realizaron 5

tratamientos (T14, T18, T22, T26 y T30) donde el número indica los días después de la eclosión (DDE) y día en que se realizó el inicio de la deshabitación alimenticia (cambio del alimento vivo por formulado). Cada tratamiento se realizó por triplicado y las muestras de larvas fueron sacrificadas y liofilizadas para su posterior análisis en el laboratorio de Nutrición Acuícola de la FCM-UABC en Ensenada. Las enzimas analizadas fueron tripsina, quimotripsina y leucina-aminopeptidasa. Los resultados muestran que la actividad de tripsina y quimotripsina aumentan conforme al desarrollo de la larva, lo que podría indicar una maduración del sistema digestivo durante el desarrollo ontogénico de la larva, sin embargo, las larvas que iniciaron el proceso de deshabitación alimenticia a partir del día 22 (T22) fueron las que mostraron mejor nivel de actividad de tripsina y quimotripsina. En el caso de leucina aminopeptidasa no mostró diferencias significativas durante los primeros DDE, sino que, a partir del primer cambio de alimento vivo de rotífero a *Artemia* (14 DDE) donde se elevó la actividad de esta enzima y se mantuvo constante hasta el día 35 DDE para después empezar a disminuir su actividad. A éste aumento de actividad se le atribuye el crecimiento de la larva así como el desarrollo de sus órganos como también la adición de presas vivas y la maduración final de los enterocitos. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se recomienda que las larvas de botete diana puedan empezar su periodo de deshabitación alimenticia a partir del 22 DDE sin afectar su crecimiento y desarrollo.

Abstract

The bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus* is a marine fish with a high value in the national and international market, which has high tolerance to environmental variations, however, one of the main factors influencing the survival and growth of larvae of this species and other marine fish, is the quality and availability of the food during the first exogenous feeding and weaning (change of food live to micro-diets). At the present, research efforts are aimed to study the evolution of the digestive physiology of larvae, with the purpose of increase the number of the fish larvae in production, with the purpose of improve feeding strategies, according to their development. The aim of this study was to evaluate the activity of digestive enzymes during ontogenetic development of the bullseye puffer fish larvae fed under different protocols. Larvae sampling was conducted on the premises of the Laboratory of Reproduction and Marine Fish Farming of the Research Center for Alimentation and Development, A. C., Mazatlán (CIAD). Three batches of fertilized eggs were incubated at a maximum density of 10,000 eggs per liter in a 600 L tank. All larval rearing protocols were performed using the green water technique, thus, after the transfer and up to 40 days post hatching (DPH)(depending on treatment) there was added to the culture tanks a mixture of 80,000 cells ml⁻¹ of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis sp*, adding also enriched rotifers and *Artemia* with an enrichment with a mix of fatty acid. Five treatments were performed (T14, T18, T22, T26 and T30) DPH in which each one was performed in triplicate and the number indicates the day of weaning (change of live food to formulated feed), samples of larvae were sacrificed and lyophilized for further analysis

in the laboratory of Aquaculture Nutrition FCM-UABC in Ensenada. The enzymes tested were trypsin, chymotrypsin and leucine aminopeptidase. Results show that the activity of trypsin and chymotrypsin increase as the larval develops, which could indicate a maturation of the digestive system during the ontogenetic development, however, the larvae fed with T22 were those that showed highest level of trypsin activity and chymotrypsin. Leucine aminopeptidase activity did not show significant differences during the first DPH, but from the first change of rotifer to *Artemia* (14 DPH) the activity of this enzyme was raised and remained constant until day 35 DPH. The increase in activity is attributed to the growth and development of the larvae organs and the final maturation of enterocytes, as well as the addition of live prey. According to the results obtained in the present study, it is recommended that bullseye puffer fish larvae may possibly start their weaning from DPH 22 without affecting their growth and development.

1.0. Introducción

El botete diana (*Sphoeroides annulatus*) es una especie con una amplia distribución, que abarca desde el sur de California, EE.UU., hasta Perú, incluyendo el Golfo de California y las Islas Galápagos; este pez penetra las lagunas costeras, y su permanencia en éstos ambientes está aparentemente relacionada con el tamaño y edad (Castro-Aguirre *et al.*, 1999), los cuales los utiliza como zonas de cría (Álvarez-Cadena *et al.*, 1987). Este pez pertenece a la familia Tetraodontidae conocido como peces globo, son organismos marinos que muestran tallas variables, tienen cuerpo robusto en forma cilíndrica, cabeza grande y aplanada. La boca está formada por un par de mandíbulas que están constituidas por dos pares de dientes grandes y fuertes; siendo dicha característica una particularidad de los miembros del orden Tetraodontiforme (Miller *et al.*, 2005).

En México el cultivo de peces marinos representa una alternativa con alto potencial para promover la diversificación acuícola, así como para la utilización de instalaciones ociosas de la camaronicultura. El botete diana *S. annulatus* (Jenyns, 1842) es un pez con un alto valor en el mercado nacional que presenta amplia tolerancia a variaciones ambientales (Thompson *et al.*, 1987). Uno de los principales factores que influye en la supervivencia y crecimiento de larvas de peces marinos es la densidad de siembra y raciones alimenticias, ya que incide en la calidad del agua de cultivo y en la disponibilidad de espacio y alimento, con lo que aumenta la agresividad y el canibalismo entre los mismos peces (King *et al.*, 2000, Hitzfelder *et al.*, 2006).

La obtención y cría de grandes cantidades de larvas de peces marinos es el paso previo al cultivo a una escala comercial. En la actualidad, los esfuerzos de investigación se dirigen a determinar las condiciones que incrementen la supervivencia y crecimiento de las larvas, así como, a caracterizar el desarrollo fisiológico de las mismas, con el objeto de planificar mejor las estrategias de alimentación. En este último caso, los estudios se basan en el conocimiento detallado de la fisiología digestiva en las distintas etapas de vida larvaria, mediante la determinación de las actividades de enzimas digestivas como son las proteasas, amilasas, fosfatasas, entre otras (Ueberschar, 1993; Galaviz *et al.*, 2011).

En la acuicultura de peces marinos, uno de los puntos más importantes es la alimentación, especialmente durante la etapa larvaria, ya que los cambios anatómicos y fisiológicos durante el desarrollo de las larvas de peces serán los factores que definen sus requerimientos nutricionales. Una vez que el saco vitelino es absorbido, los peces requieren organismos del plancton (llamados alimento vivo) como dieta inicial. Considerando que el mayor constituyente nutricional del alimento vivo es la proteína, la capacidad proteolítica para la digestión del alimento puede ser considerada como la más importante en los estudios nutricionales con larvas de peces (García-Ortega, 2000). Las larvas sin un estómago funcional van a depender de una digestión alcalina del tipo tripsina para llevar a cabo la digestión del alimento.

Para determinar la capacidad de las larvas de peces marinos se suele caracterizar la evolución temporal de la maquinaria enzimática, la expresión génica y los niveles de actividad de éstas, y así utilizar esta información para desarrollar dietas

formuladas adecuadas a cada estadio de desarrollo de las larvas (Valverde-Chevarría, 2002).

Las enzimas digestivas son producidas en varios órganos, incluyendo el estómago, el páncreas, la vesícula biliar y las paredes del intestino. Sin embargo, las enzimas pueden provenir de las presas vivas o de las bacterias que conforman la flora intestinal. En los peces con un estómago completamente desarrollado y funcional al inicio de su desarrollo, la digestión de la proteína comienza en un medio ácido en el cual la pepsina es la enzima principal. En contraste, en los peces que no secretan pepsinógeno durante las primeras fases de desarrollo para digerir las proteínas (i.e., la mayoría de las larvas de peces marinos), la digestión se lleva a cabo esencialmente por las enzimas pancreáticas e intestinales activas en un medio alcalino hasta que alcanzan la madurez de su sistema digestivo y aparece las glándulas gástricas que caracterizan el estómago funcional. De esta manera, en términos nutricionales se dice que las larvas de peces marinos aún no poseen una competencia digestiva plena (Lazo *et al.*, 2000).

Las proteasas alcalinas y ácidas de origen animal más comunes y estudiadas son la tripsina, la quimotripsina y la pepsina. La tripsina (EC 3.4.21.4) es la principal enzima digestiva intestinal responsable de la hidrólisis de proteína de los alimentos. Es una serina proteasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por lisina y arginina. La enzima se sintetiza como un zimógeno inactivo llamado tripsinógeno que es activado en la luz del intestino por la enteroquinasa presente en la membrana de los enterocitos la cual a su vez, es la encargada de activar el resto de zimógenos pancreáticos, por ejemplo: quimotripsinógeno, procarboxipeptidasa A y B y

proelastasa, entre otros (Whitaker, 1994). El pH óptimo de lisina es de 8.0. Por otro lado la proteasa alcalina quimotripsina (EC 3.4.21.1) es una proteasa serina capaz de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptófano, así mismo, actúa sobre amidas y ésteres. Se almacena en el páncreas en forma de un precursor, quimotripsinógeno, y es activado por la tripsina (Whitaker, 1994). Mientras que de las exoproteasas más importantes a evaluar en estudios de larvas de peces marinos se encuentra la aminopeptidasa. Las aminopeptidasas (EC 3.4.11) catalizan la hidrólisis de los restos aminoacídicos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+}) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal *et al.*, 1965). Entre sus diversas funciones destacan: la maduración de proteínas, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular. En el caso concreto de la leucina-aminopeptidasa, se ha relacionado su nivel de actividad en la membrana de los enterocitos con el estado nutricional de los organismos en estados iniciales.

La tripsina es una enzima fundamental para la activación de proteasas pancreáticas. También se ha demostrado que durante la primera alimentación de las larvas de peces la actividad de las enzimas de tipo tripsina aumenta, para posteriormente disminuir hasta la etapa de juvenil. Otras enzimas como son leucina aminopeptidasa (LAP) y alanina-leucinapeptidasa (ALP) ubicadas en las células del borde de cepillo del duodeno, están relacionadas con el alimento ingerido. Cuando estos organismos son alimentados con alimento inerte, la actividad de estas enzimas es baja, en comparación con las actividades enzimáticas de aquellas larvas que son

alimentadas con microorganismos vivos como rotíferos, artemias, copepodos, etc (Civera *et al.*, 2004).

En el caso de las proteasas alcalinas, se ha reportado que son detectables antes que las proteasas ácidas, debido a que las proteasas acidas como pepsina están relacionadas con el desarrollo y presencia de un estomago funcional. Las larvas tienen la capacidad de controlar la secreción de enzimas dependiendo del tipo de y cantidad de alimento (Civera *et al.*, 2004). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de diferentes protocolos de alimentación sobre la actividad de tres enzimas digestivas claves durante la ontogenia de larvas del botete diana (*S. annulatus*), con el fin de obtener un protocolo que permita optimizar el cultivo larvario de esta especie.

2.0. Antecedentes

La acuicultura es una actividad que se ha realizado desde hace más de 4000 años, y cada vez es más el interés de productores e investigadores en identificar el momento indicado de las larvas de peces para la deshabitación del alimento vivo por alimento balanceado, proporcionando un alimento nutricionalmente completo una mejor digestión de los organismos y que coadyuve a la acción de enzimas que permitirán catalizar moléculas específicas durante su desarrollo de las larvas.

Es por esto, que se han realizado investigaciones para lograr identificar los niveles de diversas enzimas digestivas que actúan durante la primera alimentación y deshabitación alimenticia en distintas especies de larvas de peces marinos. Por lo general, las larvas de especies tropicales consumen sus reservas endógenas en los

primeros dos días de desarrollo, por lo que requirieren consumir alimento exógeno de manera inmediata. En unidades de producción comerciales se utiliza principalmente alimento vivo, como rotíferos y *Artemia*, lo que vuelve costosa la producción de juveniles, ya que demanda mano de obra calificada, es bastante impredecible y requiere de tiempo y espacios considerables. Es por esto que actualmente existe gran interés a nivel mundial en el desarrollo de microdietas que sustituyan al alimento vivo desde el inicio de la alimentación exógena (Jones, *et al.* 1993; Zambonino-Infante y Cahu 2001).

Algunas características del tracto digestivo del botete diana son similares a la de otros peces marinos, de los cuales también se han realizado estudios sobre enzimas digestivas. Álvarez-González (2003) en donde determinó y caracterizó las enzimas digestivas durante la ontogenia de las larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* y demostró que la capacidad enzimática digestiva de las larvas se presenta desde su eclosión y se incrementa con el consumo de los alimentos vivos. La actividad de proteasas, lipasas, amilasas y fosfatasas fluctúa a lo largo de la ontogenia y está relacionada a dos procesos principales, la adición y cambios de los alimentos vivos, así como los cambios morfo-fisiológicos durante la transformación de la larva a juvenil. La actividad de proteasas ácidas se detectó desde el día 12 días después de la eclosión (DDE), siendo menor a la de las proteasas alcalinas. Para el día 25 la actividad de las proteasas ácidas fue proporcionalmente mayor a la de las proteasas alcalinas, por lo que se planteó la posibilidad de realizar un destete temprano a partir del día 16 DDE.

Así mismo (Montes-Macías, 2007) en el trabajo de caracterización de la actividad enzimática de larvas de jurel cola amarilla del pacífico (*Seriola lalandi dorsalis*). Desde el inicio de la alimentación exógena se detectó actividad de las enzimas proteolíticas alcalinas totales, en particular de la tripsina (una de las enzima pancreática responsable de la digestión luminal de las macromoléculas). Así mismo, 4 DDE se detectó actividad de la leucina-aminopeptidasa (enzima del borde en cepillo de los enterocitos que completa el rompimiento de los polipéptidos hasta monómeros).

La actividad de la lipasa se detectó antes de la alimentación exógena con un incremento gradual hasta el día 22 DDE. La actividad de la amilasa fue baja durante los primeros 18 DDE. Con base en la detección de las enzimas proteolíticas ácidas, se infiere que el estómago se formó y es funcional (i.e., desarrollo de las glándulas gástricas y producción de HCl y pepsina) a una edad temprana (16-18 DDE).

En otro trabajo realizado por (Zacarias-Soto, 2007) en histología, histoquímica y actividad enzimática del sistema digestivo de *Paralichthys californicus* durante su ontogenia y evaluación de probióticos como promotores de la maduración del sistema digestivo, evaluó la capacidad digestiva de las larvas de esta especie durante su ontogenia, utilizando análisis histológicos, histoquímicos y de actividad enzimática. Las larvas fueron alimentadas con rotíferos enriquecidos con ácidos grasos altamente insaturados (HUFA'S). La actividad específica de la tripsina y la LAP se detectó desde el primer DDE, con dos picos de máxima actividad. El primero a los 8 DDE y el segundo a los 20 DDE, este último coincidiendo con el cambio en el tipo de alimento. La actividad proteolítica alcalina no pudo ser cuantificada con la técnica utilizada, en tanto que la actividad proteolítica ácida total y específica solo pudieron detectarse una

vez que el estómago terminó su diferenciación. El análisis histoquímico de la fosfatasa alcalina reveló que, previo a la metamorfosis, la parte posterior del intestino es la zona de mayor absorción de nutrientes, dada la alta actividad de esta enzima en esa región. Posteriormente, la zona de mayor absorción se ubicó en la parte anterior del intestino, proceso que coincide con el inicio de la formación del estómago. Previo a la metamorfosis, la actividad de la fosfatasa ácida se mantiene sin diferencias entre regiones; sin embargo, una vez que inicia el proceso metamórfico, la región anterior del intestino concentra la mayor actividad de esta enzima.

Galaviz *et al.* (2011) reportó la ontogenia del tracto digestivo y actividad de enzimas digestivas en larvas de corvina blanca *Atractoscion nobilis*. Se observó el desarrollo del sistema digestivo y la actividad de las enzimas digestivas, se analizaron desde la eclosión hasta los 40 días DDE. El desarrollo del sistema digestivo en larvas de *A. nobilis* fue similar a la reportada para otras especies de peces marinos. Se detectaron la mayoría de las actividades de enzimas digestivas en el momento de la eclosión. La actividad de la tripsina fue detectada al 1er DDE y fue aumentando gradualmente durante los siguientes días, pero sobre todo después de la alimentación exógena inicial en el 4 DDE. Datos similares fueron observados en quimotripsina y leucina-aminopeptidasa. La actividad de la pepsina se detectó en un nivel muy bajo al 10 DDE, y un aumento gradual en la actividad entre 16 y 20 DDE, alcanzando máximo nivel al 40 DDE. Estos resultados indican que el tracto digestivo se desarrolla rápidamente en esta especie y que el estómago se vuelve funcional entre 16 y 18 DDE. Por lo que, sería posible iniciar el destete de las larvas de corvina blanca a edad temprana.

En estudios relacionados con el botete diana (Garcia-Gasca *et al.*, 2006) realizaron un trabajo sobre el desarrollo del tracto digestivo, actividad de la tripsina y expresión génica en huevos y larvas del pez botete diana (*Sphoeroides annulatus*) que fueron criados en cautiverio, desde el huevo fertilizado hasta el día 32 después de la eclosión. Las larvas de peces fueron alimentadas progresivamente con microalgas, rotíferos, nauplios de *Artemia* y microdieta formulada. El desarrollo del tracto digestivo, la actividad de la tripsina, y la expresión del gen tripsinógeno en muestras de peces fueron analizados por histología, histoquímica y por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), respectivamente. El intestino y el hígado iniciaron su desarrollo en el día 1 DDE, seguido por el páncreas. La boca se abrió en el día 4 DDE, que fue el inicio de la alimentación de rotíferos. La expresión del gen tripsinógeno se detectó muy temprano en el desarrollo, a partir del óvulo fecundado, mostrando un incremento conforme las horas después de la fecundación, y luego un aumento gradual después de la eclosión. La actividad de la tripsina por histoquímica fue detectada por primera vez en el día 2 DDE, la máxima expresión y actividad se observaron en los días 16 a 24 DDE, lo que corresponde al período de alimentación de nauplios de *Artemia*. No se observaron glándulas gástricas durante todo el período de estudio. A partir del día 28 en adelante Los peces fueron alimentados con microdieta formulada, en este momento tanto la síntesis y la actividad de la tripsina disminuyó, lo que sugiere un papel más importante para otras enzimas en el proceso de digestión. Por otro lado, el botete diana es una especie relacionada al botete tigre (*Takifugu rubripes*) que se cultiva con éxito en Japón y Korea. En particular en Japón se cultiva desde la década de los 60's y en 1999 se obtuvo una producción de 5,100 toneladas (Kanazawa, 1991).

Considerando la información realizada en diversas especies y en botete diana es importante realizar estudios de las etapas más críticas en el cultivo de peces marinos incluyendo el desarrollo de diferentes protocolos de alimentación durante el desarrollo ontogénico del botete diana con la finalidad de que se pueda acelerar la maduración del sistema digestivo y por ende la activación de las enzimas con el fin de poder establecer protocolos de alimentación óptimos para la especie.

3.0. Justificación

La reducción del uso de *Artemia* en los protocolos de cultivo larvario del botete diana (*Sphoeroides annulatus*) y la optimización del tiempo de aplicación del alimento balanceado permitirá reducir significativamente los costos de producción de juveniles. Este proceso puede darse gracias a el desarrollo de nuevos protocolos de alimentación que permitan la sustitución de *Artemia* por alimento balanceado, y de esta manera obtener un mejor desarrollo, crecimiento y sobrevivencia en larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) bajo condiciones de cultivo.

4.0. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes tiempos de cambios de alimentación de alimento vivo a formulado sobre la actividad de enzimas digestivas en larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*).

5.1. Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento de larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) alimentadas con diferentes tiempos de alimentación de alimento vivo a microdieta.

2. Evaluar la actividad de tripsina y quimotripsina durante el desarrollo ontogénico de larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) utilizando diferentes tiempos de cambio de alimentación de alimento vivo a microdieta.

3. Evaluar la actividad de Leucina-Aminopeptidasa durante el desarrollo ontogénico de larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) utilizando diferentes tiempos de cambio de alimentación de alimento vivo a microdieta.

6.0. Material y Métodos

6.1. Enumeración de variables y metodología

El trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción y Cultivo de Peces Marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Mazatlán (CIAD). Los reproductores de cautiverio fueron mantenidos en tanques de 3m³ con flujo continuo, con los siguientes valores promedio de parámetros ambientales: 30 °C, 5 mg de O₂, 35 UPS, pH 7.5, 0.5 mg de nitrógeno amoniacal total (NAT). Para la obtención de gametos se seleccionaron tres hembras de 1500 ± 100 gr de peso y 35 ± 4 cm de longitud corporal y tres machos de 1150 ± 100 gr de peso y 29 ± 3 cm de largo. Sólo se utilizaron machos que eyacularon esperma blanco opaco con alta viscosidad al ejercer presión abdominal y con valores de movilidad espermática mayores al 80%. La selección de hembras se efectuó mediante la extracción de biopsias ováricas con una cánula; las que presentaron diámetros de

ovocitos mayores a 0.5 mm y migración nuclear hacia el polo animal fueron utilizadas para la inducción hormonal de la maduración final y ovulación por medio de implantes.

Los implantes fueron de un copolímero de etileno acetato de vinilo (EVAc) con 150 µg de la hormona (LHRHa; Des-Gly10, [D-Ala6]-Luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide) (Universidad Helenica de Grecia, Dr. Mylonas c.p; Mylonas, 2001) y se aplicaron intraperitonealmente sólo a las hembras. Una vez que se suministró la hormona, una hembra y un macho fueron colocados en un tanque cilíndrico de 3000 L con un flujo continuo (~4 volúmenes/día) de agua de mar filtrada. Una vez que ocurrió la ovulación, los óvulos se extrajeron por masaje abdominal (stripping) y se colocaron en un recipiente seco para obtener el peso el total de los gametos obtenidos de cada hembra. El esperma de los machos se extrajo por masaje abdominal, se recolecto con jeringas de 5 ml para evitar cualquier contaminación y fueron mantenidos en hielo hasta su utilización. Para la fertilización *in vitro* se aplicó la técnica semi-húmeda. Los óvulos de cada hembra fueron mezclados con 1.2 ml de esperma por dos minutos en un tazón con agua de mar (35 ups) filtrada y esterilizada con radiación ultra violeta (UV). Después se enjuagaron para eliminar el exceso de esperma. Posterior al proceso de activación, se eliminó la capa adherente de los huevos utilizando una solución de proteasa (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 5 ml L⁻¹ durante 8 minutos (Rodríguez-Ibarra *et al.*, 2010).

Tres lotes de huevos de aproximadamente 22,000.00 huevos/lote se incubaron a una densidad máxima de 55 huevos por litro en un tanque de 400 L, con agua de mar previamente filtrada hasta 1 µm de retención absoluta y desinfectada por radiación UV. Para mantener una concentración de 6 ppm de O₂ y bajas concentraciones de NAT

durante la incubación, se empleó aireación con un flujo de 2 – 5 L min⁻¹ y un recambio de agua continuo de 0.5 L min⁻¹. Al momento de la eclosión, la aireación se redujo a 0.5 L min⁻¹ para no dañar a los eleuteroembriones.

6.2. Transferencia a los tanques de cultivo

Las larvas fueron transferidas al día después de la eclosión (DDE) 0 a una densidad de 40 larvas por litro.

6.3. Medición de variables

Para determinar el porcentaje de fecundación, a las 2 horas post-fertilización (HPF) se tomaron de los tanques de incubación cuatro muestras de 100 embriones que se examinaron con un microscopio para determinar el número de embriones en desarrollo. Este índice se obtuvo con la siguiente fórmula (Duncan *et al.*, 2003):

$$\text{Porcentaje de fertilización (\% F)} = \frac{\text{huevos con desarrollo}}{\text{huevos con desarrollo} + \text{huevos sin desarrollo}} * 100$$

Para determinar el porcentaje de eclosión y supervivencia a la primera alimentación se colocaron 100 huevos en 3 recipientes de 1 litro. Después de 4 horas a partir de la eclosión se filtró el contenido de 3 recipientes a través de un tamiz de 100 micras y cada uno se colocó en una caja Petri para contar el número de huevos y eleuteroembriones vivos, muertos y deformes. El porcentaje de eclosión se determinó con la siguiente relación:

$$\text{Porcentaje de eclosión (\% E)} = \frac{\text{eleuteroembriones vivos} + \text{muertos}}{\text{eleuteroembriones vivos} + \text{muertos} + \text{huevos}} * 100$$

6.4. Cultivo larvario.

El cultivo larvario se llevó a cabo en el Laboratorio húmedo del CIAD Unidad Mazatlán, en 15 tanques circulares de 500 L, con paredes negras y fondo blanco. Cada tanque tenía aireación y suministro de agua marina, regulables en forma independiente. En cada uno de los tanques se colocaron 40 larvas L⁻¹.

El cultivo se realizó a una temperatura de 28 ± 1.2 °C, salinidad de 35 ups y oxígeno disuelto entre 5.0 y 5.5 mg l⁻¹. La concentración de amonio se controló para mantener una concentración menor a 0.5 ppm.

Los protocolos de cultivo se describen a continuación: las larvas se mantuvieron con fotoperiodo de 24 h durante los primeros 12 días. Posteriormente el fotoperiodo se ajustó a 16 horas de luz. Desde el DDE 0 y hasta final del estudio, se cubrió el drenaje central de los tanques con una malla de 100 μm de luz para retener el alimento y las larvas. A partir del 20 DDE se colocó una malla con luz de 300 μm y a partir del día 30 DDE se cambió a una con 500 μm que se mantuvo hasta la cosecha.

Desde el día 0 hasta el 6 DDE, diariamente se adicionaron 100 L de agua en cada tanque hasta obtener los 500 litros de trabajo. A partir del décimo día se inició el recambio por flujo continuo, a una tasa de 0.2 volúmenes por día hasta el día 16. Luego se incrementó a 0.5 volúmenes por día entre los días 17 y 19; de 0.8 a 1 volumen por día del día 20 al 30 y finalmente, de 1 a 3 volúmenes por día del día 31 al 45. El flujo de aire se mantuvo a 0.5 L min⁻¹ desde el primer día hasta el día 15 (DDE), y se incrementó a 1 L min⁻¹ a partir del día 16 hasta el 29, para finalizar a 2 L min⁻¹ del día 30 hasta el 41.

Todos los protocolos de cultivo larvario se realizaron con la técnica de agua verde, para lo que a partir de la transferencia y hasta 30 (dependiendo el tratamiento) días después de la eclosión se añadieron a los tanques de cultivo una mezcla de 80,000 células ml^{-1} de *Nannochloropsis oculata* y células ml^{-1} de *Isochrysis* sp. Figura 1.

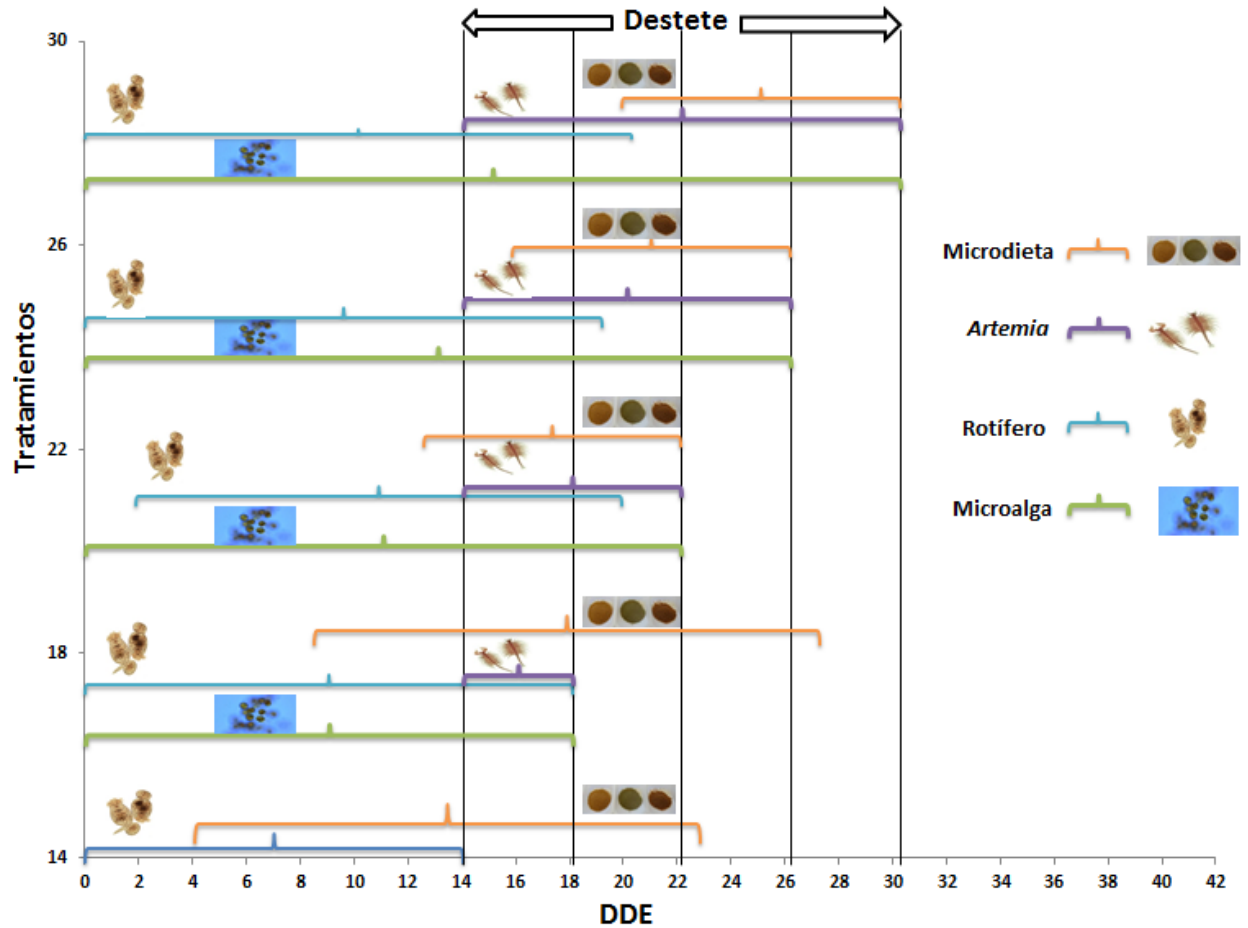


Figura 1. Protocolo de alimentación utilizado en el presente estudio para larvas de botete Diana (*Spherooides annulatus*) que consistió en mezcla de microalgas, rotíferos, *Artemia* y microdieta, por medio de los tratamientos T14, T18, T22, T26, T30. **T14:** Adición de rotíferos inicia 0 DDE y termina a los 14 DDE, con una mezcla de microdieta que va desde 4 a 23 DDE. **T18:** adición de microalga y rotífero que va desde 0 a 18 DDE, se adiciono *Artemia* de los 14 a 18 DDE y microdieta desde 8 a 27 DDE. **T22:** Adición de microalga desde 0 a 22 DDE, adición de rotíferos de 2 DDE a 20 DDE, se adiciono de artemias desde 14 a 22 DDE y la microdieta se adiciono a los 12 DDE y termino a los 22 DDE. **T26:** Adición de microalga desde 0 a 26 DDE, adición de rotíferos de 0 a 19 DDE, adición de artemias de 14 a 26 DDE y microdieta de los 16 a los 26 DDE. **T30:** Adición de microalga desde 0 a 30 DDE, rotíferos de los 0 DDE a 20 DDE, artemias del 14 a 30 DDE y adición de microdieta a los 20 DDE y termino a los 30 DDE.

6.5. Colecta de muestras para análisis bioquímico

Dependiendo de su talla, las larvas de botete diana (n=10-30) fueron muestreadas aleatoriamente directamente de los tanques de cultivo experimental, usando una malla de 300 μm . Las muestras fueron colectadas una hora después de la primera alimentación (8.00 a.m.) para activar el paquete enzimático de las larvas y posteriormente se dejaron en agua limpia para que eliminaran el exceso de heces, esto con el fin de descartar posibles efectos de enzimas provenientes de la dieta. Las muestras de larvas fueron colectadas diariamente desde el dpe 0 hasta el DDE 8, después las muestras fueron colectadas cada dos días hasta el DDE 20 y cada cuatro días hasta el final del estudio (DDE 40). Después de haber muestreado las larvas, éstas fueron anestesiadas con tricaina metansulfonato (MS 222), y lavadas con agua destilada para remover el exceso de sales y almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta análisis.

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

6.6. Preparación de extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos se obtuvieron al macerar las muestras de eleuteroembriones (larvas recién eclosionadas), larvas y juveniles liofilizadas. En larvas

mayores a 18 DDE se disecó el sistema digestivo con el propósito de eliminar los inhibidores enzimáticos que pudieran estar presentes en la musculatura, así como otras enzimas relacionadas con el metabolismo de las proteínas musculares y el sistema inmune (Hjelmeland *et al.*, 1985).

En este caso, las disecciones se realizaron bajo un microscopio estereoscópico y una lámpara con lupa sobre portaobjetos enfriados en una cama de hielo a 4 °C, con el fin de mantener las larvas a baja temperatura durante la disección. Cada muestra proveniente de la disección contenía de 10 a 30 larvas (0-16 DDE) o de tres a cinco sistemas digestivos (a partir del día 18 DDE) se homogenizo en 1 ml de agua desionizada y en baño de hielo (4 °C) utilizando un homogenizador de tejidos (Kontes, USA). Los homogenizados fueron centrifugados a 14000 g durante 30 min a 4 °C, en una centrífuga refrigerada (Biofuge Primo R marca Heraeus). El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático y se separó en alícuotas de 200 µl que se almaceno a -70 °C hasta su análisis.

6.7. Determinación de proteína soluble

La concentración de proteína soluble de cada muestra se determinó por triplicado de acuerdo a Bradford (1976). En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 10 µl de muestra, 200 µl del reactivo (Quick start – Bio-rad) y se incubo a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente fue leída a 595 nm en un espectrofotómetro MultiskanGO (Termocientific). Para la cuantificación se utilizó como estándar una solución de albúmina bovina (2mg ml⁻¹).

6.8. Cuantificación de la actividad proteolítica

La cuantificación de la actividad de enzimas digestivas evaluadas en la presente tesis fueron realizadas por medio de espectrofotometría utilizando extractos específicos para cada una de las enzimas. A continuación se describirá brevemente la metodología empleada.

6.8.2. Actividad tipo tripsina

Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961). Se le añadieron 280 μl de BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida) a 30 μl de la muestra y la mezcla fue incubada a 37 °C durante 30 min, la absorbancia fue leída a 410 nm. Se utilizó como control tripsina comercial (SIGMA Tipo IX, de páncreas de porcino), con una concentración de reacción de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Una unidad de actividad corresponde a 1 μmol de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar 8800 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Dimes *et al.*, 1994).

6.8.3. Actividad tipo quimotripsina

Para la medición de la actividad tipo quimotripsina se utilizó la metodología de Del Mar (1979). La cantidad de muestra que se utilizó fue de 30 μl . La reacción se inició al añadir 280 μl de SAAPNA (Succinil-(Ala)₂-Pro-Phe-p-nitroanilida) y la muestra se incubó por 30 min a 37°C. La absorbancia fue leída a 410 nm, usando como control quimotripsina comercial (SIGMA Tipo II, de páncreas de bovino) en una concentración de reacción de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

6.8.4. Actividad tipo leucina-Aminopeptidasa

Para la medición de la actividad tipo Leucina-Aminopeptidasa se utilizó la metodología de Maraux et al. (1973). La cantidad de muestra que se utilizó fue de 30 µl de extracto y se le añadieron 280 µl de Leucine p-nitroanilide (0.1 mmol L⁻¹ in DMSO) como sustrato, la muestra se incubó por 30 minutos a 37°C y la absorbancia fue leída a 410nm usando como control Aminopeptidasa comercial tipo IV-S (SIGMA).

Para las actividades de tripsina, quimotripsina y Leucine-Aminopeptidasa, una unidad de actividad enzimática fue definida como 1 Imol L⁻¹ p-nitroanilide relacionada por minuto, usando el coeficiente de extinción molar 8.8 a 410 nm.

6.8.5. Cálculo de actividades específicas

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

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

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

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

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

Siendo:

Δ ABS el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda; volumen final reacción, el volumen final de la reacción; CEM, el coeficiente de extinción molar.

Tabla I. Sustratos que fueron utilizados en el presente estudio para cuantificar espectrofotométricamente la actividad de diferentes enzimas digestivas en larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) en los diferentes tratamientos T14, 18, 22, 26 y 30.

Sustrato	Especificidad	Solvente
BAPNA 1mM ²	Tipo tripsina	DMSO
SAAPNA	Tipo quimotripsina	DMSO
Leucine p-nitroanilide	Tipo Leucina aminopeptidasa	DMSO

¹ BAPNA: N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida.

² SAAPNA: Succinil-(Ala)₂-Pro-Phe-p-nitroanilida

³ Leucine p-nitroanilide (0.1 mmol L⁻¹ in DMSO)

6.9. Análisis estadístico

La actividad específica e individual de las enzimas digestivas en larvas fue expresado como media y desviación estándar (media \pm D.E). Se realizaron pruebas de análisis de varianzas de dos vías (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre algunos de los días muestreados o por los protocolos de alimentación utilizados. Una prueba de comparaciones múltiples de la actividad de las enzimas cada día fue utilizada usando la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Sigma-Stat 11.0 para Windows (Sigma- Stat® 11.0, USA). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

7.0. Resultados

Crecimiento en longitud

Después de alimentar a las larvas con los diferentes tratamientos (T14, T18, T22, T26 y T30) durante 41 días después de la eclosión, se encontró que las larvas alimentadas con la dieta T30 mostraron la mayor ganancia en longitud, seguidos de las larvas alimentadas con el T 26 y T22, en tanto que las larvas alimentadas con el T14 presentaron la menor ganancia en longitud. Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento en longitud de las larvas con respecto al tiempo de desarrollo ($P < 0.05$), sin embargo, al final del estudio, diferencias significativas fueron observadas ($P < 0.019$) entre los tratamientos, siendo más claro el T30 con respecto al T14 (Figura 2).

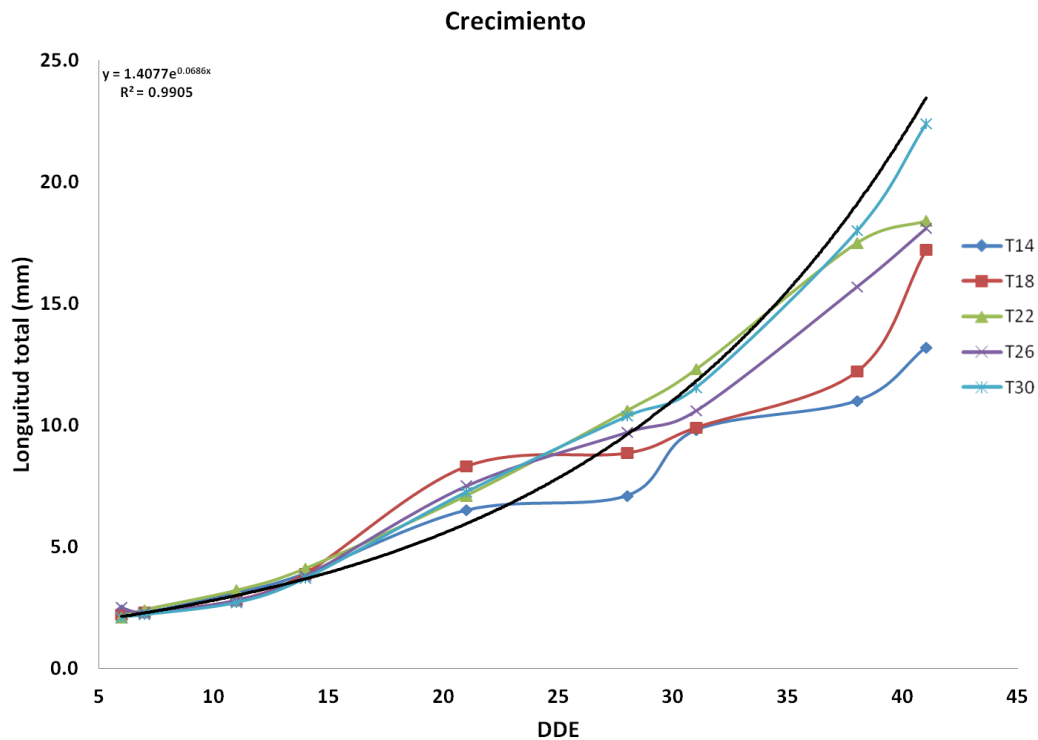


Figura 2. Crecimiento en longitud de larvas de botete diana alimentadas con diferentes tratamientos T14, T18, T22, T26 y T30 durante el cultivo experimental.

7.1. Porcentaje de fertilización

$$\text{Porcentaje de fertilización (\% F)} = \frac{\text{huevos con desarrollo}}{\text{huevos con desarrollo} + \text{huevos sin desarrollo}} * 100$$

$$\text{Porcentaje de fertilización (\% F)} = \frac{22,000}{22,000 + 1100} * 100 = 95\% = 20,900 \text{ huevos fertilizados}$$

7.2. Porcentaje de eclosión y de supervivencia

$$\text{Porcentaje de eclosión (\% E)} = \frac{\text{eleuteroembriones vivos} + \text{muertos}}{\text{eleuteroembriones vivos} + \text{muertos} + \text{huevos}} * 100$$

$$20,900 \text{ ----- } 100\%$$

$$X \text{ ----- } 96\% = 20,064 \text{ larvas eclosionadas}$$

Tabla 1. Resultado del porcentaje de supervivencia obtenida de los tratamientos, el cual se obtuvo dividiendo la cosecha final / # de larvas eclosionadas.

Tratamiento	Cosecha final	Supervivencia %
14	2343	11.6
18	1624	8
22	2918	14.5
26	1580	7.8
30	2501	12.4

7.3. Actividades enzimáticas

7.3.1. Tripsina

En los niveles de actividad de tripsina no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) durante los primeros 13 DDE, sin embargo al 15 DDE fueron observadas

diferencias significativas entre los tratamientos T18 (2.91 Umg/proteína) y T30 (6.51 Umg/proteína), siendo diferentes a los demás tratamientos. Los niveles más altos de la actividad con respecto a esta enzima fueron observados el DDE 35 (18.54 Umg/proteína) con el T22, mientras que el nivel más bajo fue presentado en el tratamiento 14 (11.86 Umg/proteína), siendo significativamente diferentes ($P < 0.001$), Figura 3.

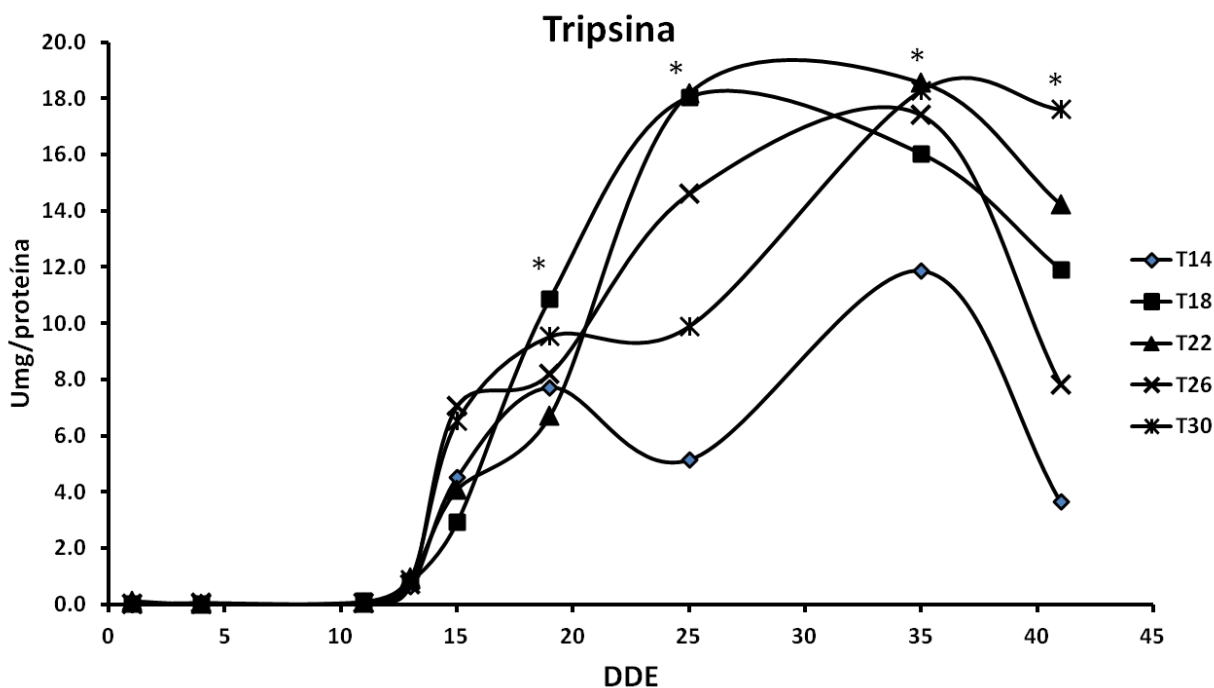


Figura 3. Actividad de tripsina (Umg/proteína) durante el cultivo de botete diana *Spherooides annulatus* alimentados a partir de los tratamientos T14, T18, T22, T26 y T30. * significa diferencias significativas.

7.3.2. Quimotripsina

En los niveles de actividad de quimotripsina no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) durante los primeros 13 DDE, sin embargo al DDE 15, fueron observadas diferencias significativas entre los tratamientos 18 ($2.87 \text{ mUmg} \cdot 10^{-6}$

³/proteína) y 30 (2.18 mUmg*10⁻³/proteína), siendo diferentes a los demás tratamientos. Los niveles más altos de la actividad con respecto a esta enzima fueron observados al DDE 25 (3.98 mUmg*10⁻³/proteína) con el T18, mientras que el nivel más bajo fue presentado en el tratamiento 26 (2.01 mUmg*10⁻³/proteína), siendo significativamente diferentes (P<0.001), Figura 4.

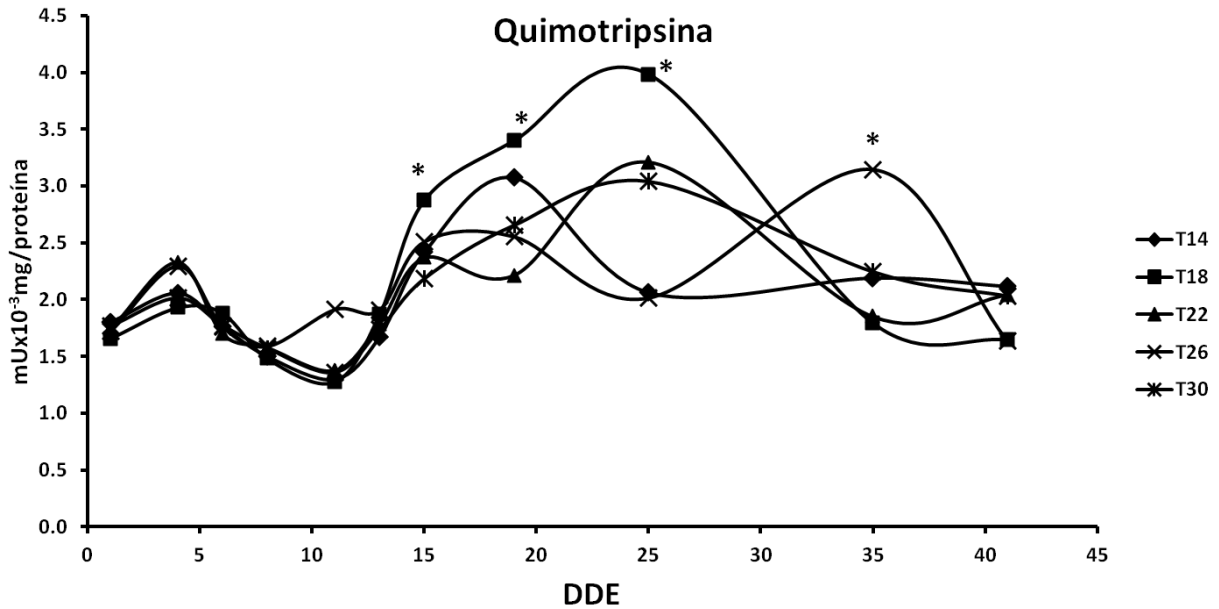


Figura 4. Actividad de quimotripsina durante el larvicultivo de botete diana alimentados *Sphoeroides annulatus* con diferentes protocolos T14, T18, T22, T26 y T30 (mUx10⁻³mg/proteína). * significa diferencias significativas.

7.3.3. Leucina aminopeptidasa

En los niveles de actividad de leucina-aminopeptidasa no se observaron diferencias significativas (P>0.05) durante los primeros 13 DDE, sin embargo, al 15 DDE diferencias significativas fueron observadas entre los tratamientos 18 (1.81 mUmg*10⁻³/proteína) y 30 (1.13 mUmg*10⁻³/proteína), siendo diferentes con respecto al resto de los tratamientos. Los mayores niveles de actividad de ésta enzima fueron

observados al DDE 35 ($3.14 \text{ mUmg} \cdot 10^{-3} / \text{proteína}$) con el T26, mientras que el nivel más bajo fue presentado en el tratamiento 18 ($1.79 \text{ mUmg} \cdot 10^{-3} / \text{proteína}$), siendo significativamente diferentes ($P < 0.02$), Figura 5.

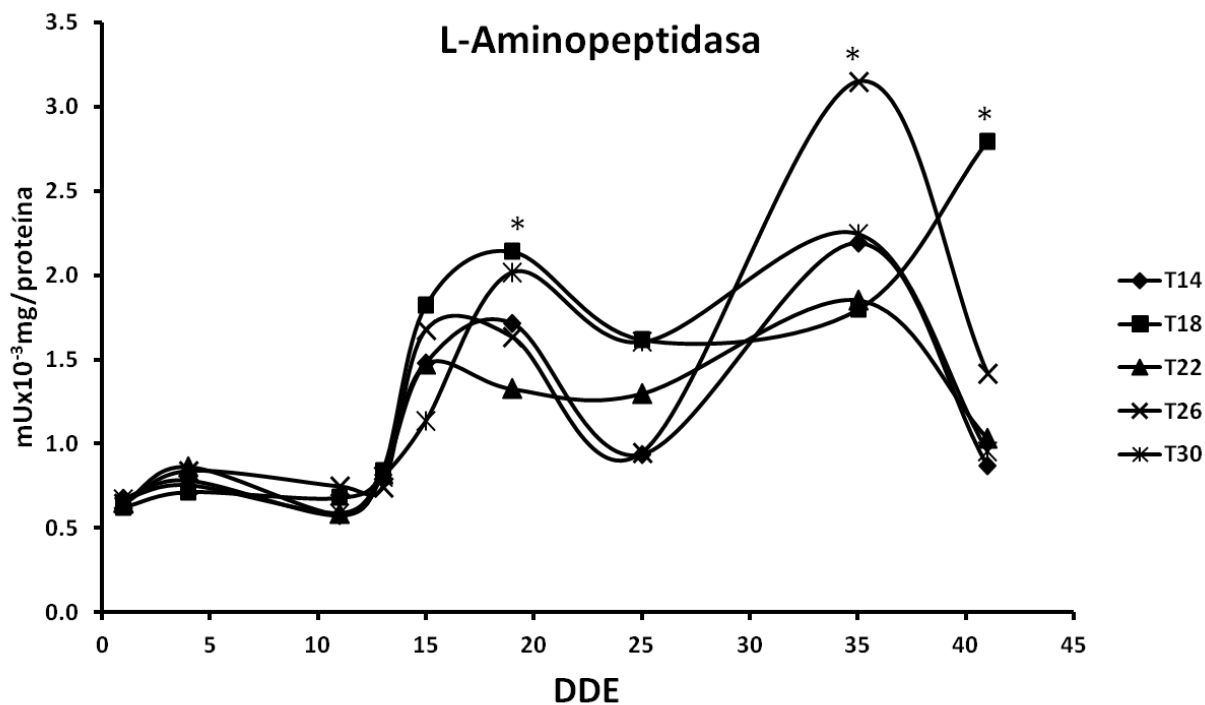


Figura 5. Actividad de leucina-aminopeptidasa durante el larvicultivo de botete diana alimentados con diferentes protocolos T14, T18, T22, T26 y T30 ($\text{mUx}10^{-3} \text{mg/proteína}$). * significa diferencias significativas.

8.0. Discusiones

La actividad enzimática de tripsina, quimotripsina y leucina-aminopeptidasa fueron estudiadas durante el periodo del 0 al 41 DDE en larvas del botete diana *Sphoeroides annulatus* cultivadas bajo diferentes protocolos, los cuales iniciaron con la deshabitación del alimento vivo a diferentes días después de la eclosión a partir de los días 14, 18, 22, 26 y 30. Al momento de la eclosión hasta 4 días después no observaron diferencias significativas en los niveles de actividades de las diferentes enzimas evaluadas, esto posiblemente se deba a que la mayoría de las larvas de peces marinos dependen de enzimas derivadas de la información genética de sus progenitores para llevar a cabo la asimilación de nutrientes contenidos en el saco vitelino y gota de aceite (Zambonino Infante y Cahu, 1994, Galaviz et al., 2011).

En el presente estudio, los niveles de actividad de tripsina y quimotripsina presentaron cambios significativos al momento que se realizó la adición y cambio de alimentación en las larvas, el cual consistió en adicionar nauplios de *Artemia* por primera vez a los 14 DDE, observándose diferencias significativas entre los tratamientos basados en los protocolos de alimentación, más no por el tiempo de cultivo. Esto debido a que un cambio de alimentación de rotíferos a nauplios de *Artemia* a los 14 DDE en las larvas incrementa la producción de gránulos de zimógeno inactivos por el páncreas que van a ser secretadas al duodeno por medio del canal colédoco, para posteriormente ser activadas por la enzima enteroquinasa (Guillaume, J y Choubert, 2004). Así mismo, (Galaviz, 2004., García Gasca et al., 2006.) reportan que el desarrollo del páncreas inicia desde 2 DDE para *S. annulatus* y para el 4 DDE se puede observar la porción endocrina bien desarrollada como un solo islote asociado al

intestino. En el presente estudio, entre el 12 DDE y 14 DDE se observa el desarrollo completo del páncreas, y es en éste momento las células excretoras empiezan a embeberse en el intestino, mismo que es acompañado con un nivel alto de actividad de tripsina, lo cual podría indicar que en (*S annulatus* su sistema digestivo se encuentra más desarrollado y apto para poder asimilar y digerir con mayor facilidad y de una mejor forma los nauplios de *Artemia* ingeridos.

Tripsina y quimotripsina presentaron en el tratamiento T22 el nivel máximo de la actividad al 35 DDE y a partir de ese día la actividad empieza a disminuir en todos los tratamientos, esto puede deberse a que en ese momento las enzimas digestivas como tripsina y quimotripsina que son proteasas importantes en la digestión de las proteínas durante el periodo larval, dejan de ser las enzimas de mayor importancia, debido a que entre el DDE 28-35 las larvas de botete diana sufren el proceso de metamorfosis y empiezan a ser juveniles y otras enzimas principalmente relacionadas a las microvellosidades del intestino toman el lugar de la tripsina y quimotripsina (García-Gasca 2006).

En el trabajo realizado en el jurel de castilla *Seriola lalandi valenciennes* reportan niveles de actividad de tripsina y quimotripsina desde antes de la primera alimentación exógena y se observó un incremento en la actividad en los días posterior a la introducción de nauplios de *Artemia* a la dieta, mismos que coinciden con los observados en el presente estudio del *S. annulatus*. Resultados similares se han observado en otras especies tales como lenguado de California, *Paralichthys californicus* (Zacarías-Soto et al., 2007) y la curvina blanca *Atractoscion nobilis* (Galaviz et al., 2011). El aumento en los niveles de actividad de tripsina y por ende de

quimotripsina al momento de introducir las *Artemias* a la alimentación se puede deber a que estos son ricos en proteínas y aminoácidos esenciales, todas estas características favorecen a la secreción de éstas proteasas por parte del páncreas (Zacarías-Soto et al., 2007).

En el caso de la actividad de leucina-aminopeptidasa no hubo diferencias significativas durante los primeros 14 DDE, la cual se mantuvo muy constante hasta ese momento, a partir de los 14 DDE se observó un incremento en el nivel de actividad que puede ser atribuido a el cambio de alimento vivo y maduración del tracto digestivo, mientras que los niveles más altos de ésta actividad se presentaron en los tratamientos 26 y 30, para después empezar a disminuir su actividad en todos los tratamientos y hasta el 35 DDE. Resultados similares fueron encontrados en *Sciaenops ocellatus* (Lazo et al., 2007) que reporta que la actividad de leucina aminopeptidasa se encuentra en una tendencia muy similar, empezando con un nivel de actividad muy bajo, para posteriormente incrementar conforme el crecimiento de la larva, en el que se puede reflejar la parte final de la absorción macromolecular y también la aparición de transportadores de aminoácidos específicos, mismo que también se relaciona (Cahu, Zambonino-Infante, 1995) con niveles más bajos de leucina-aminopeptidasa durante la primera alimentación para después elevar el nivel de la actividad de acuerdo al desarrollo de la larva, todo esto relacionado con la maduración intestinal en larvas de peces marinos.

La presencia de leucina-aminopeptidasa ha sido atribuida a una programación genética de su expresión que permite la absorción de sus nutrientes, aunque su actividad se incrementa por la adición de las presas vivas (Zambonino-Infante y Cahu,

1994; Tengjaroenkul *et al.*, 2002) por otra parte en el día 12 DDE se detectó el máximo de actividad, para después decaer para el día 15 y mantener constante su actividad hasta el final del periodo larvario. Al comparar de leucina aminopeptidasa con los obtenidos para el lenguado Dover (Clark *et al.*, 1986), el rodaballo (Cousin *et al.*, 1987) y la lubina (Cahu y Zambonino, 1997) se detectó la misma tendencia, obteniendo mayor nivel de actividad conforme el desarrollo de la larva y después una disminución abrupta al final del estudio al 40 DDE. Este tipo de fluctuaciones han sido relacionadas junto con el aumento de las enzimas del borde del cepillo (fosfatasa alcalina), como en el momento que se da la maduración final de los enterocitos (Zambonino-infante y Cahu, 2001).

9.0. CONCLUSIÓN

El nivel de actividad de las proteasas alcalinas (tripsina, quimotripsina y leucina-aminopeptidasa) del presente estudio fue detectado desde los primeros días de desarrollo, incrementando sus niveles conforme el desarrollo de la larva, sin embargo, las larvas alimentadas con los tratamientos 22 y 30 fueron las que mostraron mejor respuesta en la actividad de tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa indicando que la deshabitación alimenticia podría iniciarse a partir del 22 DDE siguiendo el protocolo de alimentación descrito para esta especie.

10.0. RECOMENDACIONES FUTURAS

Es necesario seguir con más estudios en cuestión de actividad enzimática para cada especie, es recomendable realizar otros estudios con distintas enzimas de

proteasas alcalinas para el botete diana tales como actividad tipo fosfatasa alcalina, lipasa y amilasa, de esta manera poder lograr reducir aún más los días al momento de la deshabitación alimenticia y encontrar el momento adecuado de tener un intestino completamente funcional, todo esto generando por ende un mejor crecimiento en longitud y ganancia en peso. Es importante también mencionar que en el sector privado lo que se busca es reducir los costos de producción debido a que en una actividad primaria como la piscicultura la alimentación representa la mitad o un poco más de la inversión total , entonces logrando reducir días de alimentación con alimento vivo se reducen cantidades significativas de inversión.

11.0. Referencias

- Álvarez-Cadena J, NR Cortés-Altamirano y, GA Mussot-Pérez. 1987. Composición y abundancia de las larvas de peces en el sistema lagunar Huizache-Caimanero, Parte II Tapo Botadero. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM 15: 143-157.
- Álvarez-Gonzales, C. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE). Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias marinas. P 164
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Boge, G., Peres, G., 1983. Acquisition recente concernant l'absorption intestinale de protein chez les poissons. Ichthyophysiologica Acta 7, 114-118.
- Castro-Aguirre, J, L., Espinoza-Pérez, H. y, Shmitter.Soto, J, J. 1999. Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México. Ed. Limusa, pp. 711.
- Cahu, C.L. y J.L. Zambonino-Infante. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. Fish Physiol. Biochem. 14, 431-437.
- Cahu, C., y J.L. Zambonino-infante. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?. Acuacult. Int. 5, 151-160.

- Civera-Cerecedo, R., Alvarez-Gonzalez, C.A y Moyano-Lopez, F.J. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. In: Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Clark, J., K.R. Murray y J.R. Stark. 1986. Protease development in dover sole (*Solea solea* (L.)). *Aquaculture* 53, 253-262.
- Cousin, J.C.B., F. Baudin-Laurencin y J. Gabaudan. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 30, 15-33.
- Dimes, L.E y Haard, N.F., 1994. Estimation of protein digestibility – I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 108 A, 349-362.
- Duncan, N., Rodriguez, G., Alock, D. y, Zohar, Y. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRH-a on bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus* spawning. *Aquaculture* 218, 625-635.
- Galaviz-Mario A. 2003. Estudio de la actividad y expresión de tripsina en huevos y larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*). Tesis de licenciatura de biología pesquera. P 92.
- Galaviz-Mario A., García-Gasca A., Drawbridge M., Álvarez-González C. y, López-Acuña L. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 318, 162–168
- Galaviz-Mario A., García-Ortega A., Enric Gisbert., López-Acuña. y, García-Gasca A. 2012. Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the

- spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 161, 9–16.
- García-Gasca A., Galaviz-Mario A., Gutiérrez-Jesús. y, García-Ortega A. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 251, 366 – 376
- García-Ortega, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. In: Cruz – Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A & Civera-cerecedo, R., (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. p. 287-299.
- Guillaume, J y Choubert, G. 2004. *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos*. Ed. INRA. pp475
- Hitzfelder, G.M., Holt, J., Fox, J. y, Mckee, D. 2006. The effect of rearing density on growth and survival of cobia, *Rachycentron canadum*, larvae in a closed recirculating aquaculture system, *J World aquac Soc.* 372, 204-209.
- Hjelmeland, K. y Jørgensen, T., 1985. Evaluation of radioimmunoassay as a method to quantify trypsin and trypsinogen in fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 114, 619– 621.
- Jones, D.A., Kamurudin, M.S. y, Levay, L. 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. *J. World Aquacult.* v24, p191–210.

- Kanazawa, A., (1991). Puffer fish, *Fugu rubripes*. In: R.P. Wilson. (Eds) **Handbook of nutrient requirements of finfish**. CRC Press, Boca Raton, Florida USA. p. 123-129.
- King N., Huntting O.W., Ubera M. y, Bengtso D. 2000. Effects of larval stocking on laboratory-scale and commercial-scale production of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J World aquac Soc.* 31, 436-445.
- Lazo, J.P., Holt, G.J. y, Arnold, C.R., 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition* 6, 183-192.
- Miller, R.R., Minckley W.L. y, Norris, S.M. 2005. *Freshwater fishes of Mexico*. University of Chicago press, Chicago and London. 490 p.
- Montes-Macias, R. 2007. Caracterización de la actividad enzimática de larvas de jurel cola amarilla del pacífico (*Seriola lalandi dorsalis*). Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de maestro en ciencias. Programa de posgrado en ciencias con orientación en acuicultura. P 75
- Rodríguez-Ibarra, L.L., M.I Abdo de la Parra., G.A rodriguez-Montes de Oca., M.S Moreno-Hernández., G Velazco-Blanco., N Garcia-Aguilar., L.S Álvarez-Lajonchère. 2010. Evaluación de métodos para la eliminación de la capa adherente de los huevos del botete diana *Spheoroides annulatus* (Pisces: Tetraodontidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45, 147-151.
- Tengjaroenkul, B., B.J. Smith, S.A. Smith y U. Chatreewongsin. 2002. Ontogenic development of intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211, 241-251.

- Thompson, D.A., Findley, L. y, Kerstitch, A. 1987. Reef fishes of the sea of Cortez, The rocky-shore fishes of the gulf of California, The Arizona University Press, Tucson, Arizona, USA.
- Uebershar, B. 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: Walther, B. T. & Fuhn, H. J, (Eds) Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development. Univ. of Bergen, Norway. P. 233-237.
- Valverde-Chavarria, 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.
- Walford J. y Lam T. J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lateolabrax calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109,187- 205.
- Whitaker, J.R. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. 2nd ed., Marcel Dekker, INC, New York.
- Zacarias-Soto, M. 2007. Histología, histoquímica y actividad enzimática del sistema digestivo de *Paralichthys californicus* durante su ontogenia y evaluación de probióticos como promotores de la maduración del sistema. Tesis de doctorado. P175
- Zambonino Infante J.L. y Cahu C.L., 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 209-212.

Zambonino-Infante J. L. y, Cahu C. L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part c* 130: 477-487.

12.0. ANEXOS

Weaning 14 days			
Culture day	Rotifers	Artemia	Microdiet
0	20 rot/mL enrich		
1	20 rot/mL enrich		
2	20 rot/mL enrich		
3	20 rot/mL enrich		
4	20 rot/mL enrich		0.60 g per tank
5	20 rot/mL enrich		0.80 g per tank
6	20 rot/mL enrich		1.0 g per tank
7	20 rot/mL enrich		1.2 g per tank
8	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
9	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
10	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
11	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
12	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
13	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
14	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
15			1.4 g per tank
16	1		1.4 g per tank
17	2		1.4 g per tank
18	3		1.4 g per tank
19	4		1.4 g per tank
20	5		1.4 g per tank
21	6		1.4 g per tank
22	7		1.4 g per tank
23	8		1.4 g per tank
24	9		1.4 g per tank
25	COSECHA		
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			

Weaning 18 days				
Culture day	Microalgae	Rotifers	Artemia	Microdiet
0	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		
1	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		
2	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		
3	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		
4	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		
5	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		
6	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		
7	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		
8	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		0.60 g per tank
9	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		0.80 g per tank
10	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		1.0 g per tank
11	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		1.2 g per tank
12	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
13	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich		1.4 g per tank
14	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.4 g per tank
15	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.4 g per tank
16	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.4 g per tank
17	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.4 g per tank
18	80,000 cell/mL nano-Iso	20 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.4 g per tank
19				1.4 g per tank
20			1	1.4 g per tank
21			2	1.4 g per tank
22			3	1.4 g per tank
23			4	1.4 g per tank
24			5	1.4 g per tank
25			6	1.4 g per tank
26			7	1.4 g per tank
27			8	1.4 g per tank
28			9	
29	COSECHA			
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				

Weaning 22 days				
Culture day	Microalgae	Rotifers	Artemia	Microdiet
0	80,000 cell/mL nano-Iso			
1	80,000 cell/mL nano-Iso			
2	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
3	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
4	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
5	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
6	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
7	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
8	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
9	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
10	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
11	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		
12	80,000 cell/mL nano-Iso	15 rot/mL enrich		0.60 g per tank
13	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		0.80 g per tank
14	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.0 g per tank
15	80,000 cell/mL nano-Iso	8 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.2 g per tank
16	80,000 cell/mL nano-Iso	6 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.4 g per tank
17	80,000 cell/mL nano-Iso	4 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	1.4 g per tank
18	80,000 cell/mL nano-Iso	2 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.3/mL	1.4 g per tank
19	80,000 cell/mL nano-Iso	2 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.3/mL	1.4 g per tank
20	80,000 cell/mL nano-Iso	2 rot/mL enrich	METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
21	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
22	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
23				
24			1	
25			2	
26			3	
27			4	
28			5	
29			6	
30			7	
31			8	
32			9	
33	COSECHA			
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				

Weaning 26 days				
Culture day	Microalgae	Rotifers	Artemia	Microdiet
0	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
1	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
2	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
3	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
4	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
5	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
6	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
7	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
8	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
9	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
10	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
11	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
12	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
13	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
14	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	
15	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	
16	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	0.60 g per tank
17	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	0.80 g per tank
18	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.3/mL	1.0 g per tank
19	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.3/mL	1.2 g per tank
20	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
21	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
22	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
23	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
24	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
25	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
26	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
27				
28			1	
29			2	
30			3	
31			4	
32			5	
33			6	
34			7	
35			8	
36			9	
37	COSECHA			
38				
39				
40				

Weaning 30 days				
Culture day	Microalgae	Rotifers	Artemia	Microdiet
0	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
1	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
2	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
3	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
4	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
5	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
6	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
7	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
8	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
9	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
10	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
11	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
12	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
13	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich		
14	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	
15	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	
16	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	
17	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.5/mL	
18	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.3/mL	
19	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	newly hatch artemia 0.3/mL	
20	80,000 cell/mL nano-Iso	10 rot/mL enrich	METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	0.60 g per tank
21	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	0.80 g per tank
22	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.0 g per tank
23	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.2 g per tank
24	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
25	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
26	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
27	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
28	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
29	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
30	80,000 cell/mL nano-Iso		METANAUPLIO ENRICH 0.1/mL	1.4 g per tank
31				
32			1	
33			2	
34			3	
35			4	
36			5	
37			6	
38			7	
39			8	
40			9	
41				COSECHA

