



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**USO DE DIETAS MICROENCAPSULADAS
PARA LA ALIMENTACIÓN DE LARVAS DE LA
CABRILLA ARENERA *Paralabrax*
*maculatofasciatus***

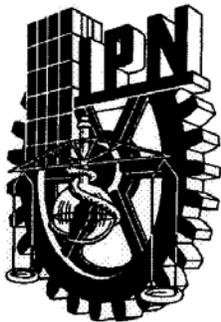
TESIS

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

PRESENTA

RUBÉN ESTEBAN GARCÍA GÓMEZ

LA PAZ, B.C.S. SEPTIEMBRE DE 2006



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

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 8 del mes Mayo del año 2006, el (la) que suscribe RUBÉN ESTEBAN GARCÍA GÓMEZ alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A030405 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO y cede los derechos del trabajo titulado:

"USO DE DIETAS MICROENCAPSULADAS PARA LA ALIMENTACIÓN DE LARVAS

DE CABRILLA ARENERA *Palaemonetes maculatofasciatus*"

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

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: regarcia@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

RUBÉN ESTEBAN GARCÍA GÓMEZ

nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 8 del mes de Mayo del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**“USO DE DIETAS MICROENCAPSULADAS PARA LA ALIMENTACIÓN DE LARVAS
DE LA CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*”**

Presentada por el alumno:

GARCÍA

Apellido paterno

GÓMEZ

materno

RUBÉN ESTEBAN

nombre(s)

Con registro:

A	0	3	0	4	0	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO

PRESIDENTE

DRA. LAURA SANCHEZ VELASCO

SECRETARIO

DR. BENJAMIN H. LANGUAS VÉLEZ

SEGUNDO VOCAL

DR. HÉCTOR NOLASCO SORIA

TERCER VOCAL

DR. DARIÉL TOVAR RAMÍREZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las instituciones y personas que facilitaron la realización de esta tesis, como lo son:

- El Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional por permitirme concluir los estudios de maestría y realizar los experimentos en la Unidad Piloto de Maricultivos.
- El Programa Institucional para la Formación de Investigadores (PIFI) y al programa de Becas-Crédito del CONACYT por el apoyo financiero brindado durante los estudios de maestría.
- Los proyectos CGPI 20031235 titulado “Optimización de la producción de semilla de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*: Nutrición larvaria” y el proyecto CGPI 20041093 “Optimización de la producción de semilla de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*: Uso de Microencapsulados en la Alimentación Larvaria” por el financiamiento para la realización de la tesis. De la misma manera, los proyectos CIBNOR AC6.2 y SAGARPA-CONACyT 044 por el apoyo en los análisis de expresión y actividad enzimática.
- El Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste quien permitió el uso de sus instalaciones, particularmente el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas para los análisis de ácidos grasos, el Laboratorio de Fisiología Comparada para los análisis bioquímicos y el laboratorio de Biología Molecular para los análisis de expresión de enzimas digestivas.
- El Dr. Francisco Javier Alarcón López y al personal del Laboratorio de Biología Aplicada perteneciente a la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería en Almería, España, por la elaboración de las microcápsulas.

- Los Codirectores de la tesis, el M. en C. José Luis Ortiz Galindo y el Dr. Dariel Tovar Ramírez, quienes sin su apoyo y consejo no habría podido realizar esta tesis.
- Los M. en C. Alicia Mónica Olalde Rodríguez, Martín Oscar Rosales Velásquez, Víctor Carrasco Chávez y Tanos Grayeb del Álamo, así como los Biol. Ac. Juan Manuel Martínez Brown y Julio Sánchez Gallegos por el apoyo durante el cultivo larvario.
- Los M. en C. Laura Carreón Palau, Jorge del Ángel Rodríguez, Jesús Neftalí Hernández Rivera, Patricia Hinojosa Baltazar, Ernesto Goytortua, Hever Latisnere y Sonia Rocha Meza, así como la IBQ. Dolores Rondero Astorga por el apoyo técnico para la realización de los distintos análisis químicos y de biología molecular.
- El comité Revisor de la tesis, el M. en C. José Luis Ortiz Galindo, los Doctores Dariel Tovar Ramirez, Hector Nolasco Soria, Laura Sánchez Velasco y Benjamín Anguas Vélez.

GRACIAS A TODOS

DEDICATORIA

Es mi deseo dedicar esta tesis a todas las personas que me apoyaron durante su realización. A aquellas personas que soportaron mi ausencia en ocasiones importantes, les acrezco su comprensión ya que este trabajo es fruto de ello.

A mi familia, que me apoyaron durante diversos momentos de manera económica y sentimental. A mis tíos Areli, Gloria, Manuel, Marcos, Severo y Rubén. A mis primos consanguíneos y adquiridos Hugo, Iván, Jesús, Magenia, Manuel, Marcela, Marcos, Rivas, Yadira, Omar, Gina, Miguel y Betty. Al Laca y a la Imeldita que me soportaron desvelos, desmañanadas, mal humor y otros eventos más agradables, gracias por intentar comprenderme. A mis queridas sobrinas y sobrinos, Daniela, Emmanuel, Grace Careli, Jesli, Karol Musmé, Manuel, Neyla Paola y Samuel.

A mis amigos que sin ellos difícilmente habría terminado este trabajo. A Melisa, Uri, Marco, Oscar, Tripp, Licha, Julio, Victor y Juan Manuel. Al grupo de trabajo de la cabrilla arenera quienes me aconsejaron y apoyaron durante la realización de la tesis. A aquellas personas que compartieron conmigo muchas experiencias gratas. A Malva, Mariana, Sandra, Sergio, Nicolás, Eduardo, Diana, Raúl, Norma, Arturo, Rosa, Karina, Isela, Luz Fabiola, Cocó, Giovanni, Chucho, Alberto, Cristina, Juan Pablo, Edith, Paulina, Cristian Liñan, Violeta, Noé, Jimmy, Cristian Vázquez, Fercho, Vero Auriolos, Verito, Leonardo, Estrella Karina, Flavio, Gabo, Charly, Josué, Mike, Fernando, Luis, Carmen, Mark, Manu, Roxanna, Rafa y tantos otros que por el momento no recuerdo pero saben que lo eventos que hemos pasado juntos serán muy gratos de recordar.

Deseo también dedicar esta tesis a Alfonso Alvarez, pues me enseñaste mucho y me encaminaste en la mala vida que es la investigación, cosa que nos encanta a muchos.

Por último y aunque quizás carezca de seriedad, deseo agradecer y dedicar esta tesis a la cabrilla arenera, cuyos logros le han permitido funcionar como modelo para el cultivo de otras especies de peces marinos, pese a las críticas y ataques. Este trabajo está dedicado a la cabrilla con la idea de lograr lo que esta y otras tesis sobre la cabrilla intentan: el cultivo comercial de la cabrilla arenera.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
GLOSARIO	V
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO	
Objetivos particulares	10
MATERIALES Y MÉTODOS	
Elaboración de las microcápsulas	11
Obtención y distribución de embriones	12
Cultivo larvario	13
Diseño experimental	15
Evaluación del crecimiento y supervivencia	16
Análisis químicos	
Calidad de las microcápsulas	
Producción de amonio por lixiviación de microcápsulas	16
Análisis de ácidos grasos	17
Maduración del tracto digestivo	
Actividad enzimática intestinal	19
Marcador de digestión extracelular	19
Marcador de digestión intracelular	20
Nivel de expresión de amilasa	22
Análisis estadístico	25

RESULTADOS

Calidad de las microcápsulas	
Tamaño de las microcápsulas	26
Producción de amonio por lixiviación	27
Análisis de ácidos grasos	27
Crecimiento en talla y peso	31
Supervivencia	33
Maduración del tracto digestivo	
Actividad enzimática intestinal	
Marcador de digestión extracelular	35
Marcador de digestión intracelular	36
Nivel de expresión de amilasa	37

DISCUSIÓN

Calidad de las microcápsulas	
Producción de amonio por lixiviación de microcápsulas	38
Análisis de ácidos grasos	39
Crecimiento en talla y peso	43
Supervivencia	47
Maduración del tracto digestivo	49

CONCLUSIONES 54

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS 55

BIBLIOGRAFÍA 56

RESUMEN

De los alimentos inertes que han sido propuestos para sustituir el suministro de presas vivas en los cultivos larvarios de peces marinos, los alimentos microencapsulados son los que mantienen mayor estabilidad y cohesión de sus ingredientes en el agua. Además, las microcápsulas pueden utilizar los ingredientes de su formulación para formar su membrana y facilitar su digestión. El presente trabajo pretende determinar los efectos de la alimentación con microcápsulas en el crecimiento y la supervivencia de larvas de cabrilla arenera. Los eleuteroembriones de cabrilla arenera fueron distribuidos en un sistema de circulación cerrada. Los primeros 12 días de cultivo se mantuvo una baja circulación de agua, por lo que se adicionó la microalga *Nannochloropsis oculata* (300,000 cel/ml). Las larvas fueron alimentadas con el rotífero *Brachionus plicatilis* (1-10 ind/ml) de los 2 a los 15 días después de la eclosión (dde). Como tratamiento testigo, se alimentó con nauplios de *Artemia* (2-6 ind/ml) a partir de los 15 dde. A esta edad, en otros dos tratamientos se realizó una sustitución de alimento vivo por 2 tipos de microcápsulas, suministradas en coalimentación con alimento vivo por cinco días. La formulación del primer tipo de microcápsulas (MCC) incluyó 49% de caseína y 31% de harina de calamar como fuentes proteicas, mientras que en la formulación del segundo tipo de microcápsulas (MCH) se sustituyó 50% del contenido de harina de calamar por hidrolizado de proteína de pescado. Cada cinco días se muestrearon diez individuos por tanque para la evaluación del crecimiento. La supervivencia fue determinada al final del experimento. El desarrollo del tracto digestivo fue determinado por la actividad de enzimas intestinales encargadas de la digestión intracelular (leucina alanina peptidasa) y de la digestión extracelular (fosfatasa alcalina y aminopeptidasa N), así como la cuantificación de mRNA codificante de amilasa mediante sondas Taqman®. Los tratamientos fueron probados por triplicado y los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba de normalidad y una de homogeneidad de varianza para realizar un ANOVA o un análisis de comparación por rangos de Kruskal Wallis. Los tratamientos con diferencias significativas fueron detectados por pruebas a posteriori de Tukey o Siegel y Castellan. El crecimiento en talla de las larvas alimentadas con presas vivas y MCC fue significativamente mayor ($p < 0.05$) durante los 15 dde a comparación de la talla de las larvas alimentadas con MCH. Durante los 20 dde la mayor talla se encontró en las lavas alimentadas con presas vivas. Para los 25 dde, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las tallas del tratamiento testigo y las MCH, los cuales resultaron ser mayores que las larvas alimentadas con MCC. En el crecimiento en peso solo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los 5 dde. La supervivencia obtenida de las larvas bajo el tratamiento testigo fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en el resto de los tratamientos y no fue encontrada una diferencia significativa entre los tratamientos con microcápsulas. La actividad enzimática intestinal de las larvas bajo el tratamiento testigo fue mayor que la actividad de las larvas alimentadas con microcápsulas. Solo en las larvas alimentadas con las MCC aumentó el nivel de expresión de amilasa de los 20 a los 25 dde. Los niveles de expresión fueron mayores en las larvas alimentadas con microcápsulas a los 25 dde. Los resultados mostraron que es necesario determinar la maduración del tracto digestivo para iniciar la sustitución de presas vivas por microcápsulas.

ABSTRACT

Among the inert feed used for the substitution of live prey supply for marine larviculture, the microencapsulated feeds have the highest stability in water. In addition, the microcapsules membrane can be made from the same ingredients used for the formulation. The present work pretend to determine the effects on growth and survival of spotted sandbass larvae fed microcapsules. The larvae were reared in a recirculating system. Microalgae *Nannochloropsis oculata* (300 000 cells/ml) was maintained during 12 days after hatching (dah). Larve were fed with rotifers *Brachionus plicatillis* (1-10 rotifers ml⁻¹) from 2 to 15 dah. From 15 dah, larvae were fed with *Artemia* nauplii and juveniles (2-6 nauplii ml⁻¹) as a control treatment. Larvae were cofed with both microcapsules and live prey during 5 days. Digestive tract development was determinated by the extracellular (alkaline phosphatase and aminopeptidase N) and intracellular (leucine-alanine peptidase) digestive enzymes activities, as well as the mRNA coding for amylase absolute quantification using Taqman® probes. Two types of microcapsules were supplied as experimental treatments from 15 dah. The first type included 49% of casein and 31% of squid meal as protein sources, while in the second type (MCH), 50% of the squid meal content was replaced by fish protein hydrolysate. Ten individuals per tank were sampled every 5 days for growth evaluation. Survival was determined at the end of the experiment. The treatments were tested in three replicates and analyzed by one-way ANOVA or with a Kruskal-Wallis's ranks comparison analysis. Significant differences were determined by a Tukey Siegel and Castellan multiple comparison of mean ranks. Size growth of larvae fed with live preys and MCC were significantly higher ($p < 0.05$) at 15 dah. Larvae fed with live preys shown the highest growth at 20 dah. Larvae fed with MCH and live prey were significant ($p < 0.05$) larger than the larvae fed with MCC. Weight growth only show significant difference ($p < 0.05$) at 5 dah on larvae fed with MCC. Survival from larvae fed live preys were significantly ($p < 0.05$) higher than the others treatments. No significant differences ($p < 0.05$) were found between microcapsules treatments. Extracellular digestive enzymes activities were higher at 25 dah, whereas the intracellular digestive enzymes displayed a greater activity at 22 dah. Enzymatic activities of larvae fed with live preys were higher than larvae fed with microcapsules. Only the live prey treatment displayed a higher activity of intracellular digestion enzymes at 25 dah than 22 dah. Only the larvae fed with MCC showed a raise in the quantities of mRNA coding for amylase from 20-25 dah. The quantification of mRNA coding for amylase from larvae fed with live preys were lower than larvae fed with microcapsules at 25 dah. Results showed the need of larval digestive tract maturation analysis for the successful substitution from live prey to microcapsules.

GLOSARIO

Agente emulsionante.- Solución de dos o más compuestos en el que un compuesto es diluido en otro por afinidad de acuerdo a su polaridad. En la polimerización interfacial se utiliza para incluir los compuestos miscibles dentro de la cápsula (Yúfera et al., 1996).

Agente Polimerizante.- Compuesto que permite la solidificación mediante una reacción química. En la microencapsulación es generalmente utilizado para la formación de la membrana (Yúfera et al., 1996).

Alimento inerte (alimento formulado; alimento preparado).- Es aquel material que se utiliza para nutrir. Los alimentos inertes para su consumo en cultivos se componen de distintos ingredientes sólidos y líquidos que pueden estar unidos por compuestos gelantes o por cubiertas de distintos orígenes (Lee, 2003).

Desaturación de ácidos grasos.- Proceso en el que una enzima desaturasa produce un enlace etilénico (dos carbonos) dentro de la cadena de un ácido graso (Tocher, 2003).

Dieta.- Régimen alimentario en el cual se encuentran sometidos los organismos heterótrofos. Una dieta consta de los distintos alimentos que un heterótrofo consumirá durante toda su vida (Pillay, 1980).

Digestión intracelular.- Durante el proceso digestivo, es la digestión que se realiza en el citoplasma del enterocito. Este tipo de digestión generalmente está relacionada con un tracto digestivo poco desarrollado (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Digestión extracelular.- Durante el proceso digestivo, es la digestión que se realiza en las microvellosidades del enterocito. Este tipo de digestión está relacionada con la digestión juvenil y adulta (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Eleuteroembrión.- Última fase del periodo embrionario que comprende la ontogenia de los peces. Comienza con la eclosión del embrión y termina antes de la completa absorción del saco vitelino y el glóbulo de aceite (Balon, 2002).

Elongación de ácidos grasos.- Proceso mediante el cual se adiciona un grupo acetil de dos carbonos a la cadena de un ácido graso (Sargent et al., 2002).

Enterocito.- Célula alta que se encuentra en el intestino, encargada de la digestión y absorción de nutrientes. Se caracteriza por ser una célula cilíndrica alta, con un núcleo grande y la membrana en la parte superior posee una serie de pliegues en forma de microvellosidades (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Fase dispersa.- En la microencapsulación por polimerización interfacial, la fase incluye a los ingredientes del alimento disueltos generalmente en Tris-HCl a pH básico (Yúfera et al., 1996).

Fase de dispersión.- En la microencapsulación por polimerización interfacial, la fase incluye un solvente que pueda ayudar a la reacción de polimerización (Yúfera et al., 1996).

Lixiviación.- Degradación de un alimento en sus diversos compuestos, principalmente por efecto ambiental. En los cultivos acuícolas, la lixiviación del alimento inerte es dada por la acción del agua (Lee, 2003).

Microcápsulas.- Pequeñas partículas que incluyen una mezcla o solución para alimento protegida dentro de una membrana (Langdon, 2003).

Microencapsulación.- Proceso en el cual se pueden incluir diversos compuestos dentro de una membrana para formar cápsulas de pequeño tamaño. La microencapsulación puede darse por solidificación de los compuestos de la membrana por cambio de temperatura o alguna reacción química (Langdon, 2003).

MUFA (Mono Unsaturated Fatty Acids).- Ácidos grasos monoinsaturados. Son los ácidos grasos que poseen solo un doble enlace entre los carbonos de su cadena. Los peces marinos tienen una capacidad moderada para la desaturación de algunos ácidos grasos (Sargent et al., 2003).

Ontogenia.- Serie de cambios morfofisiológicos que suceden durante todo el ciclo de vida de un individuo (Balon, 1984).

Polimerización interfacial.- Proceso de microencapsulación en el cual se utilizan las porciones proteicas y glucidas de los ingredientes del alimento para la elaboración de la membrana. Se basa en la reacción de dos solutos en fase líquida, los cuales pueden incluir núcleos hidrofóbicos e hidrofílicos (Chang et al, 1964; Fernandez-Díaz y Yúfera, 1995).

PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acids).- Ácidos Grasos Poliinsaturados. Son los ácidos grasos que poseen generalmente tres o más dobles ligaduras y su cadena posee 18 o más carbonos. Este tipo de ácidos grasos incluyen a los ácidos grasos que no pueden ser producidos por peces marinos (Sargent et al., 2003).

SAFA (Saturated Fatty Acids).- Ácidos grasos saturados. Son los ácidos grasos que no poseen algún doble enlace entre sus carbonos y el resto de sus enlaces se encuentran completos por protones. Los peces son capaces de producir estos ácidos grasos a partir de la acetil-CoA (Sargent et al., 2003).

Sistema cerrado.- Sistema de cultivo en el cual el agua fluye en un circuito y es reutilizada mediante el uso de diversos filtros. Aunque el agua es recirculada constantemente, generalmente es necesario un recambio del exterior del sistema (Holt, 1993).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Formulación usada para la fabricación de las microcápsulas.

Tabla 2. Densidades de microalga y presas vivas suministradas, así como peso de microcápsulas utilizadas para la alimentación de larvas de cabrilla arenera.

Tabla 3 Composición proteica y extracto etéreo del rotífero *Brachionus plicatilis* y de *Artemia* sp..

Tabla 4. Coeficientes de extinción molar para el cálculo de las unidades de actividad de las enzimas Fosfatasa alcalina (PAL) y Aminopeptidasa N (LAP).

Tabla 5. Concentraciones de los componentes equivalentes a una reacción de amplificación mediante el uso de la sonda TaqMan©.

Tabla 6.- Valores (promedio \pm desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el experimento.

Tabla 7. Talla (promedio \pm desviación estándar) del ancho menor de los dos tipos de microcápsulas antes y después de ser hidratadas en agua de mar.

Tabla 8. Concentración de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) (promedio \pm desviación estándar) contenido en los diversos alimentos utilizados en el cultivo de larvas de cabrilla arenera.

Tabla 9. Porcentajes de supervivencia de las larvas sometidas a los distintos tratamientos a los 25 dde.

Tabla 10. Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (mU Totales) obtenida de los extractos de cabrillas alimentadas con los tres distintos tratamientos.

Tabla 11. Actividad de la enzima aminopeptidasa N (mU Totales) obtenida de los extractos de cabrillas alimentadas con los tres distintos tratamientos.

Tabla 12. Actividad de la enzima leucina-alanina peptidasa (U Totales) obtenida de los extractos de cabrillas alimentadas con los tres distintos tratamientos.

Tabla 13. Nivel de expresión de la enzima amilasa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) obtenido a partir de la cuantificación de mRNA de extractos de larvas a los 20 y 25 días después de la eclosión (dde).

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Concentraciones de NH_4^+ producido a partir de cada tipo de microcápsula durante la prueba de lixiviación.

Fig. 2. Comportamiento del crecimiento en talla de las larvas alimentadas con presas vivas y con los dos tipos de microcápsulas

Fig. 3. Comportamiento del crecimiento en peso de lavas alimentadas con presas vivas y con los dos tipos de microcápsulas

Fig. 4. Número de individuos muertos (promedio \pm desviación estándar) bajo los distintos tratamientos desde el inicio del suministro de las microcápsulas hasta el final del experimento.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más frecuentes en los cultivos de peces marinos es la alimentación durante el periodo larvario (Watanabe y Kiron, 1994; Tucker, 1998; Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Langdon, 2003). Este problema ha sido minimizado con la utilización de zooplancton vivo como primer alimento. Sin embargo, las presas que tradicionalmente se utilizan para ello (como rotíferos y *Artemia*) presentan deficiencias en ácidos grasos altamente insaturados, principalmente de la serie n-3, por lo que deben ser enriquecidos con estos ácidos grasos mediante el uso de emulsiones comerciales. Una solución para este otro problema es la utilización de alimentos inertes que puedan ser adecuados a los requerimientos nutrimentales de las larvas que van a consumirlas (Watanabe y Kiron, 1994; Önal y Langdon, 2000; Tocher, 2002).

Tradicionalmente, los alimentos microparticulados han sido usados como sustitutos de presas vivas durante el cultivo de larvas de peces marinos, con los cuales han obtenido resultados aceptables de crecimiento y supervivencia. Sin embargo, este tipo de alimentos presenta una alta lixiviación de nutrimentos en el agua, disminuyendo así la calidad del agua dentro el sistema de cultivo y el aprovechamiento del alimento. (Önal y Langdon, 2000; Yúfera et al., 2000; Lee, 2003; Pedrozas-Islas et al., 2004; Wang et al., 2004).

La industria alimentaria ha resuelto en buena medida el problema de la pérdida de nutrimentos en el agua con el uso de las técnicas de microencapsulación, con lo que se logró estabilizar compuestos lábiles dentro del alimento. Dichas técnicas consisten en rodear los alimentos con una membrana que les permita mantenerlos unidos hasta que sean consumidos y digeridos por la especie en cultivo. Con esto, se ha logrado mantener gran parte de las características del alimento desde la formulación y elaboración hasta su consumo. Además, se ha logrado mantener dentro del cultivo una calidad del agua superior a la que se obtiene al utilizar otro tipo de alimentos inertes, como los alimentos microparticulados (Önal y Langdon, 2000; Lee, 2003; Bustos et al. 2003; Langdon, 2003; Pedroza-Islas et al. 2004).

Diferentes tipos de materiales han sido utilizados para formar la membrana de las microcápsulas. Algunos de ellos son los almidones, las maltodextrinas, los alginatos, los carragenanos y otros polisacáridos, las gomas de mezquite, goma arábica y de girasol, grenetina e incluso polímeros sintéticos como el nylon. Todos estos materiales han mostrado proveer gran estabilidad en el agua y resistencia de las microcápsulas a ser lixiviadas; sin embargo, algunas especies de larvas de peces marinas no poseen la capacidad para digerir o romper algunos de estos materiales (Langdon y Buchal, 1998; Langdon, 2003; Bustos et al. 2004). Sin embargo, existe una técnica de microencapsulación que utiliza los componentes proteínicos de la formulación para la formación de la membrana lo que facilita la digestión de las microcápsulas elaboradas, la microencapsulación por polimerización interfacial. (Jones et al., 1987; Yúfera et al., 2000; Langdon, 2003).

Básicamente, el método consiste en la producción inicial de una fina emulsión de una mezcla proteínica en una disolución acuosa (fase dispersa) en un líquido orgánico no miscible (fase de dispersión), para lo cual se usa emulgente. Una vez estabilizada la emulsión, las partículas se encuentran individualizadas, momento en el que es preciso formar una cubierta que les confiera mayor estabilidad. Esto se consigue con la adición de una pequeña cantidad de polimerizante (por ejemplo el Cloruro de Trimesoilo $C_9H_3Cl_3O_3$) que actúa enlazando radicales activos tanto de la proteína como de la de los polisacáridos presentes en la mezcla. De esta forma, los grupos amino y carboxilo de la proteína, así como los grupos hidroxilo de los carbohidratos, reaccionan con los grupos cloruro del agente polimerizante, formándose un polímero de membrana alrededor de las gotas emulsionadas (Chang et al., 1966; Jones et al., 1987).

A la par del desarrollo de técnicas adecuadas para la producción de un tipo de alimento inerte que sustituya el suministro de presas vivas, se desarrolló también el estudio del tracto digestivo de las distintas especies designadas para el cultivo. Diversos autores han observado una serie de patrones en la actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo de peces. Esto permitió determinar las características del tracto digestivo que se presentan entre los distintos

periodos de desarrollo de los peces (Zambonino-Infante et al. 1997; Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Applebaum y Holt, 2003).

Un patrón muy frecuente se observa en la expresión y actividad de enzimas como la amilasa. La amilasa es una de las carbohidrasas mas ampliamente distribuida en los peces marinos. Ella es producida en el páncreas y se encarga de la hidrólisis de los enlaces glucósidos α -1,4 del glicógeno. Su expresión es generalmente más alta durante el periodo embrionario y larvario que en el adulto. En los peces con estómago, la expresión de la amilasa decae conforme avanza el desarrollo del mismo. Es por ello que la expresión y actividad de la amilasa puede ser utilizada como indicadora de la madurez del tracto digestivo en peces con estómago (Kanazawa, 1995; Péres et al., 1996; Hidalgo et al., 1999; Douglas et al., 2000; Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Applebaum y Holt, 2003; Lunstedt et al., 2004).

Las enzimas intestinales también forman otro patrón de actividad que puede mostrar el desarrollo del tracto digestivo. Es posible determinar el grado de madurez de los enterocitos del intestino de acuerdo a la actividad enzimática que estos presentan (Lunstedt et al., 2004).

La actividad de enzimas citoplasmáticas como la leucina-alanina peptidasa es considerablemente más alta durante los periodos iniciales de vida. Dicha actividad disminuye conforme aumenta la actividad de enzimas que se encuentran en las microvellosidades de los enterocitos, las cuales son encargadas de la digestión externa. Por otro lado, la actividad de estas enzimas (como lo son la fosfatasa alcalina, glutamil transpeptidasa y aminopeptidasa) comienza desde las primeras fases de desarrollo a un nivel bajo y dicha actividad aumenta conforme se desarrolla el tracto digestivo (Zambonino-Infante et al. 1997; Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Applebaum y Holt, 2003; Lunstedt et al., 2004).

Una alta actividad de enzimas digestivas en las microvellosidades de los enterocitos representa la forma adulta de la digestión, lo que permite digerir distintos insumos de una mayor complejidad que no podrían ser digeridos tan fácilmente durante el periodo larvario (Kolkovski et al., 1997b; Zambonino-Infante et al. 1997; Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Lunstedt et al., 2004).

Todo lo anterior muestra la necesidad en los cultivos larvarios de peces marinos de un alimento estable en el agua, que cubra los requerimientos de las larvas en cultivo y logre sustituir el suministro de alimento vivo. Con ello se podrá evitar la dependencia de altas producciones de microalgas para alcanzar las concentraciones de alimento vivo necesarias para suministrar a las larvas en cultivo. Al mismo tiempo, el estudio de la expresión y actividad de enzimas digestivas permitirá determinar el momento adecuado para iniciar la sustitución del alimento vivo por microcápsulas durante el cultivo larvario de peces.

Por tal motivo, el presente trabajo pretende evaluar el uso de alimentos microencapsulados con membrana proteica como sustituto de presas vivas en la alimentación de larvas de cabrilla arenosa durante su cultivo. Así también, evaluar el efecto en la actividad y expresión de enzimas digestivas con el uso de alimentos microencapsulados.

ANTECEDENTES

Los intentos por sustituir el suministro de presas vivas por alimentos inertes durante el cultivo de larvas de peces marinas en condiciones experimentales, han mostrado diversos resultados en crecimiento y supervivencia. Características particulares de los alimentos inertes como la textura, el sabor, el color o el tamaño de la partícula han sido algunos de los factores que modifican estos resultados, pues cuando dichas características no son las adecuadas para las larvas, se altera la aceptación y digestibilidad del alimento (Önal y Langdon, 2000; Yúfera et al., 2000; Langdon, 2003; Pedrozas-Islas et al., 2004; Wang et al., 2004).

Particularmente para el cultivo de larvas de *Sparus aurata*, los trabajos sobre la alimentación exclusiva con micropartículas inertes han mostrado valores de supervivencia y crecimiento menores que cuando estas son suministradas en coalimentación con presas vivas (Koven et al. 2001). De la misma manera, trabajos como los de Kolkovski et al. (1997b) o Roselund et al. (1997) han mostrado la importancia de utilizar en conjunto alimentos microparticulados y presas vivas, pues los alimentos microparticulados presentan un alto nivel de lixiviación de aminoácidos. De este modo, las presas vivas pueden complementar los compuestos perdidos por la lixiviación de los alimentos microparticulados.

El problema de la pérdida de nutrimentos en el agua ha sido resuelto con el uso de las técnicas de microencapsulación, logrando con esto mantener gran parte de las características del alimento desde la formulación y elaboración hasta su consumo. Sin embargo, el tipo de material utilizado para la elaboración de la membrana puede dificultar la digestión de las microcápsulas (Önal y Langdon, 2000; Bustos et al. 2003; Langdon, 2003; Pedroza-Islas et al. 2004). Algunos ejemplos de esto son las experiencias de cultivos larvarios de especies como *Pagrus major* (Kanazawa et al., 1982) o *Solea solea* (Applebaum, 1985), en donde el uso de nylon en la membrana de las microcápsulas fue el factor que determinó la obtención de porcentajes de supervivencia de menos del 50%.

El uso del nylon en la membrana le brindó a las microcápsulas una alta estabilidad en el agua; sin embargo, su uso dificultó la digestión de las microcapsulas. Es a partir de las modificaciones realizadas por Jones et al. (1987) a la técnica de polimerización interfacial propuesta por Chang et al. (1964), que se elimina el uso de nylon en la membrana de cápsulas para la alimentación durante el cultivo de organismos marinos, así como de detergentes como TWEEN y Span que resultaban tóxicos.

Este nuevo tipo de microcápsulas poseía una membrana formada principalmente de proteína cuya fuente eran los ingredientes de la formulación. A partir de estas modificaciones se generaron las microcápsulas comerciales CAR (Crustacean Algal Replacement) y CD (Crustacean Diet; Frippak Feeds; INVE, Bélgica) que fueron utilizadas para la crianza larvaria de crustáceos por Jones et al. (1987). En dicho trabajo, se obtuvieron porcentajes de supervivencia similares cuando las microcápsulas sustituyeron a la *Artemia* en un 70% (81% de supervivencia) y cuando esta fue sustituida completamente por microcápsulas (80% de supervivencia). Walford et al. (1991) utilizaron las microcápsulas CD (Frippak Feeds; INVE, Bélgica) en un cultivo larvario de peces y observaron una mayor digestión de las microcápsulas por parte de larvas de *Lates calcarifer*, solo cuando estas eran aportadas después de cinco días de suministro de rotíferos, lo que les permitió obtener una supervivencia de 2.4% a los 14 dde.

Sin embargo, es con el uso de microcápsulas de membrana suave como las utilizadas por Yúfera et al. (2000) que pudo lograrse una supervivencia cercana al 70% cuando las microcápsulas eran suministradas después de las presas vivas. Además, con este tipo de microcápsulas también se logró igualar el crecimiento de larvas de *Sparus aurata* alimentadas con presas vivas.

De manera particular, existen trabajos que han permitido desarrollar la tecnología de cultivo a escala piloto de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

Respecto al cultivo larvario, Alvarez-González *et al.* (2001) plantearon un esquema de alimentación que utiliza de manera tradicional presas vivas como los rotíferos y *Artemia*, así como a copépodos de la especie *Pseudodiaptomus euryhalinus* e incluso eleuteroembriones de *P. maculatofasciatus*. Con este esquema de alimentación, los autores obtuvieron una supervivencia de 11.1% con una densidad de crianza de 50 eleuteroembriones/L.

Sin embargo, fue evidente la necesidad de disminuir el suministro de presas vivas, por lo que en trabajos como el de Anguas-Vélez *et al.* (2001) fueron realizados los primeros estudios sobre sustitución del alimento vivo por alimentos microparticulados. En dicho trabajo, se utilizaron alimentos microparticulados a los 25 y 30 días después de la eclosión, con lo que se obtuvo una supervivencia de alrededor del 2%. No obstante, el mayor crecimiento obtenido (27.4 ± 1.4 mm) fue registrado en las larvas alimentadas con presas vivas.

De manera similar, García-Gómez (2003) probó dos tiempos en el que debe de iniciar la sustitución del alimento vivo por alimentos microparticulados, a los 17 y 22 días después de la eclosión. Al inicio de la sustitución, se mantuvo una coalimentación por tres días, con lo que se obtuvo una supervivencia del 4%, cuando los microparticulados eran suministrados a partir de los 22 días después de la eclosión. Además, utilizó al hidrolizado de proteína de pescado, la harina de sangre de res y la harina de calamar como sustitutos parciales de la harina de sardina, en alimentos microparticulados.

Así también, Carrasco-Chávez (2004) encontró que con un nivel de 15% de lípidos en el alimento, se obtiene el mayor crecimiento en peso y longitud durante la preengorda de juveniles de cabrilla arenera. Además, observó que el aporte en ácidos grasos por parte de los rotíferos es principalmente en ácidos grasos

saturados, mientras que el aporte por parte de los nauplios de *Artemia* es de los ácidos 18:1 n7 y 18:1 n9.

Con respecto a la fisiología digestiva de la cabrilla arenera, Alvarez-González (2003) observó que durante los 12 a 15 días después de la eclosión, las larvas de cabrilla arenera poseen un juego enzimático completo en el tracto digestivo. Además, probó la digestibilidad *in vitro* de distintos ingredientes (como la harina de calamar y el hidrolizado de proteína de pescado) para su utilización en alimentos inertes durante el cultivo de larvas de cabrilla.

Así también, Peña *et al.* (2003) describieron el desarrollo del tracto digestivo de *Paralabrax maculatofasciatus* mediante técnicas histoquímicas, indicando que es posible suministrar alimentos inertes a las larvas alrededor de los 16 días después de la eclosión, una vez que las glándulas gástricas son evidentes y el tracto digestivo ya se ha diferenciado. Además, los autores consideran que a los 22 días después de la eclosión, las larvas presentan todas las características digestivas de un juvenil y por tanto el final del periodo larvario.

Una vez descrito el desarrollo del tracto digestivo de la cabrilla arenera, fue necesario determinar el efecto de alimentos inertes en la expresión y actividad de enzimas digestivas. Un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Gleaves-López (2005), quien observó el nivel más alto de expresión de la enzima lipasa en juveniles de cabrilla se detectó en una concentración de 15% de lípidos en el alimento, mientras que la mayor actividad de esta enzima se detectó en el nivel más bajo de lípidos en el alimento (5%). Al mismo tiempo, observó como la actividad de enzimas la tripsina o la proteasa alcalina es también mayor a un nivel bajo de lípidos en el alimento.

Por su parte, Olalde-Rodríguez (2005) observó el efecto en la expresión del gen de la amilasa durante el cultivo larvario de cabrilla arenera al incluir espermina en microcápsulas de membrana suave. Los resultados obtenidos en dicho trabajo mostraron que una mayor inclusión de espermina en el alimento permite un incremento en expresión de la enzima amilasa, mientras que en concentraciones bajas, la expresión se mantiene constante. No obstante, la adición de espermina en el alimento no promueve el crecimiento de las larvas que lo consumen. Este par de trabajos forman parte de las primeras experiencias de cuantificación en tiempo real del nivel de expresión de enzimas digestivas mediante la técnica de PCR en tiempo real, la cual fue utilizada en el presente trabajo.

HIPÓTESIS

Las microcápsulas elaboradas funcionarán como un sustituto adecuado de las presas vivas durante la crianza larvaria de la cabrilla arenera. De la misma manera, la madurez del tracto digestivo de las larvas determinará el momento en el cual comience la sustitución de las presas vivas por microcápsulas.

OBJETIVO

Evaluar la calidad de las microcápsulas utilizadas y determinar el efecto de la alimentación con dos tipos de microcápsulas en el crecimiento, la supervivencia y la madurez del tracto digestivo de larvas de cabrilla arenera.

Objetivos particulares

1. Elaborar alimentos microencapsulados para su uso en la crianza larvaria.
2. Evaluar la calidad de las microcápsulas mediante una prueba de lixiviación y el contenido en ácidos grasos.
3. Evaluar la supervivencia y el crecimiento de las larvas alimentadas con microcápsulas y con presas vivas.
4. Determinar la madurez del tracto digestivo mediante la cuantificación de la actividad enzimática intestinal en la digestión intra y extracelular, así como la cuantificación de mRNA codificante para amilasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de las microcápsulas

La elaboración de las microcápsulas fue realizada en el Laboratorio de Biología Aplicada perteneciente a la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería en Almería, España. Esta fue realizada mediante la técnica de polimerización interfacial, de acuerdo al método de microencapsulación propuesto en la patente UK GB 2040863 B (Hayworth, 1983), modificado por Yúfera et al. (1999).

Fueron formuladas dos tipos de microcápsulas en las que se varió el tipo y la cantidad de las fuentes de proteína. La formulación del primer tipo de microcápsula incluyó caseína en un 49% y la harina de calamar en 31% como fuentes principales de proteína. Por su parte, la formulación del segundo tipo de microcápsula incluyó hidrolizado de proteína de pescado como otra fuente de proteína, la cual sustituyó en 50% a la harina de calamar. La formulación completa de los dos tipos de microcápsulas se presenta en la Tabla 1. La composición en proteína cruda y extracto etéreo de los dos tipos de microcápsulas fue determinada en el Laboratorio de Análisis Químicos Proximales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (Tabla 1).

Tabla 1. Formulación usada para la fabricación de las microcápsulas. MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH = Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado.

Ingrediente	MCC (g)	MCH (g)
Caseína ^a	7.50	7.50
Harina de calamar ^b	4.80	2.40
Hidrolizado de Proteína de Pescado ^c	0.00	2.40
Lípidos y vitaminas liposolubles ^d	1.71	1.71
Dextrina ^a	0.75	0.75
Lecitina ^a	0.30	0.30
Premezcla de vitaminas ^e	0.13	0.13
Premezcla de minerales ^f	0.09	0.09
Vitamina Stay-C 35% ^g	0.02	0.02
Análisis químico		
Proteína (%)	59.05 ± 0.16	61.50 ± 0.31
Extracto Etéreo (%)	8.45 ± 0.07	7.12 ± 0.09

^a Sigma Co., Madrid, España; ^b Promotora Industrial Acuasistemas S.A. de C.V., México; ^c Norse fish powder, Norway; ^d Kurios, Libourne, Francia; ^e CIBNOR (mg/Kg de dieta): Vit. A (retinol), 0.6 (ICN); Vit. D3 (colecalfiferol), 0.0042 (SIGMA); Vit. E (tocoferol), 35 (SIGMA); Vit. K (menadiona), 7 (SIGMA); Vit. B₁ (tiamina), 0.7 (SIGMA); Vit. B₂ (riboflavina), 2.8 (SIGMA); Vit. B₆ (piridoxina), 2.1 (SIGMA); Ácido pentanoico, 14 (SIGMA); Niacina (ácido nicotínico), 7 (SIGMA); Biotina, 0.112 (ICN); Inositol, 210 (SIGMA); Vit. B12 (cianocobalamina), 0.014 (SIGMA); Ácido fólico, 0.7 (SIGMA); Vehículo harina de sorgo. ^f CIBNOR (g/kg de dieta; SIGMA): CaCl₂*5H₂O, 2.57; Na₂HPO₄, 5.72; MgSO₄*7H₂O, 1.49; FeSO₄*7H₂O, 0.18; ZnSO₄*7H₂O, 0.028; MnCl₂*4H₂O, 0.0096; CuSO₄*5H₂O, 0.0025; KI, 0.0003 mg; SeS₂, 0.42 mg. ^g ROVIMIX-ROCHE, Basel, Suecia.

Para la elaboración de las microcápsulas, se preparó al emulgente disolviendo lecitina en ciclohexano, mientras que el agente polimerizante fue preparado disolviendo cloruro de trimesoilo (cloruro de ácido 1,3,5-bencenotricarboxílico) en éter dietílico. Las fuentes proteícas (caseína, harina de clamar e hidrolizado de proteína de pescado) fueron disueltas en TRIS-HCl 0.2 M a un pH 9.0 (fase dispersa).

Se mantuvo en agitación 500 ml de ciclohexano a 900 rpm (fase de dispersión) en una plancha de agitación magnética y el emulgente fue posteriormente añadido y mezclado durante 8 minutos. Al término, se añadió la fase dispersa y se mantuvo en agitación por otros 8 minutos. Posteriormente, el agente polimerizante fue añadido y se mantuvo en agitación durante otros 8 minutos. Las microcápsulas formadas fueron decantadas y el exceso de ciclohexano fue eliminado. Posteriormente, se lavaron las microcápsulas por dos ocasiones con ciclohexano limpio y se dejaron en reposo durante 20 minutos después del último lavado. Finalmente se retiró todo el ciclohexano, lentamente fue añadiéndose 100 ml de una solución de grenetina al 15 % a las microcápsulas y la mezcla fue mantenida en agitación durante 5 minutos. Las microcápsulas obtenidas tras varios lavados con agua destilada fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente fueron liofilizadas. De este proceso, se obtuvieron aproximadamente 15 g de cada tipo de microcápsula.

El tamaño máximo de las microcápsulas hidratadas fue determinado con ayuda de un microscopio marca Olympus modelo SZ-ST (Olympus optics, Tokyo, Japón), una cámara Hitachi modelo KP-D50 Color (Hitachi America, Ltd., Brisbane, California, EUA) y del paquete ImagePro plus ver. 4 (Media Cybernetics, Maryland, EUA).

Obtención y distribución de embriones

Los embriones utilizados fueron obtenidos a partir de un desove espontáneo de reproductores de cabrilla arenera mantenidos en el Sistema Cerrado de Inducción al Desove dentro del Laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN, mediante el método propuesto por Rosales-Velázquez (1997). Se incubaron durante 24 horas alrededor de 396,000 embriones en dos tolvas cilíndricas de fondo cónico

con capacidad de 100 l con agua de mar a una temperatura de 25 ± 0.8 °C, una salinidad de 35 ± 0.7 ‰ y una aireación moderada. Fueron tomadas muestras de 1 ml de embriones (alrededor de 1,800 embriones) para la determinación del porcentaje de eclosión y el desove elegido fue aquel que presentó un porcentaje mayor a 90%.

El sistema de cultivo (SC-18) empleado consta de 18 tanques de fibra de vidrio de fondo plano con capacidad de 140 l cada uno, una bomba marca PerformancePro serie Artesian modelo A1/8-35-C de 1/8 de HP, un espumador de albúminas marca Euroreef con una bomba sumergible marca Sedra modelo KSP 5000, un filtro de luz ultravioleta de cuatro lámparas marca Tropical Marine Centre modelo PM6, una columna de lodos activados marca Sea Storm, un filtro mecánico de arena marca PAC-FAB modelo Triton II (Pentair Inc., Golden Valley, Minnesota, EUA) y un reservorio de agua construido con fibra de vidrio con 700 l de capacidad. Se eligieron aleatoriamente nueve tanques del SC-18 para realizar el cultivo larvario y en cada uno de ellos, fue utilizada una densidad de siembra de 37 eleuteroembriones/ml.

Cultivo larvario

La Tabla 2 muestra el protocolo de alimentación empleado durante el experimento, el cual es una modificación del esquema propuesto por Alvarez-González et al. (2001) y es explicado de la siguiente manera. Los primeros 12 días de cultivo se mantuvo un bajo porcentaje de recambio de agua, por lo que se adicionó la microalga *Nannochloropsis oculata* para mantener la calidad del agua. Las larvas fueron alimentadas inicialmente con el rotífero *Brachionus plicatilis* sin enriquecer a los 2 y 3 días después de la eclosión (dde). A partir de los 4 dde, los rotíferos fueron enriquecidos durante seis horas con la emulsión comercial RATIO HUFA® (Salt Creek, Inc., Salt Lake City, Utah, EUA) suministrándolos de esta forma hasta los 16 dde. Adicionalmente, durante los 15 y 16 dde se suministraron nauplios de *Artemia* sp. sin enriquecer (NEPTUNE INDUSTRIES, Salt Lake City, UTA, EUA). A partir de los 17 dde los nauplios de *Artemia* fueron enriquecidos por seis horas con la misma emulsión utilizada para los rotíferos. A partir de los 22 dde fueron

suministrados juveniles de *Artemia* mantenidos con Jade Spirulina® (Salt Creek, Inc., Salt Lake City, UTA, EUA).

La ración diaria de rotíferos o nauplios de *Artemia* fue dividida en tres porciones de 20, 40 y 40%. La primera porción (20%) fue suministrada sin enriquecer a las 10:00 horas, momento en el cual comenzó el enriquecimiento de la siguiente porción (40%) que fue suministrada a las 16:00 horas. El enriquecimiento de la última porción (40%) comenzó a las 12:00 horas y tal porción fue suministrada a las 18:00 horas. El suministro de juveniles de *Artemia* fue realizado en las mismas horas, aun cuando estos no fueron enriquecidos.

Tabla 2. Densidades de microalga y presas vivas suministradas, así como peso de microcápsulas utilizadas para la alimentación de larvas de cabrilla arenera. s= presas sin enriquecer; e= presas enriquecidas con la emulsión RATIO HUFA©.

Días después de la eclosión	Microalga <i>N. oculata</i> (cell/ml)	Rotíferos/ml <i>(B. plicatilis)</i>	<i>Artemia</i> sp. (nauplios/ml)	<i>Artemia</i> sp. (Juveniles/ml)
1	1208400			
2	1208400	2 s		
3	1208400	2 s		
4	1208400	4 e		
5	1208400	4 e		
6	1208400	2 e		
7	1208400	2 e		
8	1208400	2 e		
9	1208400	1 e		
10	1208400	2 e		
11	1208400	3 e		
12	1208400	3 e		
13		3 e		
14		3 e		
15		2 e	2 s	
16		2 e	2 s	
17			2 e	
18			2 e	
19			3 e	
20			3 e	
21			4 e	
22			5 e	0.2 s
23			6 e	0.3 s
24			4 e	0.4 s
25			2 e	0.5 s

Durante el transcurso del experimento, la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura y la salinidad fueron registradas dentro del SC-18 con ayuda de un equipo marca YSI modelo 556 MPS (YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio, EUA). De la misma manera, se registraron las concentraciones de amonio y nitritos disueltos en agua por medio del método propuesto por Strickland y Parson (1972) con ayuda de un espectrofotómetro marca Spectronic modelo Genesys II (Termo Electron Co., Whatman, EUA).

Diseño experimental

Se realizó una sustitución del suministro de presas vivas por microcápsulas de membrana proteica a los 15 dde. A partir de ese día fue mantenida una coalimentación con presas vivas durante 5 días manteniendo las proporciones 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100 (presas vivas/microcápsulas). Las microcápsulas fueron hidratadas en agua de mar durante 15 minutos, antes de ser suministradas durante las mismas sesiones de alimentación que en el suministro de presas vivas y manteniendo las mismas porciones de ración diaria. La cantidad (g) de microcápsulas suministradas fue determinada de acuerdo a la cantidad necesaria para igualar el contenido de extracto etéreo de las microcápsulas con el de las presas vivas utilizadas, manteniendo la relación en peso seco.

La Tabla 3 muestra el porcentaje de proteína y extracto etéreo de las presas utilizadas como alimento durante la crianza larvaria de la cabrilla arenera.

Tabla 3. Composición de proteína cruda y extracto etéreo del rotífero *Brachionus plicatilis* y de *Artemia* sp.

	Proteína (%)	Extracto etéreo (%)
Rotífero	52.99 ± 0.11	13.69 ± 0.08
<i>Artemia</i> *	50	19

*Valores mínimos según fabricante.

Adicionalmente, se mantuvo un tratamiento control en el cual se continuó el suministro de presas vivas. Cada tratamiento experimental y el tratamiento control fueron distribuidos aleatoriamente por triplicado en el SC-18.

Evaluación del crecimiento y supervivencia

Cada 5 días a partir del inicio del experimento fue tomada una muestra de diez individuos de cada uno de los tanques del SC-18. Posteriormente, fueron anestesiados con metil sulfonato de triacaína (MS-222) para ser analizados en un digitalizador de imágenes con ayuda de un microscopio marca Olympus modelo SZ-ST (Olympus optics, Tokyo, Japón), una cámara Hitachi modelo KP-D50 Color (Hitachi America, Ltd., Brisbane, California, EUA) y del paquete ImagePro plus ver. 4 (Media Cybernetics, Maryland, EUA). Se registró el crecimiento en talla de las larvas con ayuda del paquete SigmaScan Pro ver. 5 (Spss, Chicago, Illinois, EUA). El peso húmedo de las larvas fue determinado con ayuda de una balanza analítica modelo Adventurer (Ohaus, Pine Brook, Nueva Jersey, EUA).

Fue registrado el número de peces muertos diariamente a partir del inicio de la sustitución de alimento vivo por las microcápsulas. La supervivencia total (ST) fue calculada como:

donde:

$$ST = \frac{JC}{ES} \times 100$$

JC = Juveniles cosechados al final del experimento.

ES = Eleuteroembriones sembrados al inicio del experimento.

Análisis químicos

Calidad de las microcápsulas

Producción de amonio por lixiviación de microcápsulas

Para determinar la estabilidad de las microcápsulas en el agua de mar, se llevó a cabo la cuantificación del amonio producido por su lixiviación, utilizando 100 mg de cada tipo de microcápsula. Dicha cantidad fue colocada por separado en pequeñas porciones envueltas en una de malla con una luz de 300 μ m. Las porciones fueron colocadas en vasos de precipitado con agua de mar filtrada y mantenida a temperatura ambiente. Con el fin de determinar la cantidad de amonio producido por la lixiviación de las microcápsulas, fueron tomadas cuatro muestras de agua, una al inicio y 3 más cada 10 minutos. La cuantificación de amonio disuelto en agua fue realizada por medio de un espectrofotómetro mediante el método propuesto por Strickland y Parson (1972).

Análisis de ácidos grasos

Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizaron tres procedimientos: la extracción de lípidos totales, la metilación de ácidos grasos y la identificación por cromatografía de gases.

La extracción de los lípidos totales fue realizada por medio del método de Bligh y Dyer (1959) modificado para el tipo y cantidad de muestra utilizada en el presente trabajo. De esta manera, el método utilizó una cantidad de alrededor de 100 mg de muestra liofilizada que fue colocada en un tubo de centrífuga de 10 ml y al que se le agregaron 3 ml de una mezcla de cloroformo metanol (1:2 v/v). Posteriormente, la muestra dentro del tubo fue sometida a ultrasonido con ayuda de un sonicador marca Bransonic modelo 3510-DHT (Branson Ultrasonic Corp., Danbury, Connecticut, EUA) durante 15 minutos y fue colocada en reposo a 5° C durante una noche. La muestra en reposo fue cubierta con papel aluminio y sellada con cinta de teflón hasta su procesamiento. Al término del reposo, se realizó una segunda sonicación en baño de agua fría.

Posterior a la sonicación, el tubo con la muestra fue centrifugado a 3000 rpm y 5° C con ayuda de una centrífuga marca Beckman modelo 349702 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, EUA) durante 5 minutos. Posteriormente, fue recuperada la fase líquida con ayuda de una pipeta Pasteur y filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio y aproximadamente 500 mg de cloruro de potasio dentro de una pipeta Pasteur. Este proceso fue repetido por dos ocasiones. A la fase líquida obtenida de cada centrifugación le fueron agregados 3 ml de agua destilada para mantener una proporción cloroformo:metanol:agua de 2:2:1.8.

La mezcla fue homogeneizada en un agitador tipo vortex marca Baxter, modelo S8229-1 (VWR Internacional, West Chester, Pennsylvania, EUA) para posteriormente ser centrifugada a 3000 rpm y 5 °C durante 5 minutos. Fue extraída la fase con cloroformo que contenía los lípidos. Esta fase fue concentrada con ayuda de nitrógeno gaseoso. El concentrado de lípidos fue transferido a un vial de 2 ml sellado con cinta de teflón y de peso conocido. Fue determinado el contenido de

lípidos totales de cada muestra por gravimetría con ayuda de una balanza analítica marca Mettler-Toledo modelo AG245 (Mettler-Toledo GMBH, Greifensee, Suiza) con una precisión de 0.0001 g.

La obtención de esteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se llevó a cabo por medio del método propuesto por Sato y Murata (1988). Para ello, se agregaron al recipiente con extracto de lípidos de cada muestra 2.5 ml de una solución 2.5% (p/p) de ácido clorhídrico en metanol anhidrico. Posteriormente fue calentado en baño maría por 2.5 h a 85° C. Al término de las dos horas y media, se dejó reposar y enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente les fueron agregados 2.5 ml de hexano, los cuales fueron mezclados con ayuda de un agitador tipo vortex y se dejó reposar por 5 minutos. La fase superior formada al término de ese lapso fue transportada a un vial limpio y de peso conocido. La fase inferior, fue lavada con hexano por dos ocasiones y finalmente le fueron agregados 5 ml de agua destilada al remanente de la fase inferior para terminar en un último lavado con hexano. El solvente utilizado fue evaporado con nitrógeno gaseoso.

La identificación de los FAME obtenidos por el método anterior se realizó con ayuda de un cromatógrafo de gas-líquido acoplado a un espectrómetro de masas GC-MS modelo 1800b (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, California, EUA). Fue utilizada una columna capilar de sílice fundido empacado con una película de 2-polietilenglicol como fase estacionaria marca Supelco No. 2-4136 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, EUA) con dimensiones de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 μm de espesor interior. Las velocidades elegidas para el incremento de temperatura fueron los siguientes: 30 °C/minuto para la primera rampa de 110 a 165 °C durante 3 minutos y 2 °C/minuto para la segunda rampa de 165 a 220 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se mantuvo durante 16 minutos a una temperatura de 220 °C.

Fue utilizado Helio como gas acarreador a un flujo de 0.9 ml/minuto y a una temperatura de 110 °C. La temperatura de inyección y la temperatura de detección fueron de 250 °C.

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó con la comparación de espectros de masas con los espectros contenidos en las bases de datos NBS75K y NIST98 con ayuda del paquete HP Chemstation ver. B.02.04 (Hewlett-Packard, Co., Palo Alto, California, EUA). Fue utilizado un estándar de ácidos grasos de fuente marina PUFA-1 marca SUPELCO No. 4-7033 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, EUA).

Maduración del tracto digestivo

Actividad enzimática intestinal

Se realizó la cuantificación de la actividad de las enzimas intestinales para determinar la maduración del tracto digestivo de cabrillas a los 22 y 25 dde. Para este fin, las muestras de cuerpo completo de cabrillas de 22 y 25 días fueron colocadas en tubos de microcentrifuga a los que les fueron agregados 4 volúmenes de una solución TRIS-HCl 50 mM a pH 7.5. Las muestras fueron homogeneizadas con ayuda de un disruptor de tejidos marca Polytron modelo PT 2100 (Brinkmann, Westbury, Nueva York, EUA) por lapsos de 15 segundos. Los tubos de microcentrifuga fueron colocados en hielo durante la homogenización para evitar la degradación enzimática. Posteriormente, los homogeneizados fueron centrifugados en una microcentrífuga marca Eppendorf (Brinkmann, Westbury, Nueva York, EUA) a 14,000 rpm y una temperatura de 5°C durante 8 minutos. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación fue utilizado para la medición de la actividad enzimática intestinal.

Marcador de digestión extracelular

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (PAL) fue determinada por medio del método propuesto por Bessey y Lowry (1946). En tal método, se utilizaron 100 ml de solución amortiguadora de Na_2CO_3 30 mM a pH 9.8 con 10.15 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 92.5 mg de fosfato p-nitrofenil como sustrato (concentración final 20 mM). Se realizó la lectura del cambio de absorbancia por minuto a 407 nm con ayuda de un espectrofotómetro marca Jenway utilizando 2.5 ml de sustrato con el volumen de homogeneizado necesario para mostrar actividad en la curva cinética.

Las unidades de actividad de la enzima se determinaron de la siguiente manera:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\text{Absorb}_{\text{muestra}}}{\text{Coef.}} \times \frac{2.5}{1000} \times \frac{1000}{x}$$

Donde:

Absorb_{muestra} = absorbancia de la muestra a 407nm

X = µl de extracto homogeneizado utilizado

Coef.= coeficiente de extinción molar para la determinación de actividad de PAL

La actividad de la enzima aminopeptidasa N (LAP) fue determinada por medio del método propuesto por Maraoux *et al.* (1973). Se utilizaron 2.45 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 80 mM a pH 7 con 50 µl de L-leucina p-nitroanilida 0.1 M en DMSO (dimetil sulfóxido) como sustrato. A la mezcla anterior se le agregó la cantidad de homogeneizado necesario para mostrar actividad en la curva cinética a una longitud de onda de 410 nm.

Las unidades de actividad enzimática de LAP se determinó de la misma manera que con la actividad de PAL. La Tabla 4 muestra el coeficiente de extinción molar utilizado para determinar la actividad de ambas enzimas de digestión extracelular, de acuerdo al volumen de homogeneizado.

Tabla 4. Coeficientes de extinción molar para el cálculo de las unidades de actividad de las enzimas Fosfatasa alcalina (PAL) y Aminopeptidasa N (LAP).

Volumen de homogeneizado (µl)	PAL	LAP
20	6.8313	15.3685
50	2.7869	6.2190
100	1.4208	3.1702
200	-	1.6463

Marcador de digestión intracelular

La actividad de la enzima leucina-alanina peptidasa (LEAP) fue cuantificada utilizando el método propuesto por Nicholson y Kim (1975). Tal método utiliza el reactivo LAOR que consta de 90 mg de L-aminooxidasa (0.4 mM; 0.90 mg/ml), 2 mg de peroxidasa de nabo (0.5 µM; 0.02 mg/ml), 10 mg de o-dianisidina (40 mM; 0.1 mg/ml), todo disuelto en 100 ml de TRIS-HCl 50 mM a pH 8.

Para distinguir la actividad de esta enzima de la actividad de las enzimas de las microvellosidades (de digestión extracelular), se contrastó la lectura con un reactivo que incluye un inhibidor de enzimas citoplasmáticas (PHMB, ácido p-hidroximercuribencénico) que es preparado agregando 275 mg de PHMB (0.5 mM) a una segunda mezcla de reacción del reactivo LAOR. En el ensayo se utilizó 0.5 ml de una solución 0.01 M de leucina-alanina como sustrato con 1 ml del reactivo LAOR y 0.025 ml de extracto enzimático. Dicha mezcla fue incubada durante 20 minutos a 37 °C para posteriormente agregar 0.74 ml de ácido sulfúrico al 50%. Fue realizada una lectura en espectrofotómetro a 530 nm contra un blanco de reactivo (LAOR, TRIS-HCl 50 mM pH 8.25 µl de agua destilada y ácido sulfúrico).

El cálculo de la actividad necesita de una corrección a partir de la pendiente de una curva estándar de concentraciones conocidas. Dicha curva fue elaborada con diluciones seriadas de una solución estándar de sustrato 0.2 mM en TRIS-HCl 50mM a pH 8. Las concentraciones de los estándares fueron 100, 80, 60, 40 y 20 nmoles. La reacción se realizó de la misma manera que en el ensayo, utilizando 0.5 ml de cada estándar como sustrato y sustituyendo los 0.025 ml de extracto por agua destilada.

Las unidades de actividad de la enzima se determinaron de la siguiente manera:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\text{Absorb}_{\text{muestra}}}{\text{Pendiente}} \times \frac{1}{t} \times 40 = \frac{\text{Absorb}_{\text{muestra}}}{\text{Pendiente}} \times 2$$

Donde:
Absorb_{muestra} = absorbancia de la muestra a 530 nm
Pendiente = pendiente obtenida de la curva de diluciones seriadas
t = tiempo de incubación (20 minutos)

La U de actividad enzimática se considera como la cantidad de µmoles de sustrato hidrolizado por minuto. La cuantificación de la actividad de las enzimas de digestión interna y externa se determinó en mU totales, para lo cual fue necesaria la conversión de U/ml a U/mg. Esto es logrado al multiplicar las U/ml por la cantidad de proteína soluble de los homogeneizados obtenida a través del método propuesto por Bradford (1976). Las U totales de la actividad enzimática son obtenidas al multiplicar las U/mg por el volumen de extracto utilizado. Las mU totales son la milésima parte de una U total de actividad enzimática.

Nivel de expresión de amilasa

El nivel de expresión de amilasa en larvas fue determinado a partir de la cuantificación de mRNA del segmento genómico que codifica dicha enzima. Con este fin, fue extraído el RNA total de cabrillas a los 20 y 25 dde alimentadas con los dos tipos de microcápsulas y con presas vivas.

Se eligió el método de cuantificación de mRNA codificante de amilasa, debido a que de esta manera solo se incluyen los segmentos genómicos que van a expresarse, logrando obtener una mejor aproximación de la cantidad de enzima que va a sintetizarse.

La extracción de RNA total se realizó siguiendo el protocolo del reactivo Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EUA). Para realizar la extracción, fue agregado 1 ml del reactivo Trizol a aproximadamente 100 mg de muestra, la cual fue homogeneizada con ayuda de un disruptor de tejidos (marca Polytron modelo PT 2100, Brinkmann, Westbury, Nueva York, EUA) durante 15 segundos. El homogeneizado fue incubado a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteína. Posteriormente les fueron agregados 0.2 ml de cloroformo y los homogeneizados fueron agitados manualmente durante 15 segundos para posteriormente incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Los homogeneizados fueron centrifugados a 12,000 y a 5° C durante 15 minutos. Al término de la centrifugación, fue extraída la fase acuosa y fue transferida a un tubo de microcentrífuga estéril. Posteriormente fueron agregados 0.5 ml de alcohol isopropílico, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego de los cuales se centrifugó a 12,000 g y 5° C durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue retirado y el sedimento fue lavado con 1 ml de etanol, agitado ligeramente en un agitador tipo vortex y centrifugado a 7,500 g y 5° C durante 5 minutos. Finalmente, el sedimento fue secado a temperatura ambiente y almacenado a -80° C.

El RNA total extraído fue transcrito a DNA complementario (cDNA) utilizando la enzima transcriptasa inversa ImProm-II™ (Promega Corporation, Madison,

Wisconsin, EUA). Para ello, fueron colocados 5 μ l de la solución de RNA total (1 μ g/ μ l) en un tubo de microcentrífuga, el cual fue mezclado con 1 μ l del oligonucleótido (dT)₁₅ a una concentración de 0.5 μ g/ μ l, para posteriormente calentar la mezcla a 70° C durante 10 minutos. Al mismo tiempo, se elaboró la mezcla de la transcripción inversa que incluyó 5 μ l de agua destilada estéril tratada con el inhibidor de ribonucleasas dietilpircarbonato (DEPC), 4 μ l de la solución amortiguadora para ImProm-II™, 2.4 μ l de una solución 25 mM de MgCl₂, 1 μ l de una mezcla 10 mM de desoxiribonucleótidos (dNTP), 0.5 μ l del inhibidor de ribonucleasas RNasin® y 0.8 μ l de la enzima transcriptasa inversa ImProm-II™.

La mezcla de la transcripción inversa fue agregada a la mezcla de RNA y ambas fueron incubadas a temperatura ambiente (alrededor de 25° C) durante 10 minutos. Al finalizar la incubación, las mezclas fueron mantenidas a 45° C durante 60 minutos. Finalmente, las mezclas fueron mantenidas a 90° C durante 5 minutos para posteriormente colocarse en hielo. La concentración de cDNA fue obtenida con ayuda de un biofotómetro marca Eppendorf (Brinkmann, Westbury, Nueva York, EUA).

La cuantificación del mRNA codificante de amilasa se llevó a cabo utilizando la sonda Custom TaqMan© para expresión genómica (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) obtenida de la secuencia parcial de α -amilasa de *Paralabrax maculatofasciatus* obtenida del Genbank (No. Acc. AY846884). La secuencia del segmento 18s eucariótico No. cat. 4319413E (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) fue utilizada como control de expresión.

La Tabla 5 muestra las concentraciones y reactivos utilizados en la realización del ensayo de cuantificación de mRNA. Los reactivos fueron agregados a tubos de microcentrífuga de 2 ml para ser ligeramente homogeneizados con ayuda de un agitador tipo vortex. Las mezclas de los reactivos para cada muestra fueron vertidas por triplicado a una placa de 96 pozos marca ABI PRISM™ (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) con ayuda de una pipeta automática marca Eppendorf serie 2100 de 10-100 μ l de volumen (Brinkmann, Westbury, Nueva York, EUA). Se

incluyó un control de reactivo sin muestra de cDNA (NTC) por cada placa utilizada y para el gen de control y el gen problema. La placa fue cubierta con una película transparente no reflejante para placas PCR (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA).

Tabla 5. Concentraciones de los componentes equivalentes a una reacción de amplificación mediante el uso de la sonda TaqMan®.

Componente de la reacción	Volumen por muestra (µl)
Mezcla maestra universal para PCR TaqMan®	6.25
Sonda TaqMan® (2.5 µM)	0.75
Muestra de cDNA	1.00
Agua grado biología molecular (tratada con DEPC)	4.5
Total	12.5

La cuantificación fue realizada con ayuda de un sistema detector de secuencias marca ABI PRISM™ modelo 7000 (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) con las siguientes condiciones de amplificación: 10 minutos de activación a 95 °C, 15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 1 minuto de alineación y extensión a 60 °C repitiéndose por 55 ocasiones.

El nivel de expresión de amilasa se determinó de acuerdo a la cuantificación relativa de los productos de amplificación. Para ello, se realizó la diferencia entre los valores de **Ct** de las secuencias de amilasa y el gen 18s eucariótico para cada uno de los tratamientos. Estas diferencias se realizaron de la siguiente manera:

Donde:

$$\Delta Ct = Ct_{amilasa} - Ct_{18s}$$

Ct.- (Threshold Cycle). Se refiere al número de ciclos en el que la señal de amplificación muestra el inicio del crecimiento exponencial de los productos de amplificación.

Los valores de ΔCt de cada tratamiento fueron ajustados por los valores de **Ct** de un tejido calibrador. En el caso del presente trabajo, fueron elegidos embriones de cabrilla arenera como tejido calibrador. Dichos ajustes fueron realizados de la siguiente manera:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tratamientos} - Ct_{calibrador}$$

Por último, el cálculo del nivel de expresión se realizó de la siguiente manera:

$$\mathbf{N.E.} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se probó la normalidad por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, así como la homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Barlett, con ayuda del paquete estadístico STATISTICA ver. 6.1 (Statsoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Cuando no fue posible cumplir los supuestos para realizar un ANOVA, se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. En los casos que presentaron diferencias significativas, se utilizó el análisis de comparación múltiple paramétrico de Tukey o el análisis de comparación múltiple por rangos de Siegel y Castellan. Fue utilizado el valor de $\alpha = 0.05$ como nivel de confianza.

RESULTADOS

La Tabla 6 muestra los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el experimento.

Tabla 6.- Valores (promedio \pm desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el experimento.

Parámetro	Valor
Oxígeno	5.85 \pm 0.75 mg O ₂ /l
Temperatura	23.46 \pm 0.31 °C
Salinidad	35.79 \pm 0.83 ‰
Amonio	0.31 \pm 0.13 μ g NH ₄ ⁺ /l
Nitritos	0.62 \pm 0.32 μ g NO ₂ ⁻ /l

Calidad de las microcápsulas

Tamaño de las microcápsulas

La Tabla 7 muestra el tamaño de los dos tipos de microcápsulas antes y después de ser hidratadas en agua de mar. No se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las tallas de los dos tipos de microcápsulas y entre los distintos tiempos de hidratación. Se consideró como talla máxima la obtenida a partir de los 15 minutos, al no encontrarse diferencias significativas con la talla obtenida a los 30 minutos de hidratación.

Tabla 7. Talla (promedio \pm desviación estándar) del ancho menor de los dos tipos de microcápsulas antes y después de ser hidratadas en agua de mar. MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado.

Tiempo de hidratación (minutos)	MCC (μ m)	MCH (μ m)
0	407.011 \pm 150.63	315.028 \pm 96.47
15	550.172 \pm 133.43	436.954 \pm 127.70
30	584.265 \pm 148.33	515.996 \pm 149.49

Producción de amonio por lixiviación

En la Fig. 1 se observan las tendencias de la concentración de amonio durante la prueba de lixiviación de cada tipo de microcápsula. En ella se puede observar como no existe una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la concentración de amonio producido por lixiviación de las microcápsulas durante los 10 minutos de inclusión en el agua de mar.

A los 20 minutos de inclusión, la lixiviación de las microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado (MCH) produce una concentración de amonio significativamente menor ($p > 0.05$) que las microcápsulas con harina de calamar (MCC). La diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración de amonio producido entre los dos tipos de microcápsulas se mantiene hasta los 30 minutos de inclusión en el agua.

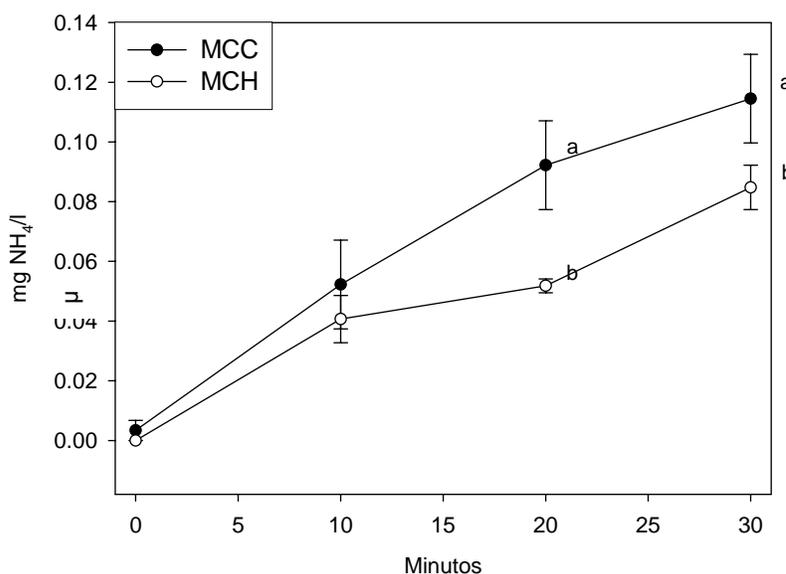


Fig.1. Concentraciones de NH_4^+ producido a partir de cada tipo de microcápsula durante la prueba de lixiviación. MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado. Literales distintas demuestran una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Análisis de ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de muestra en base seca) de cada una de las microcápsulas, así como el de las presas vivas utilizadas en la alimentación de larvas de cabrilla se presenta en la Tabla 8. En ella puede observarse como los

Tabla 8. Concentración de ácidos grasos (promedio µg/mg ± desviación estándar) contenido en los alimentos utilizados en el cultivo larvario de cabrilla atenera. EMUL = Emulsión lipídica (RATIO HUFA ®); Art S= Nauplios de *Artemia* sin enriquecer; Art E= Nauplios de *Artemia* enriquecidos; Rot S= Rotíferos sin enriquecer; Rot E= Rotíferos enriquecidos; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado. nd= no detectable. Literales distintas demuestran una diferencia significativa para cada ácido graso (p<0.05)

Ácido graso	EMUL	Rot S	Rot E	ART S	ART E	MCC	MCH
14:0	11.58±1.02	1.06±0.29 ^{ab}	1.91±0.17 ^{ab}	0.77±0.18 ^a	1.96±0.42 ^{ab}	4.42±2.69 ^b	3.64±0.51 ^{ab}
15:0	2.79±0.25	0.28±0.12 ^a	0.42±0.10 ^a	0.27±0.01 ^a	0.38±0.09 ^a	0.36±0.21 ^a	0.29±0.04 ^a
16:0	53.78±4.08	9.87±2.53 ^a	13.41±0.97 ^a	9.74±1.61 ^a	12.70±2.83 ^a	14.12±8.94 ^a	11.36±1.67 ^a
17:0	3.29±0.07	0.19±0.09 ^a	0.51±0.08 ^b	0.45±0.10 ^{ab}	0.24±0.03 ^{ab}	0.36±0.25 ^{ab}	0.23±0.04 ^a
18:0	14.98±1.19	1.77±0.31 ^a	3.16±0.16 ^a	2.76±0.44 ^a	2.64±0.61 ^a	3.68±2.36 ^a	2.78±0.46 ^a
19:0	0.73±0.14	0.69±1.04 ^a	0.11±0.02 ^a	0.89±0.13 ^a	0.07±0.02 ^a	0.09±0.06 ^a	0.06±0.01 ^a
20:0	0.84±0.12	0.09±0.03 ^a	0.16±0.04 ^a	0.05±0.00 ^a	0.12±0.03 ^a	0.25±0.16 ^a	0.15±0.02 ^a
22:0	1.41±0.15	0.14±0.02 ^a	0.27±0.07 ^a	0.57±0.21 ^a	0.16±0.04 ^a	0.38±0.24 ^a	0.24±0.03 ^a
24:0	nd	0.56±0.09 ^{ab}	0.83±0.39 ^a	0.14±0.04 ^c	0.24±0.10 ^{bc}	0.24±0.14 ^c	0.16±0.01 ^c
Σsaturados	89.38±18.02	14.67±3.14	20.77±4.28	15.63±3.11	18.51±4.10	23.88±4.60	18.90±3.72
16:1 n9	0.53±0.04	0.73±0.21 ^b	0.63±0.15 ^b	0.87±0.04 ^b	1.06±0.22 ^a	0.10±0.06 ^c	0.09±0.01 ^c
16:1 n7	13.96±1.20	0.35±0.10 ^a	1.16±0.08 ^{ab}	4.15±0.73 ^b	1.72±0.36 ^{ab}	3.83±2.39 ^b	3.59±0.53 ^b
16:1 n5	0.36±0.11	0.04±0.01 ^b	0.05±0.01 ^b	0.15±0.03 ^a	0.05±0.01 ^{ab}	0.12±0.07 ^{ab}	0.13±0.02 ^{ab}
17:1 n9	1.51±0.05	0.59±0.83 ^a	0.22±0.07 ^a	0.34±0.10 ^a	0.24±0.09 ^a	0.18±0.10 ^a	0.16±0.03 ^a
18:1 n11	nd	1.14±0.28 ^a	0.85±0.11 ^a	nd	1.00±0.27 ^a	0.21±0.08 ^b	0.16±0.03 ^b
18:1 n9	56.65±4.96	2.05±1.35 ^b	5.39±0.50 ^b	25.11±4.03 ^a	6.72±1.45 ^b	8.95±5.57 ^b	8.85±1.22 ^b
18:1 n7	7.63±0.57	1.69±1.46 ^a	1.18±0.12 ^a	5.91±0.92 ^a	1.22±0.26 ^a	1.77±1.11 ^a	1.80±0.24 ^a
20:1 n11	0.75±0.18	0.30±0.08 ^a	0.37±0.07 ^a	nd	0.43±0.04 ^a	0.32±0.15 ^a	0.29±0.04 ^a
20:1 n9	1.96±0.08	0.58±0.17 ^{ab}	0.75±0.06 ^{ab}	0.38±0.09 ^a	0.71±0.26 ^{ab}	0.50±0.32 ^b	1.37±0.18 ^{ab}
20:1 n7	0.83±0.06	0.12±0.04 ^a	0.15±0.04 ^a	0.10±0.08 ^a	0.10±0.01 ^a	0.18±0.12 ^a	0.19±0.03 ^a
22:1 n11	1.47±0.00	0.19±0.07 ^a	0.27±0.09 ^a	nd	0.20±0.04 ^a	0.48±0.32 ^a	1.50±0.18 ^a
22:1 n9	0.38±0.10	0.31±0.11 ^b	0.31±0.07 ^b	nd	0.34±0.04 ^b	0.45±0.29 ^b	0.48±0.04 ^a
24:1 n11	1.52±0.15	0.71±0.38 ^a	1.42±0.61 ^a	0.16±0.05 ^a	0.55±0.19 ^a	0.30±0.15 ^a	0.47±0.11 ^a
Σmonoinsaturados	87.55±16.06	8.79±0.61	12.75±1.40	37.01±8.56	14.33±1.76	17.40±2.51	19.10±2.44

Tabla 8. Continuación.

EMUL = Emulsión lipídica (RATIO HUFA ®); Art S= Nauplios de *Artemia* sin enriquecer; Art E= Nauplios de *Artemia* enriquecidos; Rot S= Rotíferos sin enriquecer; Rot E= Rotíferos enriquecidos; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado. nd= no detectable. Literales distintas demuestran una diferencia significativa para cada ácido graso (p<0.05).

Ácido graso	EMUL	Rot S	Rot E	ART S	ART E	MCC	MCH
16:2 n6	nd	0.13±0.06 ^{ac}	0.03±0.00 ^b	0.23±0.04 ^a	0.07±0.02 ^{bc}	nd	nd
18:2 n6	6.26±0.58	3.42±3.09 ^a	2.22±0.22 ^a	4.53±0.68 ^a	2.52±0.48 ^a	5.18±3.41 ^a	3.86±0.43 ^a
18:3 n3	5.60±0.29	2.36±2.10 ^b	1.21±0.13 ^b	18.58±3.05 ^a	1.47±0.26 ^b	0.38±0.24 ^b	0.24±0.06 ^a
20:2 n9	nd	0.33±0.15 ^a	0.13±0.03 ^b	0.28±0.00 ^{ab}	0.12±0.02 ^b	0.13±0.06 ^b	0.10±0.02 ^b
20:3 n3	0.99±0.14	0.33±0.13 ^a	0.13±0.08 ^b	0.39±0.14 ^{ab}	0.21±0.03 ^{ab}	nd	nd
20:4 n6 (ArA)	4.71±0.57	0.73±0.17 ^a	0.53±0.09 ^b	1.00±0.02 ^a	0.30±0.05 ^{bc}	0.08±0.04 ^c	0.07±0.01 ^c
20:5 n3 (EPA)	22.50±2.38	0.31±0.08 ^b	0.77±0.47 ^b	3.88±0.42 ^a	0.27±0.13 ^b	0.47±0.28 ^b	0.67±0.14 ^b
22:6 n3 (DHA)	95.10±40.89	0.82±0.94 ^a	0.84±0.69 ^a	0.37±0.48 ^a	0.28±0.20 ^a	0.24±0.11 ^a	0.19±0.02 ^a
ΣPoliinsaturados	135.16±36.33	8.43±1.19	5.86±0.73	29.25±6.27	5.23±0.88	6.50±2.01	5.11±1.49
Σ n6	10.97±1.10	4.28±1.75	2.77±1.15	5.76±2.29	2.89±1.35	5.26±2.38	3.92±0.30
Σ n3	124.19±43.69	3.82±0.96	2.96±0.45	23.22±8.68	2.22±0.61	1.10±0.12	1.09±0.27
Σn3/Σn6	11.32	0.89	1.07	4.03	0.77	0.21	0.28
DHA/EPA	4.23	2.60	1.09	0.09	1.00	0.51	0.28
EPA/ArA	4.78	0.40	1.47	3.86	0.90	5.59	10.11

ácidos grasos saturados mantienen en general la misma concentración entre los diferentes alimentos a excepción de los ácidos 14:0, 17:0 y 24:0, los cuales presentan una diferencia significativa ($p < 0.05$). En el caso del ácido 14:0, la diferencia se encontró solo entre el contenido en *Artemia* sin enriquecer y las MCC. Para el ácido 17:0, la diferencia se da entre los rotíferos enriquecidos y sin enriquecer. Por último, para el ácido 24:0 se encontró una diferencia entre la concentración en los dos tipos de rotíferos y el resto de los alimentos, aunque no se encontró una diferencia entre la concentración de este ácido graso en los rotíferos sin enriquecer y *Artemia* enriquecida. Este último ácido graso no fue detectado en la emulsión enriquecedora (RATIO HUFA®).

Con respecto a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, por sus siglas en inglés; Mono Unsaturated Fatty Acids), no fue posible detectar los ácidos 18:1 n11, 20:1 n11, 22:1 n11 y 22:1 n9 en *Artemia* sin enriquecer. De la misma manera, no se encontró el ácido 18:1 n11 en la emulsión enriquecedora. Por su parte, la concentración de los ácidos 16:1 n9 y 16:1 n7 en las microcápsulas fue significativamente distinta ($p < 0.05$) a la encontrada en los rotíferos sin enriquecer, mientras que la concentración del ácido 16:1 n5 en *Artemia* sin enriquecer fue distinta a la concentración de los dos tipos de rotíferos. La concentración del ácido 18:1 n11 fue distinta entre las presas vivas y los dos tipos de microcápsulas. La concentración de MUFA entre las microcápsulas no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) a excepción de la concentración de 22:1 n9 pues la concentración en las MCH fue mayor en las MCC.

La concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés; Poly Unsaturated Fatty Acids) entre los dos tipos de microcápsulas no presentó diferencias significativas; sin embargo, en ninguno de los dos tipos de microcápsulas pudieron ser detectados los ácidos grasos 16:2 n6 y 20:3 n3. De igual forma, no se detectaron los ácidos grasos 16:2 n6 y 20:2 n9 en la emulsión enriquecedora.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración de los ácidos 18:2 n6 y 22:6 n3 (DHA) entre los distintos alimentos. Los rotíferos sin

enriquecer presentaron diferencias con los rotíferos enriquecidos en la concentración de los ácidos grasos 16:2 n6, 20:2 n9, 20:3 n3, 20:4 n6 (ArA), mientras que también presentaron diferencias con *Artemia* sin enriquecer en la concentración de los ácidos 18:3 n3 y 20:5 n3 (EPA). La concentración de PUFA entre los dos tipos de microcápsulas no presentó diferencias significativas a excepción del ácido 18:3 n3 en la cual la concentración de este ácido graso fue mayor en las MCC.

El aporte principal de los n6 PUFA lo brindó el ácido 18:2 n6 para todos los alimentos, mientras que el aporte principal de los n3 PUFA fue brindado por el ácido 18:3 n3 en los distintos tipos de presas vivas y por el ácido EPA en los dos tipos de microcápsulas. Las proporciones entre los totales de n3 y n6 PUFA muestran que los diferentes tipos de presas vivas brindaron un aporte similar de ambos tipos de ácidos grasos, a excepción de *Artemia* sin enriquecer que presentó un aporte mayor de n3 PUFA. Por su parte, las microcápsulas presentaron un aporte mayor de n6 PUFA.

Las proporciones entre los ácidos DHA y EPA muestran como aun cuando no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración del ácido DHA, las presas vivas enriquecidas presentan un aporte similar entre EPA y DHA, mientras que los rotíferos sin enriquecer presentaron un aporte mayor de DHA. Los dos tipos de microcápsulas, así como *Artemia* sin enriquecer, presentaron un aporte mayor de EPA a comparación de DHA. Por su parte, las proporciones entre los ácidos EPA y ArA en los distintos tipos de presas vivas muestran un aporte mayor de ArA, a excepción de *Artemia* sin enriquecer que mostró un aporte mayor de EPA. Los dos tipos de microcápsulas mostraron un aporte mayor de EPA en comparación con ArA.

Crecimiento en talla y peso

La Fig. 2 muestra la tendencia del crecimiento en talla de las larvas sometidas a los tratamientos experimentales, así como las larvas sometidas al tratamiento testigo. En ella se puede observar como a partir de los 15 días después de la eclosión (dde) existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las larvas alimentadas con las MCH y las larvas alimentadas con los otros dos tratamientos. Por otro lado, a los 20 dde existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) para todos los

tratamientos; con el tratamiento de las MCH se obtuvo una menor talla, mientras que con el tratamiento de presas vivas se obtuvo una mayor talla.

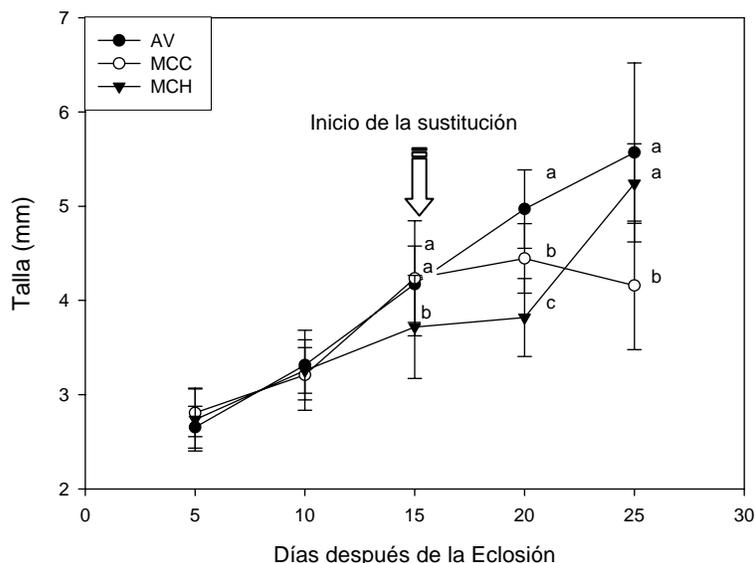


Fig. 2. Comportamiento del crecimiento en talla de las larvas alimentadas con presas vivas y con los dos tipos de microcápsulas. AV= Alimento vivo; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado. Literales distintas demuestran una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Esta situación cambia a los 25 dde, pues no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la talla de las cabrillas alimentadas con las MCH y las presas vivas. Por su parte, para este mismo día se observa como las larvas alimentadas con las MCC resultaron menores que las larvas sometidas al resto de los tratamientos, mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$).

La Fig. 3 muestra el crecimiento en peso de las larvas sometidas a los tres distintos tratamientos. En el caso del peso, solo fue encontrada una diferencia significativa ($p > 0.05$) a los 5 dde. Sin embargo, durante ese día aun no había comenzado el suministro de microcápsulas. Además, se puede observar como a los 25 dde las cabrillas sometidas al tratamiento con alimento vivo presentan un mayor peso promedio con respecto a aquellas sometidas a los otros tratamientos, aunque no exista una diferencia significativa.

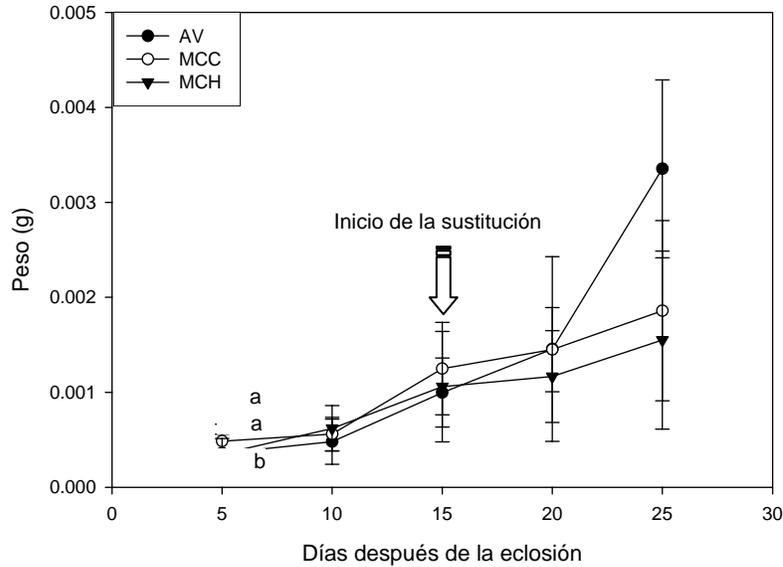


Fig. 3. Comportamiento del crecimiento en peso de lavas alimentadas con presas vivas y con los dos tipos de microcápsulas. AV= Alimento vivo; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado. Literales distintas demuestran una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Supervivencia

Respecto a la supervivencia obtenida al final del experimento, las cabrillas alimentadas con presas vivas presentaron un porcentaje de supervivencia significativamente mayor ($p < 0.05$) al obtenido por las cabrillas alimentadas con los dos tipos de microcápsulas. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia de las cabrillas alimentadas con los dos tipos de microcápsulas. La Tabla 9 muestra los porcentajes de supervivencia a los 25 dde.

Tabla 9. Porcentajes de supervivencia de las larvas sometidas a los distintos tratamientos a los 25 dde. AV= Alimento vivo; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado. Literales distintas demuestran una diferencia significativa ($p < 0.05$)

Tratamiento	Supervivencia (%)
AV	6.42 ± 2.26^a
MCC	0.28 ± 0.14^b
MCH	0.68 ± 0.32^b

La Fig. 4 muestra el número de individuos muertos desde el inicio del suministro de las microcápsulas hasta el final del experimento. En ella se puede observar como los tratamientos con microcápsulas presentaron una alta mortalidad a partir de los 20 dde; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre el número de individuos muertos de los tratamientos con microcápsulas y el tratamiento con presas vivas.

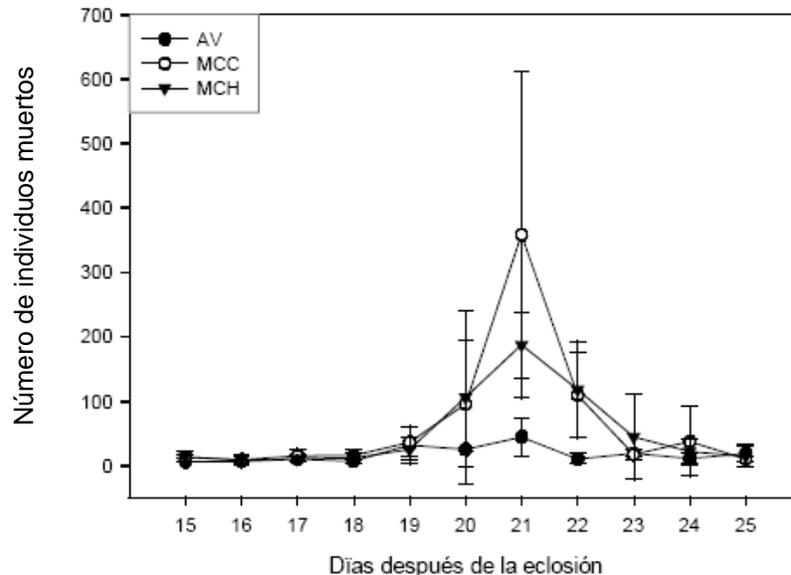


Fig. 4. Número de individuos muertos (promedio \pm desviación estándar) sometidos a los distintos alimentos desde el inicio del suministro de las microcápsulas hasta el final del experimento. AV= Alimento vivo; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado.

Incluso cuando no se encontraron diferencias significativas, puede observarse que la mortalidad en los tratamientos con microcápsulas comienza a partir de los 20 dde, que es el momento en el que finaliza la coalimentación entre microcápsulas y presas vivas. Además, a los 21 dde se observa una mortalidad generalizada entre los tres tratamientos. De esta manera, aunque puede observarse una alta cantidad de individuos muertos en los tratamientos con los dos tipos de microcápsulas, la cantidad de individuos muertos en el tratamiento de alimento vivo es lo suficientemente alta como para no detectar una diferencia significativa entre los distintos tratamientos.

Maduración del tracto digestivo

Actividad enzimática intestinal

Marcador de digestión extracelular

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (PAL) en cabrillas de 22 y 25 dde se presenta en la Tabla 10. En ella se puede observar que los extractos de cabrillas de 25 dde alimentadas con presas vivas (y con una talla de 5.57 ± 0.95 mm) presentaron una mayor actividad que las cabrillas de 22 dde (4.97 ± 0.42 mm), así como aquellas cabrillas alimentadas con otros tratamientos. Por otra parte, las cabrillas alimentadas con las MCH a los 25 dde (5.24 ± 0.42 mm) presentaron una actividad ligeramente mayor que las de 22 dde (3.82 ± 0.41 mm).

Los extractos de individuos de 22 dde alimentados con MCC (4.45 ± 0.37 mm) mostraron una actividad muy inferior al resto de los extractos, mientras que los extractos de cabrillas a los 25 dde (4.16 ± 0.68 mm) no mostraron actividad para la PAL.

Tabla 10. Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (mU Totales) obtenida de los extractos de cabrillas alimentadas con los tres distintos tratamientos. AV= Alimento vivo; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado; PAL 22= Actividad de los extractos de cabrillas a los 22 dde; PAL 25= Actividad de los extractos de cabrillas a los 25 dde; nd = no detectado.

Tratamiento	Fosfatasa alcalina (mU totales)	
	PAL 22	PAL 25
AV	0.2915	0.619
MCC	0.0001	Nd
MCH	0.0043	0.0307

La actividad de la enzima aminopeptidasa N (LAP) obtenida de los extractos de cabrillas a los 22 y 25 dde mostró un comportamiento similar a PAL, aunque los valores de actividad resultaron menores que con dicha enzima. La Tabla 11 muestra como nuevamente los extractos de cabrillas a los 25 dde, alimentadas con presas vivas (con 5.57 ± 0.95 mm de talla), presentaron una mayor actividad que los extractos de cabrillas a los 22 dde (4.97 ± 0.42 mm). De la misma manera, los extractos de cabrillas a los 25 dde alimentadas con las MCH (5.24 ± 0.42 mm) mostraron una mayor actividad que los extractos a los 22 dde (3.82 ± 0.41 mm).

Al igual que la actividad de la PAL, los extractos de cabrillas a los 22 dde alimentadas con las MCC mostraron una actividad muy inferior al resto de los extractos y los extractos de cabrillas a los 25 dde no mostraron actividad para la LAP.

Tabla 11. Actividad de la enzima aminopeptidasa N (mU Totales) obtenida de los extractos de cabrillas alimentadas con los tres distintos tratamientos. AV= Alimento vivo; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado; LAP 22= Actividad de los extractos de cabrillas a los 22 dde; LAP 25= Actividad de los extractos de cabrillas a los 25 dde. nd = no detectado

Tratamiento	Aminopeptidasa N (mU totales)	
	LAP 22	LAP 25
AV	0.01583	0.09168
MCC	0.00003	Nd
MCH	0.00088	0.00353

Marcador de digestión intracelular

Respecto a la actividad de la enzima leucina-alanina peptidasa (LEAP), todos los extractos de cabrillas a los 22 y 25 dde mostraron actividad de esta enzima. La Tabla 12 muestra como a diferencia de las actividades enzimáticas para PAL y LAP, las actividades enzimáticas de la enzima LEAP son mucho mayores a 1 U totales, motivo por el cual se utilizó esta unidad para determinar la actividad de LEAP. En este caso, los extractos de cabrillas a los 22 dde alimentadas con los dos tipos de microcápsulas presentaron una mayor actividad que los extractos de 25 dde. En contraste, los extractos de cabrillas a los 25 dde alimentadas con presas vivas presentaron un incremento en la actividad de esta enzima, pues se observa una mayor actividad que los extractos de cabrillas a los 22 dde bajo este tratamiento e incluso que las alimentadas con los dos tipos de microcápsulas.

Tabla 12. Actividad de la enzima leucina-alanina peptidasa (U Totales) obtenida de los extractos de cabrillas alimentadas con los tres distintos tratamientos. AV= Alimento vivo; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado; LEAP 22= Actividad de los extractos a los 22 dde; LEAP 25= Actividad de los extractos a los 25 dde.

Tratamiento	Peptidasa de Leucina- Alanina (U totales)	
	LEAP 22	LEAP 25
AV	125.24350	308.22645
MCC	101.85486	23.29090
MCH	132.31273	26.93930

Nivel de expresión de amilasa

El nivel de expresión de la enzima amilasa en cabrillas alimentadas con los distintos tratamientos se presenta en la Tabla 13. En ella se observa que solo las cabrillas alimentadas con las MCC presentaron un incremento significativo ($p < 0.05$) en el nivel de expresión de amilasa entre los 20 y 25 dde. En el caso de los otros dos tratamientos no se encontró un incremento o una disminución significativa entre los 20 y 25 dde.

Durante los 20 dde no se encontraron diferencias en el nivel de expresión de amilasa entre los tres tratamientos. En cambio, a los 25 dde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el nivel de expresión de cabrillas alimentadas con presas vivas y los dos tipos de microcápsulas, pues estas últimas presentaron un nivel de expresión mayor. No se encontraron diferencias significativas entre el nivel de expresión de amilasa en las larvas alimentadas con los dos tipos de microcápsulas a los 25 dde.

Tabla 13. Nivel de expresión de la enzima amilasa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) obtenido a partir de la cuantificación de mRNA de extractos de larvas a los 20 y 25 días después de la eclosión (dde). AV= Alimento vivo; MCC = Microcápsulas con harina de calamar; MCH= Microcápsulas con harina de calamar e hidrolizado de proteína de pescado. Literales distintas demuestran una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tratamiento	Nivel de expresión de amilasa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	
	20 dde	25 dde
AV	0.01 ± 0.70 ac	0.62 ± 0.44 a
MCH	0.58 ± 0.14 bc	1.84 ± 1.91 b
MCC	0.06 ± 0.04 c	30.73 ± 1.03 b

DISCUSIÓN

Calidad de las microcápsulas

Producción de amonio por lixiviación de microcápsulas

Aunque existen distintos tipos de micropartículas para alimentar larvas de peces, moluscos y crustáceos, un problema que impide la apropiada utilización del alimento es la lixiviación de compuestos con bajo peso molecular que son solubles en agua. Una formulación que cubra los requerimientos nutricionales de la especie a cultivar puede ser poco aprovechada debido a una pobre estabilidad del alimento, lo que limita el efecto deseado para el cual fue elaborado (Yúfera et al. 2002; Langdon, 2003; Tolomei et al., 2003; Önal y Langdon, 2004; Pedrozas-Islas et al., 2004; Önal y Langdon, 2005). Por otra parte, también es necesaria una lixiviación moderada del alimento (principalmente de compuestos nitrogenados como los aminoácidos u otros péptidos solubles), pues de esta manera los peces pueden detectarlos y consumirlos (Kolkovski et al., 1997a; Hargreaves, 1998; Kotrschal, 2000; Yúfera et al., 2002).

Las características del tipo de alimento utilizado es también un factor que influye en la estabilidad del alimento dentro del agua. Algunos ejemplos en los que se probó la lixiviación de distintos tipos de micropartículas son los realizados por Marchetti et al. (1999) quienes observaron que alimentos microparticulados (que presentaron una baja estabilidad en el agua) pueden mejorar su estabilidad si son cubiertos con una capa de lípidos, reduciendo la pérdida de vitaminas. De la misma manera, Lopez-Alvarado et al. (1994) y Yúfera et al. (2002) observaron una retención de aminoácidos en alimentos microencapsulados de pared proteica o lipídica de hasta 20% mayor que alimentos microparticulados.

En el caso del presente trabajo, la prueba de lixiviación mostró como las MCH presentaron una mayor estabilidad que las MCC a partir de los 20 minutos de inmersión en agua de mar. Yúfera et al. (1999), observaron que una inclusión moderada de hidrolizado de proteína de pescado permite la elaboración de microcápsulas con una alta estabilidad. Esto es debido a que el hidrolizado de proteína de pescado se compone de fracciones proteicas de pocas uniones peptídicas, lo que facilita la polimerización de la membrana proteica. De esta

manera, una mejor polimerización de la membrana permite una mayor estabilidad de las microcápsulas en el agua (Carvalho et al., 1997; Zambonino-Infante et al., 1997; Cahu y Zambonino-Infante, 1999; Yúfera et al., 2002; Langdon, 2003).

Sin embargo, aun cuando la concentración de amonio disuelto en agua producido durante la lixiviación de las MCC fue significativamente mayor que la que se produjo durante la lixiviación de las MCH, esta no presentó niveles tóxicos. Tucker (1998) mencionó que el límite superior de tolerancia al amonio para la mayoría de los peces marinos es de 1 $\mu\text{g/l}$. Tal concentración se encuentra por arriba de la registrada en el SC-18 durante todo el experimento, pues incluso con la adición de las microcápsulas, el valor más alto registrado en el sistema cerrado fue de solo 0.43 $\mu\text{g NH}_4\text{/l}$ (Tabla 6).

Análisis de ácidos grasos

Como otra medida de la calidad de las microcápsulas, se comparó el contenido y la concentración de ácidos grasos entre los distintos alimentos utilizados para el cultivo larvario.

Los ácidos grasos saturados (SAFA) son generalmente menos aprovechados que otros ácidos grasos en los peces marinos. Esto se debe en parte a que los peces pueden sintetizar principalmente los ácidos 16:0 y 18:0 a partir de la acetil Co-A formada en las mitocondrias por medio de la descarboxilación oxidativa del piruvato o de la desaminación oxidativa de algunos aminoácidos. Por lo tanto, la presencia de SAFA en los tejidos animales es considerada mas una evidencia de lipogénesis que de incorporación a partir del alimento consumido (Dias et al. 1998; Tocher, 2002).

Particularmente para la cabrilla arenera, Carrasco-Chávez (2004) reportó un consumo preferencial de SAFA de cadenas cortas durante los primeros 4 dde de larvas de cabrilla arenera sometidas a inanición. Lo anterior se explica con la actividad de estererasas no específicas de cabrilla arenera, las cuales tiene preferencia por ácidos grasos de cadenas cortas (Alvarez-González, 2003).

Además, se ha observado que en los fosfoglicéridos (de los cuales la lecitina de soya es fuente importante) existe una alta cantidad de SAFA (Olsen et al., 1999; Robin y Vincent, 2003). Esto podría sugerir que los dos tipos de microcápsulas presentan un aporte de SAFA mayor que las presas vivas, pues además de utilizar fuentes animales en su formulación, se utilizó a la lecitina de soya en emulsión como fase de dispersión para la elaboración de las microcápsulas. Sin embargo, esto no puede ser comprobado en el presente trabajo, debido a que solo fue analizada la fracción neutra de los lípidos.

Al igual que los SAFA, todos los organismos (incluidos los peces marinos) tienen la capacidad de producir ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) a partir de la desaturación de los ácidos 16:0 y 18:0 (por medio de la $\Delta 9$ desaturasa) generando así los ácidos 16:1 n7 y 18:1 n9 respectivamente (Sargent et al., 1999; Sargent et al., 2002; Tocher, 2002). Debido a que las microcápsulas incluyeron insumos de origen animal y el uso de presas vivas como alimento, es de esperarse entonces que estos ácidos grasos se presenten en todos los alimentos utilizados en el presente trabajo. En el caso de los ácidos 16:1 n7 y 18:1 n11, las fuentes animales utilizadas en los dos tipos de microcápsulas debieron sufrir una especie de “lavado” durante el proceso de elaboración, ya que las microcápsulas presentaron una menor concentración de este ácido graso en comparación con el resto de los alimentos.

Por otra parte, se piensa que los MUFA presentes en los tejidos de peces marinos (como los ácidos 18:1 n7, 22:1 n9 o 22:1 n11) no son derivados de la elongación de sus homólogos saturados, como sucede en mamíferos, sino que provienen del zooplancton consumido (Sargent et al., 2002). En este caso, el ácido 22:1 n11 es generado en el zooplancton a partir de la desaturación del ácido 20:0, seguido de una elongación del ácido 20:1 n 11 hasta 22:1 n11(Tocher, 2002). Es por ello, que la deficiencia del ácido 20:0 en *Artemia* sin enriquecer utilizada en el presente trabajo, fue determinante para la ausencia de los ácidos 20:1 n11 y 22:1 n11. De la misma manera, la acumulación de este tipo de MUFA en los peces utilizados para elaborar el hidrolizado de proteína de pescado debió ser la causa de que las MCH presentaran una mayor concentración del ácido 22:1 n9 en comparación de las MCC.

La importancia del aporte de los MUFA como estos últimos se debe a que poseen un punto de fusión más bajo que sus homólogos saturados, lo que permite la modificación de la viscosidad de la membrana celular ante distintas temperaturas (Tocher, 2002; Hsieh et al., 2003; Robin y Vincent, 2003).

Además de la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa, los peces marinos tienen la capacidad de utilizar otras desaturasas tales como la $\Delta 6$ desaturasa y en una menor escala la $\Delta 5$ desaturasa (Tocher y Ghoini, 1999). Estas, son desaturasas involucradas en la generación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) tales como los ácidos 20:4 n6, 20:5 n3 y 22:6 n3 (Tocher, 2002; Robin et al., 2003).

Sin embargo, los peces marinos poseen una limitada capacidad de conversión desde el ácido 18:3 n3 hasta el ácido 20:5 n3 (EPA) o el ácido 22:6 n3 (DHA), al igual que el ácido 20:4 n6 (ArA) a partir del ácido 18:2 n6 (Bell et al., 2003). Esta deficiencia radica principalmente en que la actividad de las $\Delta 12$ y $\Delta 15$ desaturasas (necesarias para generar los ácidos 18:2 n6 y 18:3 n3 a partir del ácido 18:1 n9) no ha sido detectada en vertebrados, por lo que los peces marinos solo pueden obtener estos ácidos grasos a partir del alimento que consumen (Tocher y Ghoini, 1999; Sargent et al., 2002).

Debido a lo anterior, es importante conocer la concentración de PUFA dentro del alimento utilizado en peces marinos. Por su parte, la *Artemia* presenta generalmente una alta concentración de los ácidos 18: 2 n6, 18:3 n3 y 20:3 n3 cuando acaba de eclosionar o cuando no es enriquecido con aceites de origen animal. Además, la concentración de EPA en *Artemia* suele aumentar cuando se ha ingerido una considerable cantidad de DHA, debido a una conversión del DHA hacia EPA (Cotteau y Mourente, 1997; Navarro et al., 1997). Por otro lado, debido a su origen dulceacuícola, los rotíferos (particularmente *Brachionus plicatilis*) presentan una alta cantidad de los ácidos 18:2 n6 y 18:3 n3, al igual que el ácido EPA, los cuales se presentan en gran cantidad en las microalgas dulceacuícolas (Rodríguez et al., 1997; Bell et al., 2003).

No obstante, ambas presas son conocidas por una deficiente concentración de ácidos grasos como ArA, EPA y DHA, al menos para los requerimientos de los peces marinos, por lo que es necesario su enriquecimiento en esos ácidos grasos (Navarro et al., 1997; Rodríguez et al., 1997; Bell et al., 2003; Ando et al., 2004a, 2004b).

Carrasco-Chávez (2004) observó que el consumo de PUFA de larvas de cabrilla arenera en inanición es mayor en el ácido DHA, seguido de los ácidos EPA y ArA, por lo que se piensa que los requerimientos de PUFA en larvas de cabrilla sigue el mismo orden. Aun con lo anterior, debe considerarse el aporte del ácido ArA, pues este ácido graso es el principal precursor de eicosanoides (encargados de una gran variedad de acciones como la función cardiovascular, renal y neural, respuesta inmune y reproducción entre otras), particularmente de prostaglandinas de la serie-2 y leucotrienos de la serie-4. Así también, el ácido EPA compete en la producción de eicosanoides como prostaglandinas de la serie-3 y leucotrienos de la serie-5, los cuales son de menor actividad biológica que los eicosanoides producidos a partir del ácido ArA (Sargent et al., 1999; Tocher, 2003). Esta competencia permite regular condiciones de alta actividad cardiovascular e inflamatoria adjudicada a la alta actividad biológica de eicosanoides derivados a partir del ácido ArA (Tocher, 2003).

Por lo tanto, es importante considerar las proporciones entre los ácidos EPA/ArA, así como la proporción entre los totales de n3/n6, que será aportado por el alimento (Rodríguez et al., 1997; Tocher, 2003). La proporción de EPA/ArA al igual que la proporción n3/n6 en la cabrilla arenera, presenta un aumento de los 15 a 20 dde (0.01 y 0.12 g de peso respectivamente) y una disminución de los 20 a los 30 dde (0.12 g y 1.5 g de peso respectivamente), aunque esta proporción se mantenga cercana a 2 (Carrasco-Chávez, 2004). Esto significa que entre los 0.01 a 0.12 g se requiere una mayor concentración del ácido EPA que ArA, mientras que entre los 0.12 a 1.5 g se requiere de una proporción menor de EPA/ArA (una mayor concentración del ácido ArA). De esta manera, microcápsulas como las utilizadas en este estudio son más adecuadas para el intervalo de peso 0.12 – 1.5 g, pues los dos tipos de microcápsulas presentaron una mayor proporción de EPA/ArA. Sin embargo, si se pretende utilizar el mismo tipo de microcápsulas en un cultivo larvario de cabrilla

arenera durante el intervalo de peso 0.01-0.12 g, deben de considerarse ingredientes con un mayor aporte del ácido ArA-

Además, según Carrasco-Chávez (2004) las larvas de cabrilla arenera de 15 dde con 0.01 g de peso presentaron una proporción DHA/EPA de 0.3 que continua disminuyendo conforme se da el desarrollo de la cabrilla arenera. En el caso del presente trabajo, debe considerarse un mejor enriquecimiento del ácido DHA, pues ambos tipos de presas enriquecidas presentan una proporción DHA/EPA cercana a 1, por lo que solo las microcápsulas presentan una proporción cercana a la que presentan las cabrillas a los 15 dde.

Crecimiento en talla y peso

Aún cuando el presente trabajo es la primera experiencia de sustitución del suministro de alimento vivo por microcápsulas dentro del cultivo de cabrilla arenera, los resultados de crecimiento de las larvas alimentadas con los dos tipos de microcápsulas parecen indicar que es posible igualar el crecimiento obtenido cuando se utilizan presas vivas.

Es importante mencionar que las características de los materiales utilizados para la elaboración de las microcápsulas son un factor determinante en el crecimiento y supervivencia de las larvas que las consumen (Langdon, 2003). Esto es mencionado debido a que a diferencia de las microcápsulas utilizadas por Kanazawa (1982), las microcápsulas utilizadas en el presente trabajo no utilizan nylon en la membrana, por lo que no presentan problemas en digerirlo. Además, las microcápsulas utilizadas en el presente trabajo fueron elaboradas con base a las microcápsulas tipo G (de membrana suave) elaboradas por Yúfera et al. (1996), a cuyos prototipos les fue probada la digestibilidad in vitro por Fernández-Díaz y Yúfera (1995). En dicho trabajo, los autores observaron una mayor digestibilidad de las microcápsulas de membrana suave (aisladas en una solución de grenetina) que aquellas con membrana rígida (aisladas en una solución de alcohol), utilizando extractos de larvas de *Sparus aurata* a los 6 y 12 dde.

Antes de comenzar el suministro de las microcápsulas se observó una alta variabilidad de talla y peso en las larvas, debido a las diferencias significativas en talla a los 15 dde y en peso a los 5 dde. A pesar de ello, los ingredientes utilizados en la elaboración de las microcápsulas mostraron ser los adecuados para igualar el peso de las larvas alimentadas con presas vivas, así como su talla a los 25 dde por las MCH.

Alarcón et al. (1999) observaron que fuentes de proteína utilizadas en este tipo de microcápsulas, como la ovoalbúmina, requieren una mayor actividad de proteasas que otros ingredientes incluidos en las microcápsulas. Esto puede llegar a limitar la actividad de proteasas sobre otros ingredientes y estos, pueden entonces presentar un menor porcentaje de digestibilidad. Por tanto, los autores sugieren el uso de fuentes de proteína como la caseína o las harinas de cefalópodos (utilizadas en el presente trabajo) para la elaboración de microcápsulas como alimento para el cultivo de larvas de *Sparus aurata*. Adicionalmente, es conocido el efecto favorable de ingredientes como el hidrolizado de proteína de pescado debido a la alta cantidad de aminoácidos libres y otras fracciones peptídicas de bajo peso molecular, en especial di y tripéptidos, que son rápida y eficientemente absorbidos por el intestino sin alguna digestión de secreciones pancreáticas (Zambonino-Infante et al., 1997; Cahu et al., 1999; Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

Aun con lo anterior, trabajos como los de Carvalho et al. (1997) o Kolkovski y Tandler (2000) mencionaron que los efectos benéficos de los hidrolizados solo se dan hasta cierto nivel de inclusión. Esto es debido a que al suministrar un nivel elevado de hidrolizado (o como la única fuente de nitrógeno) se produce una baja absorción de proteínas y pérdida de peso, debido el alto flujo de aminoácidos libres a través de la pared del intestino que no puede ser manejado adecuadamente y tiende a ser expulsado del tracto digestivo. Por tal motivo, la concentración del hidrolizado de proteína de pescado en las microcápsulas fue de solo la mitad del contenido de harina de calamar.

Particularmente para la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, tanto la harina de calamar como el hidrolizado de proteína de pescado presentaron un

porcentaje de hidrólisis mayor al 50%, esto se determinó por medio de un análisis *in vitro* de extractos multienzimáticos de juveniles de cabrilla arenera (Alvarez-González, 2003). Así también, una inclusión moderada de ambos ingredientes en alimentos microparticulados apoyaron a obtener un mayor crecimiento de juveniles de cabrilla que aquellos alimentados con micropartículas que incluyen harina de sangre de res (García-Gómez, 2003).

Todo lo anterior ayuda a explicar, cómo es posible obtener el mismo crecimiento en larvas alimentadas con microcápsulas o presas vivas. No obstante, los primeros intentos por realizar esta sustitución mostraron un mayor crecimiento por parte de las larvas alimentadas con presas vivas. Ejemplo de ello es el trabajo realizado por Kanazawa (1982) quien adjudicó el lento crecimiento a la baja digestibilidad de las microcápsulas por parte de las larvas. De la misma manera, Applebaum (1985) y Walford et al. (1991) mencionaron que el tracto poco desarrollado de las larvas alimentadas con microcápsulas impide la apropiada digestión de las mismas. Así también, Fernandez-Díaz y Yúfera (1997) observaron un mayor crecimiento en larvas alimentadas con presas vivas, mientras que las larvas en coalimentación por más tiempo obtuvieron el mayor crecimiento de entre todas las larvas alimentadas con microcápsulas.

Estudios recientes han logrado obtener el mismo crecimiento entre larvas alimentadas con microcápsulas y con presas vivas. Tal es el caso de trabajos como el de Chu y Ozkisilcik (1999), quienes obtuvieron el mismo crecimiento de larvas de *Morone saxatilis* alimentadas con microcápsulas y nauplios de *Artemia* a los 14 dde. Sin embargo, los autores observaron un mayor crecimiento de larvas alimentadas con nauplios de *Artemia* al final del experimento. Los autores mencionaron que el tipo de microcápsulas que ellos utilizaron favorece el consumo y por tanto el crecimiento, pues incluyen una cápsula de pared lipídica dentro de una cápsula de membrana proteíca. No obstante, sus resultados demuestran que ese tipo de microcápsulas no permiten obtener el mismo crecimiento en larvas alimentadas con presas vivas.

En cambio, Yúfera et al. (1999) observaron el mismo crecimiento en larvas de *Sparus aurata* alimentadas con presas vivas y con microcápsulas del tipo G. Los autores utilizaron dos distintas formulaciones para la elaboración de las microcápsulas. La primera formulación incluía ovoalbúmina e hidrolizado de proteína de pescado como fuentes principales de proteína, mientras que para la segunda formulación utilizaron caseína y harina de pulpo, así como una reducción del contenido de hidrolizado de proteína de pescado. Anteriormente fue mencionado en el presente trabajo los beneficios y deficiencias de utilizar estos ingredientes en alimentos inertes para larvas de peces marinos.

Estos dos tipos de microcápsulas fueron nuevamente probados por Yúfera et al. (2000) quienes observaron el mismo crecimiento en larvas alimentadas con presas vivas y microcápsulas con caseína, harina de pulpo e hidrolizado de proteína de pescado. Este tipo de microcápsulas ha sido elaborado de la misma manera que las microcápsulas utilizadas en el presente trabajo. Así también, la formulación utiliza ingredientes similares. Por lo tanto, los resultados obtenidos en dichos trabajos, apoyan la idea de que es posible igualar el crecimiento entre larvas alimentadas con microcápsulas o con presas vivas.

Khémis et al. (2003) utilizaron una microcápsula comercial (Hatchfry-Encapsulon, Argent Chemical laboratories) para sustituir el suministro de presas vivas en larvas de *Pseudopleuronectes americanus*. La sustitución fue realizada en cuatro días de coalimentación con una disminución gradual del suministro de presas vivas, de manera similar al presente trabajo. Los autores observaron el mismo crecimiento en las larvas alimentadas con presas vivas y microcápsulas, proponiendo el uso de la talla como referencia para iniciar la sustitución de los alimentos suministrados.

Este último punto toma importancia debido a que aun cuando las larvas alimentadas con las MCH lograron obtener un crecimiento similar al de larvas alimentadas con presas vivas los valores de talla y peso resultan menores a los obtenidos en otras experiencias de crianza larvaria de *P. maculatofasciatus* como los

realizados por otros autores (Anguas-Vélez et al. 2000; Alvarez-González et al. 2001 y Peña et al. (2003).

Por tal motivo y de acuerdo con los resultados de crecimiento obtenidos en el presente trabajo, así como por lo propuesto por Khemis et al. (2003), se sugiere utilizar la talla a la cual las larvas de peces marinos completan la madurez del tracto digestivo como punto de inicio para la sustitución de presas vivas por microcápsulas o cualquier otro tipo de alimento inerte. De esta manera, se pretende disminuir los problemas de digestibilidad de los ingredientes utilizados en los alimentos inertes.

Supervivencia

Los resultados de crecimiento obtenidos en el presente estudio, muestran a las microcápsulas de pared proteica como candidatos para sustituir el suministro de *Artemia* en el cultivo de larvas de cabrilla arenera; sin embargo, los resultados en supervivencia de las larvas alimentadas con microcápsulas e incluso con presas vivas muestran como aún no es posible realizar con éxito esta sustitución.

Como ya se mencionó, el presente trabajo es uno de los primeros intentos por realizar la sustitución del suministro de presas vivas por microcápsulas como alimento en la crianza de la cabrilla arenera. Al igual que este, los primeros intentos por suministrar microcápsulas mostraron un mayor porcentaje de supervivencia en las larvas alimentadas con presas vivas. Tal es el caso de trabajos como el de Applebaum (1985) donde el mayor porcentaje de supervivencia (87%) lo obtuvieron las larvas de *Pagrus major* y *Plecoglossus plecoglossus* alimentadas con presas vivas. De la misma manera, Walford et al. (1991) observaron una mortalidad total en larvas de *Lates calcarifer* alimentadas exclusivamente con microcápsulas a los 10 dde, mientras que observaron una supervivencia de 2.4% en larvas que fueron previamente alimentadas con rotíferos. Chu y Ozkizilcik (1999) observaron una menor supervivencia (44 y 54%) en larvas de *Morone saxatilis* alimentadas exclusivamente con microcápsulas, mientras que las larvas alimentadas con presas vivas presentaron la misma supervivencia (72%) que aquellas mantenidas en coalimentación con microcápsulas.

En ninguno de los ejemplos anteriores se logró obtener el mismo crecimiento entre larvas alimentadas con presas vivas y microcápsulas. En cambio, en este estudio se obtuvo el mismo crecimiento en talla en las presas vivas y las microcápsulas, aunque se presentó una supervivencia más baja en las microcápsulas. La razón de esto se debió a que, la cantidad de las MCH suministradas no fue ajustada de acuerdo a los cambios en la densidad de las larvas. Por tal motivo, existió una mayor cantidad de alimento disponible para cada larva conforme la densidad de larvas continuaba disminuyendo.

Debido a que se presentó una mortalidad generalizada a partir de los 20 dde (Fig. 4) los resultados obtenidos no han podido igualar los datos de supervivencia obtenidos en otros intentos por sustituir el suministro de presas vivas por alimentos inertes durante el cultivo larvario de cabrilla arenera, tales como los de Anguas-Velez et al. (2000) quienes obtuvieron una supervivencia máxima de 2.4% o el de García-Gómez (2003) con una supervivencia máxima de 4.6%. Incluso el tratamiento con presas vivas probado en este estudio obtuvo un porcentaje de supervivencia menor que el obtenido por Alvarez-González et al. (2001), con cuyo esquema de alimentación se basó el tratamiento de presas vivas.

Por otra parte, la alta mortalidad de las larvas alimentadas con las MCC impidió que estas larvas lograran obtener el mismo crecimiento que aquellas alimentadas con presas vivas. Esto se debe a que, aun cuando no existan diferencias significativas en la cantidad de individuos muertos durante el suministro de las microcápsulas, la Fig. 4 muestra como las larvas alimentadas con las MCC presentaron una elevada mortalidad que no les permitió recuperarse al final del experimento. Sin embargo, debe considerarse que las condiciones fisiológicas (como lo es el desarrollo del tracto digestivo) en las que se encontraban las larvas alimentadas en los distintos tratamientos determinaron los resultados de crecimiento y supervivencia obtenidos.

Maduración del tracto digestivo

Debido a que los resultados de calidad de las microcápsulas mostraron una buena estabilidad y una composición similar de ácidos grasos, una posible causa de las bajas tasas de crecimiento y supervivencia obtenidas pudiera deberse al estado de desarrollo en el que se encontraba el tracto digestivo de las larvas.

La determinación de la actividad de las enzimas involucradas en la digestión del alimento consumido es de particular interés, pues ellas participan en diversos eventos que determinan la maduración del tracto digestivo (Applebaum y Holt, 2003). Así, el momento en el cual la actividad de enzimas encargadas de la digestión extracelular reemplaza la actividad de las enzimas encargadas de la digestión intracelular, determina la maduración de los enterocitos. Aun cuando este tipo de procesos está establecido genéticamente, el tipo de alimento ingerido puede adelantar o retrasar el momento en que ocurre algún evento durante el desarrollo del tracto digestivo (Lazo et al., 2000; Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Lunstedt et al., 2004).

De esta manera, la inclusión de diversos ingredientes en los alimentos inertes puede modificar la expresión y actividad de este tipo de enzimas. Algunos ejemplos de esto son la ovoalbúmina, que cuando se incluye en un alto porcentaje en el alimento puede inhibir la actividad proteasa (Alarcón et al. 2003) o la alta concentración de péptidos de cadenas cortas causada por la inclusión de hidrolizado de proteína de pescado que puede influir la actividad de hidrolasas de digestión extracelular (Zambonino-Infante et al., 1997). También la ingestión de presas vivas puede modificar la actividad de enzimas digestivas en las larvas que las consumen, pues se piensa que la actividad inicial de las enzimas digestivas se debe en parte a enzimas exógenas proporcionadas por las presas vivas consumidas (Kolkovski et al., 1997b). Sin embargo, aun cuando diversos autores han observado un aporte de enzimas exógenas por parte de las presas consumidas (Munilla-Morán et al., 1990; Watanabe y Kiron, 1994; Kolkovski et al., 1997a, 1997b; Ribeiro et al., 1999; Lazo et

al., 2000; Koven et al., 2001; Lunstedt et al., 2004), este aporte no pudo ser comprobado en larvas de *P. maculatofasciatus* (Alvarez-González, 2003).

Por otra parte, Applebaum y Holt (2003) mencionaron que la alta actividad de enzimas digestivas no se debe a enzimas exógenas aportadas por las presas consumidas, sino al aporte de una gran variedad de sustratos para la acción de las enzimas. Por tal motivo, es posible que las enzimas de digestión externa de las larvas alimentadas con presas vivas hayan obtenido el suficiente sustrato y muestren mayor actividad que las larvas alimentadas con microcápsulas.

No obstante, los resultados de actividad de las enzimas intestinales pueden variar si los extractos provienen de homogeneizados de intestino o de homogeneizados de cuerpo completo, pues en el resto del cuerpo existen inhibidores como defensa ante una autodigestión (Hidalgo et al., 1999; Ribeiro et al. 1999; Koven et al., 2001; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). De la misma manera, la enzima leucina-alanina peptidasa (LEAP) se encuentra presente en el citoplasma de otras células del cuerpo, además de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Lo anterior puede explicar por que se observó mayor actividad de la enzima LEAP en comparación con las enzimas encargadas de la digestión extracelular. Por lo tanto, se consideró que con el aumento o disminución individual de la actividad de las enzimas de digestión intra y extracelular era un mejor índice para determinar la madurez del tracto digestivo, en lugar de la comparación entre ellas.

En este caso, el aumento de la actividad de las enzimas encargadas de la digestión extracelular mostró un grado de madurez avanzado a los 25 dde en las larvas alimentadas con presas vivas y con las MCH. Por su parte, la disminución en la actividad de la enzima LEAP en las larvas alimentadas con los dos tipos de microcápsulas es similar al patrón de la actividad enzimática intestinal observada en especies como *S. aurata* (Cahu y Zambonino-Infante, 1995) o *Solea senegalensis* (Ribeiro et al., 1999). Al igual que las enzimas de digestión extracelular, la actividad de la enzima LEAP muestra mayor grado de madurez a los 25 dde en las larvas alimentadas con los dos tipos de microcápsulas. Sin embargo, los resultados obtenidos de la actividad de las enzimas de digestión extracelular en las larvas

alimentadas con las MCC, así como la actividad de la enzima LEAP en las larvas alimentadas con presas vivas son reflejo de los resultados en crecimiento y supervivencia.

En el primer caso, debido a la alta mortalidad y la baja tasa de crecimiento registradas, no fue posible detectar actividad de enzimas de digestión extracelular de cabrillas alimentadas con las MCC a los 25 dde. Mientras que para el segundo caso, es posible que el uso de homogeneizados de cuerpo completo haya aportado extractos de enzimas citoplasmáticas de distintas células (además de los enterocitos) que fueron afines al sustrato probado (Hidalgo et al., 1999). También cabe la posibilidad de que, la alta variabilidad de pesos en las larvas alimentadas con presas vivas haya incluido en la muestra de homogeneizados a larvas de menor peso y con una alta actividad de enzimas de digestión intracelular. A pesar de lo anterior, los patrones de actividad de las enzimas de digestión intracelular en larvas alimentadas con los dos tipos de microcápsulas y de digestión extracelular en larvas alimentadas con las MCH y presas vivas son similares a resultados descritos por Alvarez-González (2003) en larvas de cabrilla arenera alimentadas con presas vivas.

Además de la alternancia en la actividad de las enzimas encargadas de la digestión intra y extracelular, otro patrón dentro de la ontogenia enzimática de los peces marinos es la variación en la actividad de la enzima amilasa (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Al igual que la enzima LEAP, la actividad de la amilasa es considerablemente mayor durante las primeras fases del desarrollo y presenta una caída cerca del final del periodo larvario, hecho que ha sido observado en varias especies de peces (Uys et al., 1987; Hidalgo et al., 1999; Ribeiro et al. 1999; Koven et al., 2001; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Este patrón de actividad de amilasa también ha sido observado en larvas de *P. maculatofasciatus*, donde la mayor actividad se registró en las larvas a los 18 dde, y continuó disminuyendo hasta los 30 dde (Alvarez-González, 2003).

Sin embargo, la estimación de la actividad de amilasa puede presentar diversos problemas tales como la desnaturalización e inactivación de la enzima durante la homogenización de los tejidos (Ma et al., 2001) o incluso la actividad de

amilasas aportadas por presas vivas como la *Artemia*. (Douglas et al., 2000). Por tal motivo, se ha sugerido estimar el nivel de expresión de mRNA codificante de amilasa como medio para determinar la posible actividad de la enzima expresada (Douglas et al, 2000; Ma et al., 2001).

En este trabajo, el nivel de expresión de amilasa fue distinto al patrón de actividad de amilasa observado por Alvarez-González (2003). Mientras que el nivel de expresión de amilasa a los 20 y 25 dde se mantuvo constante en larvas alimentadas con presas vivas y con las MCH, las larvas alimentadas con las MCC presentaron un aumento en el nivel de expresión de amilasa. Para el primer caso, es posible que las necesidades de obtención de energía a partir de carbohidratos se mantenga principalmente en la actividad de la amilasa sobre el glucógeno en el hígado, ya que esta actividad se mantiene a niveles bajos durante el desarrollo del pez después de haber presentado altos niveles de amilasa en el intestino y páncreas durante las primeras fases de desarrollo (Hidalgo et al., 1999; Buchet et al., 2000; Rosenlund et al., 2004). Debido a ello, los niveles de expresión de amilasa pudieron mantenerse constantes en las cabrillas alimentadas con presas vivas y con las MCH.

En el caso de larvas alimentadas con las MCC, la baja aceptación a este tipo de microcápsula traducida en la alta mortalidad observada a los 21 dde (Fig. 4) pudo ser causada por la ausencia de fuentes de proteína como el hidrolizado de proteína de pescado. En ausencia de este ingrediente, las MCC deben de poseer fracciones peptídicas de mayor complejidad que las MCH, por lo que las larvas debieron utilizar más energía en la digestión de las MCC (Carvalho et al., 1997; Zambonino-Infante et al., 1997; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). De esta manera, la obtención de energía en las larvas debió apoyarse en el efecto de “relevo” de la actividad de amilasa sobre el glucógeno, fenómeno que aparece cuando la disponibilidad de proteínas es escasa (Buchet et al., 2000; Rosenlund et al., 2004).

Aun cuando la caída en la expresión y actividad de la amilasa está programada genéticamente, es posible alterar este patrón por la disponibilidad de sustrato o bajo condiciones como las antes mencionadas (Douglas et al, 2000; Ma et al., 2001; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Ejemplo de esto es el trabajo de

Gleaves-López (2005) que observó una mayor actividad de amilasa en juveniles de cabrilla arenera con una inclusión baja de lípidos en el alimento. De la misma manera, Olalde-Rodríguez (2005) observó que el uso de espermina en el alimento de larvas de cabrilla ocasiona un aumento en la expresión de la amilasa en relación con larvas alimentadas con presas vivas.

Por otra parte, los resultados acerca del nivel de maduración del tracto digestivo obtenido en el presente trabajo mostraron una capacidad de digestión madura en cabrillas de 5.57 ± 0.95 mm de talla y 2.6 ± 1.8 mg de peso (a los 25 dde en el presente trabajo, alimentadas con las MCH o presas vivas). De manera similar, Peña et al. (2003) sugirieron que la madurez digestiva de larvas de *P. maculatofasciatus* comienza a una talla de 7.3 ± 1.4 mm (a los 16 dde en dicho trabajo), una vez que se ha diferenciado el tracto digestivo y las larvas presentan un estómago glandular. Por su parte, Alvarez-González (2003) observó la sustitución entre la actividad de las enzimas de digestión intracelular y extracelular, así como el decaimiento de la actividad de amilasa en cabrillas de 1 mg de peso (a los 25 dde). Por tal motivo, se debe de utilizar una talla mayor a 7.3 mm o un peso mayor a 1 mg como indicio para comenzar la sustitución de presas vivas por alimentos inertes.

Finalmente, mientras que las microcápsulas utilizadas en el presente trabajo mostraron una alta estabilidad en el agua y las larvas alimentadas con ellas obtuvieron un crecimiento similar a las larvas alimentadas con presas vivas, aún no es recomendable sustituir el suministro de presas vivas por microcápsulas durante el cultivo larvario de la cabrilla arenera. Esto es debido a que los resultados en supervivencia de las larvas alimentadas con microcápsulas fueron mucho menores que los obtenidos con presas vivas. Por otra parte, antes de iniciar el suministro de microcápsulas o cualquier otro tipo de alimento inerte debe de determinarse el grado de madurez del tracto digestivo para asegurar un mejor aprovechamiento del intestino.

CONCLUSIONES

El uso de ingredientes como el hidrolizado de proteína de pescado facilitó la elaboración de microcápsulas de pared proteíca, que poseen una mayor estabilidad en el agua como lo mostró la prueba de lixiviación de las microcápsulas.

A pesar de haber utilizado un solvente neutro durante la elaboración de las microcápsulas, las concentraciones de los diferentes ácidos grasos contenidos en ellas fueron similares al presentado en las presas vivas. Sin embargo debe considerarse fuentes de lípidos adicionales a la lecitina de soya, como lo son los aceites de origen animal, para tratar de igualar la composición de ácidos grasos de peces que van a consumirlos. Debido a las proporciones de ácidos grasos encontradas en los dos tipos de microcápsulas, deben utilizarse ingredientes para su elaboración que suministren una mayor concentración del ácido ArA a comparación del ácido EPA.

Los resultados en supervivencia de las larvas alimentadas con los dos tipos de microcápsulas demuestran que aun no es posible sustituir exitosamente el suministro de *Artemia* por microcápsulas durante el cultivo larvario de cabrilla arenera.

Las larvas alimentadas con las microcápsulas que incluían harina de calamar presentaron una actividad de enzimas de digestión extracelular deficiente, mientras que la expresión de amilasa indica la necesidad de cubrir los requerimientos energéticos mediante la utilización del glucógeno.

Los resultados obtenidos de madurez del tracto digestivo muestran que es necesario conocer su grado de madurez antes de comenzar la sustitución de las presas vivas por alimentos inertes. De esta manera, los resultados de madurez del tracto digestivo muestran que es necesario utilizar una medida de crecimiento (como la talla) en lugar de la edad para comenzar la sustitución de las presas vivas por algún alimento inerte.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Para cualquier tipo de experiencia de cultivo larvario de peces, se recomienda mantener el mejor control posible en la producción de embriones, así como en la producción de alimento vivo. De este modo, se evitarán las variaciones en las tallas o el peso de las larvas antes de iniciar un experimento. De la misma forma, para poder suministrar presas vivas de forma adecuada, debe de determinarse el estado de madurez del tracto digestivo para ajustar las sustituciones entre las distintas presas vivas utilizadas.

Se recomienda utilizar la talla en lugar de la edad de las larvas como punto de inicio de la sustitución del suministro de presas vivas por alimento inerte, para asegurar un mayor grado de madurez del tracto digestivo de las larvas.

Se sugiere utilizar a las microcápsulas como vehículo de compuestos lábiles (aminoácidos libres o antibióticos como ejemplo) dentro de otro tipo de alimento inerte, pues aun es limitado el éxito en la sustitución de alimento vivo por microcápsulas exclusivamente.

Por otra parte, se sugiere para trabajos futuros realizar un estudio de digestibilidad *in vitro* a las microcápsulas utilizadas con los extractos enzimáticos de las larvas en las tallas o edades en que se piensa realizar la sustitución de presas vivas por alimentos microencapsulados.

Asimismo, se sugiere determinar el efecto en la producción de hormonas y enzimas relacionadas con el proceso digestivo durante los diversos cambios en la alimentación durante un cultivo de peces marinos, para determinar el efecto del alimento en el proceso digestivo

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, F.J., Moyano, F.J., Díaz, M., Fernández-Díaz, C., y Yúfera, M., 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. *Aquacult. Nut.* 5: 107-113.
- Alvarez-González, C.A., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Martínez-Díaz, S.F., Hernández-Ceballos, D.E., Grayeb-Del Alamo, T., Moreno-Legorreta, M., Peña-Martínez, R. y Civera-Cerecedo, R., 2001. Effect of stocking density on the growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *J. World Aqua. Soc.*, 32: 130-137.
- Alvarez-González, C.A., 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE). Tesis de doctorado. CICIMAR-IPN, México. 164 pp.
- Ando, Y., Kobayashi, S., Sugimoto, T. y Takamaru N., 2004a. Positional distribution of n-3 highly unsaturated fatty acids in triacyl-sn-glycerols (TAG) of rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with fish and seal oils TAG. *Aquaculture* 229: 275-288.
- Ando, Y., Samoto, H. y Murayama, Y., 2004b. Positional distribution of DHA and EPA in triacyl-sn-glycerol (TAG) of *Artemia franciscana* nauplii enriched with fish oils ethyl esters and TAG. *Aquaculture* 233: 321-335.
- Anguas-Vélez, B.H., Civera-Cerecedo, R., Contreras-Olguin, M., Rueda-Jasso, R.A. y Guillaume, J., 2000. Preliminary study on the timing of weaning of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) larvae with a prepared diet: effects on growth and survival. *J. App. Aqua.* 10: 1-15.
- Applebaum, S., 1985. Rearing of the Dove sole, *Solea solea* (L.), through larval stages using artificial diets. *Aquaculture* 49: 209-221.
- Applebaum, S. L. y Holt, G.J., 2003. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Mar. Biol.* 149: 1159-1167.
- Balon, E.K., 2002. Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. *Environ. Biol. Fish.* 65: 1-35.
- Baskerville-Bridges, B. y Kling, L.J., 2000. Early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae onto a microparticulate diet. *Aquaculture* 189: 109-117.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estévez, A. y Sargent, J.R., 2003. Optimizing lipid nutrition in first feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227: 211-220

- Bessey, O.A. y Lowry, O.H., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*: 321-329
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buchet, V., Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, C.L., 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* 184: 339-347.
- Bustos, R., Romo, L., Yáñez, K., Díaz, G. y Romo C., 2003. Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. *J. Food Engin.* 56: 289-93.
- Cahu, C. y Zambonino Infante, J.L., 1995. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Biochem. Physiol.* 14 : 209-214.
- Cahu, C. y Zambonino-Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200: 161-180.
- Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J. L., Quazuguel, P. y Le Gall, M. M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171: 109-119.
- Carrasco-Chávez, V. 2004. Variación de ácidos grasos durante la ontogenia inicial y requerimientos lipídicos de juveniles en cautiverio, de cabrilla arenera. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 76 pp.
- Carvalho, A.P., Escafre, A.M., Oliva-Teles, A. y Bergot, P., 1997. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquacult. Int.* 5: 361-367.
- Chang, T.M.S., McIntosh, F.C. y Mason, S.G., 1966. Semipermeable aqueous microcapsules: I. Preparation and properties. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 44:115-128.
- Chu, F.E. y Ozkizilcik, S., 1999. Acceptability of complex microencapsulated diets by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 237: 1-9.
- Coutteau, P. y Mourente, G., 1997. Lipid classes and their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Mar. Biol.* 130: 81-91.

- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M. y Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein / energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161: 169-186.
- Díaz, R.J., Mani-Ponset, L., Guyot, E. y Connes, R., 1994. Assimilation of dissolved glucose from sea water by the seabass *Dicentrarchus labrax* and the sea bream *Sparus aurata*. *Mar. Biol.* 120: 181-186.
- Douglas, S. E., Mandla, S. y Gallart J. W., 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190: 247-260.
- Fernandez-Díaz, C. y Yúfera M., 1995. Capacity of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae to break down dietary microcapsules. *Aquaculture* 134: 279-284.
- Fernandez-Díaz, C. y Yúfera M., 1997. Detecting growth in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed microcapsules. *Aquaculture* 153: 93-102.
- García-Gómez, R.E., 2003. Efectos en el crecimiento y supervivencia de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* alimentadas con dietas microparticuladas en dos tiempos de destete. Tesis Licenciatura, UABCS. México. 56 pp.
- Gleaves-López, V., 2005. Efecto de diferentes concentraciones de lípidos sobre la expresión de la lipasa y la actividad enzimática de las principales enzimas pancreáticas en juveniles de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindacher, 1868). Tesis Licenciatura, U.A.B.C.S. México. 56 pp.
- Hargreaves, J.A., 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166: 181-212.
- Hayworth, L., 1983. Microencapsulation process. UK Patent Application GB 2103568 A.
- Hidalgo, M.C., Urea, E. y Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits, proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170: 267-283.
- Holt, G.J., 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. *J. World Aquac. Soc.* 24: 225-230.
- Hsieh, S.L., Chen, Y.N. y Kuo, C.M., 2003. Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation. *Aquaculture* 220: 903-918.
- Jones, D.A., Kurmaly, K. y Arshad, A., 1987. Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture* 64: 133-146.

- Kanazawa, A., 1995. Nutrition of Larval Fish. En: Lim, C. E. y Sessa, D. J. (Eds.), Nutrition and utilization technology in aquaculture. AOCS press, EUA. 50-59.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Sumida, S. e Iwashita, T., 1982. Rearing of larval red sea bream and ayu with artificial diets. Mem. Fat. Fish., Kagoshima Univ. 31: 185-92.
- Khemis, B., Audet, C., Fournier, R. y de la Noüe, J., 2003. Early weaning of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaun) larvae on a commercial microencapsulated diet. Aquacult. Res. 34: 445-452.
- Kolkovski, S., Arieli, A. y Tandler, A., 1997a. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. Aquacult. Internat. 5: 527-536.
- Kolkovski, S., Koven, W. y Tandler, A., 1997b. The mode of action of *Artemia* in enhancing in utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture 155: 193-205.
- Kolkovski, S. y Tandler, A., 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead sea bream *Sparus aurata* larvae. Aquacult. Nut. 6: 11-15.
- Kotrschal, K., 2000. Taste(s) and olfaction(s) in fish: a review of specialized sub-systems and central integration. Eur. J. Physiol. 439: 178-180.
- Koven, W., Kolkovski, S., Adas, E., Gamisz, K. y Tandler, A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. Aquaculture 194: 107-121.
- Langdon, C., 2003. Microparticles types for delivery nutrients to marine fish larvae. Aquaculture 227: 259-275.
- Langdon, C. J. y Buchal, M. A., 1998. Comparison of lipid-walled microcapsules and lipid spray bead for the delivery of water-soluble, low-molecular-weight materials to aquatic animals. Aquacult. Nut. 4: 275-284.
- Lazo, J.P., Holt, G.J. y Arnold, C.R., 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellata*. Aquacult. Nut. 6: 183-192.
- Lee, C.S., 2003. Biotechnological advances in finfish hatchery production: a review. Aquaculture 227: 439-458.
- López-Alvarado, J., Langdon, C.J., Teshima, S. y Kanazawa, A., 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. Aquaculture 122: 335– 346.

- Lunstedt, L.M., Bibiano Melo, J.F., Moraes, G., 2004. Digestive enzymes and metabolic profiles of *Pseudoploystoma corruscan* (Telostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. B* 137: 331-339.
- Ma, P., Sivaloganathan, B., Reddy, P.K., Chan, W.K. y Lam, T.J., 2001. Ontogeny of α -amylase gene expression in sea bass larvae (*Lates calcarifer*). *Mar. Biotechnol.* 3: 463-469.
- Maroux, S., Louvard, D. y Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta*: 282-295.
- Marchetti, M., Tossani, N., Marchetti, S. y Bauce, C., 1999. Leaching crystalline and coated vitamin in pelleted and extruded feeds. *Aquaculture* 171: 83-92.
- Munilla-Morán, R., Stara, J.R. y Barbour, A., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in culture of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 88: 337-350.
- Navarro, J.G., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V. y Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174: 155-166.
- Nicholson, J.A., y Kim, Y.S. 1975. A one step L -amino oxydase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63:110–117.
- Olalde-Rodríguez, A.M., 2005. Efecto de la espermina en la expresión del gen de la amilasa e inmunoglobulina M durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría. CIBNOR. 88 pp.
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Kaino T. y Ringø, E., 1999. Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol. Biochem.* 21: 35-44.
- Önal, U. y Langdon, C., 2000. Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquacult. Nut.* 6: 157-170.
- Önal, U. y Langdon, C., 2004. Characterization of lipid spray beads for delivery of glycine and tyrosine to early marine fish larvae. *Aquaculture* 233: 495-511.
- Önal, U. y Langdon, C., 2005. Development and characterization of complex particles for delivery of amino acids to early marine fish larvae. *Mar. Biol.* 146: 1031-1038.
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M. y Ortíz-Galindo, J. L., 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219: 633-644.
- Pedroza-Islas, R., Gallardo, P., Vernon-Carter, E.J., García-Galano, T., Rosas, C., Pascual, C. y Gaxiola, G., 2004. Growth, survival, quality and digestive enzyme

- activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquacult. Nutr.* 10: 167-173.
- Péres, A., Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., Le Gall, M.M., Quazuguel, P., 1996. Amylase and trypsin response to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 15: 237–242.
- Pillay T.V.R., 1980. *Feed Fish Technology*. FAO/ADCP Report. 362 pp.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. y Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155: 103-115.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. y Dinis, M. T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179: 465-473.
- Robin, J.H., Regost, C., Arzel, C. y Kaushik, S.J., 2003. Fatty acid profile of fish following a change in dietary fatty acid source: model of fatty acid composition with a dilution hypothesis. *Aquaculture* 225: 283-293.
- Robin, J.H. y Vincent, B., 2003. Microparticulated diets as first food for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture* 225: 463-474.
- Rodriguez, C., Pérez, J.A., Diaz, M., Izquierdo, M.A., Fernandez-Palacios y Lorenzo, A., 1997. Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture* 150: 77-89.
- Rønnestad, I., Thorsen, A. y Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177: 201-216.
- Rosales-Velázquez, M.O., 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 62 pp.
- Rosenlund, G., Karlsen, Ø., Tveit, K., Mangor-Jensen, A. y Hemre G.-I., 2004. Effect of feed composition and feeding frequency on growth, feed utilization and nutrient retention of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquacult. Nut.* 10: 371-378.
- Rosenlund, G., Stoss, J. y Talbot, C., 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155: 183–191.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J. y Fernández-Palacios, H., 1997. The improved incorporation of polyunsaturated fatty acids and changes in liver structure in larval gilthead seabream fed on microdiets. *J. Fish Biol.* 51: 869–879.

- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. y Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177: 191–199.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. y Bell, J.G., 2002. The lipids. En: Halver, J. E. (Ed.). *Fish Nutrition*, 3ra edición, Cap. 4. San Diego: Academic Press, 181–257.
- Sato, N. y Murata, N., 1988. Membrane lipids. *Methods Enzymol.* 167: 251-259.
- Strickland, J. D. H. y Parsons, T. R., 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada. 309 pp.
- StatSoft, Inc., 2004. STATISTICA (data analysis software system), version 6.1. www.statsoft.com.
- Tocher, D.R., 2002. Metabolism and function of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11: 1-76.
- Tocher, D.R. y Ghioni, C., 1999. Fatty acid metabolism in marine fish: low activity of fatty acyl delta 5 desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids* 34: 433–440.
- Tolomei, A., Crear, B. y Johnston, D., 2003. Diet immersion time: effects on growth, survival and feeding behavior of juvenile southern rock lobster *Junus edwardsii*. *Aquaculture* 219: 303-316.
- Tucker, J.W., 1998. *Marine Fish Culture*. Kluwer. EUA.
- Uys, W., Hetch, T. y Walters, M., 1987. Changes in digestive enzymes activities of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) after feeding. *Aquaculture* 63: 243-250.
- Walford, J., Lim, T.M. y Lam, T.J., 1991. Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of seabass (*Lates calcarifer*) larvae: do the larvae ingest and digest protein membrane microcapsules? *Aquaculture* 92: 225-235.
- Wang, Q., Takeuchi, T., Hirota, T., Ishida, S., Miyakawa, H. y Hayasawa, H., 2004. Application of microparticle diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Fisheries Sci.* 70: 611-619.
- Watanabe, T. y Kiron, V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124: 223-251.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M. C., Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F.J., García-Gallego, M. y Parra, G., 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquacult. Nut.* 6: 143-152.

- Yúfera, M., Kolkovski, S., Fernández-Díaz, C. y Dabrowski K., 2002. Free amino acid leaching from a protein-walled microencapsulated diet for fish larvae. *Aquaculture* 214: 273-287.
- Yúfera M., Kolkovski, S., Fernández-Díaz, C., Rinchar, J., Lee, K. J. y Dabrowski, K., 2003. Delivering bioactive compounds to fish larvae using microencapsulated diets. *Aquaculture* 227: 277-291.
- Yúfera, M., Pascual, E. y Fernández-Díaz C., 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing larvae of marine fish. *Aquaculture* 177: 249-256.
- Yúfera, M., Sarasquete, M.C. y Fernández-Díaz, C., 1996. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Mar. Freshwater Res.* 47: 211-216.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. y Peres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 127: 608-614.
- Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, C., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 477-487