

Tesis defendida por
José Pablo Fuentes Quesada
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director del Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Miembro del Comité

M.C. Vicente Ferreira Bartrina
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador del Posgrado en Ciencias en
Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Abril, 2014

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



Programa de Posgrado
en Ciencias en Acuicultura

Efecto del tipo de lípido en la actividad de las lipasas digestivas durante la etapa larvaria del
lenguado de California (*Paralichthys californicus*)

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:
José Pablo Fuentes Quesada

Ensenada, Baja California, México
2014

Resumen de la tesis de José Pablo Fuentes Quesada, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Efecto del tipo de lípido en la actividad de las lipasas digestivas durante la etapa larvaria del lenguado de California (*Paralichthys californicus*)

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

El lenguado de California (*Paralichthys californicus*) es una especie con alto potencial acuícola para el Noroeste de México, por su alto valor de mercado y la buena aceptación del consumidor. Sin embargo, su cultivo larvario presenta limitaciones debido a la falta de conocimiento específico sobre su capacidad digestiva y protocolos de destete adecuados durante su etapa larval. Los lípidos constituyen el segundo nutriente de importancia en la nutrición larval, no obstante son escasos los estudios evaluando la digestión de lípidos. Es por esto, que los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar la actividad de la lipasa dependiente de las sales biliares (LDSB) y la fosfolipasa A₂ (FLA₂) en el tracto digestivo del lenguado de California y evaluar el efecto del tipo de lípido en el crecimiento, supervivencia y la actividad enzimática, con el fin de obtener información adecuada para formular dietas y desarrollar estrategias de alimentación acorde a la capacidad digestiva de la larva. Dos tipos de lípidos fueron evaluados como enriquecedores del alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) durante los primeros 42 días después de la eclosión (DDE); uno de origen marino (Algamac-3000) y otro de origen terrestre (aceite de linaza). Se tomaron muestras para las pruebas enzimáticas cada dos días hasta el día 18 después de la eclosión y cada 4 días hasta los 42 DDE. Se registró la longitud total (LT) y el peso seco (PS) de los animales. Al final del bioensayo (42 DDE), se evaluó la calidad de la larva con aumento drástico de la temperatura de 18 a 32 °C. No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre tratamientos en cuanto al crecimiento en LT. Sin embargo, se encontró un crecimiento significativamente mayor en PS y supervivencia en las larvas del tratamiento con lípidos de origen marino 24.24 ± 1.80 mg y 21.23 ± 0.39 % en comparación con las de origen terrestre 9.36 ± 1.34 mg y 3.72 ± 4.79 %, respectivamente. Se encontró actividad de la LDSB y FLA₂ desde los 3 DDE antes del inicio de la alimentación exógena. La actividad de la LDSB en ambos tratamientos se mantuvo sin diferencias significativas hasta los 30 DDE donde se registró un aumento significativo en el tratamiento marino, mientras que en el tratamiento terrestre se retrasó hasta los 34 DDE, sin embargo regreso a valores comparables con el tratamiento marino para los 42 DDE. En cuanto a la actividad de la FLA₂ no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos durante el bioensayo. Lo anterior sugiere que existe un efecto negativo temporal del tipo de lípido en la actividad de la LDSB pero no en la FLA₂. Así mismo, en la prueba de calidad de larvas, se observó que las larvas del tratamiento terrestre resultaron con un índice de estrés mayor (29.92 ± 14.66) en comparación con las del tratamiento marino (3.75 ± 2.65). Esto sugiere que el aceite de linaza no proporcionó los ácidos grasos esenciales (LC-PUFAs n-3) necesarios para un desarrollo larvario y respuesta al estrés adecuados, por lo cual no es apropiado como enriquecedor del alimento vivo en el cultivo larvario del lenguado de California, ya que los valores son significativamente inferiores en crecimiento, supervivencia y capacidad de respuesta al estrés con respecto a los lípidos de origen marino.

Palabras clave: *Paralichthys californicus*, Lípidos, Actividad enzimática, Cultivo larvario, Lipasa dependiente de sales biliares, Fosfolipasa A₂.

Abstract of the thesis presented by José Pablo Fuentes Quesada as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture

The effect of lipid type on lipid digestive enzymes during the larval stage of the California halibut (*Paralichthys californicus*)

Abstract approved by:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

The California halibut (*Paralichthys californicus*) is a flounder species with a high potential for aquaculture in the Northwest of México, due to its market value and consumer preference for their color, texture and flavor. However, the development of culture techniques for this species has been limited due to the lack of knowledge, among other factors, of the digestive capacity and appropriate weaning protocols during their larval period. Lipids are the second most important nutrients in larval nutrition, but studies on lipid digestion are scarce. Thus, the objectives of this study were to characterize two important lipid digestion enzymes, the bile salt-dependent lipase (BSDL) and phospholipase A₂ (PLA₂) activities in the digestive tract of California halibut and evaluated the effect of lipid type on growth, survival and enzymatic activity during the larval period, in order to increase our knowledge to formulate diets and develop feeding strategies according to the digestive capacity of larvae. Two type of lipids were evaluated as enrichments of live feed (rotifers and *Artemia*) and used as food during the first 42 days after hatching (DAH); one from a marine source (Algamac-3000) and one from a terrestrial source (flaxseed oil). Larvae were collected for enzyme assays every two days until 18 DAH and every four days until 42 DAH. Total length (TL) and dry weight (DW) were measured every sampling date. Additionally, at the end of experiment the quality of the larvae was assessed by gradually increasing the water temperature from 18 °C to 32 °C. No significant differences in larval final TL were found between treatments. However, growth in terms of DW and survival were significantly higher in larvae fed live-feed enriched with marine lipids, 24.24 ± 1.80 mg y 21.23 ± 0.39 %, compared to those enriched with flaxseed oil 9.36 ± 1.34 mg y 3.72 ± 4.79 %. BSDL and PLA₂ activity were detected before exogenous feeding commenced (3 DAH). BSDL activity was similar in both treatments until 30 DAH, when a significantly higher peak in total activity in the marine treatment was observed, while the terrestrial treatment peak in activity was observed until 34 DHA. Nonetheless, activity returned to comparable values in both treatments by 42 DHA. No significant differences were found in PLA₂ activity between treatments. This suggests that there is a temporary negative effect of lipid type in BSDL activity, but not in the PLA₂. The larval quality tests revealed that larvae fed the terrestrial oils had a higher stress index (29.92 ± 14.66) than those fed the marine oils (3.75 ± 2.65). This suggests that flaxseed oil did not provide essential fatty acids (LC-PUFAs n-3) required for larval development and appropriate stress response and thus is not a suitable enrichment-lipid for live prey in California halibut larval culture, as the values of final DW, survival and stress response were significantly lower with respect to the marine lipid source.

Keywords: *Paralichthys californicus*, Lipids, Enzymatic activity, Larval culture, Bile salt-dependent lipase, Phospholipase A₂.

Dedicatoria

A mi Padre,

Pasa el tiempo, poco tal vez, lento o rápido, algunas veces, pero sólo basta ver mis manos o el mar para recordarte y que me arranques una sonrisa. Pa acá estoy, haciendo lo que me enseñaste durante nuestros días de pesca, pescando sueños, mis sueños, ¿a dónde me llevarán? no lo sé aún, pero el saber que estás a mi lado es lo que importa y me hace feliz.

Agradecimientos

A Dios, por ser mi fuerza y mi refugio.

A mi Madre, por estar siempre a mi lado, dándome sus palabras de amor, paz, aliento a pesar de la distancia y ser mi ejemplo a seguir.

A mis hermanas, Jimena y Valeria, y hermanos Sebas y Andrés, que son mi motivación a seguir adelante.

A mi familia, Tita, Tía Coca, Tía Lily, Tío Lelo, Tío Gilbert, Tío Topo, Tía Andrea, Tío Diego, Tía Julie, Ana, Kattia, Jim, Edguillar, Andy, Gia y Roberto que han sido parte de mi vida y que me ha apoyado en todo este camino con sus oraciones, palabras y sonrisas.

A Dr. Juan Pablo Lazo, por ser mi mentor y guía en este proceso y, enseñarme que la ciencia es más que tubos, extractos y ensayos.

A mis sinodales, Dr. Benjamín Barón y M. en C. Vicente Ferreira, por su ayuda, consejos y aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Mónica Hernández y Dra. Beatriz Cordero por haberme orientado y apoyado durante mi llegada y estancia en Ensenada.

Al Dr. Manuel Segovia, Dr. Miguel Ángel del Río, Dra. Pilar Sánchez y Dr. Eugenio Díaz por sus enseñanzas y conocimientos compartidos.

A la Dra. Maria Celia Portella y Dr. Marcelo Tesser por recibirme durante mi estancia en Brasil.

A mis compañeras y compañeros Raquel, Araceli, Miriam, George, Robert, Rigo, Luis, David, Paul, Omar, que han hecho que estos dos años y un poco más, hayan valido la pena. Además de Sara, Vivi y Faby.

A Jesús y Uvi, técnicos del laboratorio de peces marinos por estar siempre dispuestos a brindarme su ayuda y apoyo durante la fase experimental.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), al Departamento de Acuicultura por aceptarme en el programa de maestría y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para realizar mi maestría.

Y a todos los amigos y amigas que he conocido durante este tiempo en la maestría, cross, flag, Brasil, congresos, y por todos los que vendrán.

Contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Cultivo de peces planos.....	2
1.3. Lenguado de California.....	4
1.4. Ontogenia del sistema digestivo en larvas de peces marinos.....	6
1.5. Alimentación y nutrición de larvas de peces marinos.....	7
1.6. Pruebas de calidad de larva.....	10
1.7. Digestión en larvas de peces marinos.....	11
Capítulo 2. Hipótesis y objetivos.....	14
2.1. Hipótesis.....	14
2.2. Objetivo general.....	14
2.3. Objetivos específicos.....	14
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	15
3.1. Obtención de las larvas.....	15
3.2. Cultivo larval.....	15
3.3. Protocolo de alimentación.....	16
3.4. Diseño experimental.....	17
3.5. Cultivo del alimento vivo.....	17
3.6. Enriquecimiento del alimento vivo con lípidos de origen marino.....	18
3.7. Enriquecimiento del alimento vivo con lípidos de origen terrestre.....	18
3.8. Crecimiento de las larvas en longitud y peso.....	19
3.9. Tasa de crecimiento específico.....	19
3.10. Toma de muestras para la preparación del extracto enzimático.....	20
3.11. Análisis de la actividad de la lipasa dependiente de sales biliares.....	21
3.12. Análisis de la fosfolipasa A ₂	23
3.13. Análisis químico proximal.....	24
3.14. Análisis de ácidos grasos.....	24
3.15. Pruebas de calidad de larva.....	25
3.16. Análisis estadístico.....	27
Capítulo 4. Resultados.....	28
4.1. Crecimiento larval.....	28
4.2. Actividad enzimática de la lipasa dependiente de sales biliares.....	32
4.3. Actividad enzimática de la fosfolipasa A ₂	36
4.4. Enriquecimiento del alimento vivo.....	39
4.4.1. Composición proximal.....	39
4.4.2. Perfil de ácidos grasos: Rotíferos.....	40
4.4.3. Perfil de ácidos grasos: <i>Artemia</i>	44
4.5. Pruebas de calidad de larva.....	48

4.5.1. Prueba de estrés térmico.....	48
4.5.2. Destete.....	49
Capítulo 5. Discusión.....	50
5.1 Crecimiento y desarrollo larval.....	50
5.2 Actividad enzimática: lipasa dependiente de sales biliares.....	55
5.3 Actividad enzimática: fosfolipasa A ₂	58
5.4 Pruebas de calidad de larva.....	61
Conclusiones.....	65
Recomendaciones.....	66
Referencias bibliográficas.....	67
Anexos.....	79

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Lenguado de California.....	5
2	Sistema de enriquecimiento (a) y dispositivo de limpieza (b) del alimento vivo.....	18
3	Rotífero (<i>Brachionus plicatilis</i>) enriquecido por 12 horas con una emulsión de aceite vegetal teñido con rojo Sudán IV.....	19
4	Forma de la disección realizada a las larvas mayores de 8 DDE, las líneas rojas muestran la dirección del corte.....	21
5	Diseño del experimento para evaluar calidad de la larva del lenguado de California a 42 DDE alimentado con dos tipos de enriquecedores.....	26
6	Crecimiento en longitud (mm) de las larvas del <i>P. californicus</i> utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo.....	28
7	Características externas durante el desarrollo larval del lenguado de California alimentado con el tratamiento marino o control.....	31
8	Actividad total de la LDSB durante el crecimiento larval del <i>P. californicus</i> (a) y utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo (b).....	33
9	Actividad específica de la LDSB durante el crecimiento larval del <i>P. californicus</i> (a) y utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo (b).....	35
10	Actividad total de la FLA2 por larva durante el crecimiento larval del <i>P. californicus</i> (a) y utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo (b).....	37
11	Actividad específica de la FLA2 durante el crecimiento larval del <i>P. californicus</i> (a) y utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo (b).....	38
12	Prueba de estrés térmico a 32 °C, según Dhert <i>et al.</i> , (1992).....	48

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Número de larvas y/o tractos digestivos usadas cada día de muestreo para las pruebas enzimáticas.....	21
2	Valores iniciales y finales de peso (mg) por tanque y tratamiento.....	29
3	Porcentaje de crecimiento en LT por día (%C/día) de las larvas de lenguado en cada una de las etapas de desarrollo.....	30
4	Valores de proteína cruda y lípidos totales (%) del alimento vivo 12 horas después del enriquecimiento con dos fuentes de lípidos (enriquecedores).....	39
5	Perfil de ácidos grasos en los rotíferos antes y después de enriquecer. Los valores están expresados en porcentaje de ácidos grasos identificados.....	40
6	Perfil de ácidos grasos en los rotíferos antes y después de enriquecer. Los valores están expresados en g/100g de rotíferos en peso seco.....	42
7	Perfil de ácidos grasos en la Artemia antes y después de enriquecer. Los valores están expresados en porcentaje de ácidos grasos identificados.....	44
8	Perfil de ácidos grasos en las artemias antes y después de enriquecer. Los valores están expresados en g/100g de artemias en peso seco.....	46
9	Valores de supervivencia (%) en las larvas de lenguado después del destete.....	49

Capítulo 1

1. Introducción

1.1. Generalidades

El consumo global de productos acuícolas se ha incrementado en las últimas décadas, pasando de 45 millones de toneladas métricas a inicios de los años 70, a 131 millones de toneladas para el 2011, de las cuales casi el 50% provino de la acuicultura (Delgado *et al.*, 2003; FAO, 2012). Este aumento en la producción acuícola ha venido a satisfacer el incremento de la demanda de productos acuícolas resultante del crecimiento poblacional (Godfray *et al.*, 2010) y del déficit ocasionado por el colapso o la reducción de la producción pesquera mundial (Pauly *et al.*, 2005).

Duarte *et al.*, (2009) mencionan que la acuicultura marina representa una opción viable para la producción de proteína animal en la demanda futura de alimentos. A pesar de esto, son los sistemas de agua dulce los que generan más del 41% de la producción acuícola mundial y cubren menos del 1% de la superficie del planeta. El 84% de la producción de peces se desarrolla en sistemas de agua dulce, el 10.1% en agua salobre y únicamente el 5.9% en el mar (Gjedrem *et al.*, 2012).

La acuicultura en Latinoamérica representa el 3.1% del total a nivel mundial (FAO, 2012) siendo Chile, principalmente con el salmón, el mayor productor de la región (Johnson, 2004). Recientemente, se han realizado esfuerzos para el cultivo de otros peces marinos a escala comercial como la Cobia (*Rachycentron canadum*) en Brasil (Sampaio *et al.*, 2010), el Pargo Manchado (*Lutjanus guttatus*) en Costa Rica (Fuentes, 2011) y el engorde de atún aleta azul (*Thunnus thynnus*) en Baja California, México (Del Mora y Vaca, 2009).

En México, varios grupos de trabajo tanto públicos como privados se encuentran investigando y desarrollando técnicas de producción de distintas especies de peces marinos como la Totoaba (*Totoaba macdonaldi*), el botete (*Sphoeroides annulatus*), el pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) el lenguado de California (*Paralichthys californicus*), la corvina blanca (*Atractoscion nobilis*), la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*), el

huachinango (*Lutjanus peru*), el robalo (*Centropomus sp*) y el jurel (*Seriola lalandi*) (Avilés y Castelló, 2004; García-Ortega y Lazo, 2004; Zarza-Mesa *et al.*, 2006).

Estos intentos no han tenido el éxito esperado, en parte por el alto costo de inversión y de operación que tienen los sistemas marinos. A esto se le suma que el abastecimiento constante y en cantidades suficientes de alevines aún es limitado, principalmente por la falta de conocimiento de las condiciones ambientales óptimas para el cultivo, de los requerimientos nutricionales, de conocimiento sobre el desarrollo ontogénico y de la fisiología digestiva, en forma particular, de la etapa larval, que es el momento más crítico (Planas y Cunha, 1999; Lazo, 2000a; Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Rønnestad *et al.*, 2013).

Durante el cultivo larvario y especialmente en los peces marinos, es esencial el suministro de alimento vivo, principalmente rotíferos y *Artemia* en alguna fase de este período (van der Meeren *et al.*, 2008; Conceição *et al.*, 2010). Estos organismos son utilizados comúnmente porque su producción es posible en los laboratorios, además, su movimiento desencadena en las larvas un comportamiento de búsqueda y captura (Cahu y Zambonino-Infante, 2001). Sin embargo, estos alimentos tienen limitaciones, ya que son deficientes en nutrientes como los ácidos grasos esenciales (AGE) (Watanabe *et al.*, 1983) y su producción implica una inversión en infraestructura y mano de obra especializada, lo que incrementa los costos de operación (Kanazawa, 2000).

Existe un gran interés dentro del sector acuícola marino por el desarrollo de microdietas formuladas que sustituyan parcial o totalmente el uso de presas vivas en la alimentación larval y que sean adecuadas para la fisiología digestiva de la larva (Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Bonaldo *et al.*, 2011). Para lograrlo, resulta indispensable conocer de manera detallada el desarrollo del sistema digestivo y de sus glándulas accesorias, así como la actividad enzimática y la capacidad digestiva de la larva.

1.2. Cultivo de peces planos

El desarrollo del cultivo de peces planos se ha convertido en una alternativa de producción para la acuicultura en los últimos años (Brown, 2002; Schwarz, 2003; Suquet *et al.*, 2009), debido a la excelente calidad de la carne y sabor, alto precio y su creciente demanda (Lobos *et al.*, 1992). El desarrollo de la tecnología para la producción de estos peces inició a mediados de la década de los

años 70 con el lenguado Japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Kikuchi y Takeda, 2001), una especie de gran importancia comercial en países como China, Corea del Sur y Japón debido a que el sabor de su carne es muy apreciado. La producción acuícola de esta especie para el 2010 fue alrededor de 45,000 toneladas con un valor de más de 485 millones de dólares (USA) (Howell y Yamashita, 2005; FAO, 2013). El lenguado del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) inició su cultivo en la década de los años 80, y aunque se considera que sus larva son frágiles y pequeñas (Berg, 1997), para el 2005 la producción acuícola fue de 1,445 toneladas, de las cuales Noruega produjo el 80% (Suquet *et al.*, 2009).

El rodaballo Europeo o turbot (*Scophthalmus maximus*) es otra especie de pez plano importante, para el año 2010 alcanzó una producción de 11,000 toneladas, con una capacidad de expansión de hasta 16,500 toneladas para el 2012. El precio en el mercado es fluctuante pero se mantiene alrededor de los 8 euros/kg, con un precio máximo de 13 euros/kg; España es el mayor productor con un 84% de la producción mundial (Bjørndal y Øiestad, 2010).

El lenguado Senegalés (*Solea senegalense*) se ha convertido en otra opción para el maricultivo, ya que su ciclo de producción se ha cerrado de forma exitosa, lo que permite producir animales de tamaño comercial bajo condiciones intensivas. Sin embargo, su cultivo no se encuentra tan diseminado por la falta de alevines producidos comercialmente (Cañavate, 2005). Entre otras especies de peces planos con potencial acuícola, se puede mencionar el sol (*Solea solea*) debido a que su demanda es constante y su pesquería ha declinado (Imsland *et al.*, 2003).

En América, las especies como el lenguado de verano (*Paralichthys dentatus*) y el halibut o fletán del Pacífico (*Hippoglossus stenolepis*) tienen importancia tanto a nivel comercial como deportivo, por lo que se ha estudiado su biología para conocer y desarrollar su cultivo a nivel comercial. El lenguado de verano se encuentra de manera natural en la costa atlántica desde Maine hasta Florida, USA, mientras que el halibut del Pacífico, se captura en la zona Norte del Océano Pacífico y es muy apreciado en Canadá y Estados Unidos (Liu *et al.*, 1994; Bengtson, 1999; Brown *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, Chile ha introducido e impulsado el cultivo de varias especies de peces planos, entre la cuales se encuentra el rodaballo (*S. maximus*), el lenguado Japonés (*P. olivaceus*) y el halibut del Atlántico (*H. hippoglossus*) (Alvial y Manríquez, 1999). Además de estas especies,

también se ha desarrollado el cultivo del lenguado fino (*Paralichthys adspersus*) como una alternativa para desarrollar la acuicultura marina propia de la zona, tomando la información ya existente en relación con el cultivo de otros peces planos y la generada para esta especie (Silva y Oliva, 2010). Estas especies se cultivan tanto en sistemas de recirculación en tierra como en jaulas marinas.

Entre los mayores productores de peces planos se encuentran los países asiáticos, China, Corea del Sur y Japón con más del 92% de las 148,808 toneladas producidas a nivel mundial, les siguen los países europeos, España, Noruega, Francia, Portugal, Dinamarca, Reino Unido, Islandia, Bélgica y Escocia, que aportan el 7.7%. Mientras que en América, Estados Unidos, Canadá y Chile producen menos del 0.3% del total de peces planos a nivel mundial (Caro, 2010; FAO, 2012).

En los últimos años, como una medida para disminuir la presión sobre los recursos pesqueros de una especie de lenguado con importancia comercial local y suplir la demanda del mercado grupos de investigación en la Universidad de California, Estados Unidos y del CICESE en, Baja California, México, han realizado investigación básica y aplicada relacionada con el desarrollo de los protocolos de cultivo y engorde del lenguado de California (*Paralichthys californicus*), con especial énfasis en la etapa larval (Herzka *et al.*, 2003; Conklin *et al.*, 2003; Lazo y Barón, 2005). Como se mencionó anteriormente, ésta etapa se considera una fase crítica de la producción debido al escaso desarrollo del tracto digestivo al momento de la eclosión y a la escasa información relacionada con los requerimientos nutricionales durante este período, en este sentido, es necesario caracterizar las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal de las larvas, para entender su capacidad digestiva durante la ontogenia de su sistema digestivo. Estos conocimientos contribuirán a la obtención de alevines de calidad y en cantidades adecuadas para sustentar el desarrollo de su cultivo comercial en la región.

1.3. Lenguado de California

El Lenguado de California (*Paralichthys californicus*) (Figura 1) pertenece a la familia Paralichthyidae, se distribuye desde Long Beach, Washington, Estados Unidos hasta Bahía Magdalena en Baja California Sur, México (Allen, 1988). Esta especie es un recurso pesquero de importancia en la costa de California, Estados Unidos y en el Pacífico norte mexicano (Haaker *et*

al., 1975), además, es un recurso importante en la pesca deportiva (Love y Brooks, 1990), la demanda de este lenguado está asociada con la excelente calidad y exquisito sabor (Fischer *et al.* 1995). En México, el 95% de las capturas de peces planos ocurre en el noroeste (CONAPESCA, 2010), con un promedio anual de 3,000 toneladas entre los años 2006 y 2011, donde la especie más importante es el lenguado de California (I.N.P., 2011).

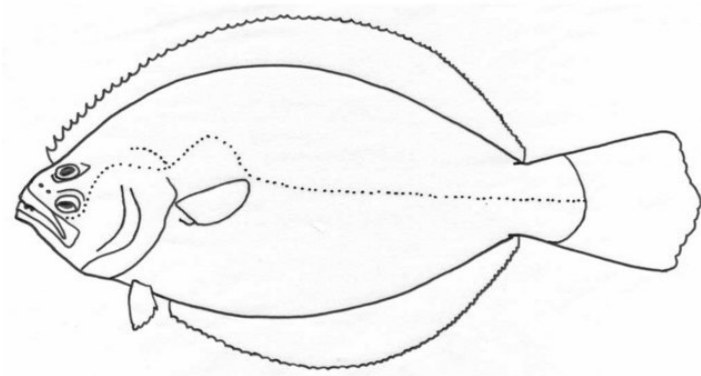


Figura 1. Lenguado de California (*Paralichthys californicus*; Ayres 1859) (Robertson, 2006. <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Paralichthys+californicus&b=FB4228&l=spanish>)

La talla de primera madurez sexual del lenguado de California varía de acuerdo al sexo. En los machos es de 23 cm de longitud total (LT) promedio, con una edad de entre dos y tres años, mientras que en las hembras es a los tres o cuatro años, con una LT promedio de 47 cm LT, y tienen la característica de ser desovadores parciales (Love y Brooks, 1990). Tienen patrones de movimiento desde la costa hasta el océano durante la etapa juvenil y en primavera los organismos adultos maduros sexualmente migran de aguas profundas hacia la costa (5-18 m) para llevar a cabo el desove que ocurre entre los meses de febrero y agosto (Allen, 1990). Bajo condiciones de cautiverio puede desovar de manera natural o inducida (Caddell *et al.*, 1990).

Los huevos son pelágicos, tienen forma esférica (700-800 micras de diámetro), el vitelo es homogéneo y tienen un pequeño glóbulo de aceite (Oda, 1991). Dependiendo principalmente de la temperatura del agua, entre los 27 y 42 días después de la eclosión, empieza a ocurrir la metamorfosis en las larvas, en esta etapa de su vida inician su característico comportamiento de asentamiento y la simetría de su cuerpo cambia de una forma bilateral a una forma asimétrica, aplanada y elíptica y su comportamiento cambia de pelágico a bentónico, posándose en el sustrato sobre uno de los lados de su cuerpo (Tanaka *et al.*, 1996; Juárez-Casillas, 2009).

1.4. Ontogenia del sistema digestivo en larvas de peces marinos

Es conocido que durante el primer mes de vida, muchas de las larvas de peces marinos experimentan una serie de cambios morfológicos y fisiológicos de los órganos digestivos, relacionados con el aumento de su funcionalidad y con su maduración (Dabrowski, 1984; Kolkovski, 2001), por lo que se considera que la capacidad digestiva de las larvas en el inicio de su alimentación exógena es limitada (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Yúfera y Darías, 2007).

Estudios previos en diferentes peces marinos indican que al momento de la eclosión el sistema digestivo de las larvas está inmaduro, órganos como el estómago, y las glándulas accesorias hígado y páncreas tienen poca o nula funcionalidad, y por consiguiente la cantidad y el tipo de enzimas digestivas presentes en la larva son relativamente bajas (Gisbert *et al.*, 2004; Lazo *et al.*, 2007; Suzer *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010). El estudio de la ontogenia del sistema digestivo permite conocer los aspectos básicos de la anatomía y funcionalidad digestiva en cada momento del desarrollo larval, con lo cual se puede conocer la capacidad digestiva de las distintas especies de interés comercial.

La alimentación de las larvas previo a la apertura de la boca es exclusivamente endógena, los nutrientes provienen de las reservas del saco vitelino. La apertura de la boca y la total absorción del vitelo ocurren de manera sincronizada y es cuando inicia la alimentación exógena (Yúfera y Darías, 2007). Varios factores como la temperatura influye la tasa de absorción del vitelo (Polo *et al.*, 1991).

En el sol senegalés (*S. senegalensis*) (Ribeiro *et al.*, 1999) y la urta (*Pagrus auriga*) (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007) la diferenciación del tracto digestivo inicia al segundo día después de la eclosión (DDE) cuando se da la apertura de la boca y el ano, entonces se pueden distinguir cinco regiones: la cavidad buco-faríngea, esófago, estómago incipiente e intestino anterior y posterior, mientras que en la corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) (Galaviz *et al.*, 2011) y en el besugo (*Pagrus pagrus*) (Darías *et al.* 2007) la diferenciación inicia en el tercer DDE.

En el lenguado de California (*P. californicus*), los estudios sobre la ontogenia del sistema digestivo han mostrado que al momento de la eclosión el tracto digestivo es un tubo recto y poco

diferenciado. Hasta el tercer DDE es cuando se da la apertura de la boca y del ano, lo que coincide con la diferenciación del tubo digestivo y la primera alimentación exógena. El páncreas endocrino y exocrino es visible desde la eclosión y un día antes de la alimentación exógena ya se detectan los gránulos de zimógenos (i.e., precursores de enzimas digestivas), los cuales aumentan una vez que se inicia la alimentación exógena. La diferenciación del estómago ocurre entre los días 27 y 30 DDE, cuando aumentan las glándulas gástricas y se pueden observar tres regiones histológicas bien diferenciadas: cardíaca, fúndica y pilórica, este momento también coincide con el inicio de la migración ocular y la metamorfosis (Gisbert *et al.*, 2004; Zacarías-Soto, 2007; Juárez-Casillas, 2009).

1.5. Alimentación y nutrición de larvas de peces marinos

El aporte de los nutrientes adecuados durante las primeras etapas del desarrollo larval es primordial para garantizar un óptimo crecimiento de los animales y, debido a la reducida capacidad digestiva de las larvas para digerir y absorber las proteínas (i.e., aminoácidos), lípidos (i.e., ácidos grasos) y carbohidratos provenientes de las microdietas, este momento es crítico para su supervivencia (producción de enzimas y regulación hormonal) (Lazo, 2000a; Kolkovski, 2001; Zambonino-Infante y Cahu, 2007; Rønnestad *et al.*, 2007).

El conocimiento de la composición química del alimento vivo (i.e., zooplancton) es de gran utilidad durante el cultivo larvario, ya que el uso de dietas que no satisfagan los requerimientos nutrimentales (i.e., aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales) provoca un desarrollo reducido o anormal (i.e., deformidades del esqueleto) lo que trae consigo una baja tasa de supervivencia (Torrentara y Tacon, 1989; Civera-Cerecedo *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2008).

Las proteínas se consideran el nutriente principal de la dieta de las larvas y son las más estudiadas, ya que aportan los aminoácidos necesarios para sostener la rápida tasa de crecimiento y son sustratos importantes para la obtención de energía metabólica en los primeros días del desarrollo larval (Rønnestad *et al.*, 2003, 2007). Con el fin de suministrar a las larvas un alimento de mejor calidad favoreciendo así el crecimiento y supervivencia de las larvas, Aragão *et al.*, (2004) lograron enriquecer el pool de aminoácidos libres (AAL) de rotíferos y metanauplios de *Artemia* utilizando microalgas y microdietas formuladas.

Los lípidos constituyen el segundo nutriente de mayor importancia en la nutrición de peces, e forma particular durante la etapa larvaria. Son compuestos orgánicos de origen biológico, solubles en solventes orgánicos (i.e., benceno, éter, cloroformo, metanol), y casi o completamente insolubles en agua. Se pueden clasificar en lípidos saponificables (los que poseen ácidos grasos, AGs), los cuales ante un agente alcalino se hidrolizan y producen ésteres de ácidos grasos, entre este grupo están los triacilglicéridos, ceras y fosfoglicéridos. Los no saponificables (no poseen ácidos grasos) no experimentan la reacción de hidrólisis por el agente alcalino, en este grupo podemos encontrar las prostaglandinas, terpenoides, esteroides, colesterol (Higgs y Dong, 2000; Sargent *et al.*, 2002).

Otra clasificación común para los lípidos, se basa en su polaridad. Los lípidos neutrales son aquellos que carecen de polaridad y son casi totalmente hidrofóbicos (i.e., triglicéridos), mientras que los lípidos polares o anfipáticos son los que poseen una región hidrófila y otra hidrofóbica (i.e., fosfolípidos), lo que le confiere la propiedad de poder mezclarse con solventes polares como el agua y formar emulsiones.

Los AGs presentes en los lípidos saponificables poseen un grupo carboxilo y una cadena hidrocarbonada larga que termina en un grupo metilo. Estos AGs pueden contener de 4 a 36 átomos de carbono y, los más abundantes son los que tienen 16 y 18. Los AGs se pueden clasificar en saturados cuando no poseen enlaces dobles entre los átomos de carbono, lo que los hace sólidos a una temperatura ambiente (i.e., 25°C) y los insaturados que poseen uno (monoinsaturados) o más (poliinsaturados) enlaces dobles a lo largo de la cadena hidrocarbonada, lo que provoca que sean menos rígidos por la disposición espacial menos compacta de las cadenas hidrocarbonadas (Higgs y Dong, 2000; Tocher, 2003).

Al igual que otros vertebrados, los peces no pueden sintetizar ácidos grasos de 18 carbonos o más, con dos o más enlaces dobles, ya que carecen de las enzimas delta 12 y 15 desaturasas. Es por esto que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que tienen más de 18 carbonos, con uno o dos enlaces dobles (PUFAs, por sus siglas en inglés), o los altamente insaturados con más de 20 carbonos y con tres o más enlaces dobles (LC-PUFAs, por sus siglas en inglés), se requieren en la dieta para un crecimiento y desarrollo adecuados (Sargent *et al.*, 1997; 1999a, Bell *et al.*, 2003). Los PUFAs y LC-PUFAs son llamados ácidos grasos esenciales (AGE).

Los AGE son principalmente el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) y el ácido araquidónico (ARA, C20:4n-6) y, son importantes para el mantenimiento de la estructura y función de las membranas celulares, son componentes del sistema nervioso y para el desarrollo de la visión, son precursores de activadores biológicos del metabolismo, (i.e., eicosanoides y hormonas), participan en la pigmentación en los peces planos y en la respuesta a estresores como la temperatura (Kanazawa, 1997; Estévez *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 1999a; Tocher, 2003; Vizcaíno-Ochoa *et al.*, 2010). Sargent *et al.*, (1999b) mencionan que naturalmente los rotíferos y la *Artemia* son naturalmente deficientes en AGE, especialmente de la serie n-3, por lo cual deben ser enriquecidos por medio de emulsiones generalmente de aceite de pescado ricas en LC-PUFAs n-3, para luego ser suministrados a los organismos con el fin de satisfacer los requerimientos esenciales y aumentar su supervivencia y crecimiento (Watanabe, 1988; Koven *et al.*, 1990; Bell *et al.*, 2003).

Un tipo de lípidos muy importante durante el desarrollo de larvas de peces son los fosfolípidos (Kanazawa, 1993; Coutteau *et al.*, 1997), ya que la base fosfoglicérida que los caracteriza no puede ser sintetizada por la mayoría de los peces y en particular las larvas. Los fosfolípidos marinos contienen un alto porcentaje de LC-PUFAs y son considerados adecuados para iniciar la alimentación de las larvas de peces marinos (Sargent *et al.*, 2002), ya que tienen un alto contenido de fosfatidilcolina (FC), fosfatidilinositol (FI), fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilserina (FS), los cuales en conjunto con los AGE cumplen funciones vitales (i.e., biosíntesis de membranas celulares, segundos mensajeros en la transducción de señales celulares, mantenimiento y síntesis de neurotransmisores, mejoran la absorción y transporte de los lípidos neutrales, participan en el desarrollo del esqueleto, la maduración del sistema digestivo y, aumentan la palatabilidad de los alimentos) (Tocher *et al.*, 2008; Cahu *et al.*, 2009). El nivel de inclusión y el tipo de fosfolípidos en las dietas afecta el desarrollo larval, aumentando el crecimiento, supervivencia y evitan el desarrollo de deformidades óseas (Cahu *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, el aceite de pescado es la principal fuente de PUFAs y LC-PUFAs para la alimentación de larvas de peces marinos (Izquierdo, 1996). Sin embargo, la alta demanda de este recurso limitado que se obtiene principalmente de la pesca, se ha vuelto un impedimento clave para el crecimiento y sustentabilidad de este sector en el futuro, debido al alto costo y una menor disponibilidad de esta materia prima en los últimos años (Jackson, 2007; Tacon y Metian *et al.*,

2008; Turchini *et al.*, 2009; Eryalçin *et al.*, 2013). Lo anterior, ha generado que se busquen fuentes alternativas de PUFAs y LC-PUFAs para la sustitución parcial o total del aceite de pescado de la alimentación de peces marinos (Turchini *et al.*, 2009; Eryalçin *et al.*, 2013). En el caso de aceites de origen terrestre, el aceite de linaza es el que contiene la mayor proporción de PUFAs n-3 y n-6 con 53.3 y 12.7 % del porcentaje total de AGs (NRC, 2011), por lo cual lo convierte en una alternativa para la sustitución del aceite de pescado.

A la fecha, la formulación y fabricación de dietas para larvas de peces marinos solo ha logrado sustituir parcialmente el uso de alimento vivo en las etapas tempranas del desarrollo y son especie-específicas (Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Rønnestad *et al.*, 2013). La falta de conocimiento sobre las fuentes de nutrientes más digestibles (origen de la proteína y del lípido), de los requerimientos específicos de cada especie y de la capacidad digestiva de las larvas, dificulta el desarrollo de dietas adecuadas que reemplacen totalmente el alimento vivo y que, incrementen la supervivencia y la calidad de las larvas (Lazo *et al.*, 2000a; Civera-Cerecedo *et al.*, 2004; Conceição *et al.*, 2010; Hamre *et al.*, 2013).

Por lo anterior, es indispensable estudiar y entender cómo se desarrolla el sistema digestivo de cada especie y conocer su capacidad digestiva en la etapa larval, a través de la caracterización de las enzimas digestivas durante la ontogenia, además, es necesario conocer en qué momento y en qué cantidad presentan actividad, para así suministrar los nutrientes adecuados a través de la dieta para promover su digestión, absorción y asimilación. Esta información es fundamental para poder formular microdietas específicas adecuadas a la capacidad digestiva de las larvas con el fin de producir larvas de mejor calidad.

1.6. Pruebas de calidad de larva

Cuando se realiza un experimento donde se evalúan diversos tipos de nutrientes a través de la dieta, las variables de respuesta comúnmente utilizadas y analizadas son el peso y la longitud. Sin embargo, existen ocasiones en las que estas variables no tienen la resolución necesaria para evaluar los efectos de los cambios en la composición de la dieta, por lo que no es posible establecer diferencias significativas entre los tratamientos, no obstante, esta indiferencia no garantiza que fisiológicamente los organismos se encuentren en las condiciones óptimas para sobrellevar

situaciones de estrés. Es por esto, que se han desarrollado varias pruebas complementarias para medir la calidad de las larvas luego de un bioensayo, tales como la exposición a condiciones de hipersalinidad (Kjørsvik *et al.*, 2003), exposición al aire (Kraul *et al.*, 1993), aumento de la temperatura y condiciones de hipoxia (Kanazawa, 1997), o incluso pruebas combinadas de salinidad y nado contracorriente (Coutteau *et al.*, 1995). Todas estas pruebas han resultado exitosas para diferenciar la calidad de las larvas.

1.7. Digestión en larvas de peces marinos

En los peces, el proceso de digestión de los alimentos se lleva a cabo por procesos mecánicos, químicos y por una batería de enzimas digestivas muy diversas, las cuales son producidas en distintos órganos como el estómago, páncreas, hígado y las paredes celulares del intestino. Estas enzimas se encargan de digerir los macronutrientes y liberar moléculas más simples para su mejor absorción y posterior utilización como sustratos en los procesos metabólicos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

En particular, la digestión de las proteínas se lleva a cabo por varios tipos distintos de enzimas digestivas características de cada región del tracto digestivo. Por ejemplo, en el estómago, donde inicia la digestión, la pepsina es secretada por las glándulas gástricas y actúa en un medio de pH ácido. Por su parte, la tripsina, quimiotripsina y elastasa, son producidas por el páncreas y vertidas al lumen intestinal donde actúan a un pH alcalino y continúan la digestión iniciada por la pepsina, liberando mayormente polipéptidos y aminoácidos libres. Por último se encuentran las enzimas adheridas al borde de cepillo de los enterocitos del intestino y algunas enzimas citosólicas, las cuales degradan los polipéptidos en aminoácidos. (Rønnestad *et al.*, 2003; Zambonino-Infante y Cahu, 2007).

Las lipasas son las enzimas encargadas de llevar a cabo la digestión de los lípidos presentes en la dieta. La digestión de los lípidos y su posterior absorción permiten al organismo obtener AGs ricos en energía y AGE (Murray *et al.*, 2003). La lipasa dependiente de sales biliares (LDSB) es la más importante en los peces teleósteos (Gjellesvik, 1992; Hoehne-Reitan *et al.*, 2001). Adicionalmente se puede mencionar la lipasa neutra o no específica, algunas lipasas pancreáticas y las fosfolipasas (Izquierdo *et al.*, 2000). La LDSB es secreta por el páncreas y se activa con las sales biliares que

proviene de la vesícula biliar. Las sales biliares cumplen además con la función de emulsificar las grasas (colesterol, vitaminas A, D y E) para aumentar su superficie para facilitar la acción digestiva de las enzimas (Higgs y Dong, 2000) y también forman micelas que favorecen la absorción de los productos de la digestión. En las larvas de peces marinos se ha identificado la presencia de esta enzima desde el inicio de la alimentación exógena (Pérez-Casanova *et al.*, 2004; Faulk y Holt, 2009).

La fosfolipasa A₂ (FLA₂) es la encargada de catalizar la hidrólisis del enlace éster en la posición sn- 2 de los fosfolípidos (FL) haciéndolos disponible para su absorción y posterior utilización en el metabolismo y es dependiente del ion Ca²⁺ (Van den Bosch, 1982). A pesar de que esta enzima ha sido poco estudiada en los peces marinos (Fijukawa *et al.*, 2012), se ha reportado en especies como el besugo (*Pagrus major*) (Iijima *et al.*, 1997), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Hoehne-Reitan *et al.*, 2003) la lubina (Zambonino-Infante y Cahu, 1999) y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (Sæle *et al.*, 2011). De las diecinueve enzimas reportadas con actividad de FLA₂ (tipo secretora y citosólica) la FLA₂ IB es la única del tipo secretora que es producida en el páncreas y está encargada de la digestión de los fosfolípidos (Murakami y Kudo, 2002).

Zacarías-Soto *et al.*, (2006) caracterizaron las proteasas alcalinas (quimiotripsina, tripsina y leucin aminopeptidasa) y la LDSB en el lenguado de California (*P. californicus*), y detectaron la actividad de estas enzimas desde el inicio de la alimentación exógena. Sin embargo, la actividad de las proteasas ácidas se detectó hasta la formación del estómago al día 35 DDE (Zacarías-Soto, 2007). Resultados similares fueron reportados por Álvarez-González *et al.* (2006) en otro estudio con la misma especie, con excepción de la actividad de las proteasas ácidas que fueron estudiadas con un método equivocado, por lo que reportan haberla detectado a los 18 DDE y, sugieren que el destete (el cambio de alimento vivo por alimento formulado) se puede iniciar desde los 18 DDE. Por su parte Zacarías-Soto *et al.*, (2006) proponen que el destete se haga hasta el día 36 DDE, cuando la larva cuenta con una capacidad enzimática más completa, capaz de digerir mejor las microdietas.

A la fecha, de todas las enzimas que digieren los lípidos, para el lenguado de California solo se ha reportado la actividad de la LDSB y no se ha investigado la actividad de la FLA₂. Así mismo, se conoce poco sobre el efecto del tipo de lípido sobre la actividad de las enzimas digestivas en las larvas de peces marinos. Es por esto, que el estudio del efecto del tipo de lípidos (i.e., origen marino

vs. terrestre) utilizados como enriquecedores del alimento vivo sobre la actividad de las enzimas lipídicas sería de gran utilidad para elucidar su posible uso durante el cultivo larvario.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar la capacidad de las larvas del lenguado de California para digerir los lípidos de la dieta y enriquecer el conocimiento de la fisiología digestiva de esta especie, con el fin de formular dietas acordes a la capacidad digestiva de sus larvas, y que permita reducir o eliminar el uso de alimento vivo durante el cultivo larvario.

Capítulo 2

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

El consumo de alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) enriquecido con aceite de origen terrestre (linaza) no disminuirá la actividad de las lipasas digestivas del lenguado de California (*P. californicus*) durante su etapa larval.

2.2. Objetivo general

Caracterizar la actividad de las lipasas en el tracto digestivo del lenguado de California (*P. californicus*) durante la etapa larval y evaluar el efecto del tipo de lípido sobre estas.

2.3. Objetivos específicos

2.3.1. Caracterizar la actividad de la lipasa dependiente de sales biliares (LDSB) del tracto digestivo en el lenguado de California (*P. californicus*) durante la etapa larval.

2.3.2. Caracterizar la actividad de la fosfolipasa A₂ (FLA₂) del tracto digestivo en el lenguado de California (*P. californicus*) durante la etapa larval.

2.3.3. Evaluar el efecto del tipo de lípido enriquecedor para rotíferos y *Artemia* en la actividad de la LDSB y la FLA₂ en el lenguado de California (*P. californicus*) durante la etapa larval.

Capítulo 3

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención de las larvas

Las larvas se obtuvieron de huevos desovados de manera natural por reproductores estabulados en el Laboratorio de cultivo de peces marinos del CICESE, Baja California, México. La recolección de los huevos se hizo por medio de un recolector de huevos que consta de un canal colector semicircular de PVC de 15 cm de diámetro, colocado en forma subsuperficial en posición radial, del centro hacia un extremo del tanque. Los huevos del lenguado son pelágicos, por lo que son colectados por el canal gracias al movimiento circular del agua en el interior del tanque y con la salida del agua fueron trasladados fuera del tanque hacia un colector. La revisión del colector se realizó de cuatro o cinco veces al día hasta obtener un desove exitoso.

Una vez que los huevos fueron recolectados, se revisó una muestra al microscopio para observar su estado de desarrollo y viabilidad. Se desinfectaron con formalina al 1% por una hora. Posteriormente se enjuagaron con agua limpia y se concentraron en una probeta para separar los huevos que flotaban y por lo tanto eran viables, los que se sedimentaron y tenían una coloración blanquecina se consideraron no viables y se descartaron. Se tomó una alícuota de un ml para contar y calcular el número total de huevos por ml.

3.2. Cultivo larval

El bioensayo se realizó en un sistema de recirculación cerrado de agua de mar, el cual cuenta con una bomba centrífuga de $\frac{3}{4}$ de caballo de fuerza, un filtro biológico expandible de cuentas plásticas (Polygeyser Modelo DF/3, USA), dos filtros de cartucho de 1 y 5 μm , una lámpara UV (Modelo QL-25, Pentairaquatics, USA) y un sistema automático para el control de temperatura con una bomba de calor (Delta Star, Modelo DSHP-5, USA). El abastecimiento de agua fue constante e independiente para cada tanque (el agua de cada tanque se drenó a un reservorio común para inmediatamente pasar por el sistema de filtración, control de temperatura y regresar de nuevo a cada tanque). El sistema de cultivo consistió de 6 tanques de fibra de vidrio de color gris con una capacidad de 150 L ($n = 3$ tanques experimentales por cada tratamiento). Los huevos fueron

colocados a una densidad de 13 huevos L⁻¹, (alrededor de 2000 huevos por tanque). Para mantener los parámetros fisicoquímicos en los niveles óptimos (Conklin *et al.*, 2002), las variables ambientales se midieron todos los días antes de cada alimentación. La temperatura se mantuvo a 18.0 ± 0.2 °C, el oxígeno disuelto a 6.8 ± 0.4 mg L⁻¹, la salinidad a 33.93 ± 0.25 UPS y una iluminación de 72 Lux. Cada tres días se midió el amonio total, nitritos, nitratos y la alcalinidad, utilizando un kit comercial (Api Aquarium Pharmaceutic Kit) y el pH con un potenciómetro portátil (Thermo Scientific, Orion Star A211)

3.3. Protocolo de alimentación

Antes de suministrar el alimento vivo a las larvas en los tanques de cultivo y después de retirarlos de los recipientes de enriquecimiento el alimento vivo se lavó en un dispositivo de limpieza que consistió de un recipiente de PVC en el que se colocó una malla interna de 45 y 100 µm de apertura, para rotíferos y metanauplios de *Artemia* respectivamente (Figura 2b). El lavado se hizo durante 15 minutos con agua de mar filtrada y finalmente por 5 minutos con agua dulce. Este proceso es de gran importancia porque permite eliminar la mezcla de la emulsión que puede favorecer el crecimiento de bacterias en los tanques de cultivo y con el agua dulce se buscaba reducir la carga bacteriana del alimento vivo.

La primera alimentación exógena se realizó siguiendo el protocolo descrito por Zacarías-Soto (2007). Se inició a los ocho DDE con cinco rotíferos (*Brachionus plicatilis*) por ml, incrementándose hasta 7 rotíferos/ml a los 12 DDE, esta densidad se mantuvo hasta los 16 DDE. A los 17 DDE se inició el cambio gradual de rotíferos a metanauplios de *Artemia salina*. El suministro de rotíferos se disminuyó gradualmente en una proporción de 20% por día hasta alcanzar el 0% y simultáneamente se incrementó el suministro de *Artemia* hasta alcanzar el 100%. Después del día 21 DDE las larvas se alimentaron únicamente con *Artemia* a una proporción inicial de 3-4 metanauplios/ml aumentándose hasta 7-8 metanauplios/ml al final del experimento a los 42 DDE. El suministro de alimento vivo se realizó dos veces al día (8:00 y 14:00 horas).

3.4. Diseño experimental

Se aplicaron dos tratamientos: 1) Alimento vivo enriquecido con una emulsión de origen marino, Algamac 3000™ (Bio-Mari.ne Inc) rica en LC-PUFAs n-3, el cual es usado como parte del protocolo para el cultivo larval del laboratorio de peces marinos, por lo que puede ser considerado también como el tratamiento control; y 2) Alimento vivo enriquecido con una emulsión de origen terrestre, aceite de linaza, Flax oil omega-3 (Spectrum Organic Products) rico en PUFAs n-3. Para evaluar el efecto de cada tipo de lípido, la fase experimental inició a los 8 DDE, las larvas confinadas en tres de las unidades experimentales se alimentaron con rotíferos enriquecidos con el aceite vegetal terrestre y las larvas de los otros tres tanques se alimentaron con rotíferos enriquecidos con aceite de origen marino. Ambos tratamientos se suministraron hasta los 42 DDE.

3.5. Cultivo del alimento vivo

El cultivo de rotíferos se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del CICESE. El sistema de cultivo consistió en 3 tanques de 500 L de capacidad mantenidos a una temperatura de 26 °C, salinidad de 26 UPS y 800 Lux de iluminación constante. Los rotíferos fueron alimentados con microalga viva *Nannocloropsis* sp a una densidad de 20 millones de cel/ml y se cosecharon con una malla de 60 µm y se enjuagaron con agua de mar desinfectada con luz UV.

Los quistes de *Artemia* (SALT Creek Inc., Salt Lake City, UT, USA) se hidrataron en agua dulce, colocándolos en un recipiente con aireación constante por una hora. Para desencapsular los quistes, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio, en una relación 0.1 L de agua de mar con 0.1 L de hipoclorito de sodio al 75%, por cada 10 gramos de quistes, con agitación constante hasta que se observó una coloración naranja (alrededor de los dos minutos). De manera inmediata se colocaron en una malla de 75 µm y se lavaron con agua dulce por 5 min. La incubación de los quistes se hizo en un tanque cónico de 200 L por 24 horas, a una temperatura de 28 °C, con iluminación mayor a los 1000 lux y aireación constante para que se mantuvieran suspendidos en la columna de agua. Una vez que los nauplios eclosionaron, se cosecharon y lavaron en una malla de 125 µm con agua de mar desinfectada con luz UV para eliminar los quistes no eclosionados.

3.6. Enriquecimiento del alimento vivo con lípidos de origen marino

El enriquecimiento con Algamac 3000TM (Bio-Marine Inc.) se hizo con una concentración de 300 mg L⁻¹ y a una densidad de 300 nauplios de *Artemia*/ml y de 125 mgL⁻¹ para una densidad de 200-500 rotíferos/ml, en recipientes de 45L (Figura 2a) a una temperatura de 28 °C, salinidad de 33 UPS y aireación constante. El enriquecimiento se realizó por 12 horas antes de ser suministrado a las larvas.

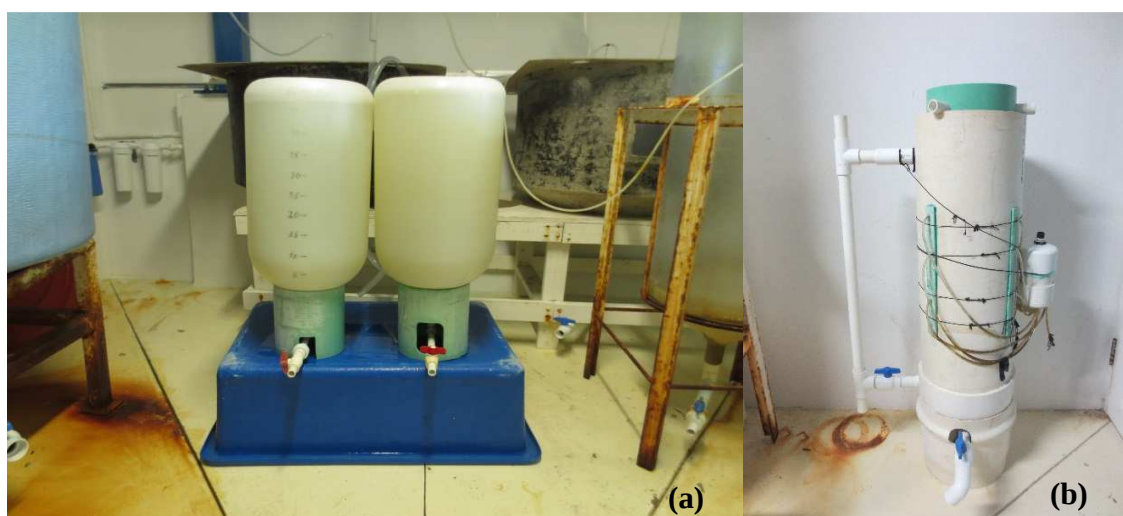


Figura 2. Sistema de enriquecimiento (a) y dispositivo de limpieza del alimento vivo (b).

3.7. Enriquecimiento del alimento vivo con lípidos de origen terrestre

Para el enriquecimiento con el aceite terrestre se preparó una emulsión compuesta de: 5 ml de aceite de linaza (Spectrum Organic Products), 0.5 g de lecitina de soya (Gelcaps, Banner Pharmacaps, Inc.) como emulsificante y 100 ml de agua destilada. Se mezcló en una licuadora por un período de 2 a 3 minutos y se observó al microscopio una muestra de la emulsión para evaluar si el tamaño de las micelas era lo suficientemente pequeño (de 10 a 30 μ m) para ser consumido por el alimento vivo. Adicionalmente, se hizo una prueba con rojo Sudán IV (Sigma Cat. S-8756) para teñir la emulsión y confirmar que era ingerida adecuadamente por los organismos (Figura 3). Para enriquecer el alimento vivo se agregó en una proporción de 0.8 ml emulsión/L a una densidad de 500 rotíferos/ml y de 100 a 200 nauplios de *Artemia*/ml.

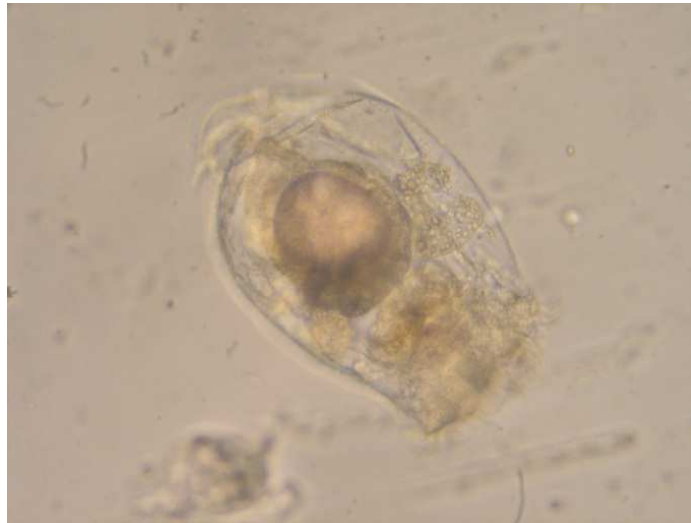


Figura 3. Rotífero (*Brachionus plicatilis*) enriquecido por 12 horas con una emulsión de aceite terrestre teñido con rojo Sudán IV.

3.8. Crecimiento de las larvas en longitud y peso

Para registrar el crecimiento en longitud, se tomaron 30 larvas al azar de cada tanque, se anestesiaron con metasulfonato de tricaina (MS222) al 0.05% y se les midió la longitud total (LT), desde la boca hasta el final de la notocorda, utilizando un estereoscopio con retícula ocular. Las muestras se tomaron cada dos días, de los 8 hasta los 18 DDE, luego cada 4 días de los 22 a los 42 DDE. Para el registro del peso seco de las larvas, a los 8 DDE se tomó una muestra inicial de 30 larvas y a los 42 DDE se tomó la muestra final de 10 larvas por tanque. Las larvas se colocaron en una estufa a 60 °C por un mínimo de 24 horas hasta alcanzar peso seco constante que se calculó como la diferencia entre el peso inicial menos el peso final.

3.9. Tasa de crecimiento específico

Con el fin de caracterizar el desarrollo de las larvas de lenguado antes, durante y después de la metamorfosis, el crecimiento en LT se dividió en 3 etapas: 1) antes de la metamorfosis que va de los 8 a 18 DDE; 2) durante la metamorfosis de los 18 a 34 DDE y 3) posterior a la metamorfosis de los 34 a los 42 DDE. En cada una de las etapas se calculó la tasa de crecimiento específico (TCE) utilizando la fórmula de Hardy y Barrows (2002):

(1)

$$TCE = \frac{\ln LTf - \ln LTi}{Tf - Ti}$$

Donde,

$\ln LT_f$ = logaritmo natural de la longitud total final

$\ln LT_i$ = logaritmo natural de la longitud total inicial

T_f = tiempo final de la etapa

T_i = tiempo inicial de la etapa

La tasa de crecimiento específico también se conoce como la tasa de crecimiento instantáneo diario, la cual puede ser convertida al incremento en porcentaje del crecimiento por día (%C/día) por medio de la siguiente fórmula de Hardy y Barrows (2002):

(2)

$$\%C/día = (e^{TCE} - 1) * 100$$

3.10. Toma de muestras para la preparación del extracto enzimático

Una vez registrada la longitud de las larvas, se procedió a preparar las muestras para los análisis enzimáticos. Para las larvas menores de 8 DDE se preparó un homogenizado de las larvas completas, ya su pequeño tamaño dificulta la extracción del tracto digestivo. Para las larvas de mayor edad (8 DDE) se procedió a realizar la disección del tracto digestivo cortando la cavidad abdominal. Para esto, las larvas se colocaron sobre un porta-objetos previamente enfriado con hielo, y con la ayuda de agujas de disección y con un estereoscopio se eliminaron la cabeza y la parte posterior del cuerpo (Figura 4). Este proceso se realizó con el fin de reducir la interferencia de enzimas e inhibidores presentes en los tejidos musculares de las larvas.

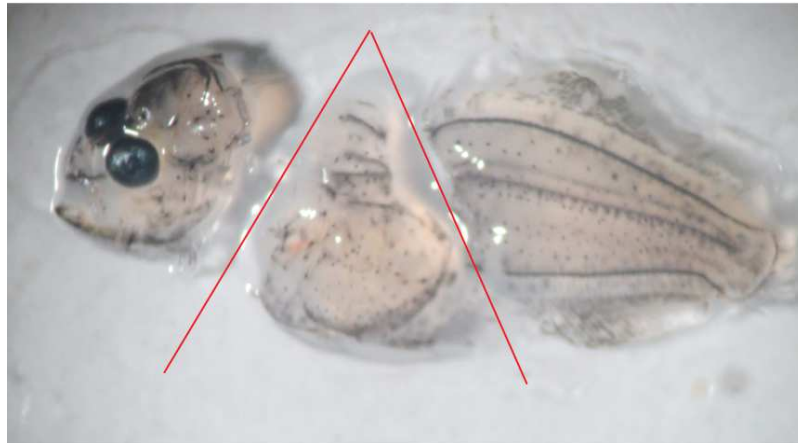


Figura 4. Forma de la disección realizada a las larvas mayores de 8 DDE, las líneas rojas muestran la dirección del corte (larva de 30 DDE).

La tabla 1. especifica la cantidad de larvas (1,3,4 y 6 DDE) y tractos digestivos (desde los 8 hasta los 42 DDE) usados por cada día de muestro, los cuales se coloraron en un tubo de centrífuga eppendorf de 1.5 ml, se homogenizaron en 100 μ L de agua destilada durante un minuto con un homogenizador (Kontes, USA), luego se agregó agua destilada fría hasta alcanzar 1 ml, se centrifugó a 4 °C y 1800 Xg (4 000 rpm) por 30 minutos, se extrajo el sobrenadante, se colocó en otro tubo eppendorf limpio y se guardó a -80 °C.

Tabla 1. Número de larvas y/o tractos digestivos diseccionados por cada día de muestreo para las pruebas enzimáticas.

DDE	1	3	4	6	8	10	12	14	16	18	22	26	30	34	38	42
No. L	20	15	15	12	8	8	6	6	6	5	4	4	3	2	2	2

DDE = días después de la eclosión y No. L = número de larvas.

3.11. Análisis de la actividad de la lipasa dependiente de sales biliares

Para cuantificar la actividad de las lipasas dependiente de sales biliares (L-DSB) se siguió el método descrito por Juárez-Casillas (2009) de acuerdo a Gjellesvik (1992) con algunas modificaciones, en particular, se sustituyó el sustrato del protocolo (4-nitrofenil-caproato a 0.35mM) por el 2-nitrofenil miristato (Sigma Cat. N2377-1G) a 0.50mM, pero bajo las mismas condiciones de reacción; solución amortiguadora pH 7.4 de Tris a 0.5 M, taurocolato de sodio a 6 mM y cloruro de sodio (NaCl) a 100 mM.

El método también se adaptó para realizar las mediciones en un lector de placas Beckman Coulter AD 200. Se agregaron 25 µl del extracto enzimático a cada pozo y para iniciar la reacción se agregaron 200 µl del buffer ya mezclado con el sustrato. Como blanco de reacción se agregó agua destilada en lugar extracto enzimático y para el control positivo se usó lipasa pancreática porcina a 1.0 mg/ml (Sigma Cat. L3126). Se registró la absorbancia de la reacción a una longitud de onda de 400 nm, cada minuto por una hora a 30 °C de temperatura. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La actividad enzimática se reporta como actividad total por larva ($U \text{ Larva}^{-1}$) y actividad específica ($U \mu\text{g}^{-1}$ proteína). Donde 1 U de actividad enzimática se definió como el incremento de 0.1 unidades de absorbancia por minuto (Lazo *et al.*, 2000b). Los valores reportados son la media de tres mediciones de muestras independientes.

La actividad total se determinó usando la siguiente fórmula,

$$U \text{ Larva}^{-1} = \left\{ \frac{\Delta \text{ Abs/min}}{\text{Coef Ext}} * \frac{\text{Vol total de H } (\mu\text{l})}{\text{Vol de H utilizado } (\mu\text{l})} * \frac{\text{Vol de reacción } (\mu\text{l})}{\text{Vol de H utilizado } (\mu\text{l})} \right\} / \text{No. Larvas} \quad (3)$$

Donde,

$\Delta \text{ Abs/min}$: es el punto donde se registró la mayor absorbancia de cada muestra

Coef Ext: 0.1 unidades de absorbancia por minuto

Vol total de H: es el volumen total de agua destilada que se usó para homogenizar las larvas (1 ml)

Vol de H utilizado: es la cantidad de homogenizado que se utilizó para la reacción (25µl)

Vol de reacción: es el volumen final de la reacción (225µl)

No. Larvas: es el número total de larvas utilizadas para realizar el homogenizado

La actividad específica se obtuvo al dividir la actividad total por larva entre la concentración de proteína soluble del homogenizado y se expresa en $U \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. La proteína soluble se cuantificó utilizando el kit Quick Star™ Bradford Protein Assay (Bio Rad, Cat.500-0201) con albumina de huevo como estándar.

3.12. Actividad de la fosfolipasa A₂

La actividad de la FLA₂ se analizó con el kit comercial de Abcam (Cat. AB133089) el cual utiliza un análogo del diheptanoyl fosfatidilcolina que funciona como sustrato para la mayoría de las FLA₂ (i.e., veneno de cobra y abeja, fluido pancreático) con excepción de la FLA₂ citosólica. Una vez que la FLA₂ hidroliza el enlace thio-éster en la posición sn-2, los thioles libres son detectados usando DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)). Se midió la absorbancia de la reacción a 414 nm cada minuto por una hora a 30 °C de temperatura en un lector de placas Beckman Coulter AD 200.

La actividad enzimática como actividad total por larva (U Larva⁻¹) se calculó con la siguiente fórmula,

$$FLA_2 = \left\{ \frac{\Delta A_{414}/\text{min}}{10.66 \text{ por mM}} * \frac{0.225 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} * \text{dilución de la muestra} \right\} / \text{No. Larvas} \quad (4)$$

Donde,

$\Delta A_{414}/\text{min}$ es el cambio en absorbancia por minuto

10.66 por mM es el coeficiente de extinción para el DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-ácido nitrobenzoico))

La dilución de la muestra es el total de homogenizado (1000µl) entre el volumen de homogenizado utilizado por reacción (25µl)

No. Larvas es el número total de larvas utilizadas para realizar el homogenizado

La actividad específica se obtuvo de igual manera que para la LDSB, al dividir la actividad total por larva entre la concentración de proteína soluble por larva del homogenizado y se expresó en U µg⁻¹ de proteína.

3.13. Análisis químico proximal

La calidad nutricional (i.e., proteína cruda, lípidos) de los rotíferos y metanauplios de *Artemia* se evaluó antes y después del enriquecimiento con los dos tipos de emulsiones. Para cuantificar el contenido de la proteína cruda se utilizó el método micro-Kjendahl (Ma y Zuazago, 1942). Los lípidos totales se cuantificaron por el método de Folch *et al.*, (1957) modificando el solvente para la extracción, al sustituir el cloroformo:metanol (1:1) por diclorometano:metanol (2:1) según Cequier *et al.*, (2008).

3.14. Análisis de ácidos grasos

Una vez que se extrajeron los lípidos, se procedió a saponificarlos con una solución metanólica al 90% 0.3 N de KOH durante 30 minutos en baño maría a 60 °C. Posteriormente se agregó agua y hexano y se eliminó la fase superior (hexano) que contenían los lípidos insaponificables. Finalmente se adicionó agua, hexano y se acidificó con HCl 6 N para recuperar los lípidos saponificables. La metilación se llevó acabo utilizando el trifloruro de boro (BF₃/CH₃ OH al 14% en metanol (Sigma Cat. B1252) en baño maría por 15 minutos a 60 °C, se extrajo la capa superior de hexano con los esteres de ácidos grasos, se secaron bajo una atmósfera de N₂ y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis (Morris, 1986).

Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos por medio de cromatografía de gases se siguió la metodología descrita por Vizcaíno-Ochoa *et al.*, 2010. Brevemente, los esteres metilados se disolvieron en hexano grado HPLC en una relación de 100 ug/ul y se analizaron en un cromatógrafo de gases GC (Agilent 7890A) con un columna capilar (123-3232, DB-FFAP, de 30 m de longitud, 0.320 mm de diámetro y 0.25 µm de espesor de película, Agilent J&W, GC columns), con un detector de flamas ionizado y como gas trasportador se usó el nitrógeno a un flujo de 3 ml/min. Se utilizó un volumen de inyección de 1 µl, con una dilución de 100:1 (split ratio). La rampa de temperatura fue la siguiente; 1) temperatura inicial de 120 °C con aumentos de 9 °C por minuto hasta llegar a los 190 °C, 2) a partir de los 190 °C incrementó a 3 °C por minuto hasta alcanzar los 230 °C y 3) por último se mantuvo a 230 °C por 4 minutos.

La identificación de los ácidos grasos se hizo comparando los tiempos de retención de tres estándares; 37 Component FAME Mix, Supelco (Sigma Cat. 47885-U), PUFA No.3 Menhaden oil, Supelco (Sigma Cat. 47085) y PUFA No.1 Marine Source, Supelco (Sigma Cat. 47033), con los tiempos de retención de los ésteres extraídos de cada una de las muestras. El porcentaje de cada uno de los ácidos grasos se calculó con base al total de ácidos grasos identificados. Para estos cálculos se utilizó el programa Chem Station versión B.04.01 (Agilent, USA). Adicionalmente se reportan las concentraciones de ácidos grasos en peso seco (gramos de ácido graso por cada 100 gramos de alimento vivo en peso seco; g/100g) estimando la cantidad de lípidos saponificables inyectados al cromatógrafo. Los ácidos grasos identificados se agruparon y clasificaron en Saturados, Monoinsaturados, PUFAs n-6 y n-3 y LC-PUFAs n-6 y n-3, de acuerdo al número de carbonos y al grado de insaturación (Sargent *et al.*, 2002).

3.15 Pruebas de calidad de larva

Con el objetivo de evaluar la calidad de las larvas al final del experimento, se utilizó la prueba de estrés según Dhert *et al.*, (1992) que consiste en someter a las larvas a un estrés agudo, en este trabajo se usó la temperatura, a 32 °C. Para esto, se colocaron vasos de precipitado de 500 ml con agua de mar del sistema de cultivo dentro de una tina también con agua (i.e., baño maría), además se utilizaron dos calentadores de 1000 watts para mantener la temperatura del agua constante dentro de los recipientes (Figura 5). Cuando se alcanzó la temperatura seleccionada, se colocaron 5 larvas (42 DDE) de cada tanque (por duplicado) dentro de cada recipiente. El tiempo de la prueba de estrés fue de 120 minutos.

Durante el transcurso de esta prueba se generó una tabla donde se registró cada cinco minutos el número de larvas muertas en cada uno de los recipientes (i.e., 25 observaciones). Para esto, se anotó un cero mientras no apareciera ninguna larva muerta, cuando se observó la primera larva muerta se anotó un 1, a los cinco minutos siguientes cuando se volvió a revisar el mismo recipiente se anotaba nuevamente un 1 si no había muerto otra larva, en caso que se observaba otra larva muerta se anotó un 2 y así sucesivamente. Al finalizar la prueba se hizo la sumatoria de los valores correspondientes a cada recipiente, con lo cual se obtuvo el índice de estrés que indica la letalidad de la temperatura y la tasa de muerte, al incorporar cuantas y qué tan rápido mueren las larvas a través del tiempo de la prueba. Se consideraron dos criterios para decidir si el lenguado estaba

muerto; 1) que no presentara movimiento del opérculo y que al colocar el lenguado con su lado ciego hacia arriba, este no regresara a su posición natural. Durante el ensayo se estableció un tratamiento control (por duplicado) en el cual se mantuvo la misma temperatura de cultivo (18 °C), pero los lenguados fueron sometidos al mismo manejo que los demás organismos de la prueba.

Otro parámetro para establecer la calidad de las larvas al final del cultivo larvario fue el de considerar el éxito del destete (el cambio del alimento vivo a alimento formulado). Para esto, a los 43 DDE se inició el cambio de alimento vivo por uno formulado. Paulatinamente se aumentó (i.e., 20% por día) la cantidad de alimento formulado hasta alcanzar un 100% y de la misma forma se disminuyó el alimento vivo. A los 47 DDE (5 días de transición) se consideró que los lenguados estaban destetados y, se contabilizó la supervivencia de cada tanque.



Figura 5. Diseño del experimento para evaluar calidad de la larva del lenguado de California a 42 DDE alimentado con dos tipos de lípidos.

3.16. Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre las medias de los valores de peso seco, supervivencia, proteína cruda, tasas de crecimiento de las larvas y para los porcentajes y peso seco de ácidos grasos del alimento vivo se utilizó una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Las diferencias significativas se contrastaron con una prueba *pos hoc* de Tuckey. Para los valores de actividad enzimática y longitud total se aplicó una ANCOVA para comparar las pendientes, con una significancia de $P \leq 0.05$. Adicionalmente para la actividad enzimática se utilizó una prueba de análisis de varianza de dos vías (tipo de lípido enriquecedor y edad de la larva) con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Para el índice de estrés se aplicó la prueba de t-student. Los valores expresados en porcentaje fueron transformados con la función arcoseno para que cumplieran con los supuestos del ANOVA. Para realizar todos los análisis se empleó el programa STATISTICA 7®.

Capítulo 4

4. Resultados

4.1. Crecimiento larval

El crecimiento en longitud total (mm) de las larvas se cuantificó a partir del día 8 y hasta los 42 DDE. Durante este período, para ambos tratamientos el crecimiento fue positivo y se ajustó a un modelo lineal (Figura 6). Al comparar las pendientes de cada tratamiento por medio de una prueba de ANCOVA se encontraron diferencias significativas. En el caso del tratamiento marino se obtuvo una ecuación con una pendiente positiva, $y = 0.16x + 2.92$ con un $R^2 = 0.96$, mientras que para el tratamiento terrestre la pendiente fue positiva pero significativamente menor, $y = 0.11x + 3.51$ con un $R^2 = 0.94$.

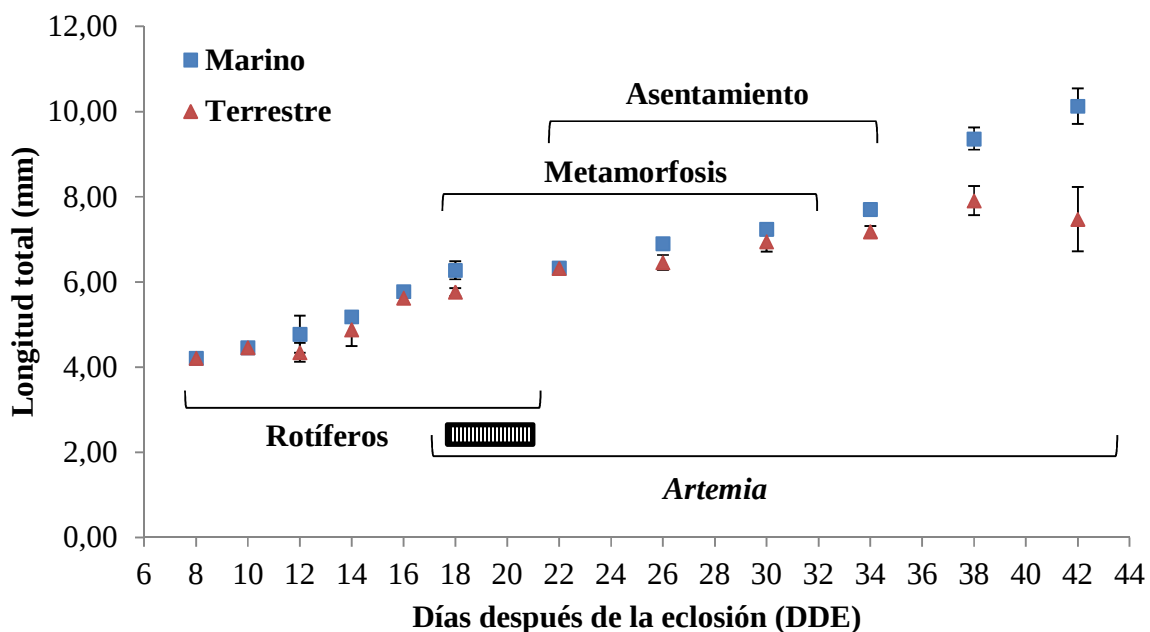


Figura 6. Crecimiento en longitud total (mm) de las larvas del *P. californicus* utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo. Se muestra el período de metamorfosis y asentamiento para el tratamiento marino y los períodos de alimentación con el alimento vivo. Área sombreada () período de [hatched box] sición de rotíferos a *Artemia*.

Al inicio del bioensayo la talla de las larvas era de 4.21 ± 0.50 mm de LT y al final del bioensayo con el tratamiento marino la LT fue de 10.13 ± 0.42 mm, mientras que en el tratamiento terrestre fue de 7.47 ± 0.75 mm, lo que equivale a un 44.93 % más de crecimiento con el tratamiento marino.

Al iniciar el bioensayo las larvas de ambos tratamientos tenían un peso seco de 0.17 ± 0.08 mg. Al final del experimento las larvas del tratamiento marino alcanzaron un peso seco promedio 2.59 veces mayor que las del tratamiento terrestre (Tabla 2). Durante el transcurso del bioensayo se observó que los organismos del tanque 6, correspondiente a uno de las réplicas del tratamiento marino presentaron un desarrollo y un comportamiento anormal con respecto a los bioensayos típicamente realizados en el laboratorio (e.g., se observó de que el 95% de las larvas permanecían sin asentarse al final del bioensayo a los 42 DDE, cuando a esa misma edad la totalidad de las larvas ya deberían de estar asentadas). Así mismo, el crecimiento en LT y peso seco eran inferiores (7.03 ± 0.59 mm y 7.87 ± 0.72 mg) incluso a las tres repeticiones del tratamiento terrestre. Por lo que se asumió que la causa fue una variable externa (no identificada) pero ajena a las variables experimentales del diseño experimental del presente estudio, por lo que se decidió eliminar esta réplica y trabajar con solo dos réplicas para este tratamiento.

Tabla 2. Valores iniciales y finales de peso (mg) por tanque y tratamiento. (Media $\pm$ la desviación estándar).

Tratamiento	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)
Marino		
1	$0.17 (\pm 0.08)$	$25.24 (\pm 1.27)$
3	$0.17 (\pm 0.08)$	$23.23 (\pm 1.87)$
Promedio	$0.17 (\pm 0.08)$	$24.24 (\pm 1.80)$
Terrestre		
2	$0.17 (\pm 0.08)$	$7.86 (\pm 0.88)$
4	$0.17 (\pm 0.08)$	$10.27 (\pm 0.85)$
5	$0.17 (\pm 0.08)$	$9.96 (\pm 0.69)$
Promedio	$0.17 (\pm 0.08)$	$9.36 (\pm 1.34)$

Durante la premetamorfosis (8 a 18 DDE) las larvas del tratamiento marino presentaron un crecimiento específico por día (CED) de 4.05 ± 0.35 %C/día que resultó significativamente mayor al crecimiento de las larvas del tratamiento terrestre (3.18 ± 0.17 %C/día). Durante la metamorfosis de los 18 a 34 DDE se observó una disminución significativa en el crecimiento con valores de CED de 1.30 ± 0.33 y 1.38 ± 0.20 %C/día para el tratamiento marino y terrestre respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En la última etapa (i.e., posmetamorfosis; 34 a 42 DDE) se encontró que las larvas del tratamiento marino aumentaron el CED a 3.46 ± 0.30 %C/día, a diferencia de las larvas del tratamiento terrestre que disminuyó significativamente a 0.46 ± 1.04 %C/día (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de crecimiento en LT por día (%C/día) de las larvas de lenguado en cada una de las etapas de desarrollo. (Media $\pm$ la desviación estándar, n=3). Los subíndices con letra minúscula distinta denotan diferencia significativa entre los tratamientos por etapa. Los subíndices con letras mayúsculas denotan diferencia significativa entre las etapas dentro de cada tratamiento.

Tratamiento	Premetamorfosis 8 – 18 DDE	Metamorfosis 18 – 34 DDE	Posmetamorfosis 34 – 42 DDE	Anova, P
Marino	4.05 ($\pm$ 0.35)aA	1.30 ($\pm$ 0.33)bB	3.46 ($\pm$ 0.30)aA	P=0.01
Terrestre	3.18 ($\pm$ 0.17)bA	1.38 ($\pm$ 0.20)bB	0.46 ($\pm$ 1.04)bB	P=0.00
Anova, P	P=0.03	P=0.73	P=0.03	

DDE = días después de la eclosión

En relación con las características externas del desarrollo de las larvas, entre los 10 y 12 DDE se pudo observar la presencia del asa intestinal (Figura 7e), el comienzo de la flexión de la sección posterior de la notocorda (Figura 7c) y la aparición del penacho (crecimiento de los primeros radios de la aleta dorsal) (Figura 7b), el cual se reduce alrededor de los 35 DDE. A los 18 DDE se observó el inicio de la migración ocular (metamorfosis) en algunas larvas (Figura 7f), pero fue a partir de los 25 DDE que se observó en más del 50% de los lenguados, principalmente en el tratamiento marino. La migración ocular coincidió con el inicio del asentamiento a los 18 DDE, primeramente en los tanques del tratamiento marino y a partir de los 20 DDE se registró en el tratamiento terrestre. Entre los 30 y 32 DDE un 90 a 95% de las larvas del tratamiento marino se encontraban totalmente asentadas y se consideró completa la metamorfosis, mientras que para el tratamiento terrestre el 50% de las larvas aún no se asentaban y no habían iniciado la migración ocular. No fue, sino hasta los 36 a 38 DDE cuando más de la mitad de las larvas de los tanques del tratamiento terrestre se asentaron y al final del bioensayo (42 DDE) todavía se observaron grupos de larvas sin asentarse.

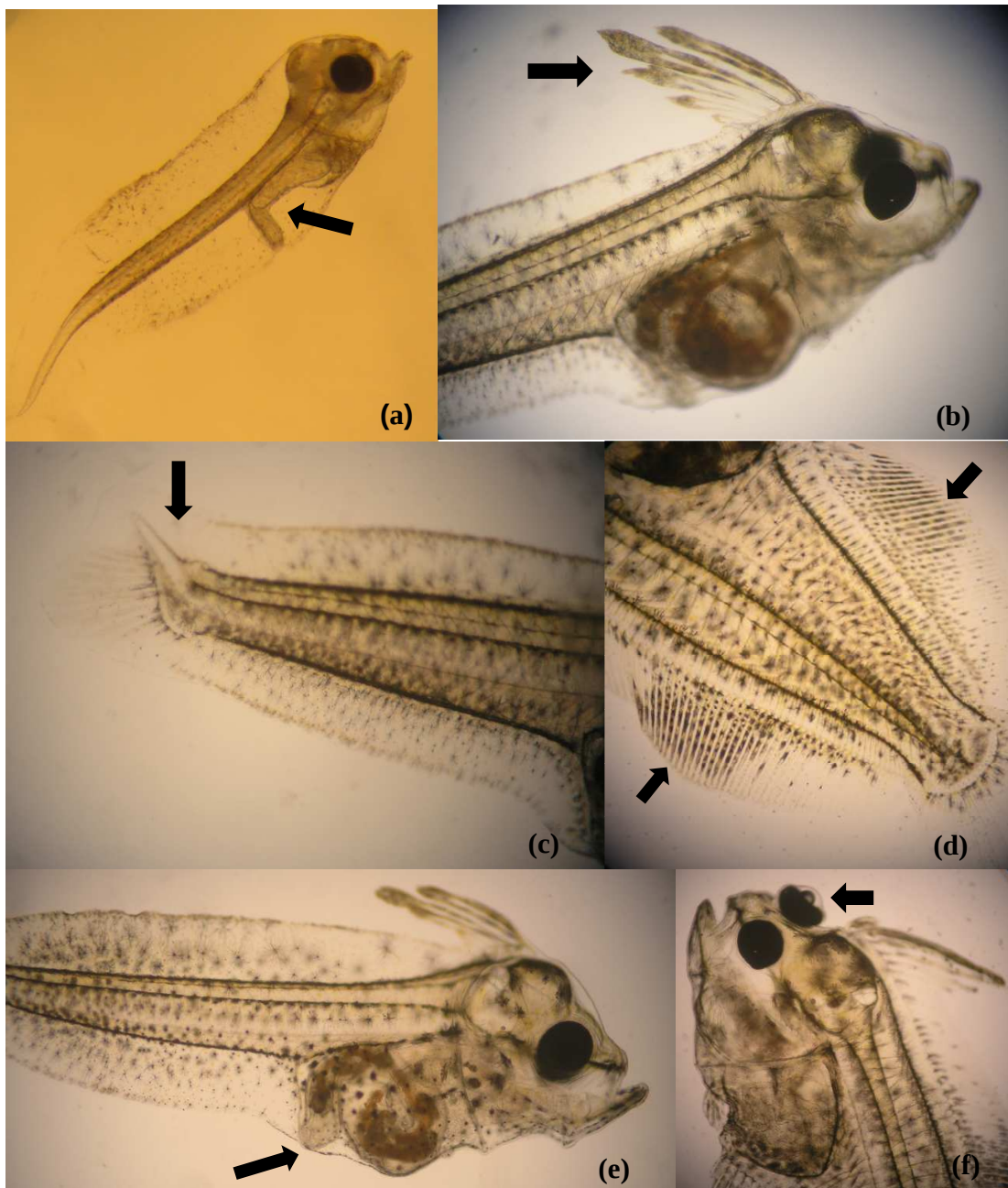


Figura 7. Características externas durante el desarrollo larval del lenguado de California alimentado con el tratamiento marino o control. (a) Larva de 3 DDE con división del intestino en la región anterior o prevalvular y la región posterior o postvalvular. (b) Aparición del penacho en larva de 12 DDE. (c) Torsión de la notocorda larva de 12 DDE. (d) Desarrollo de coloración en las aletas dorsal y ventral, larva de 22 DDE. (e) Presencia del asa intestinal, larva de 10 DDE. (f) Migración ocular, larva de 22 DDE.

4.2. Actividad enzimática de la lipasa dependiente de sales biliares

En la figura 8 se presenta la actividad total de la LDSB de las larvas durante los primeros 42 DDE alimentadas con el tratamiento marino (a) y la actividad total de la LDSB a partir de los 8 DDE para ambos tratamientos cuando inicio el bioensayo con la alimentación de lípidos de origen terrestre (b). No se detectó actividad de la LDSB en las larvas de 1 DDE, pero a partir de los 3 DDE se observó un aumento de la actividad con un primer pico de actividad a los 6 DDE ($3.89 \pm 0.13 \text{ ULarva}^{-1}$). La actividad de la LDSB disminuyó a los 8 DDE para el tratamiento marino a $0.03 \pm 0.00 \text{ ULarva}^{-1}$, por su parte para el tratamiento terrestre que inició a los 8 DDE el valor fue de $0.04 \pm 0.00 \text{ ULarva}^{-1}$. La actividad de la LDSB se mantuvo relativamente baja y constante hasta los 30 DDE cuando se registró un aumento significativo en el tratamiento marino de $16.75 \pm 1.69 \text{ ULarva}^{-1}$, con respecto a las larvas del tratamiento terrestre. Sin embargo, la actividad de la LDSB en el tratamiento terrestre no registró este aumento sino hasta los 34 DDE con valores de $30.94 \pm 11.20 \text{ ULarva}^{-1}$. Los análisis de covarianza entre la actividad de la LDSB de los tratamientos no resultaron en diferencias significativas entre sus pendientes ($P = 0.84$), no obstante, al realizar la prueba de análisis de varianza de dos vías encontró diferencia significativa entre los tratamientos para los 30, 34 y 38 DDE.

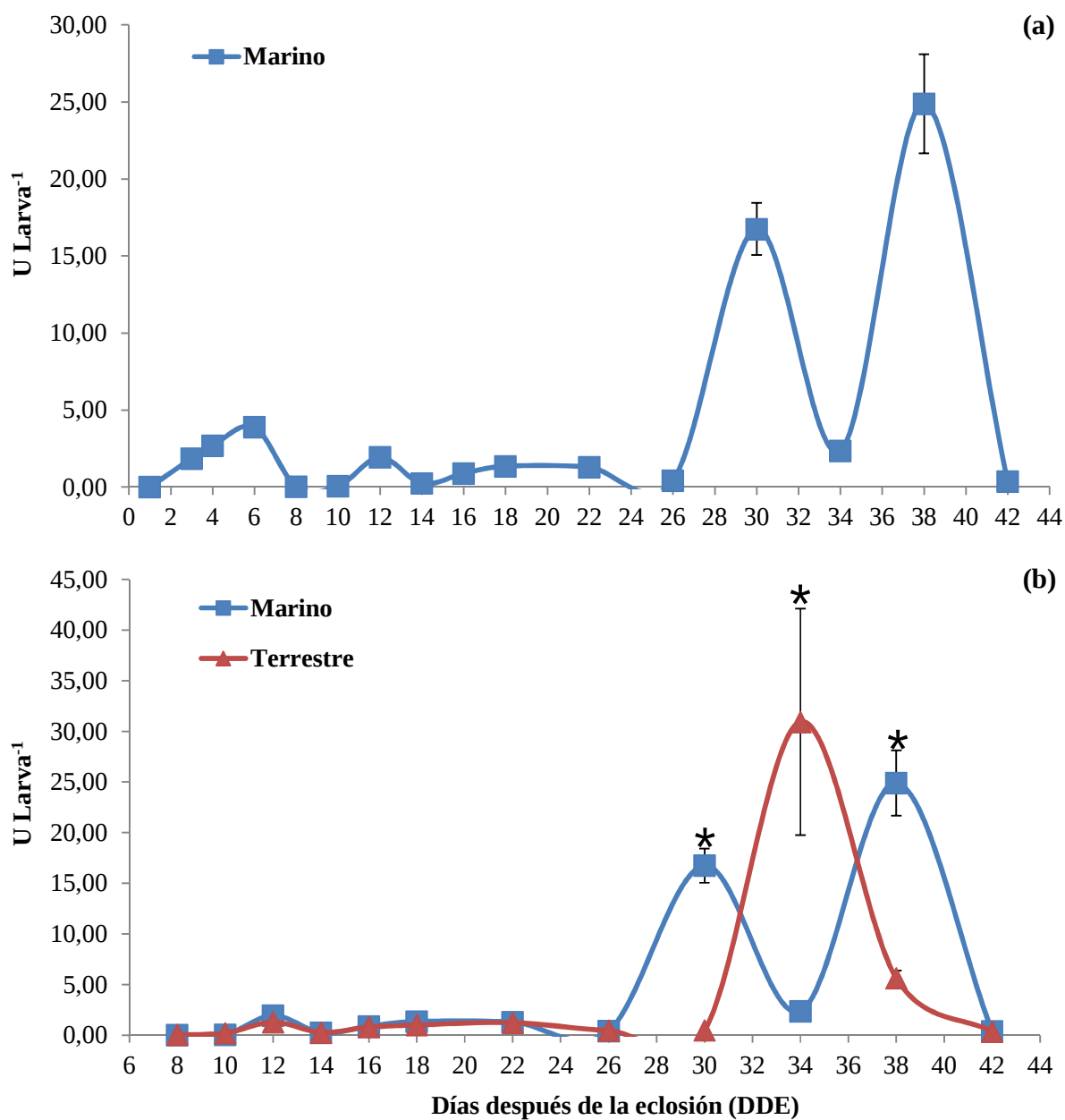


Figura 8. Actividad total de la LDSB durante el crecimiento larval del *P. californicus* (a) y utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo (b).

En la figura 9 se presenta la actividad específica de la LDSB de las larvas durante los primeros 42 DDE alimentadas con el tratamiento marino (a) y la actividad específica de la LDSB a partir de los 8 DDE para ambos tratamientos cuando inicio el bioensayo con la alimentación de lípidos de origen terrestre (b). No se detectó actividad específica de la LDSB en las larvas al 1 DDE, pero a los 3 DDE se da un aumento en la actividad ($1.55 \pm 0.01 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) y se mantiene relativamente constante hasta los 6 DDE ($1.26 \pm 0.02 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína). Para los 8 DDE la actividad de la LDSB disminuyó para el tratamiento marino a un valor de $0.13 \pm 0.02 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína, mientras que para el tratamiento terrestre que inició a los 8 DDE la actividad fue de $0.03 \pm 0.02 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. A los 12 DDE se presentó un primer pico de actividad en la LDSB en ambos tratamiento con valores de 1.66 ± 0.89 y $1.93 \pm 0.42 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína para el tratamiento marino y terrestre respectivamente. A partir de los 14 DDE la actividad de la LDSB se mantuvo relativamente baja y constante hasta los 30 DDE, cuando se registró un aumento significativo en el tratamiento marino de $0.62 \pm 0.02 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. Sin embargo, la actividad de la LDSB en el tratamiento terrestre no presentó este aumento sino hasta los 34 DDE con valores de $0.42 \pm 0.01 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. Los análisis de covarianza entre la actividad de la LDSB de los tratamientos no resultaron en diferencia significativa entre sus pendientes ($P = 0.86$). Sin embargo, la prueba de análisis de varianza de dos vías encontró diferencia significativa entre los tratamientos para los 10, 30, 34 y 38 DDE.

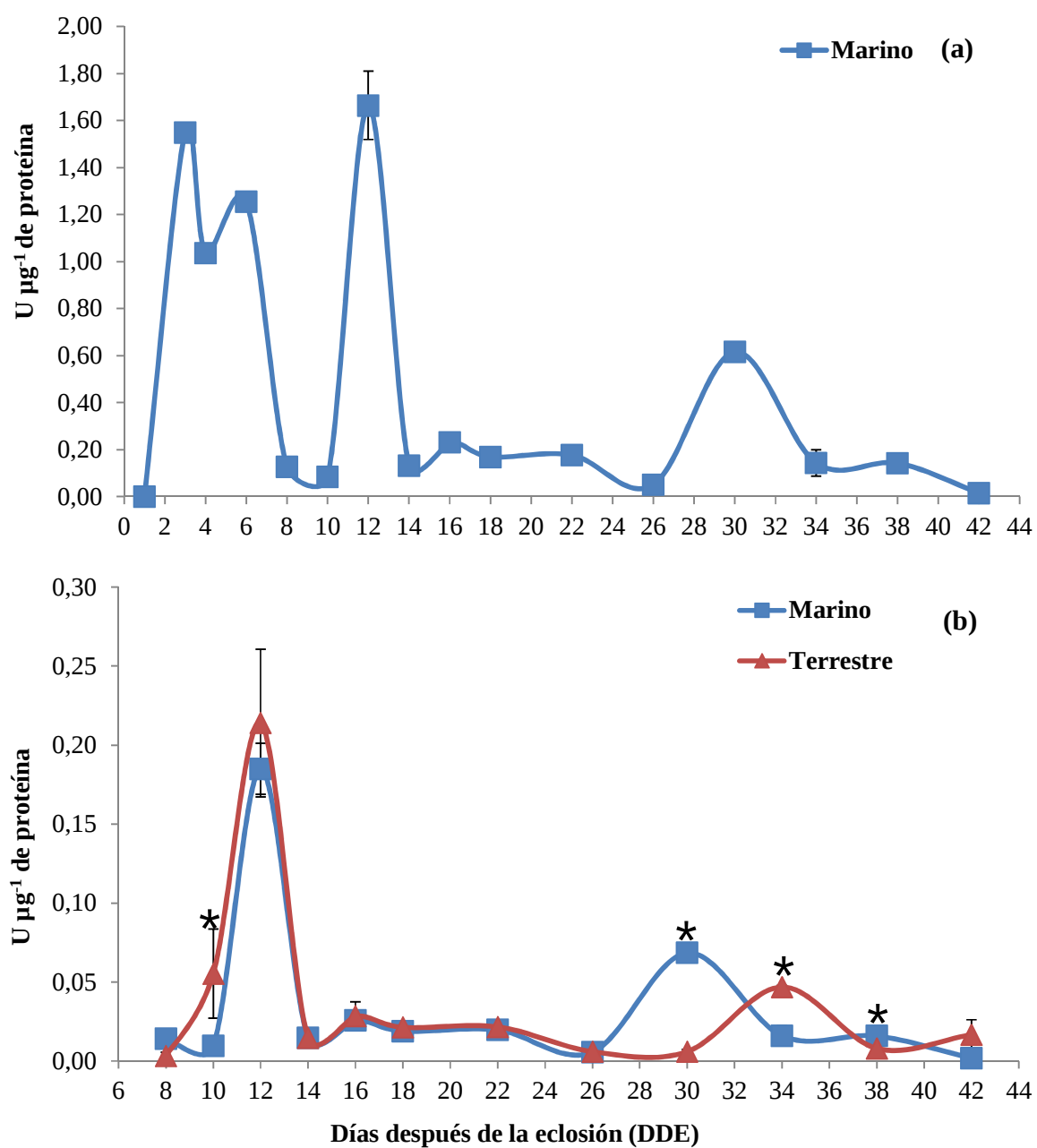


Figura 9. Actividad específica de la LDSB durante el crecimiento larval del *P. californicus* (a) y utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo (b).

4.3. Actividad enzimática de la fosfolipasa A₂

En la figura 10 se presenta la actividad total de la FLA₂ de las larvas durante los primeros 42 DDE alimentadas con el tratamiento marino (a) y la actividad total de la FLA₂ a partir de los 8 DDE para ambos tratamientos cuando inicio el bioensayo con la alimentación de lípidos de origen terrestre (b). Se detectó una actividad baja después de la eclosión pero antes de la primera alimentación exógena (1 DDE). Durante las primeras dos semanas, la actividad se mantuvo relativamente baja, entre 0.01 y 0.03 ± 0.01 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por larva para ambos grupos. A partir de los 18 DDE se observó un incremento significativo en ambos tratamientos. Para el tratamiento marino la máxima actividad se alcanzó a los 30 DDE con 1.37 ± 0.61 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por larva, mientras que para el tratamiento terrestre fue a los 22 DDE pero con 0.99 ± 0.24 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por larva. A continuación, las actividades disminuyeron, y a los 38 DDE fueron de, 0.32 ± 0.06 y 0.18 ± 0.06 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por larva para el tratamiento marino y terrestre respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de los tratamientos ($P = 0.59$).

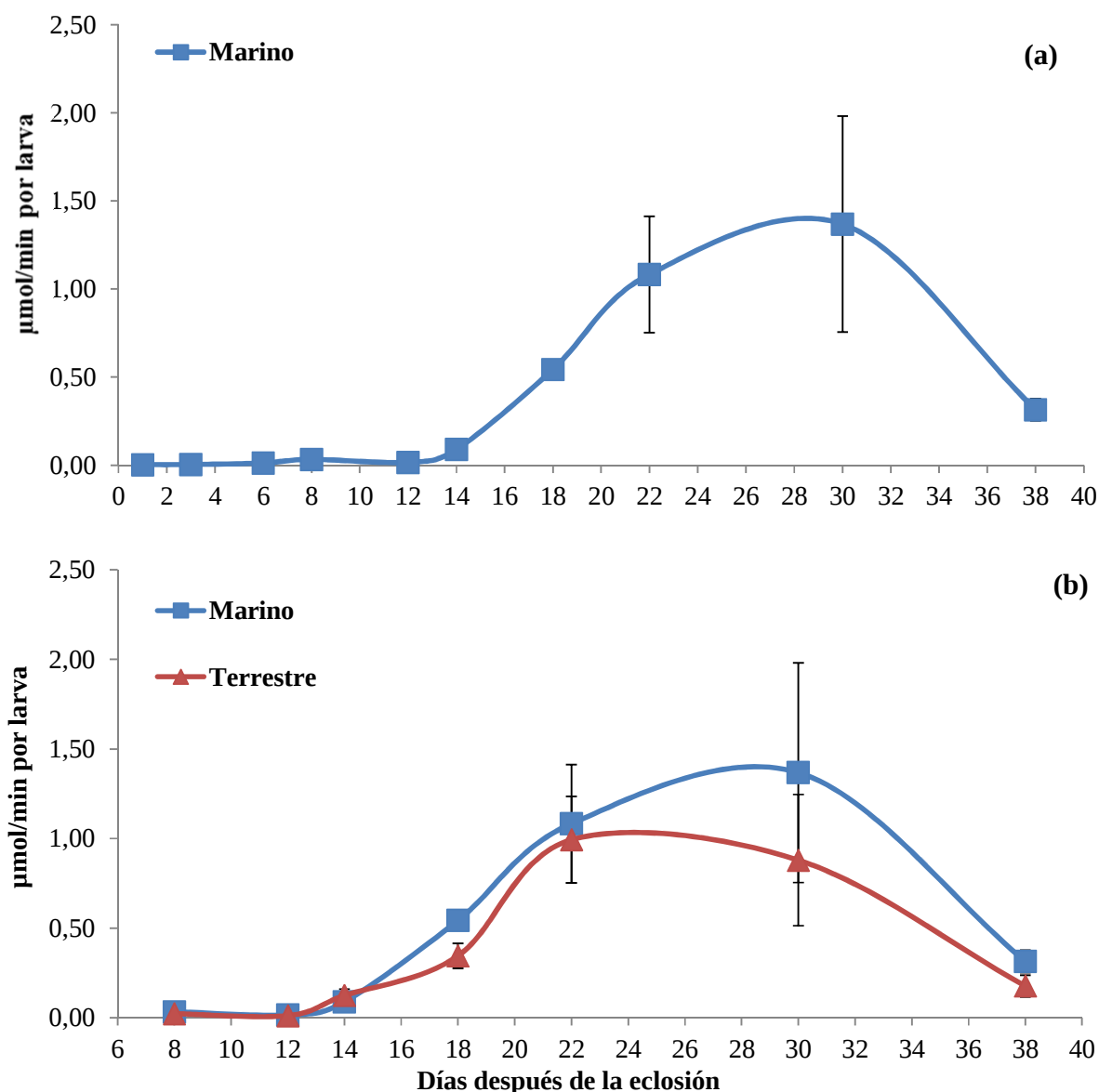


Figura 10. Actividad total de la FLA₂ por larva durante el crecimiento larval del *P. californicus* (a) y utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo (b).

En la figura 11 se presenta la actividad específica de la FLA₂ de las larvas durante los primeros 42 DDE alimentadas con el tratamiento marino (a) y la actividad específica de la FLA₂ a partir de los 8 DDE para ambos tratamientos cuando inicio el bioensayo con la alimentación de lípidos de origen terrestre (b). Se detectó actividad después de la eclosión con un valor de $0,03 \pm 0,00 \mu\text{mol}/\text{min}$ por μg de proteína. La actividad de la FLA₂ disminuyó significativamente, siendo casi nula, hacia el momento de la primera alimentación exógena (3 DDE). A los 8 DDE se presentó un pico de actividad de la FLA₂ en el tratamiento marino con un valor de $0,13 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{min}$ por μg de

proteína, a diferencia del tratamiento terrestre que aumentó a 0.01 ± 0.00 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por μg de proteína. A los 12 DDE la actividad de la FLA₂ del tratamiento marino disminuyó y el tratamiento terrestre aumentó hasta un valor común de 0.02 ± 0.00 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por μg de proteína. A partir de los 12 DDE se observó un incremento significativo hasta alcanzar un máximo de actividad a los 22 DDE con un valor de 0.15 ± 0.03 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por μg de proteína para ambos tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de los tratamientos después del análisis de covarianza ($P = 0.58$).

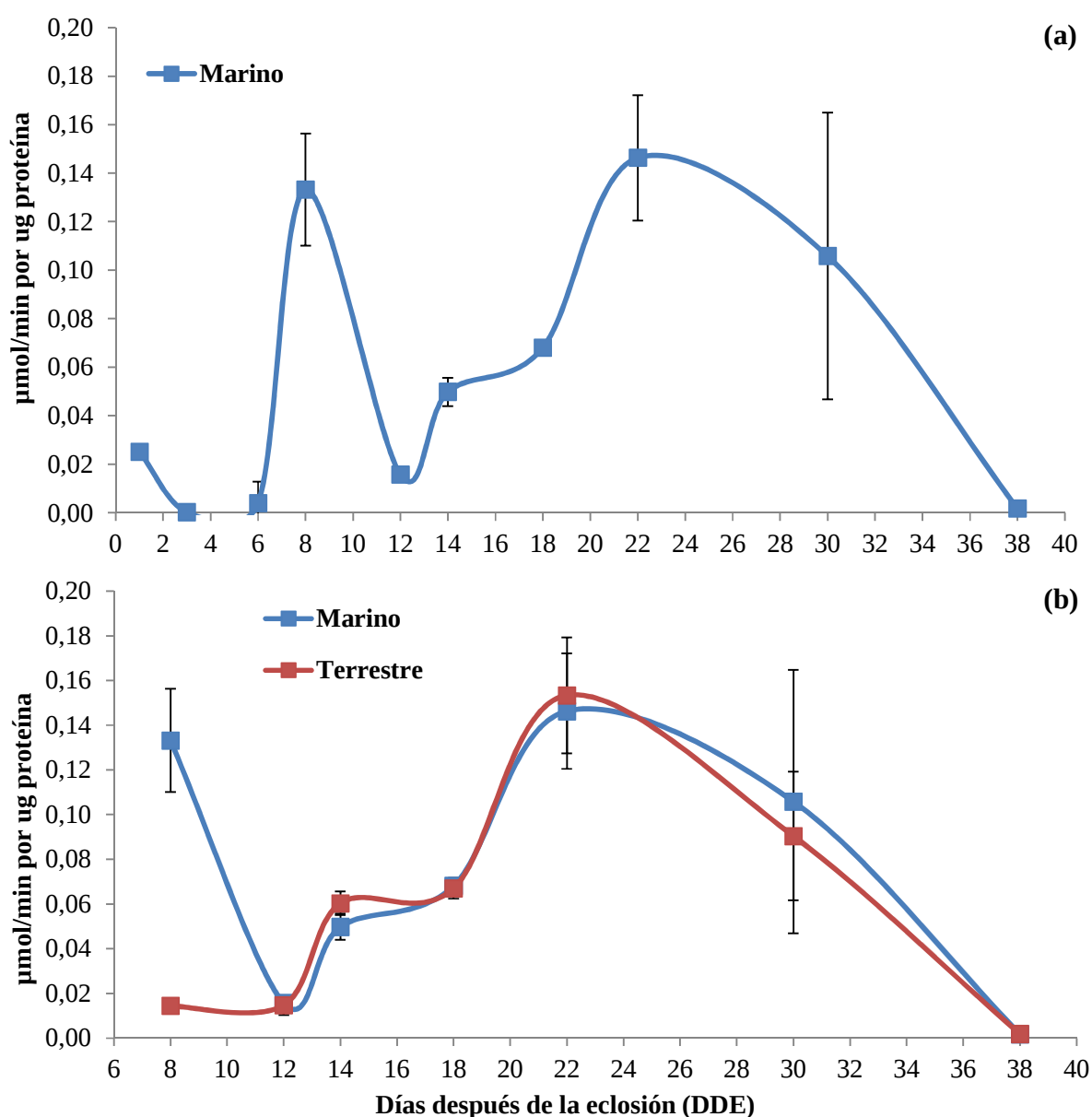


Figura 11. Actividad específica de la FLA₂ durante el crecimiento larval del *P. californicus* (a) y utilizando dos fuentes de lípidos (enriquecedores) en el alimento vivo (b).

4.4. Enriquecimiento del alimento vivo

4.4.1. Composición proximal

En la tabla 4 se presentan los valores estimados de proteína cruda (%) y lípidos totales para el alimento vivo antes y después del enriquecimiento con las dos fuentes de lípidos. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de proteína cruda en el alimento vivo antes y después de enriquecer. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los lípidos totales en el alimento vivo antes y después de enriquecer con ambas fuentes de lípidos (i.e., marino y terrestre).

Tabla 4. Valores de proteína cruda y lípidos totales (%) del alimento vivo 12 horas después del enriquecimiento con dos fuentes de lípidos (enriquecedores). (Media $\pm$ desviación estándar, n=3)

Tratamiento	Proteína Cruda (%)		Lípidos Totales (%)	
Rotíferos				
Sin enriquecer	55.33	(± 3.49)	8.07 b	(± 0.12)
Marino	57.75	(± 1.75)	15.46 a	(± 2.00)
Terrestre	54.25	(± 1.75)	16.19 a	(± 0.70)
Anova, P	(P=0.28)		(P=0.01)	
Artemia				
Sin enriquecer	54.83	(± 1.01)	12.21 b	(± 0.66)
Marino	56.58	(± 2.02)	21.15 a	(± 2.34)
Terrestre	54.67	(± 4.15)	21.53 a	(± 2.56)
Anova, P	(P=0.65)		(P=0.01)	

4.4.2. Perfil de ácidos grasos: Rotíferos

En la tabla 5 se presenta el porcentaje de los ácidos grasos identificados en los rotíferos antes y después de ser enriquecidos con cada uno de los enriquecedores. Los ácidos grasos se agruparon tomando como base el número de carbonos y el grado de saturación según Tocher, (2003). Se encontraron diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos de los rotíferos antes y después de enriquecer.

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos en los rotíferos antes y después de enriquecer. Los valores están expresados en porcentaje de ácidos grasos identificados (Media $\pm$ desviación estándar, n=3). Subíndices con letras distintas denotan diferencia significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Ácido Graso	Sin Enriquecer	Marino	Terrestre
Saturados			
C14:0	7.52 $\pm$ 0.01 b	12.63 $\pm$ 0.96 a	2.00 $\pm$ 0.20 c
C16:0	21.90 $\pm$ 0.54 a	20.39 $\pm$ 1.29 a	8.80 $\pm$ 0.26 b
C18:0	3.58 $\pm$ 0.02 a	1.58 $\pm$ 0.23 b	2.69 $\pm$ 0.35 ab
Total	33.00 $\pm$ 0.30 a	34.59 $\pm$ 0.54 a	13.49 $\pm$ 0.08 b
Monoinsaturados			
C16:1	15.38 $\pm$ 0.07 a	4.42 $\pm$ 0.21 b	4.03 $\pm$ 0.19 b
C18:1n9	4.76 $\pm$ 0.09 b	1.32 $\pm$ 0.13 c	10.94 $\pm$ 0.14 a
C18:1n7	5.83 $\pm$ 0.01 a	1.60 $\pm$ 0.12 c	2.01 $\pm$ 0.11 b
C20:1	2.99 $\pm$ 0.01 a	0.78 $\pm$ 0.09 c	1.20 $\pm$ 0.08 b
Total	28.96 $\pm$ 0.05 a	8.13 $\pm$ 0.05 c	18.17 $\pm$ 0.05 b
PUFAs n-6			
C18:2n6	11.29 $\pm$ 0.01 b	3.05 $\pm$ 0.23 c	14.76 $\pm$ 0.27 a
Total	11.29 $\pm$ 0.01 b	3.05 $\pm$ 0.23 c	14.76 $\pm$ 0.27 a
PUFAs n-3			
C18:3n3	0.64 $\pm$ 0.07 b	0.78 $\pm$ 0.21 b	45.59 $\pm$ 0.14 a
C18:4n3	0.14 $\pm$ 0.00 b	0.48 $\pm$ 0.03 a	0.08 $\pm$ 0.02 b
Total	0.79 $\pm$ 0.05 c	1.26 $\pm$ 0.13 b	45.67 $\pm$ 0.08 a
LC-PUFAs n-6			
C20:3n6	1.18 $\pm$ 0.02 a	0.31 $\pm$ 0.01 c	0.43 $\pm$ 0.05 b
C20:4n6 (ARA)	4.69 $\pm$ 0.08 a	3.54 $\pm$ 0.02 b	1.38 $\pm$ 0.05 c
Total	5.86 $\pm$ 0.04 a	3.85 $\pm$ 0.00 b	1.82 $\pm$ 0.00 c
LC-PUFAs n-3			
C20:3n3	1.96 $\pm$ 0.01 a	0.85 $\pm$ 0.06 b	0.51 $\pm$ 0.01 c
C20:5n3 (EPA)	17.87 $\pm$ 0.27 a	6.86 $\pm$ 0.05 b	5.43 $\pm$ 0.24 b
C22:6n3 (DHA)	0.28 $\pm$ 0.08 b	41.39 $\pm$ 3.11 a	0.15 $\pm$ 0.00 b
Total	20.10 $\pm$ 0.14 b	49.10 $\pm$ 1.76 a	6.09 $\pm$ 0.16 c
Proporciones			
DHA:EPA	0.02 $\pm$ 0.00	6.04 $\pm$ 0.41	0.03 $\pm$ 0.00
EPA:ARA	3.81 $\pm$ 0.02	1.94 $\pm$ 0.02	3.92 $\pm$ 0.04

Los rotíferos sin enriquecer presentaron valores altos de ácidos grasos saturados ($30.00 \pm 0.30\%$), monoinsaturados ($28.96 \pm 0.05\%$) y de LC-PUFAs n-3 ($20.10 \pm 0.14\%$). De estos últimos, el C20:5n3 (EPA) representó el mayor porcentaje con un valor de $17.87 \pm 0.27\%$ de los LC-PUFAs n-3, mientras que el valor de C22:6n3 (DHA) fue casi nulo. De los LC-PUFAs n-6 el ácido graso más abundante fue el C20:4n6 (ARA), el cual representó el $4.66 \pm 0.07\%$. Así mismo, los PUFAs n-3 representaron un porcentaje bajo con el $0.92 \pm 0.17\%$ del total de ácidos grasos identificados.

Al enriquecer los rotíferos con el tratamiento marino los LC-PUFAs n-3 incrementaron significativamente alcanzando porcentajes de $49.10 \pm 1.76\%$, donde el C22:6n3 (DHA) representó el LC-PUFAs n-3 más abundante ($41.31 \pm 3.11\%$). Los ácidos grasos saturados mantuvieron valores similares ($34.59 \pm 0.54\%$) y los monoinsaturados ($8.13 \pm 0.05\%$) y los LC-PUFAs n-6 ($3.85 \pm 0.00\%$) disminuyeron significativamente.

Los rotíferos enriquecidos con el tratamiento terrestre tuvieron valores altos de PUFAs n-3 ($45.67 \pm 0.08\%$), donde el ácido linolénico (C18:3n3) es el PUFAs n-3 más abundante en el tratamiento terrestre ($45.59 \pm 0.14\%$). Al igual que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, los ácidos grasos LC-PUFAs n-3 y los LC-PUFAs n-6 ($1.82 \pm 0.00\%$), en especial el C22:6n3 (DHA) ($0.15\% \pm 0.00\%$) de los LC-PUFAs n-3 y el C20:4n6 (ARA) ($1.82 \pm 0.00\%$) de los LC-PUFAs n-6 disminuyeron significativamente. Sin embargo, el C20:5n3 (EPA) no mostró diferencia significativa con respecto al tratamiento marino.

En la tabla 6 se presentan los valores de los ácidos grasos identificados expresados en peso seco (gramos de a.g. por cada 100 gramos de rotíferos) antes y después de ser enriquecidos con cada uno de los enriquecedores. Se encontraron diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos de los rotíferos antes y después de enriquecer.

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos en los rotíferos antes y después de enriquecer. Los valores están expresados en g/100g de rotíferos en peso seco (Media $\pm$ desviación estándar, n=3). Subíndices con letras distintas denotan diferencia significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Ácido Graso	Sin Enriquecer			Marino			Terrestre		
Saturados									
C14:0	0.38	±0.01	b	1.33	±0.30	a	0.23	±0.05	c
C16:0	1.09	±0.05	b	2.14	±0.45	a	1.02	±0.08	b
C18:0	0.18	±0.01	b	0.17	±0.05	b	0.31	±0.01	a
Total	1.65	±0.03	b	3.63	±0.20	a	1.56	±0.04	c
Monoinsaturados									
C16:1	0.77	±0.02	a	0.47	±0.09	b	0.47	±0.07	b
C18:1n9	0.24	±0.00	b	0.14	±0.03	c	1.26	±0.12	a
C18:1n7	0.29	±0.01	a	0.17	±0.04	c	0.23	±0.04	b
C20:1	0.15	±0.00	a	0.09	±0.01	b	0.14	±0.01	a
Total	1.45	±0.01	b	0.86	±0.03	c	2.10	±0.05	a
PUFAS n-6									
C18:2n6	0.56	±0.01	b	0.32	±0.07	c	1.71	±0.15	a
Total	0.56	±0.01	c	0.32	±0.07	b	1.71	±0.15	a
PUFAS n-3									
C18:3n3	0.03	±0.00	c	0.08	±0.01	b	5.28	±0.14	a
C18:4n3	0.01	±0.00	b	0.72	±0.10	a	0.01	±0.02	b
Total	0.04	±0.00	c	0.80	±0.06	b	5.29	±0.08	a
LC-PUFAS n-6									
C20:3n6	0.06	±0.00	a	0.03	±0.01	b	0.05	±0.01	a
C20:4n6 (ARA)	0.23	±0.00	b	0.37	±0.06	a	0.16	±0.02	c
Total	0.29	±0.00	b	0.40	±0.04	a	0.21	±0.01	c
LC-PUFAS n-3									
C20:3n3	0.10	±0.00	a	0.09	±0.02	a	0.06	±0.01	b
C20:5n3 (EPA)	0.89	±0.01	a	0.72	±0.10	b	0.63	±0.09	b
C22:6n3 (DHA)	0.01	±0.00	c	4.30	±0.32	a	0.02	±0.00	b
Total	1.00	±0.00	b	5.10	±0.16	a	0.71	±0.05	c
Proporciones									
DHA:EPA	0.02	±0.00		6.04	±0.41		0.03	±0.00	
EPA:ARA	3.81	±0.00		1.94	±0.02		3.92	±0.04	

Los rotíferos sin enriquecer tuvieron valores de ácidos grasos saturados (1.65 ± 0.03 g/100g), monoinsaturados (1.45 ± 0.01 g/100g) y LC-PUFAS n-3 (1.00 ± 0.00 g/100g) en mayor cantidad, siendo el C20:5n3 (EPA) el que se encontró en mayor cantidad con un peso seco de 0.89 ± 0.01 g/100g, mientras que el valor de C22:6n3 (DHA) fue casi nulo. De los LC-PUFAs n-6 el C20:4n6 (ARA) fue el ácido graso más abundante con un valor de 0.23 ± 0.00 g/100g. Los PUFAs n-3 tuvieron un valor bajo de 0.04 ± 0.00 g/100g, mientras que el contenido de los PUFAs n-6 fue mayor con un peso seco de 0.56 ± 0.01 g/100g.

Al enriquecer los rotíferos con el tratamiento marino los LC-PUFAs n-3 se incrementaron significativamente alcanzando un valor de 5.10 ± 0.16 g/100g, donde el C22:6n3 (DHA) representó el LC-PUFAs n-3 más abundante (4.30 ± 0.32 g/100g). Así mismo, los ácidos grasos saturados y LC-PUFAs n-6 aumentaron significativamente hasta 3.63 ± 0.20 y 0.40 ± 0.04 g/100g respectivamente, en cambio los ácidos grasos monoinsaturados (0.86 ± 0.03 g/100g) y PUFAs n-6 (0.32 ± 0.07 g/100g) disminuyeron significativamente.

Los rotíferos enriquecidos con el tratamiento terrestre aumentaron significativamente el valor de PUFAs n-3 a 5.29 ± 0.08 g/100g, donde el ácido linolénico (C18:3n3) representa casi la totalidad de los PUFAs n-3 (5.28 ± 0.08 g/100g). A diferencia de los ácidos grasos saturados que mantuvieron un valor similar (1.56 ± 0.04 g/100g), los monoinsaturados y PUFAs n-6 aumentaron significativamente sus valores a 2.10 ± 0.05 y 1.71 ± 0.05 g/100g respectivamente, mientras que los LC-PUFAs n-6 (0.21 ± 0.01 g/100g) y LC-PUFAs n-3 (0.71 ± 0.5 g/100g), en especial el C22:6n3 (DHA) a un valor de 0.02 ± 0.00 g/100g de los LC-PUFAs n-3.

4.4.3. Perfil de ácidos grasos: *Artemia*

En la tabla 7 se presenta el porcentaje de los ácidos grasos identificados en la *Artemia* antes y después de ser enriquecida con cada uno de los enriquecedores. De igual manera los ácidos grasos se agruparon de acuerdo con el número de carbonos y el grado de saturación según Tocher, (2003). Se encontraron diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos de la *Artemia* antes y después de enriquecer.

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos en la *Artemia* antes y después de enriquecer. Los valores están expresados en porcentaje de ácidos grasos identificados (Media $\pm$ desviación estándar, n=3). Subíndices con letras distintas denotan diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Ácido Graso	Sin Enriquecer	Marino	Terrestre
Saturados			
C14:0	0.89 $\pm$ 0.07 b	2.71 $\pm$ 0.12 a	0.46 $\pm$ 0.03 c
C16:0	12.74 $\pm$ 0.01 b	15.39 $\pm$ 0.23 a	9.62 $\pm$ 0.04 c
C18:0	5.53 $\pm$ 0.15	5.35 $\pm$ 0.29	5.76 $\pm$ 0.04
Total	19.15 $\pm$ 0.07 b	23.45 $\pm$ 0.08 a	15.84 $\pm$ 0.00 c
Monoinsaturados			
C16:1	2.36 $\pm$ 0.07 a	1.57 $\pm$ 0.04 b	1.34 $\pm$ 0.00 c
C18:1n9	21.91 $\pm$ 0.25 a	15.46 $\pm$ 0.09 c	20.80 $\pm$ 0.05 b
C18:1n7	6.47 $\pm$ 0.39 a	4.81 $\pm$ 0.09 b	4.63 $\pm$ 0.02 b
C20:1	0.74 $\pm$ 0.04 a	0.62 $\pm$ 0.01 b	0.62 $\pm$ 0.00 b
Total	31.48 $\pm$ 0.17 a	22.46 $\pm$ 0.04 c	27.40 $\pm$ 0.02 b
PUFAS n-6			
C18:2n6	6.46 $\pm$ 0.15 b	4.26 $\pm$ 0.02 c	9.61 $\pm$ 0.03 a
Total	6.46 $\pm$ 0.15 b	4.26 $\pm$ 0.02 c	9.61 $\pm$ 0.03 a
PUFAS n-3			
C18:3n3	39.85 $\pm$ 0.62 a	27.92 $\pm$ 0.22 b	40.24 $\pm$ 0.12 a
C18:4n3	0.11 $\pm$ 0.00 b	5.26 $\pm$ 0.09 a	4.99 $\pm$ 0.01 a
Total	39.96 $\pm$ 0.44 b	33.18 $\pm$ 0.09 c	45.23 $\pm$ 0.08 a
LC-PUFAS n-6			
C20:3n6	0.24 $\pm$ 0.01 a	0.22 $\pm$ 0.00 b	0.26 $\pm$ 0.00 a
C20:4n6 (ARA)	0.51 $\pm$ 0.06 b	1.68 $\pm$ 0.01 a	0.33 $\pm$ 0.01 c
Total	0.75 $\pm$ 0.04 b	1.90 $\pm$ 0.00 a	0.59 $\pm$ 0.00 c
LC-PUFAS n-3			
C20:3n3	0.14 $\pm$ 0.00 b	0.21 $\pm$ 0.02 a	0.11 $\pm$ 0.00 b
C20:5n3 (EPA)	1.63 $\pm$ 0.09 b	3.67 $\pm$ 0.02 a	1.13 $\pm$ 0.04 c
C22:6n3 (DHA)	0.49 $\pm$ 0.36 b	10.88 $\pm$ 0.15 a	0.09 $\pm$ 0.13 b
Total	2.26 $\pm$ 0.18 b	14.76 $\pm$ 0.08 a	1.33 $\pm$ 0.07 c
Proporciones			
DHA:EPA	0.29 $\pm$ 0.20	2.96 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.00
EPA:ARA	3.23 $\pm$ 0.24	2.18 $\pm$ 0.02	3.43 $\pm$ 0.02

Los metanauplios de *Artemia* sin enriquecer presentaron valores altos de ácidos grasos PUFAs n-3 ($39.85 \pm 0.62\%$), siendo el ácido linolénico C18:3n3 el ácido graso más abundante dentro de este grupo y representa el mayor porcentaje en las artemias, con un valor de $39.85 \pm 0.85\%$, le siguieron los monoinsaturados ($31.48 \pm 0.17\%$) y saturados ($19.15 \pm 0.07\%$). Los LC-PUFAs n-3 representaron un valor bajo, con el $2.26 \pm 0.18\%$ y para los LC-PUFAs n-6 de $0.75 \pm 0.04\%$.

Al enriquecer las artemias con el tratamiento marino los LC-PUFAs n-3 aumentaron significativamente hasta un valor de $14.76 \pm 0.08\%$, siendo el C22:6n3 (DHA) el ácido graso de mayor proporción dentro de este grupo, seguido por el C20:5n3 (EPA). De igual manera, los LC-PUFAs n-6, en especial el C20:4n6 incrementó significativamente su valor en los metanauplios de *Artemia*. En el caso de los PUFAs n-3, estos disminuyeron significativamente a un valor de $33.18 \pm 0.09\%$, siendo el ácido linolénico C18:3n3 nuevamente el ácido graso más abundante en las artemias con un valor de $27.92 \pm 0.22\%$. Los ácidos grasos monoinsaturados y PUFAs n-6 disminuyeron significativamente a un valor de $22.46 \pm 0.04\%$ y $4.26 \pm 0.02\%$ respectivamente, mientras que los saturados aumentaron a $23.45 \pm 0.08\%$.

Las artemias enriquecidas con el tratamiento terrestre presentaron valores altos de PUFAs n-3 ($45.23 \pm 0.08\%$), dentro de este grupo el ácido linolénico C18:3n3 fue el más abundante ($40.24 \pm 0.12\%$). Los ácidos grasos saturados ($15.84 \pm 0.00\%$), monoinsaturados ($27.40 \pm 0.02\%$), los LC-PUFAs n-6 ($0.59 \pm 0.00\%$) y LC-PUFAs n-3 ($1.33 \pm 0.07\%$) presentaron una disminución significativa con respecto a los no enriquecidos. Dentro del grupo los LC-PUFAS n-3 el que se presentó en mayor abundancia fue el C20:5n3 (EPA) con valores de $1.13 \pm 0.04\%$.

En la tabla 8 se presenta los valores de los ácidos grasos identificados expresados en peso seco (gramos de a.g. por cada 100 gramos de *Artemia*) antes y después de ser enriquecidos con cada uno de los enriquecedores. Se encontraron diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos de los rotíferos antes y después de enriquecer.

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos en las artemias antes y después de enriquecer. Los valores están expresados en g/100g de artemias en peso seco (Media $\pm$ desviación estándar, n=3). Subíndices con letras distintas denotan diferencia significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Ácido Graso	Sin Enriquecer	Marino	Terrestre
Saturados			
C14:0	0.08 $\pm$ 0.01 b	0.41 $\pm$ 0.04 a	0.06 $\pm$ 0.01 c
C16:0	1.12 $\pm$ 0.07 c	2.33 $\pm$ 0.13 a	1.27 $\pm$ 0.07 b
C18:0	0.49 $\pm$ 0.05 b	0.78 $\pm$ 0.03 a	0.76 $\pm$ 0.05 a
Total	1.68 $\pm$ 0.03 c	3.52 $\pm$ 0.06 a	2.10 $\pm$ 0.03 b
Monoinsaturados			
C16:1	0.21 $\pm$ 0.02 a	0.24 $\pm$ 0.02 a	0.18 $\pm$ 0.01 b
C18:1n9	1.92 $\pm$ 0.15 c	2.33 $\pm$ 0.07 b	2.76 $\pm$ 0.16 a
C18:1n7	0.57 $\pm$ 0.00 c	0.72 $\pm$ 0.02 a	0.61 $\pm$ 0.03 b
C20:1	0.07 $\pm$ 0.01 b	0.09 $\pm$ 0.00 a	0.08 $\pm$ 0.01 ab
Total	2.76 $\pm$ 0.07 c	3.38 $\pm$ 0.03 b	3.63 $\pm$ 0.07 a
PUFAS n-6			
C18:2n6	0.57 $\pm$ 0.02 c	0.64 $\pm$ 0.02 b	1.27 $\pm$ 0.07 a
Total	0.57 $\pm$ 0.02 c	0.64 $\pm$ 0.02 b	1.27 $\pm$ 0.07 a
PUFAS n-3			
C18:3n3	3.49 $\pm$ 0.18 c	4.24 $\pm$ 0.13 b	5.33 $\pm$ 0.31 a
C18:4n3	0.01 $\pm$ 0.01 c	0.80 $\pm$ 0.02 a	0.66 $\pm$ 0.04 b
Total	3.50 $\pm$ 0.12 c	5.04 $\pm$ 0.08 b	5.99 $\pm$ 0.19 a
LC-PUFAS n-6			
C20:3n6	0.02 $\pm$ 0.00 b	0.03 $\pm$ 0.00 a	0.03 $\pm$ 0.00 a
C20:4n6 (ARA)	0.04 $\pm$ 0.01 b	0.25 $\pm$ 0.01 a	0.04 $\pm$ 0.00 b
Total	0.07 $\pm$ 0.00 c	0.29 $\pm$ 0.00 a	0.08 $\pm$ 0.00 b
LC-PUFAS n-3			
C20:3n3	0.01 $\pm$ 0.00 b	0.03 $\pm$ 0.00 a	0.01 $\pm$ 0.00 b
C20:5n3 (EPA)	0.14 $\pm$ 0.02 b	0.56 $\pm$ 0.02 a	0.15 $\pm$ 0.01 b
C22:6n3 (DHA)	0.04 $\pm$ 0.03 b	1.65 $\pm$ 0.03 a	0.01 $\pm$ 0.02 b
Total	0.20 $\pm$ 0.02 b	2.24 $\pm$ 0.01 a	0.18 $\pm$ 0.01 b
Proporciones			
DHA:EPA	0.29 $\pm$ 0.20	2.97 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.00
EPA:ARA	3.23 $\pm$ 0.24	2.19 $\pm$ 0.00	3.43 $\pm$ 0.02

Las artemias sin enriquecer presentaron valores altos de ácidos grasos PUFAs n-3 (3.50 ± 0.12 g/100g), siendo el ácido linolénico C18:3n3 el más abundante de este grupo y en los metanauplios de *Artemia* con un valor de 3.49 ± 0.18 g/100g, le siguieron los monoinsaturados (2.76 ± 0.07 g/100g), los saturados (1.68 ± 0.03 g/100g) y PUFAs n-6 (0.57 ± 0.02 g/100g). Los LC-PUFAs n-6 presentaron un valor bajo de 0.07 ± 0.00 g/100g y para los LC-PUFAs n-3 de 0.20 ± 0.02 g/100g.

Al enriquecer las artemias con el tratamiento marino los LC-PUFAs n-3 y LC-PUFAS n-6 aumentaron su contenido significativamente hasta un valor de 2.24 ± 0.01 y 0.29 ± 0.00 g/100g g/100g respectivamente, siendo el C22:6n3 (DHA) dentro de los LC-PUFAS n-3 el ácido graso más abundante, seguido por el C20:5n3 (EPA) con un valor de 0.56 ± 0.02 g/100g, mientras que el C20:4n6 (ARA) con un valor de 0.25 ± 0.01 g/100g dentro de los LC-PUFAs n-6. De igual manera, los ácidos grasos saturados (3.52 ± 0.06 g/100g), monoinsaturados (3.38 ± 0.03 g/100g), PUFAs n-6 (0.64 ± 0.02 g/100g) y los PUFAs n-3 (4.24 ± 0.13 g/100g) aumentaron significativamente, de los PUFAs n-3, el ácido linolénico se encontró en mayor cantidad en los metanauplios de *Artemia* con un valor de 5.04 ± 0.08 g/100g.

Las artemias enriquecidas con el tratamiento terrestre presentaron un valor alto de PUFAS n-3 (5.99 ± 0.19 g/100g), donde el ácido linolénico nuevamente fue el ácido graso más abundante dentro de los PUFAs n-3 y en los metanauplios de *Artemia* tuvo un valor de 5.33 ± 0.31 g/100g. Así mismo, los ácidos grasos saturados (2.10 ± 0.03 g/100g), monoinsaturados (3.63 ± 0.07 g/100g) y los PUFAs n-6 (1.27 ± 0.07 g/100g) aumentaron significativamente con respecto a los no enriquecidos. Los LC-PUFAS n-3 y LC-PUFAS n-6 disminuyeron significativamente a valores de 0.18 ± 0.01 y 0.08 ± 0.00 g/100g.

4.5. Pruebas de calidad de larva

4.5.1 Prueba de estrés térmico

Se encontraron diferencias significativas en la resistencia de las larvas a la prueba de estrés, con el tratamiento marino presentaron un índice de estrés significativamente menor (1.88 ± 2.65) que las larvas del tratamiento terrestre (29.92 ± 14.66). Las primeras larvas murieron a los 60 minutos en el tratamiento terrestre, mientras que en el tratamiento marino la primera muerte se registró a los 95 minutos después del inicio de la prueba de estrés. Ninguno de los animales del grupo control murió durante la prueba, lo que mostró que la manipulación no les causó daño alguno.

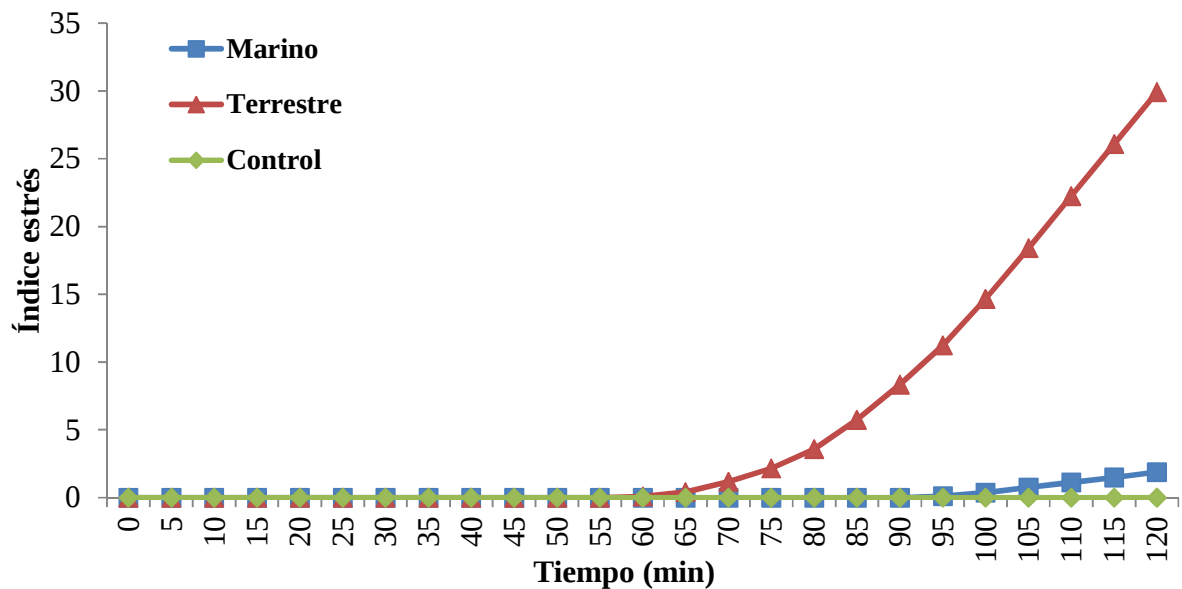


Figura 12. Prueba de estrés térmico a 32 °C según Dhert *et al.*, (1992).

4.5.2. Destete

Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de las larvas después de realizar el destete entre el tratamiento marino y terrestre ($P = 0.02$). Las larvas alimentadas con la fuente de lípidos marina registró una supervivencia final promedio de 21.23%, mientras que la supervivencia del tratamiento terrestre fue de 3.72% (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de supervivencia (%) en las larvas de lenguado después del destete. (Media $\pm$ desviación estándar)

Tratamiento	Supervivencia %
Marino	
1	20.95
3	21.50
Promedio	21.23 (0.39)
Terrestre	
2	0.95
4	9.25
5	0.95
Promedio	3.72 (4.79)

Capítulo 5

5. Discusión

5.1. Crecimiento y desarrollo larval

El desarrollo morfológico de las larvas del lenguado de California observado en este trabajo, como la edad de apertura de la boca y del ano, la división del intestino en dos regiones (figura 7a), la torsión de la notocorda (figura 7c), la migración ocular (figura 7f) y el asentamiento, es similar al descrito por Gisbert *et al.*, (2004), Zacarías-Soto (2007) y Juárez-Casillas (2009) para esta especie. Como parte del estudio de la fisiología digestiva de larvas de peces marinos, se evalúa el crecimiento en longitud o peso como un indicador del grado de desarrollo de los organismos. En el presente trabajo, las larvas de lenguado alimentadas con una dieta enriquecida con aceite de origen marino (control) tuvieron un crecimiento de 10.13 ± 0.42 mm en LT a los 42 DDE, un resultado similar al reportado por Gisbert *et al.*, (2002) a la misma edad (10.1 ± 0.5 mm), mientras que con el alimento enriquecido con aceite de linaza alcanzaron los 7.47 ± 0.75 mm a los 42 DDE. Esta diferencia en el crecimiento se asoció principalmente con el aporte de AGE presentes en el alimento vivo después del enriquecimiento con las emulsiones de origen marino y terrestre.

Como el alimento vivo (rotíferos y metanauplios de *Artemia*) típicamente utilizado para cultivar larvas de peces marinos es naturalmente deficiente de AGE, el objetivo del enriquecimiento es mejorar su perfil de ácidos grasos y suministrar a las larvas los AGE que requieren (Tocher, 2003). El alimento vivo enriquecido por doce horas con las emulsiones marina y terrestre tuvo diferencias significativas en los valores de los principales ácidos grasos esenciales DHA, EPA y ARA. Con el enriquecimiento, se logró aumentar a casi el doble el porcentaje de lípidos totales en los rotíferos (49%) y en la *Artemia* (43%), particularmente el DHA en el tratamiento marino y el ácido linolénico (C18:3n3) en el tratamiento terrestre se encontraron en mayor proporción.

Watanabe *et al.*, (1989) mencionan que el DHA es el AGE más importante en las larvas de peces marinos, ya que cuando se alimentan con dietas bajas en AGE o se someten a un período de inanición, se ha observado que el DHA es el AGE retenido en mayor proporción, debido a que su contenido en los tejidos de la larva y, en especial en las membranas celulares afecta la comunicación entre células, la expresión de receptores en membrana, el transporte de nutrientes y

la transducción de señales que modulan el crecimiento celular (Izquierdo, 1996). Los contenidos de DHA equivalentes al 5% y al 2.5% del peso seco de la dieta, promueven un mejor crecimiento y supervivencia de las larvas de la dorada (Liu *et al.*, 2002) o 2.5% y del lenguado del Atlántico (Hamre y Harboe, 2008), respectivamente.

En el presente trabajo el alimento vivo que se enriqueció con el tratamiento marino presentó un porcentaje de DHA de 41.39% en rotíferos y de 10.88% en las artemias del total de ácidos grasos identificados, mientras que el alimento vivo enriquecido con el tratamiento terrestre tuvo un porcentaje menor, con valores de 0.15 y 0.09% para rotíferos y artemias respectivamente. Copeman *et al.*, (2002) en el lenguado cola amarilla (*Limanda ferruginea*) alimentaron las larvas con alimento vivo enriquecido con cuatro emulsiones, alto DHA (43.3% del total de ácidos grasos), DHA + EPA (37.4 y 14.2%), DHA + ARA (36.0 y 8.9%) y la emulsión control que contenía únicamente aceite de oliva sin DHA, EPA y ARA, encontraron que las larvas del tratamiento alto en DHA alcanzaron una longitud y supervivencia significativamente mayores (9.7 ± 0.2 mm y $22.1 \pm 0.4\%$ respectivamente) que las alimentadas con la emulsión control (7.3 ± 0.2 mm y $5.1 \pm 1.9\%$), lo cual concuerda con lo encontrado en esta investigación.

En el lenguado de California, Vizcaíno-Ochoa *et al.*, (2010) evaluaron el efecto de un incremento gradual de DHA (0.16, 0.85, 1.61 y 3.25% del total de ácidos grasos identificados) en el alimento vivo (*Artemia*) en el cultivo larvario y encontraron conforme se incrementó el nivel de DHA en la *Artemia*, las larvas presentaron un mayor crecimiento y supervivencia a los 75 DDE. Además, encontraron que las larvas pueden completar la metamorfosis con el nivel más bajo de DHA, sin embargo comentan que el requerimiento de DHA aumenta después de la metamorfosis cuando se incrementa de nuevo la tasa de crecimiento. Este patrón de crecimiento es característico de los peces planos durante la metamorfosis (Tanaka *et al.*, 1996). Por ejemplo, Bolasina *et al.*, (2006) reportan una reducción en la tasa de crecimiento en la LT del lenguado Japonés (*Paralichthys olivaceus*) durante la metamorfosis, entre los 22 y 27 DDE, seguido de un aumento en la tasa de crecimiento, un resultado similar al observado por Vizcaíno *et al.*, (2010). En este trabajo se observó una tendencia similar, ya que la tasa de crecimiento con el tratamiento marino pasó de 1.30 ± 0.33 %C/día durante la metamorfosis a 3.46 ± 0.30 %C/día después de la metamorfosis, mientras que en el tratamiento terrestre pasó de 1.38 ± 0.20 %C/día durante la metamorfosis a 0.46 ± 1.04 %C/día después de la metamorfosis. Tomando como base los resultados de Vizcaíno *et al.*, (2010),

es probable que las bajas tasas de crecimiento en las larvas alimentadas con el tratamiento terrestre están asociadas al reducido aporte de DHA del alimento vivo y confirma la importancia de este AGE después de la metamorfosis para la formación de nuevos tejidos en esta especie.

Otros AGE importantes son el EPA y el ARA los cuales tienen beneficios similares a los del DHA. Se ha observado que el incremento de estos AGE mejora la supervivencia, el crecimiento y la respuesta al estrés, aunque en menor proporción que el DHA (Furuita *et al.*, 1998; Koven *et al.*, 2001). El EPA y el ARA son los principales precursores de eicosanoides en peces y su biosíntesis es mediada por las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa, para producir moléculas que se agrupan en prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, las cuales desempeñan funciones importantes como mediadores del sistema nervioso y, en la respuesta inmune (i.e., inflamación) (Sargent *et al.*, 1999a,b; Tocher *et al.*, 2008). Así mismo, se ha demostrado que son necesarios para una adecuada pigmentación en los peces planos como el sol Senegales (*S. senegalensis*) (Villalta *et al.*, 2005b), el turbot (*S. maximus*) (Estevéz *et al.*, 1999) y el lenguado Japonés (*P. olivaceus*) (Estévez *et al.*, 2001) y durante la metamorfosis para la migración del ojo en el lenguado de cola amarilla (*Limanda ferruginea*) (Copeman *et al.*, 2002), en el sol Senegales (Villalta *et al.*, 2005a) y el *Solea solea* (Lund *et al.*, 2008). Los requerimientos dietarios de EPA y ARA para las larvas de peces marinos se encuentran en un rango de 0.7 a 1.6% y de 0.5 a 1.2% del peso seco de la dieta (Izquierdo y Koven, 2011) respectivamente.

En el presente estudio, el enriquecimiento de los rotíferos con el tratamiento marino disminuyó el valor de EPA a 0.72 ± 0.10 g/100g, mientras que el de ARA aumentó a 0.37 ± 0.06 g/100g, los cuales se encuentran en los límites inferiores recomendados para peces marinos. En los metanauplios de *Artemia* los valores fueron inferiores a los encontrados en los rotíferos con 0.56 ± 0.02 g/100g de EPA y 0.25 ± 0.01 g/100g de ARA. Para el tratamiento terrestre los valores en los rotíferos de EPA y ARA fueron de 0.16 ± 0.02 y 0.63 ± 0.09 g/100g, y en la *Artemia* de 0.15 ± 0.01 g/100g de EPA y 0.04 ± 0.00 g/100g de ARA. Copeman *et al.*, (2002) encontraron en el lenguado de cola amarilla que la migración del ojo se mejoró de un 47% a un 75% cuando las larvas fueron alimentadas con un contenido alto de DHA y EPA y un contenido bajo de ARA, comparado con la dieta alta únicamente en DHA. Así mismo, Estévez y Kanazawa (1995) mencionan que una deficiencia de LC-PUFAS n-3 y n-6 retrasa la metamorfosis en el turbot (*S. maximus*), debido a que una deficiencia de EPA y ARA afecta el control neuroendocrino en el

cerebro (Estévez *et al.*, 1999). Un bajo aporte de EPA y ARA se puede relacionar con el retraso en el desarrollo larval observado en el presente trabajo, ya que el asentamiento de las larvas alimentadas con el tratamiento terrestre se observó hasta los 38 DDE, cuando solo el 50% de las larvas se encontraban asentadas, mientras que con el tratamiento marino el 95% de las larvas ya se habían asentado a los 32 DDE.

A pesar de la importancia del contenido absoluto de cada AGE en la dieta, es necesario tomar en cuenta sus relaciones (DHA/EPA/ARA), ya que sus interacciones pueden afectar positiva o negativamente ciertos procesos fisiológicos (i.e., metamorfosis, división celular) durante el desarrollo de las larvas. Sargent *et al.*, (1997) consideran adecuada una relación de 2 para la relación DHA/EPA y coincide, con la observada en los huevos de peces marinos, por lo que se sugiere mantener este valor en la dieta al momento de la primera alimentación exógena. Izquierdo *et al.*, (2000) indican que el incremento de EPA en la dieta disminuye la incorporación del DHA en los fosfolípidos de las larvas, de la misma forma, un aumento de DHA reduce la incorporación de EPA en la segunda posición de la fosfatidiletanolamina (FE), por lo cual es importante mantener una relación de DHA/EPA adecuada para optimizar la utilización de ambos ácidos grasos en la dieta. Así mismo, un nivel elevado de EPA sobre el DHA provoca efectos adversos en la función neural de las larvas y esto a su vez en el crecimiento y la supervivencia como se ha observado en el arenque (*Clupea harengus*) (Bell *et al.*, 1995).

En el presente trabajo el enriquecimiento del alimento vivo con el tratamiento marino incrementó la relación DHA/EPA a valores mayores de 3, sin embargo para el tratamiento terrestre tanto para rotíferos y como metanauplios de *Artemia* esta relación se mantuvo cercana a 0. Rodríguez *et al.*, (1997) encontraron que la tasa de crecimiento en las larvas de lubina era mayor cuando se alimentaban con rotíferos que tenían una relación de DHA/EPA de 1.5 comparado con las alimentadas con una relación menor a 0.6. Esto puede explicar porque se obtuvo un menor crecimiento y supervivencia en las larvas alimentadas con alimento vivo enriquecido con el aceite terrestre.

En relación al EPA y ARA Sargent *et al.*, (1999a,b) mencionan que un desbalance en la relación de EPA/ARA puede disminuir la producción de eicosanoides, por competencia del EPA y el ARA, ya que son sustratos metabólicos para las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa en la producción,

de prostanoïdes de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4 a partir del ARA y de prostanoïdes de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5 a partir del EPA, los cuales compiten por los mismos receptores en las membranas celulares, siendo los eicosanoïdes de ARA biológicamente más activos que los producidos a partir del EPA.

En el presente estudio, el enriquecimiento de los rotíferos con el tratamiento terrestre alcanzó una relación de EPA/ARA de 3.9, el doble que con el tratamiento marino, que fue de 1.9 y en las artemias enriquecidas con el tratamiento terrestre fue de 3.4, mientras que en el tratamiento marino fue de 2. En cuanto a la relación de EPA/ARA Izquierdo y Koven (2011) mencionan que la relación adecuada de EPA/ARA encontrada en varios trabajos está entre 3.5 y 5, siempre y cuando se tenga un aporte de DHA adecuado para cada especie, lo cual mejora la supervivencia y el crecimiento en las larvas. Como se puede observar la relación de EPA/ARA en los rotíferos y metanauplios de *Artemia* fue menor en el tratamiento marino que con el tratamiento terrestre, a pesar de esto, las larvas del tratamiento marino alcanzaron un crecimiento significativamente mayor. Atalah *et al.*, (2010) encontraron que cuando los requerimientos de DHA de las larvas de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) son cubiertos por la dieta, se puede mejorar el crecimiento y la supervivencia si se incrementa el EPA y ARA, siempre y cuando se mantengan en una relación 3.3 a 4. Lo anterior pone en evidencia que a pesar de que la relación de EPA/ARA de los rotíferos y en los metanauplios de *Artemia* en el tratamiento terrestre fue de 3.92 y 3.43 respectivamente, el contenido de DHA en la dieta no fue el adecuado para que las larvas tuvieran un crecimiento normal.

El porcentaje de lípidos en los rotíferos se incrementó significativamente con el enriquecimiento, alcanzando valores de 15 a 16% con respecto al valor inicial de 8.07 % y en la *Artemia* aumentó a valores de 22% con respecto a los 12.21% iniciales, mientras que el contenido de proteína cruda no mostró diferencias significativas. Morais *et al.*, (2004) realizaron dos bioensayos con larvas de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), en el primero alimentaron las larvas desde el momento de la apertura de la boca (5 DDE) hasta los 24 DDE con 6 microdietas con tres tipos de lípidos (aceite de bacalao, trioleína y aceite de coco) y dos niveles de inclusión (7.5 y 15%) y en el segundo bioensayo se suministró una dieta comercial desde los 5 hasta los 36 DDE y a partir de los 37 DDE se inició la alimentación de las larvas con las 6 microdietas experimentales hasta los 52 DDE. Estos autores encontraron que un aumento en el nivel de lípidos de la dieta resultó en un crecimiento

significativamente mayor de las larvas alimentadas con el aceite de pescado y trioleína, mientras que para el aceite de coco un nivel dietético mayor (15%) fue responsable de una disminución significativa en el crecimiento (peso seco). Lo anterior sugiere que la inclusión de ciertas cantidades de lípidos de origen terrestre en la dieta de larvas de peces marinos (i.e., $\geq 15\%$), disminuye su crecimiento, como se observó en el presente trabajo. No obstante, estos autores mencionan que el menor crecimiento se debió a que la dieta con un 15% aceite de coco, contenía 2.5% de ácido caprílico (C:8) que representó el 40% de los ácidos grasos de cadena media (AGCM, de 6 a 12 carbonos) en la dieta. Los AGCM se han asociado a menores crecimientos en la carpa común (*Cyprinus carpio* L.) y juveniles de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*), aun con valores bajos (2%) en la dieta (Craig y Gatlin, 1995; Fontagné *et al.*, 2000). Así mismo, una intensa β -oxidación a partir de AGCM, produce cuerpos cetónicos y su interacción con otros ácidos grasos y nutrientes (i.e., triacilglicerol, carbohidratos) reducen su utilización como fuente de energía y por lo tanto, reducen el crecimiento. Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron AGCM en el alimento vivo enriquecido con aceite terrestre, por lo que la disminución del crecimiento de las larvas de este tratamiento, probablemente se debió a su bajo contenido de AGE.

5.2 Actividad enzimática: lipasa dependiente de sales biliares

La actividad total (U Larva⁻¹) y específica (U μ g⁻¹ de proteína) de la LDSB en las larvas fue detectada desde el momento de la apertura de la boca (3 DDE) y antes del inicio de la alimentación exógena (i.e., rotíferos). Lo anterior sugiere que la larva del lenguado de California es capaz de digerir lípidos desde el inicio de la alimentación exógena. Resultados similares han sido reportados en otras especies de peces marinos como en el turbot (*S. maximus*) (Hoehne-Reitan *et al.*, 2001), el lenguado de invierno (*P. americanus*) (Murray *et al.*, 2003), el lenguado Japonés (Bolasina *et al.*, 2006) el abadejo (*Melanogrammus aeglefinus*) y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (Pérez-Casanova *et al.*, 2006).

Álvarez-González *et al.*, (2006) mencionan que las larvas del lenguado de California en ayuno mueren a los 6 DDE, pero reportan una actividad similar de la LDSB en larvas alimentadas y en ayuno. En el presente estudio la actividad total (U Larva⁻¹) de la LDSB aumenta paulatinamente hasta los 6 DDE y la actividad específica (U μ g⁻¹ de proteína) presenta un primer pico a los 3 DDE y se mantiene constante hasta los 6 DDE. Estos datos, sugieren que la expresión de esta enzima

durante los primeros días de desarrollo larval es un proceso ontogénico genéticamente programado y no estimulado por la ingestión del alimento exógeno (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Morais *et al.*, 2007).

En el lenguado de California, Juárez-Casillas (2009) describen un aumento de la actividad total de los 3 a 4 DDE seguido de una reducción a los 7 DDE, lo cual es similar a lo encontrado en este trabajo. Después de los 8 DDE la actividad total y específica de la LDSB disminuyó a los valores más bajos detectados en el presente estudio y se mantuvieron bajos hasta los 30 DDE, a excepción de un pico de actividad que se presentó en la actividad específica a los 12 DDE. Álvarez-González *et al.*, (2006) reportan en la misma especie que la actividad total y específica de la LDSB aumentó de manera constante hasta los 15 DDE y después se mantuvo estable hasta el final del experimento a los 30 DDE. Esta diferencia se puede atribuir a que estos investigadores utilizaron larvas completas para preparar el homogenizado para los análisis enzimáticos, mientras que en el presente trabajo se disecó y utilizó únicamente la cavidad abdominal, con el fin de evitar cuantificar enzimas con capacidad lipolítica presentes en el resto de la larva (i.e., músculo) (Hoehne-Reitan *et al.*, 2001). Pérez-Casanova *et al.*, (2006) reportan una alta actividad específica de la LDSB durante los primeros 66 DDE en homogenizados de cuerpo completo del abadejo (*M. aeglefinus*) y en el caso del bacalao del Atlántico (*G morhua*) la LDSB presentó una menor actividad pero no tuvo diferencia significativa con respecto a la del abadejo.

A partir de los 8 DDE la actividad total de la LDSB (en ambos tratamientos) se mantuvo estable y sin cambios hasta los 30 y 38 DDE cuando se presentaron picos en la actividad total de esta enzima en las larvas del tratamiento marino (figura 8). En el turbot (*S. maximus*) Hoehne-Reitan *et al.*, (2001) observaron que en larvas de entre 3 y 7 DDE la actividad total de la LDSB se mantuvo estable, aumentando significativamente a partir de los 13 DDE y hasta el final del experimento a los 22 DDE. La actividad específica de la LDSB ($\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) presentó un pico de actividad a los 12 DDE en ambos tratamientos, lo cual también fue reportado por Álvarez-González *et al.*, (2006), este incremento en la actividad coincide con el incremento en la acumulación de lípidos en el hígado, reportado por Gisbert *et al.*, (2004) para el mismo periodo.

Después de los 12 DDE la actividad específica volvió a disminuir manteniéndose estable aún durante la transición de rotíferos a *Artemia*. Durante este periodo las larvas aumentan de tamaño,

incrementando su peso como parte del crecimiento, Hoehne-Reitan *et al.*, (2001) mencionan que durante el crecimiento y desarrollo de larvas de peces marinos, la longitud y la superficie del tracto digestivo se incrementa considerablemente, permitiendo un mayor tiempo de retención del alimento y favoreciendo una mayor digestión y absorción, lo que reduce la necesidad de excretar grandes cantidades de enzimas digestivas al lumen, lo anterior podría explicar en parte, porque disminuye la relación entre la cantidad de enzima producida y la biomasa de la larva.

A los 26 DDE se observa una disminución de las actividades total y específica de la LDSB (en ambos tratamientos) asociadas al proceso de metamorfosis y el asentamiento que ocurre en esta especie. Durante la metamorfosis los organismos disminuyen su tasa de crecimiento (ver tabla 3), a consecuencia de procesos fisiológicos relacionados con cambios morfológicos internos y externos drásticos, que resultan en un cambio en la disposición final de los órganos de la cavidad digestiva (Zacarías-Soto *et al.*, 2006; Vizcaíno-Ochoa *et al.*, 2010). Este proceso también se ha observado en el lenguado Japonés durante la metamorfosis (Tanaka *et al.*, 1996; Bolasina *et al.*, 2006). En el tratamiento marino se dio un incremento en la actividad total y específica de la LDSB a los 30 DDE, edad a la que se observó que la mayoría de los lenguados se encontraban asentados y finalizando la metamorfosis. De manera similar, Zacarías-Soto *et al.*, (2006) observó un comportamiento similar de algunas enzimas proteolíticas (i.e. tripsina, proteasas alcalinas, leucina aminopeptidasa) durante el desarrollo larval y la metamorfosis del lenguado de California.

En el caso del tratamiento terrestre la actividad de la LDSB se mantuvo sin diferencias significativas durante los primeros 26 DDE. Gjellesvick (1991) menciona que la LDSB en las larvas de bacalao (*Gadus morhua*), hidroliza preferentemente ácidos grasos de cadena larga e insaturados (PUFAs). Esta afinidad de las lipasas por los triglicéridos se reduce conforme aumenta el número de carbonos de la cadena de los ácidos grasos y se incrementa el grado de saturaciones (reducción de enlaces dobles) (Olsen *et al.*, 1998; Morais *et al.*, 2006). El orden de preferencia de la actividad lipolítica se describe como PUFAs > monoinsaturados > saturados (Izquierdo y Koven, 2011). Lo anterior puede explicar por qué la actividad total de la LDSB en el tratamiento terrestre fue similar a la del tratamiento marino, ya que el contenido de PUFAs totales (PUFAs n-3 + PUFAs n-6) en los rotíferos y la *Artemia* enriquecidos con el tratamiento terrestre fue de 7.00 y 7.26 g/100g respectivamente, mientras que en el tratamiento marino fue de 1.12 g/100g de rotíferos y de 5.68 g/100g de *Artemia*. Además, el tratamiento terrestre tenía valores de ácidos grasos saturados más

bajos en rotíferos (1.56 ± 0.04 g/100g) y la *Artemia* (2.10 ± 0.03 g/100g) que el tratamiento marino que presentaba valores de 3.63 ± 0.20 g/100g de rotíferos y de 3.52 ± 0.06 g/100g de *Artemia*.

Adicionalmente, Izquierdo *et al.*, (2000) reportan que la actividad de la LDSB en larvas de dorada (*S. auratus*) se incrementó más cuando fueron alimentadas con rotíferos que contenían triglicéridos ricos en EPA que cuando eran ricos en DHA o ácidos monoinsaturados. En este estudio, el valor de EPA en los rotíferos disminuyó su contenido significativamente después del enriquecimiento de 0.89 ± 0.01 g/100g a valores de 0.72 ± 0.10 g/100g para el tratamiento marino y de 0.63 ± 0.09 g/100g en el tratamiento terrestre, siendo similar el contenido de EPA en ambos tratamientos. Por lo cual, el retraso hasta los 34 DDE de la actividad total de la LDSB de las larvas del tratamiento terrestre se atribuye a un bajo aporte en los AGE, que a su vez retardo el crecimiento y por ende la metamorfosis en los lenguados. Es importante mencionar que en este trabajo no se caracterizó el grado de desarrollo del sistema digestivo, mediante la utilización de algún marcador comúnmente usado en los estudios de larvas de peces marinos (i.e., actividad de las aminopeptidasas del borde de cepillo de los enterocitos (EBC), fosfatasa alcalinas), las cuales reflejan la maduración de los enterocitos del intestino, al reducirse la digestión intracelular (típica al inicio de la etapa larval), e incrementarse la actividad de las EBC, que involucra una digestión intraluminal propia de la etapa adulta (Zambonino-Infante *et al.*, 1997, 1999). Estas observaciones pueden ser una herramienta útil para relacionar y corroborar si el atraso en la actividad total y específica de la LDSB se debió a un bajo contenido de AGE en la dieta.

5.3. Actividad enzimática: fosfolipasa A₂

En el presente estudio se reporta por primera vez la caracterización de la actividad enzimática de la FLA₂ en el lenguado de California. Se detectó actividad de esta enzima antes del inicio de la alimentación exógena (1 DDE). En el bacalao del Atlántico (*G. morhua*), Sæle *et al.*, (2011) reportan actividad de la FLA₂ desde la primera alimentación exógena a los 3 DDE. Sin embargo, en el besugo (*P. major*) Uematsu *et al.*, (1992) no encontraron actividad de la FLA₂ hasta los 13 DDE, diez días después del inicio de la alimentación exógena. Por su parte, Hoehen-Reitan *et al.*, (2003) en el turbot (*S. maximus*) encontraron actividad de la FLA₂ hasta los 6 DDE, cuatro días después de la primera alimentación.

Los lípidos de los huevos y el saco vitelino de los peces marinos son principalmente fosfolípidos (10%) y triglicéridos (5%) (Sargent *et al.*, 1999a; Cahu *et al.*, 2009), por lo que la actividad de la FLA₂ se debe detectar antes del inicio de la alimentación exógena, ya que es necesaria para metabolizar las reservas del saco vitelino (Sæle *et al.*, 2011). Ozkizilcik *et al.*, (1996) reporta que la FLA₂ es la enzima lipolítica más importante en los huevos y larvas de la lubina rayada (*M.saxatilis*) hasta la etapa juvenil.

En el presente estudio, la actividad total de la FLA₂ aumentó a partir de los 14 DDE hasta alcanzar su máxima actividad, que ocurrió a los 30 DDE en las larvas del tratamiento marino, periodo en el cual las larvas están terminando la metamorfosis y el asentamiento. Kanazawa (1993) menciona que debido a la alta tasa de crecimiento, las larvas requieren una gran cantidad de fosfolípidos para la formación de las membranas de las nuevas células durante el crecimiento, lo cual puede explicar porque su actividad va en aumento hasta que se alcanza la metamorfosis.

Con base en estudios anteriores en los que se evaluó la contribución relativa de las fosfolipasas en las diferentes regiones del cuerpo de las larvas. En el presente estudio se decidió diseccionar el tracto digestivo lo más temprano posible (8 DDE) para reducir la posible interferencia de las FLA₂ provenientes de otros tejidos de la larva. En el besugo, Iijima *et al.*, (2000) encontraron hasta 70 veces mayor actividad de la FLA₂ en las branquias que en el páncreas. Por su parte, en el bacalao del Atlántico (*G.morhua*), Sæle *et al.*, (2011) no encontró actividad de la FLA₂ en el músculo, pero si en hígado, cerebro, riñón y branquias, aunque menores cantidades en comparación con el tracto digestivo. En el turbot (*S. maximus*), la actividad de la FLA₂ asociada al tracto digestivo representa el 61% de la actividad total del homogenizado de larvas completas a los 12 DEE Hoehne-Reitan *et al.*, (2003).

En este trabajo, la disminución de la actividad específica de la FLA₂ de las larvas con ambos tratamientos, de los 22 a los 30 DDE, coincide con la etapa de metamorfosis (de los 18 a 34 DDE). Tanaka *et al.*, (1996) encontraron que durante la metamorfosis del lenguado Japonés (*Paralichthys olivaceus*), la actividad de la amilasa y la tripsina disminuían significativamente y que al finalizar la metamorfosis, un alto porcentaje de los organismos asentados, tenían el estómago vacío, lo que indica que la alimentación se reduce durante esta etapa, al mismo tiempo que está ocurriendo una reorganización (cambio de posición) del intestino y muchos otros órganos (i.e., hígado, páncreas).

Esta tendencia es similar a la observada en este trabajo, para la actividad específica de la FLA₂, que disminuyó durante la metamorfosis. A pesar de que en este estudio no se estudió ingestión del alimento por etapa de desarrollo, sería una herramienta adicional para elucidar la disminución en la actividad específica de la FLA₂ en esta etapa. Por su parte, Sæle *et al.*, (2011) encontraron que en el bacalao del Atlántico la actividad específica de la FLA₂ del tracto digestivo representa el 63.2% del total de las fosfolipasas en larvas de 34 DDE y su importancia disminuye conforme aumenta la edad de la larva a un 30.8 y 14.2% a los 48 y 62 DDE respectivamente, lo cual concuerda con la reducción en la actividad total y específica de la FLA₂ después de la metamorfosis en el presente trabajo.

Para la preparación de la emulsión enriquecedora de aceite de linaza, se agregó lecitina de soya, la cual es una buena fuente de fosfolípidos de origen terrestre (65 - 75% de su peso seco) (Cahu *et al.*, 2009), de los cuales un 19-21% son FC (Scholfied, 1981). Varios trabajos han evaluado el efecto del tipo de lípido sobre la actividad de las lipasas entre estas la FLA₂. Zambonino-Infante y Cahu, (1999) evaluaron el efecto del nivel de lípidos de las dietas en las larvas de lobina europea (*D. labrax*) alimentadas por 23 días con 5 dietas formuladas con un porcentaje incremental de lípidos (10, 15, 20, 25, 30%) donde los fosfolípidos representaron un mínimo de 4.5% del total de lípidos. Estos investigadores reportan que después de los 14 DDE la actividad de la FLA₂ se incrementó en relación directa con el contenido de lípidos en la dieta hasta un 20% (15% triglicéridos y 5% fosfolípidos), pero con las dietas de mayor contenido (con 25 y 30% de lípidos) la actividad se mantuvo igual, sin diferencias significativas. Así mismo, la síntesis del RNA mensajero de la FLA₂ fue similar en las dietas de 25 y 30% lo que puede indicar que la enzima alcanza su capacidad máxima de síntesis con 20% de lípidos en la dieta. Morais *et al.*, (2007) concuerdan que existe un límite máximo de expresión de las enzimas lipolíticas en larvas de peces marinos, por lo tanto hay una capacidad máxima para la síntesis de estas enzimas durante la etapa larvaria. Buchet *et al.*, (2000) observaron que cuando las larvas de la corvina roja (*S. ocellatus*) se alimentan con dos dietas con 15 y 30% de lípidos totales de la dieta, la actividad de la FLA₂ se incrementa por el aumento de 3.6 a 6.8% de fosfolípidos del total de lípidos en la dieta. Sin embargo, Hoehne-Reitan *et al.*, (2003) alimentaron a un grupo de larvas de turbot (*S. maximus*) de los 2 DDE hasta los 24 DDE con alimento vivo y otro grupo con una microdieta que contenía mayor porcentaje de fosfolípidos de los 13 hasta los 24 DDE y reportan una menor actividad en la FLA₂ en el grupo alimentado con la microdieta, concluyen que la síntesis y secreción de la enzima está más relacionada con factores

de la dieta, lo cual probablemente afecta la capacidad digestiva de los lípidos (i.e., menores tasas de ingestión, desbalance nutricional). Lo anterior puede sugerir que los fosfolípidos de la lecitina de soya presentes en el enriquecedor del tratamiento terrestre sirvieron como sustrato para la FLA₂, estimulando la actividad total y específica, provocando que fueran similares a las encontradas para el tratamiento marino.

Morais *et al.*, (2007) mencionan que un exceso de lípidos neutrales o una relación inadecuada de lípidos neutrales:polares tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de las larvas, debido a que altos niveles de lípidos neutrales (i.e., saturados, monoinsaturados) con una deficiencia de lípidos polares en particular de fosfolípidos (FL), provoca una acumulación de gotas de aceite en los enterocitos reduciendo el transporte de los lípidos absorbidos y re-esterificados e los enterocitos (Morais *et al.*, 2005). Este efecto adverso en el transporte de los lípidos puede ser revertido con la adición de FL a la dieta, en especial la fosfatidilcolina (FC), (Fontagné *et al.*, 1998) ya que favorece la síntesis de lipoproteínas que son vitales para el transporte de los lípidos de los enterocitos hacia el hígado (Izquierdo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). Lo anterior sugiere que las larvas del tratamiento terrestre se vieron favorecidas con el aporte de fosfolípidos provenientes de la lecitina de soya, con lo cual tuvieron un adecuado transporte de lípidos, especialmente saturados y monoinsaturados, necesarios como energía para el metabolismo celular, provocando que la actividad total y específica de la FLA₂ fuera similar a la encontrada en el tratamiento marino. Sin embargo, aunque se menciona que la lecitina de soya es una buena fuente de FL, no contiene LC-PUFAs (i.e., DHA, EPA) (Scholfied, 1981). Lo cual evidencia que a pesar de tener presente FL en la dieta, el aporte de AGE es de gran importancia para obtener un mayor crecimiento y supervivencia.

5.4 Pruebas de calidad de larva

Las pruebas de estrés o resistencia en larvas de peces son una herramienta para evaluar el estado general de salud o la condición de las larvas, que les permite responder a un agente estresante, esta respuesta se puede correlacionar con la calidad de los nutrientes suministrados en la dieta. La prueba de estrés térmico en este trabajo se hizo de forma aguda (i.e., shock térmico), al someter las larvas a un aumento inmediato de temperatura de 18 a 32 °C. Las larvas del tratamiento marino presentaron un índice de estrés significativamente menor que las del tratamiento terrestre.

Ganga *et al.*, (2006) mencionan que bajo situaciones de estrés, los organismos aumentan la producción de la hormona adenocorticotropina (ACTH, por sus siglas en inglés), la cual activa un tipo de fosfolipasas específicas para la liberación de EPA y ARA, que llevan a la formación de eicosanoides. Estas moléculas aumentan la expresión de receptores de glucocorticoides (i.e., cortisol), de proteínas de shock térmico, producción de prostaglandinas, modulan la función cardiovascular, neural, estimulan la osmoregulación y la respuesta inmune (i.e., leucotrienos) (Mustafa y Srivastava, 1989; Koven *et al.*, 2001) ayudando al organismo a responder al agente estresor (Tocher, 2003). Como se mencionó anteriormente a pesar de que los valores de EPA y ARA se encontraban en el límite inferior recomendado en el alimento vivo enriquecido con el tratamiento marino (g/100g del peso seco), eran significativamente mayores a los del tratamiento terrestre. Koven *et al.*, (2001) mencionan que probablemente el ARA se requiera en pequeñas cantidades, debido a la naturaleza de su papel fisiológico en la regulación de ciertos procesos biológicos (i.e., producción de ciertas prostaglandinas) a diferencia de los altos niveles de DHA y EPA que son necesarios para la función y estructura de las membranas celulares, lo que demuestra la importancia de suministrar estos AGE aún en las cantidades mínimas recomendadas en las dietas para garantizar un mejor crecimiento y respuesta a situaciones de estrés. Además, Izquierdo y Koven, (2011), indican que el suministro de EPA y ARA en cantidades adecuadas y en combinación con otros LC-PUFAs (DHA) mejora el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés en larvas de peces marinos.

Por su parte, Kanazawa, (1997) alimentó larvas de dorada (*Pragus major*) con dietas que contenían diferentes niveles de DHA (0,1, 2%) y lecitina de soya (LS) (0, 3, 5%) del total de la dieta y al final del bioensayo sometió las larvas a un estrés térmico con aumentos escalonados de temperatura, desde los 22.5 hasta los 33.5 °C y encontró que las dietas con 1 y 2% de DHA y 5% de fosfolípidos las larvas presentaban una mayor tolerancia a los incrementos de temperatura. De igual manera Kanazawa, (2000) evaluó el efecto de la alimentación de las larvas del lenguado (*Limanda yokohamae*) con una dieta con dos niveles de DHA (0, 2% del peso total de la dieta) y encontró que al someter a las larvas a incrementos de 1 °C por hora desde los 16 °C hasta los 32 °C, aquellas larvas alimentadas con 2% de DHA resistieron mejor el incremento de temperatura.

Izquierdo y Koven (2011), mencionan que el DHA afecta directa o indirectamente la producción de eicosanoides, ya que es un sustrato para la lipooxigenasa, una enzima encargada de la

producción de leucotrienos y además junto con el EPA son precursores de biomoléculas mediadoras llamadas “resolvin” y “(neuro)protectin” los cuales ayudan a regular la respuesta celular de los peces, al ser potentes antiinflamatorios e inmunoreguladores (Hong *et al.*, 2005). En el presente trabajo el contenido de DHA en el alimento vivo del tratamiento marino fue significativamente mayor al contenido en el tratamiento terrestre, el cual fue casi nulo, lo que en parte ayuda a explicar por qué se observó una mejor resistencia al estrés en las larvas del tratamiento marino. Es bien conocido que el DHA tiene una mayor funcionalidad biológica como LC-PUFAs n-3 que el EPA y por esto, este LC-PUFAs n-3 tiene una mayor esencialidad, en particular para los peces marinos. Por esto se recomienda una relación de 2:1 de DHA:EPA en la dietas para peces marinos (NRC, 2011). El alimento vivo enriquecido con aceites marinos presentó una relación DHA:EPA mayor a 2 (i.e., 2.9) muy superior a los enriquecidos con aceite terrestre (relación de 0.16) por lo que las cantidades y relaciones de DHA y EPA fueron mejores.

De igual manera, se utilizó el destete (cambio de alimento vivo a una microdieta formulada) como una prueba de estrés para evaluar la capacidad de las larvas para resistir y adaptarse a este cambio drástico de alimentación. Las larvas del tratamiento terrestre que consumieron un alimento con un bajo aporte de AGE durante un período de 35 días, no lograron adaptarse al cambio de dieta, obteniéndose una supervivencia de 3.72% y un menor crecimiento en LT a diferencia del tratamiento marino con una supervivencia igual a 21.13% y un mayor crecimiento en LT. Lo anterior puede sugerir que en las larvas alimentadas que tuvieron un menor aporte de AGE, el desarrollo del sistema nervioso y los órganos sensoriales como la visión estuvieran comprometidos, con consecuencias significativas en una serie de procesos fisiológicos, de comportamiento e incluso los que dependen del sistema neuroendocrino (Sargent *et al.*, 1999b), disminuyendo la capacidad de la larva para reconocer y capturar el alimento vivo. Bell *et al.*, (1995) encontraron que un aumento del DHA en la dieta mejoró el comportamiento alimenticio del arenque (*Clupea harengus*) a bajas intensidades de luz. Esto último sugiere que las larvas alimentadas con el tratamiento terrestre posiblemente presentarían un menor grado de desarrollo de los órganos sensoriales necesarios para una adecuada captura del alimento.

Por su parte, Benítez-Santana *et al.*, (2007) mencionan que el DHA se acumula selectivamente en el tejido neural, participando en el desarrollo de la sinapsis nerviosas. Bell *et al.*, (1995) encontraron que los ojos de las larvas de peces contienen altas cantidad de DHA, donde los

fosfoglicéridos (di-C22:6n3) pueden alcanzar más del 70% de los ácidos grasos en la retina. Además, Izquierdo y Koven (2011) sugieren que el DHA tiene un papel importante en el mantenimiento y función de las membranas neurales. Así mismo, Furuita *et al.*, (1998) alimentaron larvas del lenguado Japonés (*P. olivaceus*) de alrededor de 6 mm de longitud total con rotíferos y *Artemia* enriquecidos con valores de 1.72% de DHA, 4.42% de EPA, 5.37% de ARA y 10.43% de ácido oleico por 25 días, y encontraron que el volumen del cerebelo de las larvas alimentadas con la *Artemia* enriquecida con EPA y DHA era mayor que las larvas alimentadas con la dieta deficiente de AGE (ácido oleico), además de alcanzar un mayor porcentaje de supervivencia y crecimiento en longitud total. Por otro lado, Roo *et al.*, (2009) mencionan que en el besugo (*Pagrus pagrus*) un aumento del DHA en los rotíferos de 2 a 4.5% en peso seco redujo la aparición de deformidades óseas (i.e., fusión de vértebras, deformidades craneales), ya que los LC-PUFAS n-3 y n-6 tienen un papel importante durante la condrogénesis y la osteogénesis en la etapa larval (Faustino, 2002). Lo anterior evidencia que los AGE están involucrados en procesos fisiológicos que son fundamentales durante el desarrollo larval en los peces marinos, por lo que es de gran importancia suplir los AGE en las cantidades y en las relaciones óptimas, además de suministrarlos por medio de nutrientes adecuados para promover su digestión, absorción y asimilación.

Conclusiones

- Se detectó la actividad de la lipasa dependiente de sales biliares (L-DSB) y la fosfolipasa A₂ (FLA₂) antes del inicio de la alimentación exógena, dos enzimas que son parte importante de la batería enzimática que posee la larva para digerir lípidos durante los primeros 42 DDE.
- La deficiencia de AGE en el enriquecedor de origen terrestre probablemente retraso el desarrollo fisiológico de las larvas, incluyendo el tracto digestivo, lo que llevó a un retraso en la actividad de la LDSB.
- Se observó una disminución de la actividad total y específica de la FLA₂ al final de la metamorfosis y asentamiento de las larvas, lo que sugiere que la tasa de ingestión de alimento vivo se reduce durante esta etapa y por ende la síntesis y secreción de esta enzima.
- En el presente estudio se evidenció la importancia del aporte de ácidos grasos esenciales como el DHA, EPA, ARA en el alimento, así como la relación entre estos, que es de gran importancia para el desarrollo larval del lenguado de California bajo condiciones de cultivo.
- El uso del aceite de linaza no es adecuado como enriquecedor del alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) en cultivo larvario de lenguado de California, ya que el crecimiento, supervivencia y capacidad de respuesta al estrés fueron significativamente inferiores con respecto al alimento vivo enriquecido con aceite de origen marino.

Recomendaciones

- Hacer un experimento donde se relacione la actividad de las enzimas digestivas contrastando un homogenizado del tracto digestivo y otro de la larva completa para determinar si hay diferencias en la actividad o si existe la presencia de inhibidores.
- Incluir una enzima digestiva como indicador del grado de desarrollo del sistema digestivo (i.e, aminopeptidasa), para tener un control de que el desarrollo digestivo de la larva se está llevando acabo de acuerdo a lo esperado.
- Evaluar la expresión génica de la FLA₂ a través del desarrollo larval para relacionarlo con la actividad enzimática.
- Evaluar tasa de ingestión para determinar si la larva en períodos críticos (i.e, metamorfosis) se está alimentando y relacionarlo con el comportamiento de las enzimas digestivas.

Referencias bibliográficas

- Allen, L.G. 1988. Recruitment, distribution and feeding habits of young of the year California halibut (*Paralichthys californicus*) in the vicinity of Alamitos Bay, Long Beach Harbor, California, 1983-1985. *Bull Southern California Acad. Sci.*, 87(1): 19-30.
- Allen, M.J. 1990. The biological environment of the California halibut *Paralichthys californicus*. *Fish Bulletin*, 174: 7-29.
- Alvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E., Piedrahita, R. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol Biochem.*, 31:83–93.
- Aragão, C., Conceição, L. E., Dinis, M. T., Fyhn, H.J. 2004. Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*, 234: 429–445. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.01.025
- Atalah, E., Hernández-Cruz, C. M., Ganuza, E., Benítez-Santana, T., Ganga, R., Roo, J., Montero, D. and Izquierdo, M. 2011. Importance of dietary arachidonic acid for the growth, survival and stress resistance of larval European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed high dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture Research*, 42: 1261–1268. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02714.x
- Avilés, A., Castelló, F. 2004. Manual para el Cultivo de *Seriola lalandi* (Pisces: Carangidae) en Baja California Sur, México. Instituto Nacional de Pesca.
- Alvial, A., Manríquez, J. 1999. Diversification of flatfish cultura in Chile. *Aquaculture*, 176: 65-73.
- Bell, M.V., Batty, R., Navarro, J.C., Sargent, J.R., Dick, J.R. 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 30: 443 – 449.
- Bell, J.G., Mc Evoy, L.A., Estévez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227: 211-220.
- Bengtson, D.A. 1999. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current research and future research priorities. *Aquaculture*, 176: 39-49.
- Benítez-Santana, T., Masuda, R., Juárez Carrillo, E., Ganuza, E., Valencia, A., Hernández-Cruz, C.M., Izquierdo, M.S. 2007. Dietary n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 264: 408–417.
- Berg, L. 1997. Commercial feasibility of semi-intensive larviculture of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 155: 333-340.

- Bjørndal, T., Øiestad, V. 2010. The Development of a New Farmed Species – Production Technology and Markets for Turbot. Institute for Research in Economics and Business Administration Bergen. Working Paper No. 51/10.
- Bolasina, S., Pérez, A., Yamashita, Y. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 252: 503-515.
- Bonaldo, A., Parma, L., Badiani, A., Serratore, P., Gatta, P. P. 2011. Very early weaning of common sole (*Solea solea* L.) larvae by means of different feeding regimes and three commercial microdiets: Influence on performances, metamorphosis development and tank hygiene. *Aquaculture*, 321: 237–244. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.09.007
- Brown, N. 2002. Flatfish farming systems in the Atlantic region. *Reviews in Fisheries Science*, 10 (3-4): 403-419.
- Brown, R. T., Colburn, H. R., Nardi, G. C., Berlinsky, D. L. 2013. Cryopreservation of summer flounder, *Paralichthys dentatus* L., sperm. *Aquaculture Research*, 44: 1560–1567. doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03163.x
- Buchet, V., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. L. 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture*, 184: 339-347. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00325-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00325-7)
- Caddell, S.M., Gadomski, D.M., Abbott, L.R. 1990. Induced spawning of the California halibut *Paralichthys californicus* (Pisces: Paralichthyidae) under artificial and natural conditions. *Fish Bulletin*, 174: 175-198.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: 161–180. doi:10.1016/S0044-8486(01)00699-8
- Cahu, C.L., Gisbert, E., Villeneuve, L.A.N., Morais, S., Hamza, N., Wold, P.A., Zambonino-Infante, J.L. 2009. Influence of dietary phospholipids on early ontogenesis of fish. *Aquaculture Research*, 40: 989-999.
- Cañavate, J.P. 2005. Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis*; Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 21 (1-4): 147-154.
- Caro, S. 2010. Los peces planos desde una óptica comercial. Taller Regional: Situación y Perspectivas del Desarrollo del Cultivo de Peces Planos en América Latina. INFOPECA. Montevideo. Recuperado el 23 julio del 2012, de: www.racua.org/archivos/archivos/santiago_caro.pdf
- CONAPESCA. 2010. Carta Nacional Pesquera. Consejo Nacional de Pesca y Acuicultura. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Segunda sección. Diario Oficial. 2 de Diciembre 2010, México. 319 pp.
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, A., Ravelo, R., Zarate, R. 2008 Dichloromethane as solvent for lipid extraction, lipid clases and fatty assessment from samples of different nature. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 56: 4297-4303.

- Civera-Cerecedo, R., Álvarez-González, C.A., Moyano-Lopéz, F.J. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto-Lopéz, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances de Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 16-19. Hermosillo, Sonora, México.
- Conceição, L. E. C., Aragão, C., Richard, N., Engrola, S., Gavaia, P., Mira, S., Dias, J. 2010. Novel methodologies in marine fish larval nutrition. *Fish physiology and biochemistry*, 36(1): 1–16. doi:10.1007/s10695-009-9373-z
- Conklin, D.E., Piedrahita, R.H., Merino, G., Muguet, J.B., Bush, D., Gisbert, E., Rounds, J. 2002. Development of California halibut *Paralichthys californicus* culture. Book of Abstracts, Aquaculture America 2002. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Conklin, D.E., Piedrahita, R.H., Merino, G.E., Muguet, J.B., Bush, D.E., Gisbert, E., Rounds, J. Cervantes-Trujano, M. 2003. Development of California Halibut, *Paralichthys californicus*, Culture. *J. Appl. Aquacul.*, 14 (3/4): 143-154.
- Copeman, L.A., Parrsh, C.C., Brown, J.A., Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limada ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*, 210: 285-304.
- Coutteau, P., Inge, G., Schwarz, L., Sorgeloos, P. 1995. A combined salinity/countercurrent stress test to evaluated stress sensitivity of juvenile European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc.*, 23: 29-30.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, 155: 1-4.
- Craig, S.R., Gatlin, D.M. 1995. Coconut Oil and Beef Tallow, but not Tricaprylin, Can Replace Menhaden Oil in the Diet of Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) Without Adversely Affecting Growth or Fatty Acid Composition. *J. Nutr.*, 125: 3041-3048.
- Darias, M.J., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G., Yúfera. M. 2007. Organogenesis of *Pagrus pagrus* L., 1758 with special attention to the digestive system development. *Histol. Histopathol*, 22: 753-768.
- Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: present A state of the art and perspectives. *Reprod., Nutr., Dev.*, 24: 807–833.
- Del Moral, R.J., Vaca, J.G. 2009. Administración de la pesquería del atún aleta azul en Baja California: Una visión global. *Frontera norte*, 21 (41): 151-175.
- Delgado, C., Wada, N., Rosegrant, M., Meijer, S., Ahmed, M. 2003. Outlook for Fish to 2020: Meeting Global Demand. *Int. Food Policy Res. Inst. Washington, D.C., U.S.A.* 36 pp.
- Dhert, P., Lavens, P., Sorgeloos, P. 1992. Stress evaluation: a tool for quality control of hatchery-produced shrimp and fish fry. *Aquaculture Europe*, 17(2): 6-10.

- Duarte, C. M., Holmer, M., Olsen, Y., Soto, D., Marba, N., Guiu, J., Black, K., Karakassis, I., 2009. Will the oceans help feed humanity?. *Bioscience*, 59: 967-976.
- Eryalçın, K.M., Roo, J., Saleh, R., Atalah, E., Benítez, T., Betancor, M., Hernández-Cruz, M.C., Izquierdo, M. 2013. Fish oil replacement by different microalgal products in microdiets for early weaning of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*, 44: 819-828. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03237.x
- Estévez, A. Kanazawa, A. 1995. Effect of (n-3) .PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation success of turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aqua. Nutrition*, 1: 159–168.
- Estévez, A., Mc Evoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R. 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*, 180: 321-343.
- Estevez, A., Kaneko, T., Seikai, T., Tagawa, M., Tanaka, M. 2001. ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid-enriched live prey. *Aquaculture*, 192:309–319
- FAO. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Rome. 209 pp.
- FAO. 2013. Fisheries and Aquaculture Department. Recuperado el 4 junio del 2012, de: <http://www.fao.org/fishery/species/3350/en>
- Faulk, C.K., Holt, G.J. 2009. Early weaning of southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, larvae and ontogeny of selected digestive enzymes. *Aquaculture*, 296: 213-218.
- Faustino, M. 2002. Developmental osteology of the gilthead seabream (*Sparus aurata*). Thesis, Faro University, Portugal.
- Fernández, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, JB., Kotzamanis, Y., Estévez, A., Zambonino-Infante, J.L. 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 283: 102–115.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E., Niem. V.H. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol. III. Vertebrados (2). Roma, FAO.1201-1813.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- Fontagné, S., Geurden, I., Escaffre, A.M., Bergota, P. 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, 161: 213-223.
- Fontagné, S., Corraze, G., and Bergot, P. 2000. Response of Common Carp (*Cyprinus carpio*) larvae to different dietary levels and forms of supply of Mmedium-chain fatty acids. *Aquat. Liv. Resour.* 13: 429-437.
- Fuentes, P. 2011. Maricultura de Camarones en Jaulas. Universidad de Costa Rica. Tesis de licenciatura. San José, Costa Rica.

- Fujikawa, Y., Shimokawa, M., Satoh, F., Satoh, O., Yoshioka, D., Aida, S., Uematsu, K., Iijima, N. 2012. Ontogeny of gene expression of group IB phospholipase A2 isoforms in the red sea bream, *Pagrus (Chrysophrys) major*. Comp. Biochem. Physio., Part A, 161: 185-192.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Uematsu, K. 1998. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 161: 269-279.
- Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A. López, L.M. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. Aquaculture, 318: 162-168.
- Ganga, R., Tort, L., Acerete, L., Montero, D., Izquierdo, M.S. 2006. Modulation of ACTH-induced cortisol release by polyunsaturated fatty acids in interrenal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*). Journal of Endocrinology, 190: 39-45.
- García-Ortega, A., Lazo, J. 2004. Marine fish larviculture in Mexico: Advances and challenges in nutrition and feeding. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque, Marie,D., Nieto-López, M.G., Villareal, D., Scholz, V. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 16-19. Hermosillo, Sonora, México.
- Gisbert, E., Merino, G., Muguet, H.B., Bush, D., Conklin, D., Piedrahita, R.H., 2002. Morphological development and allometric growth patterns in California halibut (*Paralichthys californicus*) larvae. J. Fish Biol, 61:1217–1229.
- Gisbert, E., Piedrahita, R., Conklin, D.E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. Aquaculture, 232: 455-470.
- Gjedrem, T., Robinson, N., Rye, M. 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. Aquaculture, 350–353: 117–129. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.04.008
- Gjellesvik, D.R., 1991. Fatty acid specificity of bile salt-dependent lipase: enzyme recognition and super-substrate effects. Biochim. Biophys. Acta 1086, 167–172.
- Gjellesvik D.R., Lombardo D., Walther B.T. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta, 1124: 123–134.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C. 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. Science, 327: 812-818.
- Haaker, P.L. 1975. The biology if the California halibut *Paralichthys californicus* (Ayres) in Anaheim bay. In: Lane, E.D. and Hills C.W. (eds). The Marine Resources of Anaheim bay. Fish Bull., 165: 137-153.
- Hamre, K., Harboe, T. 2008. Critical levels of essential fatty acids for normal pigmentation in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. Aquaculture, 277: 101–108.

- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L. E. C., Izquierdo, M.S. 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, 5(1): S26-S58. doi: 10.1111/j.1753-5131.2012.01086.x
- Hardy, R., Barrows, F.T. 2002. Diet formulation and manufacture. In: Halver, J., Hardy, R. (3ed) *Fish Nutrition*. Elsevier Science U.S.A. 505-600 pp.
- Herzka, S.H., Conklin, D., Piedrahita, R., Fodrie, J., Lazo, J.P. 2003. Current research efforts on California halibut focus on aquaculture practices and utilization of nursery habitat. *Bight Bulletin*, 7: 2–7.
- Higgs, J., Dong, F., 2000. Lipids and Fatty Acids. In: Stickney, R (ed). *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 476-496 pp.
- Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E., Gjellesvik, D.R. 2001. Development of bile salt-dependent lipase in larval turbot. *Journal of fish Biology*, 58: 737-745.
- Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E., Reitan, K. I. 2003. Lipolytic activities in developing turbot larvae as influenced by diet. *Aquac. Intern.*, 11: 477-489.
- Hong, S., Tjonahen, E., Morgan, E.L., Lu, Y., Serhan, C.N., Rowley, A.F. 2005. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins-Mediator lipidomic analysis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 78: 107-116.
- Howell, B.R., Yamashita, Y.L. 2005. *Aquaculture and Stock Enhancement*. In: Gibson, R.N. (ed). *Flatfishes Biology and Exploitation*. Blackwell Science. Oxford. UK. 391 pp.
- I.N.P. 2011. Anuario Estadístico de Pesca. Subsecretaría de Pesca, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Pesca, México. Recuperado el 17 de agosto del 2012, de: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/infografia_captura2011
- Iijima, N., Chosa, S., Uematsu, K., Goto, T., Hoshita, T., and Kayama, M. 1997. Purification and Characterization of Phospholipase A2 from the Pyloric Caeca of Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, 16, 487–498
- Iijima, N., Uchiyama, S., Fujikawa, Y., Esaka, M. 2000. Purification, characterization, and molecular cloning of group I phospholipases A2 from the gills of the red sea bream, *Pagrus major*. *Lipids*, 35: 1359–1370.
- Izquierdo, M.S. 1996. Review article: essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 2: 183-191.
- Izquierdo, M.S., Socorro J., Arantzamendi L., Hernandez-Cruz C.M. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 22: 97–107.
- Izquierdo, M.S., Koven, W. 2011. Lipids. In: Holt, J (ed). *Larval Fish Nutrition*. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 47-81 pp.

- Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P. 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biology and Fisheries*, 13: 379-407.
- Jackson, A.J. 2007. Challenges and opportunities for the fishmeal and fish oil industry. *Feed Technology Update*, 2(1): 9 pp
- Johnson, H. 2004. Salmon aquaculture: market overview and strategic assessment. Rep. WWF White Pap. World Wildlife. Fund., Washington, DC., U.S.A.
- Juárez-Casillas, L.G. 2009. Expresión de tres enzimas digestivas durante el desarrollo larval del lenguado de California *Paralichthys californicus*. Tesis maestría. CICESE. Baja California, México.
- Kanazawa, A. 1993. Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (eds), *Fish Nutrition in Practice. IVth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding*, Paris. 519-530.
- Kanazawa, A. 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance if fish. *Aquaculture*, 155: 129-134.
- Kanazawa, A. 2000. Nutrición de larvas de peces. *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México, 53-64.
- Kikuchi, K., Takeda, S. 2001. Present Status of Research and Production of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Japan. *Journal of Applied Aquaculture*, 11: 165-175. doi: 10.1300/J028v11n01_12
- Kjørsvik, E., Hoehne-Reitan, K., Reitan, K.I. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 227: 9-20.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181-201.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., Friezlander, O. Harel, M., 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 91: 131- 141.
- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 193: 107-122.
- Kraul, S., Brittain, K., Cantrell, R., Nagao, T., Ogasawara, A., Ako, H. and Kitagawa, H. 1993. Nutritional Factors Affecting Stress Resistance in the Larval Mahimahi *Coryphaena hippurus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24: 186–193. doi: 10.1111/j.1749-7345.1993.tb00007.x
- Lazo, J., 2000a. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-

- Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R. (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 19–22. Mérida, México, 300–312.
- Lazo J.P., Holt G.J., Arnold C.R. 2000b. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquacult. Nutr.*, 6: 183–192.
- Lazo J.P., Barón, B. 2005. Desarrollo del cultivo del lenguado de California. 2do. Foro Internacional de Acuicultura. Diciembre 1-3. Hermosillo, México.
- Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C., Arnold, C.R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265: 194–205.
- Liu, H. W., Stickney, R. R., Dickhoff, W. W., McCaughran, D. A. 1994. Effects of Environmental Factors on Egg Development and Hatching of Pacific Halibut *Hippoglossus stenolepis*. *J. World Aqua. Soc.*, 25: 317–321.
- Liu, J., Caballero, M.J., El-Sayed Ali, T., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., Valencia, A., Fernández-Palacios, H. 2002. Necessity of dietary lecithin and eicosapentaenoic acid for growth, survival, stress resistance and lipoprotein formation in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fisheries Science*, 68: 1165–1172.
- Lobos, G., Silva, A., Rojas, R., Quero, P. 1992. Rentabilidad de un centro de cultivo de Lenguado en la IV Región. *Panorama Económico de la Agricultura*, 81: 8-12.
- Love, M.S., Brooks, A. 1990. Size and age at first maturity of the California halibut *Paralichthys californicus*, in the southern California bight. In: The California halibut, *Paralichthys californicus*, resource and fisheries. California fish and Game Fisheries Bulletin, 174: 167-174.
- Lund, I., Steenfeldt, S.J., Banta, G., Winding Hansen, B. 2008. The influence of dietary concentrations of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid at various stages of larval ontogeny on eye migration, pigmentation and prostaglandin content of common sole larvae (*Solea solea* L.). *Aquaculture*, 276: 143-153.
- Ma, T.S., Zuazago, G. 1942. Micro-Kjeldahl determination of nitrogen. A new indicator and an improved rapid method. *Ind. Eng. Chem.*, 14: 280-282.
- Morais, S., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L., Robin, J., Rønnestad I., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. 2004. Dietary TAG Source and Level Affect Performance and Lipase Expression in Larval Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids*, 39: 449-458.
- Morais, S., Koven, W., Rønnestad, I., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. 2005. Dietary protein/lipid ratio and lipid nature affects fatty acid absorption and metabolism in a teleost larva. *Br. J. Nutr.*, 93: 813–820.
- Morais, S., Caballero, M.J., Conceição, L.E.C., Izquierdo, M.S., Dinis, M.T. 2006. Dietary neutral lipid level and source in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on growth, lipid metabolism and digestive capacity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 144B: 57–69.

- Morais, S., Conceição, L.E.C., Rønnestad, I., Koven, W., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L., Dinis, M.T. 2007. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture*, 268: 106–122.
- Morris, K. 1986. *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. American Elsevier Pub. 345 pp.
- Murakami, M., Kudo, I. 2002. Phospholipase A₂. *J.Biochem*, 101: 285-292.
- Murray, H.M., Douglas, S.E., Gallant, J.W. 2003. Ontogeny of lipase expression in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal. of fish Biology*, 62: 816-833.
- Mustafa, T., Srivastava, K.C., 1989. Prostaglandins (Eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. In: Gilles, R. (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Springer-Verlag, Berlin. 157–207 pp.
- N.R.C. 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*; National Research Council. 376 pp.
- Oda, D. 1991. Development of eggs and larvae of California halibut *Paralichthys californicus* and Fantail sole *Xystreurys liolepis* (Pisces: Paralichthyidae). *Fishery Bulletin*, 89(3): 387-402.
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., Ringø, E. 1998. The digestion and selective absorption of dietary fatty acids in Arctic Charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquac. Nutr.*, 4: 13–21.
- Ozkizilcik, S., Chu F.E., Place, A.R. 1996. Ontogenetic changes of lipolytic enzymes in striped bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B: 631-637.
- Pauly, D., Watson, R., Alder, J. 2005. Global trends in world fisheries: impacts on marine ecosystems and food security. *Phil. Trans. Roy. Socie. B.*, 360: 5-12. doi: 10.1098/rstb.2004.1574.
- Planas, M., Cunha, I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177: 171-190.
- Pérez-Casanova, J.C., Murray, H.M., Gallant, J.W., Ross, N.W., Douglas, S.E., Johnson, S.C., 2004. Bile salt-activated lipase expression during larval development in the haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture*, 235: 601– 617.
- Pérez-Casanova, J.C., Murray, H.M., Gallant, J.W., Ross, N.W., Douglas, S.E., Johnson, S.C., 2006. Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 251: 377-401.
- Polo, A., Yúfera, M., Pascual, E. 1991. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 92: 367–375.
- Ribeiro, I., Sarasquete, C., Dinis, M.T. 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 171: 293-308.
- Robertson, R., 2006. Recuperado el 17 de octubre del 2013, de <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Paralichthys+californicus&b=FB4228&l=spanish>

- Rodriguez, C., Perez, J.A., Diaz, M., Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Lorenzo, A. 1997. Influence of EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture*, 150: 77–89.
- Rønnestad, I. 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture*, 227: 147–164. doi:10.1016/S0044-8486(03)00500-3
- Rønnestad, I., Kamisaka, Y., Conceicao, L.E.C., Morais, S. Tonheim, S.K. 2007. Digestive physiology of marine fish larvae: Hormonal control and processing capacity for proteins, peptides and amino acids. *Aquaculture*, 268: 82-97.
- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Boglione, C. 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture*, 5(1): S59-S98. doi: 10.1111/raq.12010
- Roo, FJ., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J.A., Fernández-Palacios, H., Montero, D., Izquierdo, M.S. 2009. Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 287: 84–93.
- Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P.A., Hamre, K. 2011. Characterisation and expression of secretory phospholipase A2 group IB during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Br. J. Nutr.*, 105, 228–237.
- Sánchez-Amaya, M.I., Ortiz-Delgado, J.B., García-López, Á., Cárdenas, S., Sarasquete, C. 2007. Larval ontogeny of redbanded seabream (*Pagrus auriga*, Valenciennes, 1843) with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach. *Aquaculture*, 263: 259-279.
- Sampaio L. A., Tesser, M.B., Junior. W. 2010. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. *R. Bras. Zootec.*39. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300012>
- Sargent, J., McEvoy, L., Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155: 117-127.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estévez, A. 1999a. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177: 191–199. doi:10.1016/S0044-8486(99)00083-6
- Sargent J., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D. 1999b. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179: 217-229.
- Sargent, J., Tocher, D., Bell, G. 2002. The Lipids. In: Halver J., Hardy, R, (ed). *Fish Nutrition*. Academic Press, U.S.A. 181-257pp.
- Scholfied, C.R. 1981. Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists Society.*, 58(10): 889 - 892.

- Schwarz, M. 2003. Flatfish Research and Production in USA: Status and Perspectives. Global Aquaculture Advocate, February, 73-74.
- Silva, A., Oliva, M. 2010. Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). Lat. Am. J. Aquat. Res., 38(3): 377-386. doi: 10.3856/vol38-issue3-fulltext-3
- Suquet, M., Divanach, P., Hussenot, J., Coves, D., Fauvel, C. 2009. Pisciculture marine de "nouvelles espèces" d'élevage pour l'Europe. Cahiers Agricultures, 18 (2/3): 148-156.
- Suzer, C., Aktülün, S., Çoban, D., Kamacı, H.O., Saka, S., Fırat, K., Alpbaz, A. 2007. Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). Comparative Biochem. and Physiol., 148: 470-477.
- Tacon, A.G.J., Metian, M. 2008. Global review on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. Aquaculture, 285: 146–158.
- Tanaka, M., Kawai, S., Seikai, T., Burke, J.S. 1996. Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 28: 19-31. doi: 10.1080/10236249609378976
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Reviews in Fisheries Science, 11: 107-184.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E. Å., Campbell, P.J., Bell, J.G. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish, Review. Aquaculture, 280: 21-34.
- Torrentara, L., Tacon, A. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura, una diagnosis. FAO. Proyecto GCP/RLA/075/ITA, Brasil.
- Turchini G.M., Torstensen B.E., Ng W.K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. Reviews in Aquaculture, 1: 10–57.
- Uematsu, K., Kitano, M., Morita, M., Iijima, N. 1992. Presence and ontogeny of intestinal and pancreatic phospholipase A2- like proteins in the red sea bream, *Pagrus major* – an immunocytochemical study. Fish Physiol Biochem., 9: 427–438.
- Van den Bosch, H. 1982. Phospholipases. In New Comprehensive Biochemistry, Vol. 4, Phospholipids. In: Hawthorne, N. and Ansell, G.B., (Eds). Elsevier Biomedical, Amsterdam. pp. 313–357
- van der Meeren, T., Olsen R.E., Hamre, K., Fyhn, H.J. 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. Aquaculture, 274: 375-397.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P. 2005a. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture, 245: 193–209.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M., Bell, J.G. 2005b. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the Artemia feeding period. Aquaculture, 249: 353–365.

- Vizcaíno-Ochoa, V., Lazo, J.P., Barón-Sevilla, B., Drawbridge, M.A. 2010. The effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on growth, survival and pigmentation of California halibut *Paralichthys californicus* larvae (Ayres, 1810). *Aquaculture*, 302: 228-234.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S. 1983. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115–143.
- Watanabe, T. 1988. Fish nutrition and mariculture. The General Aquaculture Course, JICA Textbook. Departament of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries. 233 pp.
- Watanabe, T., Izquierdo, M.S., Takeuchi, T., Satoh, S., Kitajima, C. 1989. Comparision between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficiency in larval red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1635-1640.
- Yang, R., Xie, C., Fan, Q., Gao, C., Fang, L. 2010. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 302: 112-123.
- Yúfera, M., Darías, M.J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268: 53-63.
- Zacarias-Soto, M., Muguet, J. B., Lazo, J. P. 2006. Proteolytic Activity in California Halibut Larvae (*Paralichthys californicus*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37: 175–185. doi: 10.1111/j.1749-7345.2006.00024.x
- Zacarias-Soto, M.G. 2007. Histología, histoquímica y actividad enzimática del sistema digestivo de *Paralichthys californicus* durante su ontogenia y evaluación del probióticos como promotores de la maduración del sistema. Tesis doctoral. CICESE. Baja California, México.
- Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. L. Péres, 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., Cahu, C., Péres, A. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larvae development. *J. Nutr.*, 129, 1195–1200.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130: 477-487.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268: 98-105.
- Zarza-Meza, E.A., Barruecos-Villalobos, J.M., Vásquez-Peñáez, C., Álvarez-Torres, P. 2006. Cultivo experimental de robalo *Centropomus undecimalis* y chucumite *Centropomus parallelus* (Perciformes: Centropomidae) en estanques rústicos de tierra. *Ciencias Marinas*, 32(2): 219-227.

Anexos

Protocolo para la determinación de la actividad de la lipasa dependiente de sales biliares (LDSB) en un lector de placas usando 2-nitrofenil miristato (modificado de Gjlllesvik, 1992)

1. Reactivos

1.1. Sustrato para lipasa (una vez mezclado con el buffer usar el mismo día).

1.1.1. Primero disolver 34.9 mg de miristato (Peso molecular 349.49g mol^{-1}) en 1.0 ml de etanol para alcanzar una concentración de 100 mM y almacenar a -80°C .

1.1.2. Preparar el buffer a un pH de 7.4 (0.5 M tris-HCl), 6 mM de taurocolato de sodio y 100 mM de cloruro de sodio (NaCl). Para 10 ml de buffer se disuelven 0.661 g de tris-HCl + 0.097 g de tris-Base en agua destilada, se añaden 0.032 g de taurocolato de sodio + 0.058 g de NaCl.

1.1.3. Mezclar el buffer con el miristato (100 mM) para alcanzar una concentración final de 0.50 mM. Para 1 ml agregar 5.0 μl de miristato a 995 μl de buffer.

2. Procedimiento

2.1. Ensayo de LDSB

2.1.1. Agregar 25 μl del homogenizado del tracto digestivo de las larvas en los pozos de la placa

2.1.2. Iniciar la reacción al agregar 200 μl de la solución buffer + miristato, preferiblemente con una pipeta de carga.

2.1.3. Registrar la absorbancia de la reacción a una longitud de onda de 400 nm de luz UV-visible, cada minuto por una hora a 30°C de temperatura.

2.2. Blanco y control positivo

2.2.1. Agregar agua destilada en lugar extracto enzimático como blanco.

2.2.2. Para el control positivo utilizar lipasa pancreática porcina a 1.0 mg/ml.

3. Cálculo de actividad enzimática

La actividad enzimática se reporta como actividad total por larva ($U \text{ Larva}^{-1}$) y actividad específica ($U \mu\text{g}^{-1}$ proteína). Donde 1 U de actividad enzimática se definió como el incremento de 0.1 unidades de absorbancia por minuto (Lazo *et al.*, 2000b).

La actividad total se determina usando la siguiente fórmula,

$$U \text{ Larva}^{-1} = \left\{ \frac{\Delta \text{ Abs/min}}{\text{Coef Ext}} * \frac{\text{Vol total de H } (\mu\text{l})}{\text{Vol de H utilizado } (\mu\text{l})} * \frac{\text{Vol de reacción } (\mu\text{l})}{\text{Vol de H utilizado } (\mu\text{l})} \right\} / \text{No. Larvas}$$

Donde,

Abs/min: es el punto donde se registró la mayor absorbancia de cada muestra

Coef Ext: 0.1 unidades de absorbancia por minuto

Vol total de H: es el volumen total de agua destilada que se usó para homogenizar las larvas (1 ml)

Vol de H utilizado: es la cantidad de homogenizado que se utilizó para la reacción (25 μl)

Vol de reacción: es el volumen final de la reacción (225 μl)

No. Larvas: es el número total de larvas utilizadas para realizar el homogenizado

La actividad específica se obtiene al dividir la actividad total por larva entre la concentración de proteína soluble del homogenizado y está expresada en $U \mu\text{g}^{-1}$ de proteína.