



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN DE LA
LEVADURA VIVA *Debaryomyces hansenii* A TRAVÉS
DEL ROTÍFERO *Brachionus rotundiformis* DURANTE
LOS PRIMEROS DÍAS DE DESARROLLO DEL JUREL
Seriola rivoliana

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

MARCELO BURGOIN COTA

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 25 del Mes de junio del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN DE LA LEVADURA VIVA *Debaryomyces hansenii* A TRAVÉS DEL ROTÍFERO *Brachionus rotundiformis* DURANTE LOS PRIMEROS DÍAS DE DESARROLLO DEL JUREL *Seriola rivoliana*"

Presentada por el alumno:

Marcelo Burgoin Cota

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **BIOTECNOLOGÍA**

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

LA COMISION REVISORA


Dr. Daríel Tovar Ramírez

DIRECTOR DE TESIS


Dr. Ricardo Vázquez Juárez

CO-TUTOR


Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA

DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS.

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Co – Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Co – Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

COMITÉ REVISOR

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Director

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Co - Tutor

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Co – Tutor

Dr. Alberto Peña Rodríguez

(Suplente)

RESUMEN

La producción de peces ha crecido constantemente en las últimas décadas y el incremento de la demanda de pescado ha aumentado. China se ha mantenido como el principal productor de pescado por su expansión a la par del crecimiento económico. México se encuentra entre los primeros productores pesqueros, sin embargo, su producción acuícola aun es mínima. Para que las especies sean blanco de la acuicultura deben tener cierta relevancia en el mercado de la potencial pesquería. Uno de los principales problemas de los cultivos de peces marinos es la alta mortalidad en los estadios tempranos larvarios representando el cuello de botella para el desarrollo de la acuicultura marina. El cambio de alimentación suele estar asociado a mortalidades en los primeros días, son los factores del alimento y la captación por parte de las larvas lo que determina la supervivencia. Para el género *Seriola* los sistemas de cultivo actuales a nivel mundial varían, hay trabajos en Asia con *Seriola quinqueradiata*, Europa con *Seriola dumerili*, Australia y Nueva Zelandia con *Seriola lalandi*. Para tratar de evitar la mortalidad en los estadios larvarios tempranos se empleó la levadura *Debaryomyces hansenii* que es productora de poliaminas y que ya se ha empleado en diferentes estudios (Tovar *et al.*, 2002; 2004, Reyes – Becerril *et al.*, 2008; 2011, Luna, 2012) donde se ha observado un efecto positivo sobre el crecimiento y la supervivencia, empleamos la prueba t de Student y encontramos diferencias significativas entre tratamientos. Observamos que el rotífero es capaz de llevar 64 levaduras en promedio, y observamos las levaduras dentro de la larva, también registramos un aumento de 8.98% en el crecimiento, un aumento de 75% en la supervivencia de las larvas entre los dos tratamientos, además de un aumento de 12.95% en la longitud del borde de cepillo, esto nos da mayor potencial de desarrollo de las larvas de *Seriola rivoliana*.

Palabras clave: acuicultura, larvicultura, poliaminas.

ABSTRACT

Worldwide fish production has been growing constantly for the last decades and the increase of fish demand has grown 3.2%, folding the production capacities by 1.6%. China is the world's largest fishing country, expanding production as the economy grows. Mexico is in between the first 18 world fishing countries, but aquaculture here is minimal. For marine species to be target of aquaculture they have to be relevant in the market where the fishing activity is taking place. One of the main issues with aquaculture is the high mortality within the first days post hatch, and remains as bottleneck for marine aquaculture. First exogenous feeding is very important to preserve optimal vital functions and hence survival. The switch to living prey is associated with high mortalities, but food quality and prey capture are the main factors among larvae survival. Marine culture of genus *Seriola* vary from all around the world, there are several papers about commercial *Seriola* species in Asia with *Seriola quinqueradiata*, Europe with *Seriola dumerili*, Australia and New Zealand with *Seriola lalandi*. Fish from genus *Seriola* live in warm seas. Trying to avoid massive mortality over early larval development we fed yeast *Debaryomyces hansenii*, which is a polyamine producer, to the larvae, this yeast has been widely studied and described in several papers (Tovar *et al.*, 2002; 2004, Reyes – Becerril *et al.*, 2008: 2011, Luna, 2012), as it shows positive effect in growth and survival. Our results suggest that yeast polyamine production supplied in early larval development is involved in faster growing and better survival in the groups fed yeast because of gut maturation, we submitted the Student's t test and we found significant differences among treatments. We observed yeast inside rotifer, which got inside the larvae, this means the rotifer is able to carry 64 yeast, among this, the overall length of larvae increased 8.98% and survival raised to 75% in the treatment, and also a 12.95% increase in border brush length, this will increase the potential to rise *Seriola rivoliana* larvae culture.

Key words: aquaculture, larvae, polyamines.

DEDICATORIA

A mi familia; Don José, Doña María, Edgar, Vero y Fran, por sus ánimos y sugerencias para el futuro.

A mi segunda familia; Don Paco, Doña May y la Abuela que estuvieron en muchos momentos clave y me echaron más que porras.

A mis abuelos; porque me enseñaron que el trabajo siempre rinde frutos.

A ustedes; Que no alcanzaron a verme en estado adulto, pero que seguramente están viendo todo lo que pasa y seguramente están complacidos.

No hubiera sido posible nada de esto sin ti Liz; que jamás me dejaste rendirme, por tanto que has hecho por mí, por lo que fue, por lo que es y por lo que viene.

AGRADECIMIENTOS:

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por todas las facilidades otorgadas en equipo e infraestructura.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada No. 344381, con registro No. 279810 y que permitió realizar la presente tesis.

Al Dr. Dariel Tovar Ramírez, por su tiempo hacia sus estudiantes, hacia sus colegas y hacia mí, que siempre mantiene la ética, el optimismo y sobre todo la paciencia.

Al Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola por sus consejos durante la fase experimental, por preocuparse por cada elemento dentro del bioensayo.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez por su apoyo durante las fases de análisis, por su visión.

A los Técnicos como Jorge Sandoval, Delia Rojas, Patricia Hinojosa, Gilberto Colado, Marcos Quiñones, Francisco Encarnación, Pablo Monsalvo y Jeb Rabadan, que siempre estuvieron al pendiente cuando los necesité.

Al BOM y al laboratorio de Fisiología comparada y Genómica donde estuve gran parte del tiempo y a las personas que en el laboran.

A mis amigos de la maestría porque nos frecuentamos cuanto pudimos, compartimos muchas actividades y experiencias.

Finalmente agradezco a mi círculo familiar, padres, hermanos, tíos, abuelos, suegros y allegados, porque siempre nos apoyamos, aconsejamos, estamos al pendiente de que lo que pasa, le buscamos solución a las cosas y salimos adelante.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS:	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS.	viii
INTRODUCCIÓN	1
Panorama de la pesca y la acuicultura.	1
Alimentación y nutrición de larvas de peces marinos.	5
Alimentación de las larvas.	6
Deshabitación al alimento vivo.	8
Características de la especie.	9
Taxonomía.....	10
Cultivo.....	10
Distribución y hábitat.	12
Parámetros de cultivo.	12
Probióticos en acuicultura.....	13
ANTECEDENTES	17
Empleo de probióticos en la alimentación del pez.	17
JUSTIFICACION	23
HIPOTESIS	26

OBJETIVOS.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Preparación de la levadura.....	28
Preparación del alimento vivo.....	28
Inoculación de la levadura.....	29
Preparación del bioensayo.....	30
Parámetros fisicoquímicos.....	30
Muestreo.....	31
Metodología del objetivo 1.....	31
Metodología del objetivo 2.....	34
Metodología del objetivo 3.....	37
RESULTADOS.....	38
DISCUSION.....	62
CONCLUSIONES.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 17
Figura 29
Figura 330
Figura 438
Figura 539
Figura 640
Figura 741
Figura 842
Figura 943
Figura 1045
Figura 1146
Figura 1247
Figura 1348
Figura 1449
Figura 1550
Figura 1651
Figura 1752
Figura 1853
Figura 1953
Figura 2054
Figura 2155
Figura 2257
Figura 2359
Figura 2460

LISTA DE TABLAS.

Tabla I	2
Tabla II	3
Tabla III	53
Tabla IV	55
Tabla V	56

INTRODUCCIÓN

Panorama de la pesca y la acuicultura.

La producción global de peces ha crecido constantemente en las últimas cinco décadas, con el incremento de la demanda de pescado a una tasa mundial de 3.2%, sobrepasando el crecimiento de la población mundial por 1.6%.

El consumo per cápita de pescado se ha incrementado de 9.9 kg en la década de 1960 a 19.2 en 2012. China se ha mantenido como el principal productor de pescado por su expansión a la par de su crecimiento económico.

La captura mundial para 2011 fue de 93.7 millones de toneladas, el segundo gran volumen de captura después de 1996 con 93.8. La producción pesquera global en las regiones marinas fue de 82.6 millones de toneladas en 2011 y de 79.7 millones en 2012 (Tabla I), en este periodo, los principales países productores de Asia, capturaron un promedio de 1 millón de toneladas por año, lo que significa el 76% de la captura mundial. Solo China produjo 43.5 millones de toneladas de pescado y 13.5 millones de toneladas de algas.

Las principales especies que se capturan son la anchoveta, abadejo de Alaska, bonito, sardina, arenque, entre otros.

La acuicultura global se adjudicó un máximo histórico con una producción de 90.4 millones de toneladas (equivalente en peso vivo) en 2012 (144 billones de dólares), dividido en 66.6 millones de toneladas de pescado y 23.8 millones de toneladas de alga.

La acuicultura tiene como principales productos los peces de aleta (354 especies, 5 híbridos), moluscos (102), crustáceos (59), anfibios y reptiles (6), invertebrados acuáticos (9) (FAO, 2014). Como puede observarse en la Tabla II, la tendencia es que la producción por acuicultura rebase a la captura.



World fisheries and aquaculture production and utilization

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>(Million tonnes)</i>						
PRODUCTION						
Capture						
Inland	10.1	10.3	10.5	11.3	11.1	11.6
Marine	80.7	79.9	79.6	77.8	82.6	79.7
Total capture	90.8	90.1	90.1	89.1	93.7	91.3
Aquaculture						
Inland	29.9	32.4	34.3	36.8	38.7	41.9
Marine	20.0	20.5	21.4	22.3	23.3	24.7
Total aquaculture	49.9	52.9	55.7	59.0	62.0	66.6
TOTAL WORLD FISHERIES	140.7	143.1	145.8	148.1	155.7	158.0
UTILIZATION¹						
Human consumption	117.3	120.9	123.7	128.2	131.2	136.2
Non-food uses	23.4	22.2	22.1	19.9	24.5	21.7
Population (<i>billions</i>)	6.7	6.8	6.8	6.9	7.0	7.1
Per capita food fish supply (<i>kg</i>)	17.6	17.9	18.1	18.5	18.7	19.2

Note: Excluding aquatic plants. Totals may not match due to rounding.

¹ Data in this section for 2012 are provisional estimates.

Tabla I. Estado de la pesca y la acuicultura en el mundo (FAO, 2014).

México se encuentra entre los primeros 18 países productores pesqueros, con un incremento en el periodo de 2003 a 2012, con una producción de 1, 467, 790 toneladas, manteniéndose estable; sin embargo, su producción acuícola aun es mínima y no figura entre las potencias mundiales acuícolas. Aun cuando no hay producción notable de productos acuícolas, el sector de Latinoamérica y el caribe ha tenido un crecimiento significativo.

La pesca en México constituye una fuente importante de alimentos, no solo a nivel nacional, sino también a nivel internacional, así como el apoyo en la generación de empleos, recreación, comercio, y el bienestar económico del país, tomando en cuenta que ha sido una actividad muy productiva en el pasado, con un adecuado ordenamiento y legislación siendo útil para generaciones presentes y con los

principios de sustentabilidad pensando en las futuras generaciones (CONAPESCA, 2013).

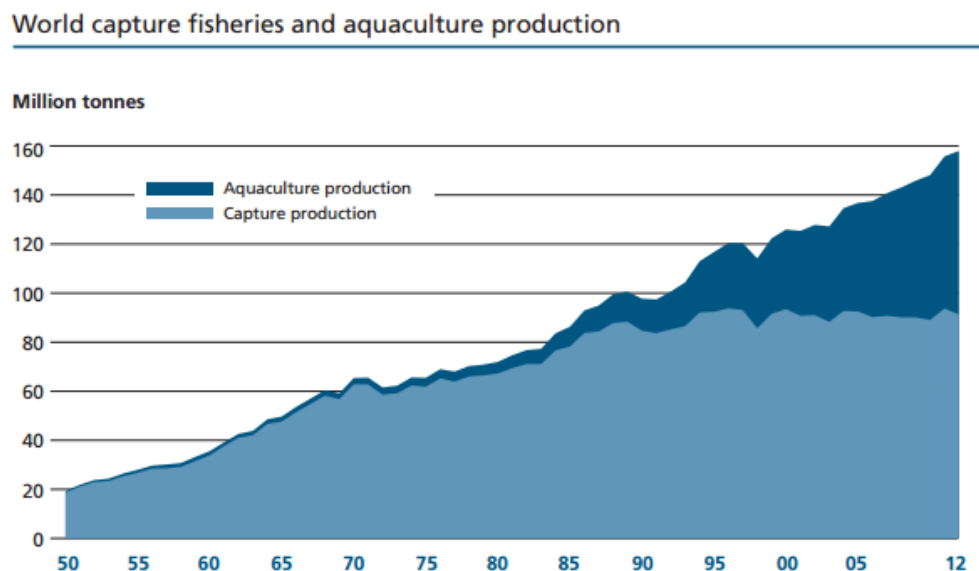


Tabla II. Producción acuícola vs captura. (FAO, 2014).

Del ecosistema marino entre numerosas plantas y animales, los peces, representan una fuente importante de alimento y proteína de alta calidad para los humanos. Los peces y sus pesquerías no solo proveen una importante cantidad de alimento disponible para consumo, también integra al sector económico al crear empleos y oportunidades de inversión en muchos países, mejorando así el balance en el comercio internacional. La mayor parte del consumo viene de poblaciones salvajes que son explotadas por el área comercial o la deportiva (Çiftci, 2003).

Para que las especies sean blanco de las actividades acuícolas deben tener cierta relevancia en el mercado ya sea local, nacional o internacional, marco donde se desarrollaría la potencial pesquería (Tucker, 1998). Otros criterios que determinan el potencial de cultivo de las especies son: velocidad de crecimiento durante los primeros meses después de la eclosión, supervivencia, conducta (hábitos

gregarios, canibalismo) resistencia a la manipulación, entre otros (Lanza – Espino, Arredondo – Figueroa, 1990).

Es bien conocido que en el ambiente, la supervivencia de las larvas presenta altas fluctuaciones que van desde 0.1% hasta 10%, los cuales son producto de dos factores; los factores externos y los factores internos. Los factores externos se dividen a su vez en dos grupos; los físicos y los químicos. Dentro de los factores físicos tenemos la temperatura, la iluminación, el flujo de agua, corrientes, etc. Los factores químicos son el pH, la salinidad, oxígeno disuelto, iones, mismos que son muy limitantes para la supervivencia de las larvas. En el caso de los factores internos, pueden ser subdivididos en cuatro tipos: a) los genéticos, transmitidos por el material heredado, b) los etológicos que se relacionan con el comportamiento alimenticio, c) los biológicos, que tienen que ver con la competencia y depredación y d) los nutricionales, que confieren a la larva la energía necesaria para mantener su metabolismo, además de crecer y asegurar su supervivencia (Civera – Cerecedo *et al.*, 2004).

Uno de los principales problemas que se han presentado dentro de los cultivos de peces marinos es la alta mortalidad en los estadios tempranos larvarios. Dentro de este contexto, la temperatura toma un papel fundamental en el desarrollo de las larvas, la cual, se ha reportado que influye directamente en la supervivencia, eclosión, así como también en la talla al eclosionar y en el crecimiento, además en la absorción del saco vitelino y en la eficiencia en el uso de las reservas energéticas (Moreno-Figueroa, 2011).

Hoy en día, la producción larvaria, así como la obtención de alevines de buena calidad, siguen representando el cuello de botella para el desarrollo de la acuicultura, sobre todo en ciertas especies marinas. Esto es debido a que las larvas presentan un desarrollo incompleto al eclosionar, por lo que ciertos tejidos y órganos como el sistema nervioso, digestivo y estructuras óseas, sufrirán cambios

morfológicos, funcionales, fisiológicos, etc., en las primeras semanas de vida (Govoni *et al.*, 1986).

De acuerdo con Tucker (1998), el desarrollo del cultivo de nuevas especies requiere la obtención de semillas en gran cantidad para su posterior engorda, ya sea en jaulas y/o estanques. A largo plazo, los cultivos cerrados de estas especies aseguran un aporte constante de juveniles con miras a emplear el mejoramiento genético, ya que aún no se obtienen las condiciones favorables que promuevan el desarrollo biológico natural de las larvas en cultivo.

Alimentación y nutrición de larvas de peces marinos.

Dentro de los cultivos, es importante la primera alimentación exógena del organismo. Las reservas de vitelo de las larvas empiezan a agotarse, por lo que es necesaria la ingesta de presas que permitan mantener el funcionamiento óptimo de los sistemas vitales de las larvas. El cambio de alimentación suele estar asociado a mortalidades en los primeros días del desarrollo larvario, donde también intervienen factores como la calidad de los huevos, de los reproductores, de la especie, pero principalmente son los factores del alimento y la captación de este por parte de las larvas lo que determina la supervivencia.

La mayoría de las larvas de peces marinos son cazadores planctónicos visuales, sin importar sus hábitos alimenticios posteriores. En el ambiente, la alimentación de las larvas de peces marinos se compone de complejas redes tróficas que van cambiando en función del crecimiento. La alimentación se basa en diatomeas, dinoflagelados, tintínidos, ciliados, cladóceros, copépodos, huevos de bivalvos, entre otros muchos tipos de organismos (Blaxter, Hunter, 1982). Es por eso que para que las larvas aseguren su supervivencia se deberá seleccionar la presa, de tamaño adecuado y de movimiento lento; además de que esta presa, una vez ingerida sea fácil de digerir, cubriendo así sus requerimientos nutricionales mínimos (Hunter, 1981).

Desde el punto de vista de la alimentación, las larvas usualmente de menor talla y más delicadas, requieren alimento vivo entre 3 y 5 semanas después de la eclosión (más de ocho semanas en algunos casos). Para algunas especies, la desventaja de una talla pequeña, puede ser compensada modificando factores como el tamaño de la boca, tipo de dentición, o que las larvas se desarrollen en un ambiente de gran abundancia y diversidad de presas (Civera–Cerecedo *et al.*, 2004).

Alimentación de las larvas.

Durante los primeros días o semanas después de la eclosión, la larva utiliza su limitada reserva endógena como fuente de nutrientes para el crecimiento y la producción de energía (Kendall *et al.*, 1984). La reserva endógena de una larva está constituida por el saco vitelino y el(los) glóbulo(s) de aceite (Figura 2), y sus componentes principales son las proteínas y lípidos, respectivamente (Heming y Buddington, 1988). Una vez que la larva vitelina haya absorbido completamente el vitelo y el glóbulo de aceite, sus reservas se agotan y la larva pasa a depender exclusivamente del alimento suministrado (Balon, 1984).

En algunas especies, p.ej. los espáridos (*Sparidae*), existe un periodo de alimentación mixta (o alimentación endo-exotrófica), en donde los organismos se nutren al mismo tiempo de sus reservas vitelinas y del alimento capturado (Yúfera *et al.*, 2011). Para otras especies, p.ej. los pargos (*Lutjanidae*), ocurre un cambio drástico de una alimentación endógena a exógena, así que las larvas empiezan el proceso de aprendizaje de captura de presas vivas cuando ya no cuentan con sus reservas vitelinas.

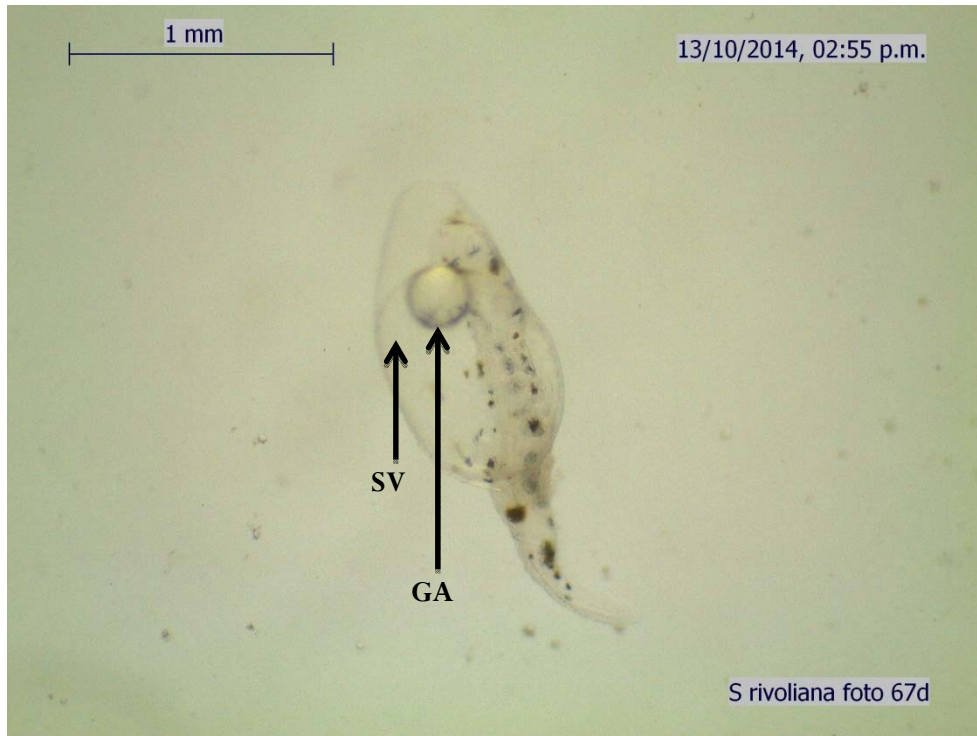


Figura 1. Larva de jurel al 1DDE. Aumento de 2X. SV: saco vitelino; GA: glóbulo de aceite.

En los cultivos marinos, la ingestión se ha reducido a un grupo pequeño de presas, mismas que se emplean con el fin de cubrir los requerimientos nutricionales del pez, estos son:

Microalgas: La utilización de microalgas es necesaria para la alimentación exógena del pez, como también lo es para los integrantes del cultivo, como base de la cadena alimentaria para el cultivo en agua verde, la microalga también mejora las condiciones del estanque, produciendo oxígeno y removiendo algunos productos metabólicos (Coutteau, 1996).

Rotíferos: Son microorganismos adecuados para la alimentación de las larvas debido a su capacidad de absorber inespecíficamente, como una especie de biocápsula, un vector el cual se puede enriquecer para hacer llegar nutrientes esenciales al pez (Grossi, 2010).

Artemia: En días posteriores al inicio de la alimentación con rotífero, se suele cambiar a *Artemia*, la cual no es naturalmente una presa para los peces, sin embargo, es empleada por su versatilidad de manejo. El valor nutricional de los nauplios es alto, sin embargo se pueden enriquecer con emulsiones comerciales gracias a que son filtradores no selectivos, no obstante, la *Artemia* sigue creciendo al aplicar este tipo de compuestos, por lo que en los cultivos las fases más empleadas son el nauplio y el metanauplio (Grossi, 2010).

Copépodos: Este grupo marino es el alimento natural de numerosos peces, con un contenido nutricional mayor que la *Artemia*, además de que el estímulo visual del movimiento en zigzag hace que los prefieran sobre los rotíferos, sin embargo, sus largos ciclos de vida largos pueden ser una limitante (Delbare *et al.*, 1996).

Deshabitación al alimento vivo.

El producir alimento vivo, genera múltiples complicaciones, implicado el costo en mano de obra y equipamiento, aún más importante está el valor nutricional del alimento vivo que se produce, mismo que puede perderse debido a problemas en la producción o no generar diferencias al administrarse a los peces (Sorgeloos, 1980; 2001.).

Estas razones obligan a que se reduzca el tiempo de uso del alimento vivo, para ser reemplazado por alimento microparticulado, lo que enfatiza a la alimentación combinada como paso definitivo para la deshabitación alimentaria ya que los peces presentan una preferencia natural por el alimento vivo (Dutton, 1992).

La optimización de las condiciones de cultivo, pasa por mantener unas condiciones abióticas y bióticas adecuadas que deben tender a aproximarse en lo posible, a las condiciones del medio natural. En el éxito de las distintas técnicas de cultivo intervienen un gran número de factores que son condicionantes de sí mismas, entre ellas la calidad nutritiva del alimento (Grossi, 2010).

Características de la especie.

El Jurel *Seriola rivoliana*, también llamado, Kampachi, Pacific yellowtail, long-fin amberjack, es un pez de la familia *Carangidae*, de color verdoso gris en la parte superior, mientras que en su base es claro, con una línea oscura en diagonal sobre el ojo en los peces jóvenes.

Esta especie llega a crecer a 1 metro de longitud total, es un pez alargado levemente comprimido y moderadamente alto. Se distribuye en aguas tropicales, algunas templadas, a nivel mundial. Es una especie epipelágica, que circula en los fondos por episodios cortos.

La forma en que se reproducen estos peces es por fertilización externa, son ovíparos. Los huevos son pelágicos, de forma esférica, con gota de aceite, sin coloración.

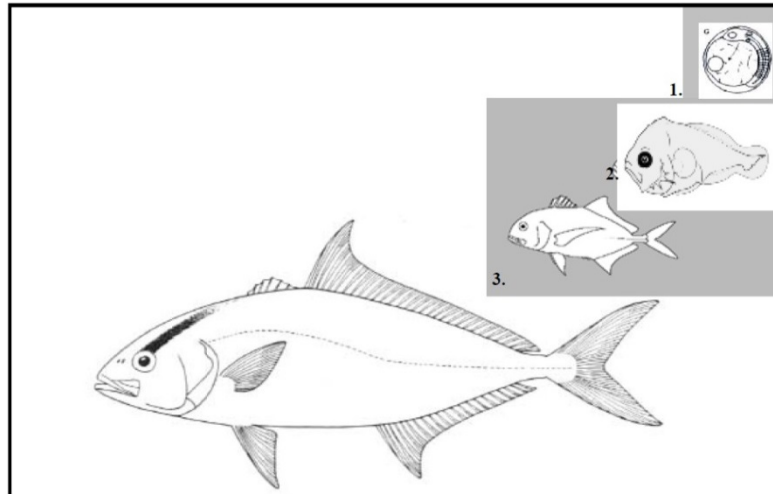


Figura 2. Fases de desarrollo del jurel (Grossi, 2010).

Taxonomía.

Reino: *Animalia*; Phylum: *Chordata*; Subphylum: *Vertebrata*; Clase: *Actinopterygii*; Orden: *Perciformes*; Familia: *Carangidae*; Genero: *Seriola*; Especie: *rivoliana*. (World register of marine species).

Cultivo.

Para el cultivo de esta y otras especies los levantamientos larvarios se han basado en el origen de la alimentación que se proporciona. Encontramos el cultivo intensivo, el extensivo y el semiextensivo.

El intensivo es un sistema donde se emplea una alta densidad larvaria (175 larvas / litro). Se llevan a cabo en tanques de forma cilíndrica, con la tendencia a usar volúmenes grandes (10 a 20 m³). Los parámetros de cultivo que se tienen que controlar son: la temperatura, la iluminación, hidrodinámica, oxigenación y alimentación. Generalmente el fotoperiodo, intensidad y espectro lumínico es un recurso artificial y puede cambiar de acuerdo al desarrollo de la larva y la agudeza de su sistema visual (Roo *et al.*, 2001). El alimento viene a ser exógeno y se compone de rotíferos, para cambiar posteriormente a *Artemia*, que se han de enriquecer por medio de mezclas comerciales de ácidos grasos o microalgas.

El extensivo es un sistema que emula en parte a la naturaleza, donde la larva es el eslabón superior de la cadena alimenticia que se genera, por lo que no es necesario proveer de alimento a las mismas, ya que el ecosistema es autónomo desde el inicio de la vida trófica hasta la cosecha. Los volúmenes de cultivo se adicionan con zoo y fitoplancton para luego añadir los huevos o larvas que se deseen desarrollar (Van der Meeren, 1997). Este tipo de cultivo se lleva a cabo con densidades de 1 individuo por litro, es relativamente más económico y ecológico. Aun cuando las densidades de cultivo son menores, la supervivencia es mayor que en condiciones naturales (Divanach *et al.*, 1996).

El cultivo semiextensivo es un sistema de alto rendimiento, intermediarios entre el intensivo y el extensivo, mejora las condiciones de ambos, con el mínimo de

inconvenientes. Los cultivos semiextensivos mantienen una densidad de 2 a 10 larvas por litro, las condiciones pueden ser naturales o artificiales, con la posibilidad de controlar las variaciones climáticas, se les suministra alimentación exógena, sin embargo pueden contar con alimentación endógena. Los alevines resultantes tienen mejor calidad que los que se producen en sistemas extensivos e intensivos, debido a ello, se emplea esta técnica para la producción de peces en más de 25 especies marinas.

En el cultivo intensivo de larvas, la técnica de agua verde es a menudo utilizada, con muy buenos resultados. Para esto se le agrega microalga, donde influye directamente en algunas funciones de la larva, así como en la mejora del alimento vivo que se agrega al tanque, sin embargo, aún no está claro el modo en que la microalga mejora la supervivencia de las larvas, algunos experimentos sugieren que es un efecto indirecto sobre las condiciones del alimento pero no realmente por la ingesta directa del pez (Skiftesvik *et al.*, 2003).

Para el género *Seriola* los sistemas de cultivo actuales a nivel mundial varían según el sistema y las condiciones de cultivo. De lo cual, se recogen distintos trabajos con las especies de interés comercial en muchas regiones, así tenemos en los países asiáticos con el *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack), europeos con el *Seriola dumerilii* (Greater amberjack; Mediterranean amberjack), y Australia y Nueva Zelandia con el *Seriola lalandi* (Yellowtail amberjack; Goldstriped yellowtail). El cultivo de estas especies se da en forma de semicultivo, puesto que el cultivo larvario masivo aún no se ha puesto a punto a escala industrial. El proceso de cultivo se compone de tres etapas bien diferenciadas: recolección de los alevines (2.5 - 5 cm), cría de los alevines hasta el estado juvenil (5 - 15 cm), y engorde de juveniles hasta su tamaño comercial (> 40 cm). La mayoría de los cultivos se limitan al uso de sistemas con estructuras flotantes en regiones litorales protegidas. Esto ocurre mayormente en los países asiáticos, donde la tecnología para maricultura está muy desarrollada (Grossi, 2010).

Distribución y hábitat.

Son peces pelágicos demersales, epibentónicos, marinos (Smith–Vaniz, 1999), que se encuentran en aguas abiertas cerca de la superficie, se pueden encontrar en aguas con temperaturas de entre 18 y 24°C, en profundidades de 50 metros, sin embargo pueden descender por la columna de agua hasta los 300 metros.

Se encuentra en las regiones subtropicales de los océanos Índico, Atlántico oeste y Pacífico oeste, en el continente americano se puede encontrar desde la costa de Baja California hasta el Norte de Perú. Estos peces son oportunistas, con una dieta que varía en función de su tamaño, en el medio natural se alimentan principalmente de moluscos, crustáceos, equinodermos y peces pequeños. Cuando tienen una talla de 4 cm, su alimentación se compone principalmente de copépodos *Calanus*. A medida que crecen comienzan a alimentarse de pequeñas anchovetas, entre otros peces pequeños. Una vez alcanzados los 15 cm, estos comienzan a alimentarse de sardinas, macarelas, calamares, etc.

Parámetros de cultivo.

Los peces del género *Seriola* viven en aguas cálidas, su rango óptimo de temperatura es de 18 a 29°C, a temperaturas por debajo de los 15°C su crecimiento disminuye y a temperaturas inferiores a 9°C o superior a 31°C estos peces mueren. También soportan salinidades altas de 33 ppm, pero no resisten concentraciones menores de 16 ppm.

El consumo de oxígeno es de 500 ml / kg de peso corporal, en una hora bajo condiciones normales. El nivel óptimo de oxígeno de estos peces es mayor a 4 ml/l de agua en el tanque (Espinoza *et al.*, 2004).

El género *Seriola* no figura como pieza fundamental en las actividades acuícolas de México, solo en algunas regiones a nivel mundial se mantienen granjas para engorda, producción y captura de semilla, (Ej. Hawaii, Japón) (FAO, 2014; CONAPESCA, 2013), el jurel en México se captura en varios estados por arriba de

los 572, 000 kilogramos. En Baja California Sur, en las temporadas de pesca se llevaron a puerto 16, 525, 823 kg para consumo humano directo, que generaron \$137, 069, 962. (CONAPESCA, 2013).

Probióticos en acuicultura.

La alimentación es esencial en la supervivencia de los peces y de sus larvas, especialmente durante la absorción de los nutrientes del saco vitelino. En conjunto con la detección de las presas, la capacidad de captura (que se basa en la coordinación del desarrollo muscular - visual) un sistema digestivo adecuado, se debe adquirir en cuestión de semanas o meses, antes de que sea capaz de aprovechar la alimentación exógena, ocurriendo esto en la mayoría de las larvas de especies marinas.

El desarrollo del tracto digestivo involucra la maduración funcional del páncreas, intestino, estómago, donde se incluyen además, cambios morfológicos combinados con diferenciación celular. La consecuencia de estos cambios es la producción de enzimas específicas en los diferentes órganos clave nombrados anteriormente. Un mejor entendimiento de la ontogenia gastrointestinal es particularmente importante para las especies blanco de la acuicultura, con el fin de alimentar a las larvas con una dieta adecuada.

Debido a que la acuicultura se enfoca en mejorar la producción de especies cultivadas para el consumo humano, se ha observado de cerca su evolución, ya que se ha tenido que enfrentar a obstáculos como brotes de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas, por lo que la necesidad de usar antibióticos y otros químicos se ha incrementado (Martínez – Cruz et al., 2012).

El termino probiótico es relativamente nuevo, compuesto por los vocablos *pro* y *bios*, significando a favor de la vida, está asociado a los microorganismos que son beneficiosos para el hospedero (Schrezenmeir *et al.* 2001).

Los probióticos son usualmente miembros de la microbiota intestinal saludable, sin embargo pueden tener la llave para reducir el uso de antibióticos en acuicultura, ya que su adición a los cultivos puede devolver a la normalidad la microbiota dañada. Se definen los probióticos como suplementos viables que influyen benéficamente en la salud del hospedero (Salminen *et al.*, 1998).

El probiótico, no es necesariamente un antagonista del patógeno o patógenos, aun cuando algunos probióticos inhiben ciertas especies de bacterias. Moriarty describió la capacidad de *Bacillus sp.* para disminuir la proporción de *Vibrio spp.* en estanques de camarón, especialmente en los sedimentos. Estudios posteriores han notado la capacidad de los probióticos para estimular el apetito, mejorar la absorción de nutrientes así como aumentar la respuesta inmune del hospedero.

El conocimiento de los probióticos ha aumentado, ahora sabemos que estos microorganismos tienen efectos antimicrobianos, modificando la microbiota intestinal por medio de secreciones de bacteriocinas y otros compuestos, compiten por la adhesión en el intestino, de igual manera compiten por nutrientes necesarios para la supervivencia de los patógenos, produciendo un efecto antitóxico, los probióticos son capaces además de modular el sistema inmune, regulando las respuestas alérgicas del cuerpo, reduciendo de esta manera la proliferación favoreciendo la salud del hospedero.

Por mucho tiempo el termino estuvo restringido a la bacterias características de la microbiota intestinal, bacterias Gram positivas ácido lácticas, particularmente representantes del genero *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*. En contraste con los animales terrestres, la microbiota de las especies, es particularmente dependiente del flujo de agua que corre a través del tracto gastrointestinal. Por ello, la gran mayoría de los microorganismos son transitorios en el intestino, esto por el transito constante de agua y alimento, además de una carga microbiana adicional.

Un concepto más general de lo que es un probiótico lo define como uno o varios microorganismos con efectos benéficos para el hospedero, capaces de persistir debido a su tolerancia a las sales biliares y ácidos del tracto. Aun cuando el estudio de los probióticos es relativamente nuevo en acuicultura, el interés en ellos ha crecido debido al potencial que tienen para controlar enfermedades.

Actualmente existen preparaciones comerciales, el interés en los probióticos como alternativa para solucionar problemas de modo natural se incrementa, tanto científica como económicamente, con un mercado en crecimiento de preparaciones con uno o más microorganismos vivos. Los probióticos pueden usarse como aditivo alimentario vertido directamente en tanques de cultivo, o mezclados con la comida.

Es importante mencionar que los efectos de los probióticos en la acuicultura no se limitan al tracto gastrointestinal, sino que también, pueden afectar la salud del pez y moluscos, controlando patógenos, mejorando la calidad del agua por modificación de la comunidad microbiana, además del control de los sedimentos (Verschuere *et al.*, 2000).

Separado de las preparaciones de bacterias, algunos productos ya están disponibles, una de las primeras evaluaciones de estos productos, llamado BioStart que esta derivado de aislados de *Bacillus*, se empleó durante el cultivo de bagre, estudiando la concentración de inóculo utilizado. En 1998, Moriarty reporto el uso de cepas probióticas de *Bacillus spp.* incrementando la calidad de viabilidad de camarón criado en estanques, mientras tanto Chang y Liu evaluaron el efecto de *Enterococcus faecium* SF68 y *Bacillus toyoi* en Cervinet LBC y Toyocerin respectivamente, para tratar de minimizar la mortalidad de la anguila europea por edwardsielosis, con gran eficiencia por parte de *E. faecium*. Es importante resaltar que *E. faecium* se ha caracterizado como probiótico en humanos, mientras *B. toyoi* se ha empleado en animales terrestres. *B. subtilis* se ha combinado con enzimas

hidrolíticas para producir Biogen, usado como suplemento para alimentar *Oreochromis niloticus*, obteniendo incrementos significativos en la productividad.

Debido a la necesidad de encontrar un equilibrio sustentable en la acuicultura ha impulsado el uso de los probióticos en los organismos acuáticos. Llamam la atención por la capacidad de mejorar la salud de los animales huésped, sin embargo nuevas áreas se han encontrado como el efecto que tienen en la reproducción, tolerancia a estrés, entre otros, aunque esto requiere un mayor desarrollo científico

ANTECEDENTES

Empleo de probióticos en la alimentación del pez.

Una preocupación creciente debido al alto consumo de químicos en la acuicultura, ha orillado a buscar alternativas para el reemplazo de estos mismos para el control de las enfermedades. Aun cuando los antibióticos aumenten la supervivencia, también afectan a la microbiota intestinal e inducen resistencia sobre las poblaciones de bacterias, con efecto a largo plazo dentro de la salud pública (McEwen, 2002).

En 1991, Porubcan documentó el uso de probióticos (*Bacillus spp.*) esperando un incremento en la productividad de *Penaeus monodon* así como el mejoramiento de las condiciones del agua, por reducción de las concentraciones de amoníaco y nitritos. En orden de reducir la cantidad de agentes antibióticos, se han probado controles de probióticos, descritos como enemigos naturales para minimizar el daño causado por microorganismos patógenos.

Se han reportado dentro del sistema digestivo de los peces bacterias como *Salmonella*, *Listeria*, y *Escherichia coli*, incluyendo bacterias Gram positivas como *Bacillus*, *Carnobacterium* y *Enterococcus*, como también numerosas especies de *Enterococcus*, *Lactobacillus*, bacterias gram negativas facultativas como *Vibrio*, *Pseudomonas*, algunos hongos, levaduras y algas, de géneros como *Debaryomyces*, *Saccharomyces* y *Tetraselmis*, respectivamente.

Kozaza (1986) hizo el primer acercamiento de la acuicultura a los probióticos, considerando que había beneficios debido al uso de probióticos en otras especies como las aves, empleo esporas de *Bacillus toyoi* como aditivo para incrementar el crecimiento de *Seriola quinqueradiata*.

Un microorganismo probiótico puede emplear diferentes mecanismos para su efecto benéfico en el hospedero, uno de ellos es la competencia por los sitios de adhesión. El probiótico compite directamente con los patógenos por sitios en la

mucosa o en el tracto gastrointestinal, sin provocar una respuesta inmune desfavorable, establecen además relaciones simbióticas ayudando a la digestión, desplazando a las bacterias patógenas o inmunomodulación (Balcázar *et al.*, 2006). Se ha observado que tres aislados de *Sparus aurata* tienen la habilidad de reducir la adhesión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en la especie *Solea senegalensis* por exclusión en la mucosa, desplazamiento y competencia directa (Chabrillon *et al.*, 2005).

Se ha observado además por estudios del equipo de Balcázar *et al.* (2006), que *L. lactis* subsp. *lactis* CLFP 100, *L. lactis* subsp. *cremoris* CLFP 102 y *L. sakei* CLFP 202 redujeron la adhesión de *A. salmonicida*, *C. piscícola* y *Yersinia ruckeri* en el moco intestinal en la trucha arcoíris. Esta evidencia sugiere que los probióticos que se adhieren, deben tener preferencia al momento de diseñar dietas suplementadas con estos microorganismos. Los investigadores concuerdan que la adhesión es específica para el hospedero y varía entre cepas, debido a las fuerzas pasivas, interacciones electrostáticas, hidrofobicidad, fuerzas estéricas, ácidos lipoteicóicos y estructuras específicas (Servín *et al.*, 2003).

Las bacterias ácido lácticas han sido objeto de interés. El probiótico humano *Lactobacillus rhamnosus* ATCC se usó en trucha arcoíris por 51 días, con el objetivo de reducir la mortalidad por *Aeromonas salmonicida*, el agente causante de la furunculosis, una enfermedad en los peces, esta se redujo de 52.6% a 18.9% cuando 10^9 por gramo se administraron con los alimentos, cuando la cantidad de probiótico se incrementó, la mortalidad aumento, por lo que no necesariamente un exceso contribuye a un mejor funcionamiento.

Diferentes microorganismos liberan sustancias químicas que tienen un efecto bactericida o bacteriostático en otras poblaciones microbianas, lo cual influye en la competencia por las sustancias o por la energía disponible (Frederickson & Stephanopoulos, 1981). Hay numerosos estudios que demuestran *in vitro* el efecto inhibitorio de cepas bacterianas contra patógenos que se sabe existen en la

larvicultura. Se debe enfatizar que la producción de compuestos inhibitorios o antagonicos *in vitro* no garantiza que los efectos probióticos potenciales se den también *in vivo* (Gram *et al.* 2001).

Las levaduras se conocen ampliamente en la nutrición animal debido a su capacidad de producir poliaminas, las cuales inducen la maduración intestinal (Peulen *et al.*, 2000). Recientemente, diferentes cepas de levadura se han incorporado en dietas para el mejoramiento larvario. Tovar–Ramírez *et al.*, (2002, 2004) investigaron la secreción de enzimas digestivas en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), alimentadas con cepas de *S. cerevisiae* y *D. hansenii*. El crecimiento y supervivencia de las larvas alimentadas con levaduras fue mayor que en las dietas sin levadura. Los autores sugieren que el efecto es dosis dependiente, ya que el efecto de las poliaminas es dependiente de la concentración que es secretada por las levaduras dentro del tracto se da una estimulación de las enzimas endógenas provocando un efecto inmunoestimulador.

Existen varios reportes donde se establece el efecto de probióticos en peces, sin embargo el efecto en larvas es escaso. Hay dos estudios recientes donde se emplean *S. cerevisiae* y β -glucanos para estimular la protección contra *Vibrio campbelli* con nauplios de *Artemia*. Dos cepas de levadura, el tipo silvestre y su mutante, donde se observó una protección contra un vibrio oportunista (*V. proteolyticus*) y una cepa de mayor virulencia (*V. campbelli*), los autores sugieren que el cambio en la composición de la pared celular (con un mayor contenido de β -glucano) es un factor importante, más que la composición nutricional de la bacteria, sin embargo, se necesitan reportes inmunológicos para descubrir los mecanismos en los cuales se dan este tipo de interacciones (Marques *et al.*, 2006; Magnelli *et al.*, 2002).

Levaduras como *Candida sake*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizophyllum commune* han sido

empleadas como activadores del sistema inmune del camarón (*Fenneropenaeus indicus*, *Penaeus monodon*) y peces (*Channa striata* y *Sparus aurata*) en contra de agentes patógenos. Miles *et al.* (2005), observó que los bioproductos derivados de levadura mejoran la respuesta inmunológica de *C. striata* en contra de *Aphanomyces invadans* (*A. piscicida*) causante del síndrome epizoótico ulcerativo en estos peces. Los organismos alimentados o expuestos presentaron una mejor supervivencia y crecimiento. Estos resultados sugieren la posibilidad de emplear estos microorganismos como inmunoestimulantes y fuente de bioproductos empleados para este fin.

Reyes–Becerril *et al.* (2011), estudiaron el efecto de la administración de *D. hansenii* (106 UFC / g) sobre la respuesta inmune de la cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) mediante una dieta enriquecida conteniendo 106 UFC/g y expuesta a patógenos (*Aeromonas hydrophila*). Los organismos alimentados con levadura en esta dieta presentaron una supervivencia mayor comparada con el grupo control (sin levadura) mostrando además altos niveles y una relación significativa con la enzima SOD.

A parte de los extensos estudios sobre levaduras como *S. cerevisiae* Se han realizado esfuerzos por ampliar las opciones del uso de otras levaduras, tal es el caso de *D. hansenii*, una levadura osmotolerante, que puede crecer en medios hasta 4M de NaCl. Por otro lado, *Debaryomyces hansenii* es una levadura acumuladora de lípidos, y esta especie puede almacenar lípidos en 70% de su peso en seco, por lo que su metabolismo claramente está dominado por caminos que contribuyen al metabolismo lipídico (Breuer *et al.* 2006).

Las larvas de peces marinos, normalmente se exponen a estresores ambientales como las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden promover malformaciones y disfunciones fisiológicas. Los estados de metamorfosis suponen un punto crítico debido a su gran consumo de energía y recursos para las larvas (Solé *et al.*, 2004). El uso de probióticos en acuicultura es una estrategia para

mejorar las funciones digestivas, inmunológicas, las funciones digestivas, inmunológicas y antioxidantes. Numerosos estudios se han centrado en el efecto que tiene *D. hansenii*, como estimulante del sistema antioxidante y el inmune de *Sparus aurata*, *Mycteroperca rosacea* y *D. labrax* (Reyes Becerril *et al.*, 2008; Tovar-Ramírez *et al.*, 2010). Se ha visto que la cepa de *D. hansenii* acelera la maduración del tracto gastrointestinal en *Dicentrarchus labrax* traducido a una diferencia de 10 mg en peso (Tovar–Ramírez *et al.*, 2004).

Gatesoupe (2007) menciona que aun cuando el tránsito intestinal de los probióticos es relativamente corto en peces, es suficiente para contribuir a la digestión y para que la levadura pueda liberar compuestos de interés fisiológico como las poliaminas, proteasas y fosfatasa, las que benefician el desarrollo del sistema digestivo.

Los efectos benéficos de los probióticos en el campo de la acuicultura pueden resumirse en: (1) mejora de la calidad del agua (Nimrat *et al.*, 2012), (2) competencia con bacterias patógenas causantes de enfermedad por sitios de adhesión, fuentes de energía y nutrientes (Irianto y Austin, 2002a), (3) inhibición de patógenos (Balcázar, 2006), (4) estimulación de la respuesta inmune (Reyes *et al.*, 2011), (5) aumento de la resistencia a infecciones como lactococosis y streptococosis (Brunt y Austin, 2005), vibriosis (Spaangaard *et al.*, 2001), furunculosis (Irianto y Austin, 2002b), *Amyloodinium* y *Aeromonas* (Reyes *et al.*, 2008a; Reyes *et al.*, 2008b), etc., y (6) aporte de moléculas de importancia fisiológica para el hospedero, lo que conlleva a una precoz maduración del aparato digestivo y un mejor crecimiento, supervivencia y calidad larvaria (Tovar *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2004; Tovar *et al.*, 2010).

La alimentación exógena de la mayoría de las especies de peces marinos de interés en acuicultura aún depende del suministro de alimento vivo en la etapa larval. Esto se debe principalmente porque, a diferencia del alimento inerte, el alimento vivo tiene la capacidad de desplazarse por la columna de agua y por ende está constantemente disponible para las larvas; también, su movimiento

estimula la respuesta de captura de las larvas y, debido a su delgado exoesqueleto y alto contenido de agua parece poseer mayor palatabilidad (Bengston, 2003).

El típico protocolo de alimentación durante el cultivo de larvas de peces marinos se inicia con rotíferos (*Brachionus spp.*) al momento de la primera alimentación, seguido de nauplios de *Artemia* y, cercano al periodo de metamorfosis, se cambia el alimento vivo por uno inerte en un proceso gradual de coalimentación. Algunas especies, como *Dicentrarchus labrax* e *Hippoglossus hipoglossus*, la alimentación exógena se inicia directamente con el uso de nauplios *Artemia* (Zambonino-Infante *et al.*, 1996; Luizi *et al.*, 1999); mientras que otras, como salmónidos y truchas, inician la alimentación exógena con alimento inerte (Bengston, 2003).

Rotíferos y *Artemias* no son el alimento natural de las larvas de peces marinos, sin embargo son fáciles de producir en altas. Usualmente, son enriquecidos en emulsiones comerciales o microalgas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (los PUFA, sigla del inglés *polyunsaturated fatty acids*) de la serie omega-3 (p.ej. el EPA, ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3, y el DHA, ácido docosahexaenoico 22:6 n-3) y omega-6 (p.ej. el ARA, ácido araquidónico 20:4 n-6) (Palmtag *et al.*, 2006) (Seychelles *et al.*, 2009; Kotani *et al.*, 2010; Cisneros, 2011).

Mientras que algunas especies de agua dulce pueden alimentarse con alimento inerte desde que abren la boca, este proceso se da en semanas para la mayoría de los peces marinos. En el cultivo de larvas de peces marinos, la búsqueda por disminuir la dependencia al alimento vivo o su reemplazo por uno inerte, se ha convertido en una verdadera obstinación para los acuicultores. Esto permitiría una disminución de labores y costo de producción, y lo más importante, permitiría poder estudiar con precisión los requerimientos nutricionales de las larvas (Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

JUSTIFICACIÓN

En México, y en especial en la región noroeste, se están haciendo esfuerzos para llevar a cabo la optimización de las tecnologías de cultivo de peces marinos con potencial económico. Para esto se necesitan incrementar los esfuerzos multidisciplinarios para abarcar la gama de problemas en los cuales se centran los cuellos de botella de los cultivos larvarios y así avanzar significativamente en el conocimiento biológico y zootécnico de las especies cultivadas.

El aporte de datos que permitan conocer las variables fisiológicas relativas a la digestión larvaria en los peces, es vital para realizar investigaciones posteriores y en otras etapas del desarrollo, para lograr el establecimiento de un cultivo, así como el desarrollo de técnicas de análisis precisas que proporcionen información básica pero robusta, misma que será empleada con el propósito de volver eficiente y viable la producción en gran escala.

Por los resultados observados en otras especies de peces alejadas filogenéticamente de la nuestra, el uso de probióticos supondría un avance para generar modelos aplicables a esta especie en específico, que posee un gran potencial comercial, por su gran distribución geográfica que abarca los Océanos Índico, Atlántico oeste y Pacífico oeste.

Debido a que el periodo larvario es un período crítico para la obtención masiva de peces de cualquier especie (Gatesoupe, 1999; Chele *et al.*, 2005; Battaglione, Cobcroft, 2007; Murray *et al.*, 2010; Zavala *et al.*, 2012), es crucial enfocarse en la supervivencia del pez, por lo que debemos conocer los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados durante este proceso biológico para que sean usados como una herramienta predictiva en el control de variables nutricionales durante este periodo.

La eficiencia digestiva (digestión y absorción) que presentan las larvas durante el periodo larvario es limitada (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Cahu y Zambonino-

Infante, 2001), y esta característica ha sido asociada con las bajas supervivencias (Govoni *et al.*, 1986; Tovar *et al.*, 2002). La limitada eficiencia digestiva radica en que durante todo el periodo larvario el tracto digestivo de estos organismos carece de una digestión ácida y de pepsina (debido a la no funcionalidad del estómago); que posee poca área para digestión y absorción, relacionadas con los pliegues del lumen intestinal (que aumentan en número y tamaño durante el desarrollo); un intestino corto en relación al cuerpo; reducido espesor de la musculatura intestinal; baja cantidad de enzimas complementarias en cuanto al sustrato que hidrolizan, etc. (Guillaume *et al.*, 2002; Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Sin embargo, se sabe también que algunos microorganismos tienen la capacidad de influir en la maduración del sistema digestivo, además de estimular el crecimiento y aumentar la supervivencia. Este proceso se ha demostrado en ratas (Dufour *et al.*, 1988; Peulen *et al.*, 2004), puercos (Lange *et al.*, 2010), peces (Cahu y Zambonino-Infante, 1995) (Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Péres *et al.*, 1996; Wache *et al.*, 2006), etc.

Para el caso de los peces se ha visto que estimulan su crecimiento (Buts *et al.*, 1994) y aumentan la supervivencia (Tovar, 2002), actuando como verdaderos probióticos. Dentro del grupo de organismos que se ha demostrado ejercer algún tipo de beneficio a su hospedero se incluyen las levaduras productoras de poliaminas. La utilización de levaduras vivas productoras de poliaminas suplementadas en el alimento inerte ha evidenciado beneficios en la fisiología digestiva y supervivencia de larvas y juveniles de peces (Tovar, 2002; Wache *et al.*, 2006). Sin embargo, los estudios sobre el cultivo de larvas de peces marinos utilizando alimento vivo, y no el inerte, suplementado con levaduras vivas productoras de poliaminas desde que se inicia la alimentación exógena son inexistentes

Pese a las altas mortalidades obtenidas en los cultivos larvarios del jurel, los resultados de este trabajo contribuirán para el mejoramiento de la tecnología de cultivo de larvas de esta especie de interés comercial.

HIPÓTESIS

Si la levadura productora de poliaminas *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 es suministrada viva, y de forma temprana utilizando como vector al rotífero *Brachionus rotundiformis*, ésta promoverá el desarrollo larvario de *Seriola rivoliana*, en función del incremento del crecimiento, un aumento de la supervivencia y el desarrollo del tracto digestivo.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Conocer el efecto de la levadura *Debaryomyces hansenii*, absorbida por el rotífero *B. rotundiformis* y la de promover la supervivencia, crecimiento y desarrollo del tracto digestivo de *S. rivoliana*.

Objetivos específicos.

1. Determinar la eficiencia del uso del rotífero *Brachionus rotundiformis* como vector de la levadura viva *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 para alimentar larvas de *S. rivoliana*.
2. Conocer el efecto de la administración temprana de levaduras probióticas en la supervivencia y crecimiento de *S. rivoliana* durante el periodo larvario.
3. Conocer el efecto de la incorporación de levaduras vivas sobre el desarrollo del tracto digestivo de *S. rivoliana* durante el periodo larvario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la levadura.

El objeto de estudio de la tesis es el efecto de la levadura *Debaryomyces hansenii* sobre el organismo modelo (*S. rivoliiana*) por lo tanto para el bioensayo se empleó la cepa CBS 8339, esta levadura se cultivó en las siguientes condiciones:

Medio YPD (Yeast – Extracto de levadura - 10 g, Peptona 20 g, Dextrosa, 20 g por litro) líquido y sólido.

Temperatura: 30°C de incubación.

Agitación: 170 revoluciones por minuto.

Tiempo: 24 hrs.

Para iniciar el cultivo masivo de la levadura se reactivó la cepa de *D. hansenii* CBS 8339 en placas de Petri de YPD sólido incubando 24 horas a 30°C, después se caracterizó una colonia y se empleó como inóculo para un matraz Erlenmeyer de 500 mililitros con 300 mililitros de YPD líquido adicionado con ampicilina (1 mg / L).

Al tener crecimiento suficiente se trasladó el total del volumen cultivado de levadura a un matraz de 2.5 litros conteniendo 1.5 litros de YPD, se dejó incubar 24 hr a 170 rpm a 30°C.

Transcurridas las 24 hr se procedió a separar la levadura del medio YPD por centrifugación en recipientes de plástico para centrifuga de 500 mililitros a 3700 rpm por 10 minutos.

La levadura aislada se conservó en tubos Falcon de 50 mililitros en refrigeración a 5°C para su uso en el bioensayo.

Preparación del alimento vivo.

Para el manejo del alimento vivo (rotífero) se emplearon columnas de 320 litros, con fondo cónico. El rotífero seleccionado, *Brachionus rotundiformis*, fue proporcionado por la empresa acuícola Earth and Ocean Farms. El inóculo recibido fue de 300 millones de rotíferos, mismos que se dividieron en 3 columnas, para mantener 100 millones por columna como inóculo inicial. Se les suministró el enriquecedor Ori One (Skretting, Nutreco Co.), preparado de acuerdo con las especificaciones del fabricante, para dosificar en 6 raciones diarias de acuerdo a la población de cada columna. Después de la mortalidad inicial, el cultivo se mantuvo en 300 a 380 rotíferos por mililitro en 300 litros, con lo que se aseguró una población suficiente para alimentar durante el periodo de prueba del experimento, así como algunos ensayos posteriores.

Inoculación de la levadura.

De la levadura almacenada se aisló por dosis 1 gr, esto corresponde a 10^6 UFC (Tovar et al., 2002). Se resuspendió en 10 mililitros de agua salada estéril. Para inocular el rotífero, éste se cosecho usando una malla de 100 micras, empleando el filtrado para las primeras etapas de alimentación (día 3 a 6). El rotífero cosechado se llevó a un matraz de 1 litro, fue resuspendido a un volumen de 900 mililitros, se agregaron los 10 mililitros de la suspensión de levadura, se colocó una manguera en el matraz con suministro de aire y piedra de poro fino, para que el rotífero absorbiera la levadura se le dio un tiempo de 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se retiró la manguera y se filtró en malla de 35 micras para eliminar el exceso de levadura y se llevó a un volumen de 100 mililitros en agua salada estéril.

Preparación del bioensayo.

Para el cultivo de los peces se emplearon 9 columnas de 300 litros de fibra de vidrio, 4 columnas para el tratamiento con levadura y 4 para el tratamiento sin levadura, y una columna adicional para larvas en inanición, las columnas eran fondo claro, tenían con filtro central de 100 micras para mantener el nivel durante el recambio de agua sin perder organismos.

El agua para llenar los tanques fue bombeada directamente del mar, sin embargo antes de llegar a los tanques se filtró y esterilizo en un sistema de mallas de 20 micras y circulada en UV para asegurar la esterilidad del agua, se empleó un enfriador para asegurar la temperatura antes de entrar al sistema de mallas.



Figura 3. Columnas del sistema de cultivo larvario.

Parámetros fisicoquímicos.**Oxígeno.**

El sistema de oxigenación emplea un aro de manguera microporo para crear circulación, gracias a una corriente convectiva que evita la formación de zonas anóxicas en el tanque. El nivel de oxígeno fue de 5.13 ± 1 mg / ml en los tanques, el nivel más bajo registrado fue de 4.5 mg / ml, sin embargo no se registró mayor o menor mortalidad en este tanque.

Iluminación.

El sistema posee iluminación ambiental que en su zona más oscura alcanza los 1800 lux, mientras que en su zona más clara aumenta a 2000 lux.

Temperatura

La temperatura ambiental se mantuvo a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante todo el experimento. El agua dentro del tanque se mantuvo a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Muestreo.

Para monitorear el crecimiento se retiraron 5 larvas por tratamiento, mismas que se midieron usando el microscopio estereoscópico Leica EZ4D y el software LAS EZ, con el cual se obtuvieron imágenes, además se empleó un microscopio estereoscópico con graduación para corroborar cada uno de los datos. Se emplearon 5 larvas de cada tanque para los estudios de histología, además, se muestrearon por separado las levaduras que se usaron en búsqueda de contaminantes. Dentro de los controles se muestreo rotífero, con y sin levadura para microscopia electrónica de barrido y microscopia de fluorescencia.

Metodología del objetivo 1.

Para evaluar el primer objetivo; la eficiencia del rotífero *Brachionus rotundiformis*, se tuvo que optimizar la producción masiva y mantenimiento del cultivo del rotífero, procediendo de la siguiente manera:

1. Se recolectaron 30 litros de rotíferos (2000 organismos/ml) de la empresa EARTH & OCEAN FARMS (La Paz, Baja California Sur) para ser depositados en columnas de fibra de vidrio de 300 litros en el laboratorio larvario anexo al edificio O de reproductores del CIBNOR. Los organismos se aclimataron para luego ser liberados en las columnas.
2. Posteriormente se colectó un litro directo de la columna. Se dividió en 2 partes iguales de 100 ml, y se hizo un conteo nuevamente de organismos. Se diluyeron con agua de mar hasta una concentración de organismos de 400 por mililitro.
3. Del volumen colectado 100 mililitros se utilizaron para adicionar la levadura, mientras que los 100 ml restantes se emplearon como control. Para las muestras se emplearan 100 microlitros.
4. Cada muestra se filtró con malla de 35 micras, se lavó 3 veces con un volumen 50/50% agua de mar/ agua destilada, para resuspenderse y colocar 100 microlitros en tubos Eppendorf de 500 microlitros. Se prepararon 3 tubos por muestra de eficiencia de absorción de levadura.
 - a) Muestra control: solo rotífero.
 - b) Muestra con levadura 5: Rotífero + levadura (incubación de 5 minutos).
 - c) Muestra con levadura 10: Rotífero + levadura (incubación de 10 minutos).
 - d) Muestra con levadura 15: Rotífero + levadura (incubación de 15 minutos).

Cada muestra se sometió al protocolo estándar de fijación para Microscopía Electrónica de Barrido.

Adicionalmente, se prepararon muestras para analizar en el microscopio de fluorescencia, por medio del marcaje de las levaduras con DTAF empleada por Sherr et al. (1987).

Metodología del objetivo 2.

Para conocer el efecto de la administración temprana en la supervivencia de las larvas de *S. rivoliana*, se sometieron las larvas al siguiente bioensayo.

1.- En 8 tanques con capacidad de 300 litros (figura 3), llenados a 280 litros, se colocaron 35 mililitros de desove fresco por tanque proveniente de los reproductores de *S. rivoliana*, que se encuentran en el patio de cultivos del CIBNOR y a cargo de la empresa Kampachi Farms. Adicionalmente, se empleó un tanque como control, el cual no se alimentó de ninguna manera, dejando a los organismos en inanición.

Los parámetros que se monitorearon fueron los siguientes:

- Temperatura.
- Salinidad.
- Oxigenación.
- Iluminación.

2.- Al momento de la eclosión se tomó 1 mililitro de muestra para el análisis cualitativo de la gota de aceite y la integridad del huevo por microscopía óptica. Antes de colocar en el tanque, se tomó un mililitro adicional para estimar el porcentaje de eclosión, además de que se estimó la cantidad de larvas por mililitro para restarlas al final del experimento de las larvas que se cosecharon y obtener así la supervivencia del tanque.

3.- A los tanques se les agregaron 35 ml de huevos. Para evaluar la cantidad de huevos por mililitro de desove se empleó la siguiente metodología:

- a) Del desove fresco se toma una muestra de más de un mililitro en volumen. Para este caso fueron 10 ml en total.

- b) Dentro de un tubo Eppendorf de 2 mililitros se estableció la medida de 1 mililitro con una micropipeta Eppendorf ajustada a mil microlitros.
- c) Se agregó poco a poco el volumen de desove, retirando el agua con una pipeta de plástico de punta delgada para no alterar el número de huevos, al final se retiró toda el agua, dejando solo los huevos en el tubo.
- d) Cuando los huevos alcanzaron el volumen de un mililitro al ras de la graduación, se resuspendieron para contar por secciones en el microscopio estereoscópico Leica EZ 4D.
- f) Se obtuvo un total de 1275 huevos de jurel por mililitro de desove, que se obtuvo de 3 réplicas.
- g) En el laboratorio los tanques se dividieron de la siguiente manera:

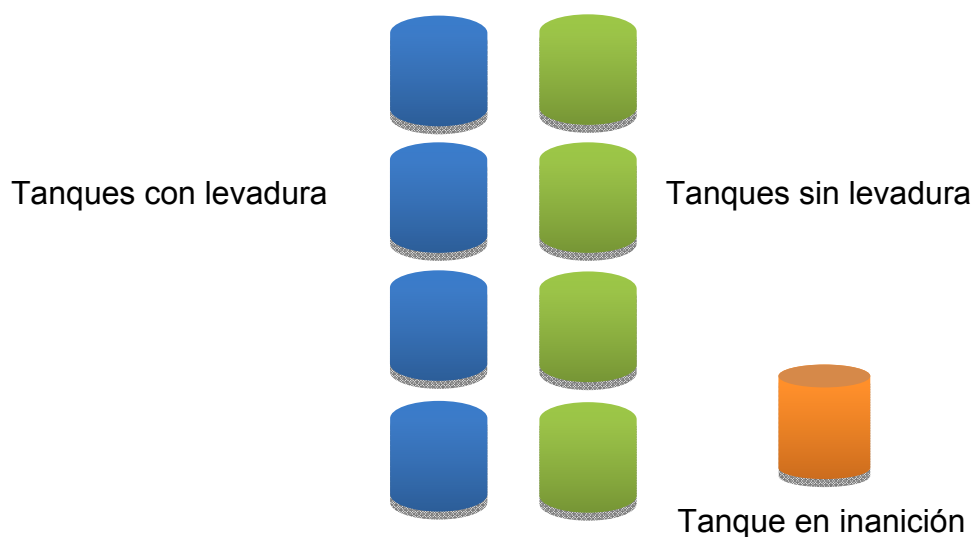


Figura 3. Distribución de los tanques en el bioensayo.

3.- Cada tanque fue alimentado con rotífero enriquecido (*Brachionus rotundiformis* + enriquecedor Ori One (Skretting, Nutreco Company, rico en HUFA) se estableció un consumo de 5 rotíferos por larva de acuerdo con Dumas *et al* 2012, se empleó

complementariamente la microalga *Nanochloropsis sp.*, para sostener el ambiente de agua verde.

4.- De los 8 tanques de tratamiento, 4 de ellos fueron alimentados con rotíferos conteniendo a la levadura *Debaryomyces hansenii*, previamente incubados por 15 minutos, con 1 dosis de la levadura cada 12 horas.

5.- Se separaron 5 larvas de cada tanque cada tercer día para observar el crecimiento en el estereoscopio Leica EZ 4D, acoplado a una computadora, para obtener una imagen digital de las larvas. Adicionalmente se tomó una muestra de 5 larvas para estudios de histología, los días 10 y 15 después de la eclosión respectivamente.

6.- Al día 15 se detuvo el experimento, se contaron las larvas en la etapa final para obtener el porcentaje de supervivencia.

Metodología del objetivo 3.

El objetivo 3 fue conocer el efecto de la levadura en el desarrollo del tracto digestivo de la larva de *S. rivoliana*.

1. De las muestras obtenidas para histología fijadas en solución Davidson se seleccionaron los mejores cortes.
2. Se aplicó el método de tinción hematoxilina y eosina para obtener a detalle núcleos celulares, citoplasma y más específicamente el borde de cepillo.
3. Se aplicó además la tinción de Gram para distinguir rápidamente la presencia de levaduras y precisar con exactitud su localización en el intestino.
4. Con las laminillas generadas por tinción HE se procedió a medir la longitud de las células de borde de cepillo para comparar el desarrollo entre las larvas no suplementadas y las suplementadas.
5. Las láminas de tinción Gram se emplearon para medir el diámetro de las levaduras, como para la observación de la morfología y conteo de las mismas.

RESULTADOS

Bioensayo.

Durante el bioensayo se tomaron muestras de las larvas durante las diferentes fases de crecimiento. Las larvas observadas hasta el día 15 si bien se cuenta como fase larvaria engloba otros cambios mayores, se observaron 4 fases importantes, de acuerdo a las siguientes imágenes:



Figura 4. Fase de huevo.

La eclosión de los huevos que dieron origen al bioensayo de *Seriola rivoliana* se dio a las 38 horas después de la puesta (figura 4). El diámetro de los huevos tuvo en promedio 1.103 mm, y la longitud de la larva al eclosionar fue de 2.475 mm.



Figura 5. Larva recién eclosionada y huevo por eclosionar a las 37 horas después de la puesta.

Las larvas presentaron una longitud muy similar con la reportada por Grossi (2010), también se observó que no todas las larvas eclosionaron al mismo tiempo, algunas completaron hasta 3 horas después de que las primeras larvas empezaron a eclosionar. El tiempo de eclosión también coincide con lo reportado por Grossi en 2010. La larva al eclosionar presenta saco vitelino y gota de aceite (figura 5), no tiene medios visuales desarrollados y cuenta con una aleta primaria que circula por todo el cuerpo de la larva desde la cabeza hasta la cola, el saco vitelino ocupa una longitud de 1.15 mm, casi la mitad de la longitud total de la larva.

Se empieza a observar desarrollo marcado al día siguiente (2 DDE) (figura 6), cuando inicia la pigmentación de la aleta primaria, así como la diferenciación de los ojos y en algunas larvas la pigmentación parcial del ojo. El saco vitelino está casi absorbido y se distingue aun la gota de aceite, a este tiempo las larvas han incrementado su talla a 2.7 mm, y están casi listas para su primera alimentación.



Figura 6. Desarrollo larvario al día 2 DDE.

Al día 3DDE (figura 7) las larvas ya tienen la boca abierta y los ojos completamente pigmentados, son sensibles a la luz, además tienen reflejo, tienen movimientos sostenidos, son larvas ágiles y voraces, que circulan hasta la mitad de la profundidad del tanque. Se observa movimiento predatorio desde el día 3

hasta el 15 DDE, aglomerándose en grupos. Hay mucha dispersión de tallas durante todo el experimento, pero empieza a ser medible desde los primeros días.



Figura 7. Día 3 DDE, previo a la primera alimentación exógena.

Las larvas del día 4 al día 10 (figura 9) presentan cambios morfológicos importantes, el aumento de la talla es el primer aspecto notable, seguido de las aletas que empiezan a diferenciarse a pesar de que poseen aun la aleta primaria que circula alrededor del cuerpo. La larva aumenta su talla considerablemente a una media de 0.30 mm por día, llegando al día 10 a 4.6 milímetros en el tratamiento y el control en 4.1 mm.



Figura 8. Larva al 4to. DDE

Del día 11 al 15 (figura 10), la larva empieza a presentar distinción en las aletas laterales y se empieza a separar la aleta caudal considerablemente, la boca es más grande y puede capturar presas mayores, son móviles y se encuentran en diferentes partes del tanque, aun en el fondo buscan alimento, en esta etapa la larva ya no se diferencia drásticamente de los días siguientes al 11, la talla y la formación de la aleta caudal son las principales características del desarrollo.

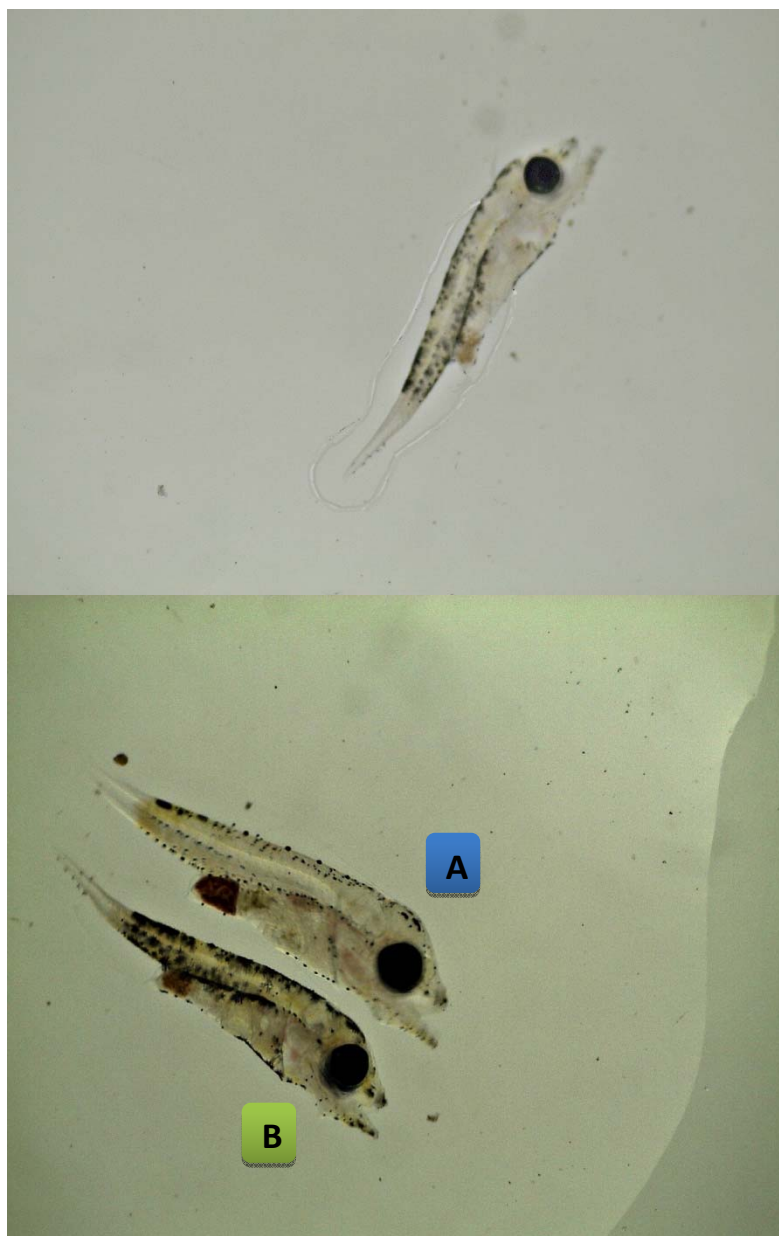


Figura 9. Arriba: Larva día 11 DDE. Abajo: Comparación de larvas al día 15 DDE. A. Larva suplementada con levadura, talla: 5.286 mm. B. Larva control, talla 5.1494 mm.

La diferencia de tallas entre tratamientos es muy marcada al día 15, donde la larva ha perdido casi por completo la aleta primaria, tiene mayor movilidad la larva suplementada, además de que se nota su intestino ligeramente abultado. Nos da

la idea de que las larvas suplementadas tuvieron un desarrollo temprano en comparación con las larvas no suplementadas por lo tanto una mejor captación de presas más grandes, esto va acorde a los conteos de rotíferos en el tanque, los cuales fueron menores en los tanques que recibieron la levadura.

Objetivo 1.

El objetivo 1 prueba la eficiencia del rotífero como vector para la levadura *D. hansenii*. Para saber si las levaduras estaban siendo absorbidas por el rotífero se empleó el marcaje con el reactivo fluorescente DTAF (5-(4,6 diclorotriazinil) aminofluoresceína).

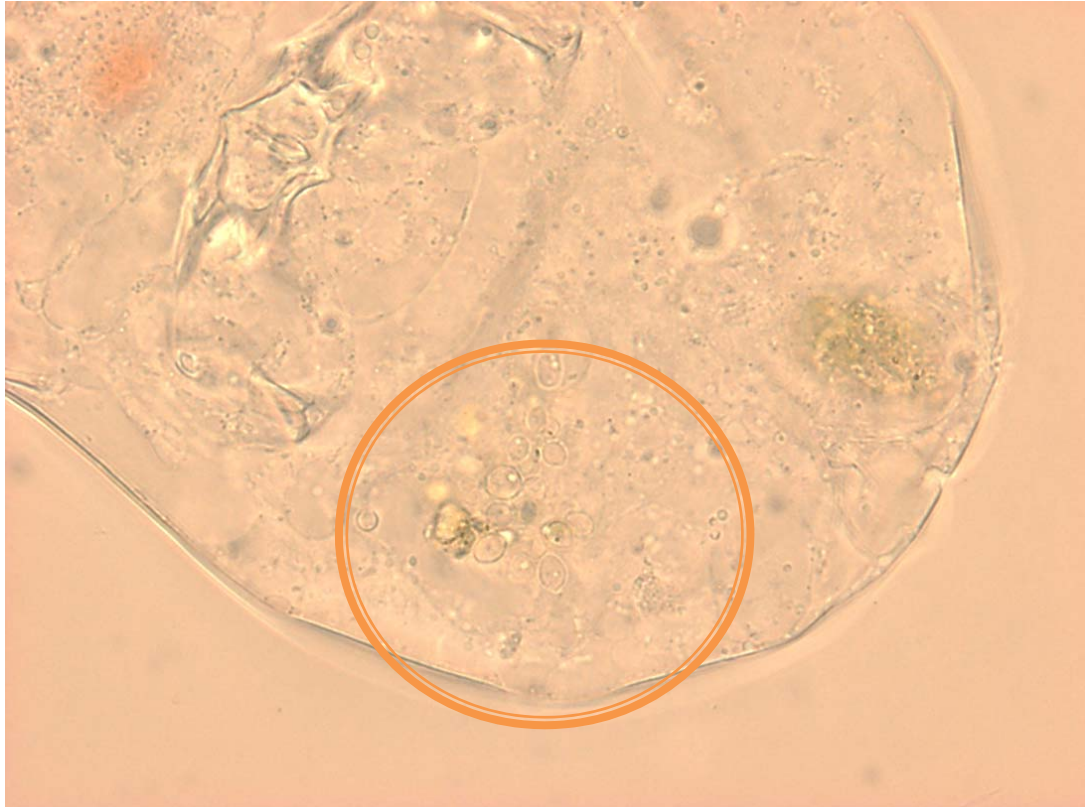


Figura 10. Microscopia de fluorescencia a 40X, donde se aprecian algunas levaduras marcadas dentro del rotífero (circulo).

Se detectó la presencia de las levaduras marcadas dentro del rotífero, aun cuando la imagen no es muy nítida en el campo claro (figura 10) , la microscopia de fluorescencia nos da una idea de la cantidad de levaduras que se pueden captar por parte del rotífero (figura 11).

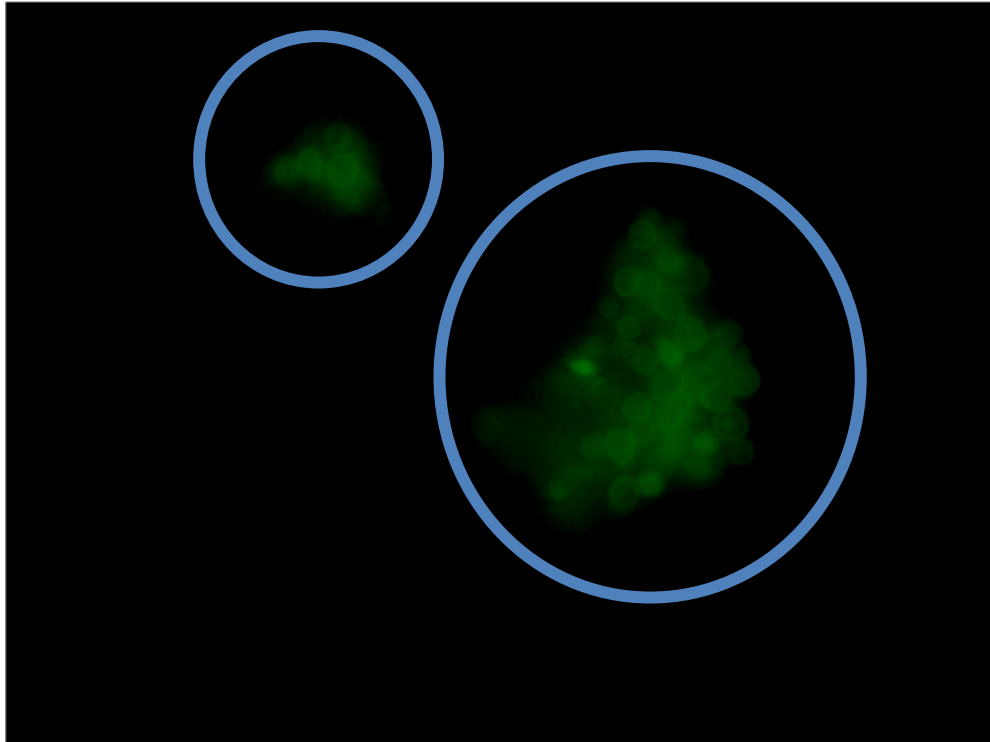


Figura 11. Microscopia de fluorescencia campo oscuro 40X, se observan las levaduras marcadas dentro del rotífero (círculo azul).

Adicional a esto se realizó la observación de los rotíferos en el microscopio electrónico para comprobar la presencia de levaduras dentro del rotífero, así como la ausencia en los rotíferos de control.

La microscopia electrónica de barrido reveló que los rotíferos mantienen a las levaduras vivas (figura 12), en las imágenes siguientes se pueden observar levaduras en gemación (figura 12, figura 14). Se empleó también el microscopio electrónico para corroborar la medida de las levaduras, la integridad (figura 16) y la longitud del rotífero (figura 15).

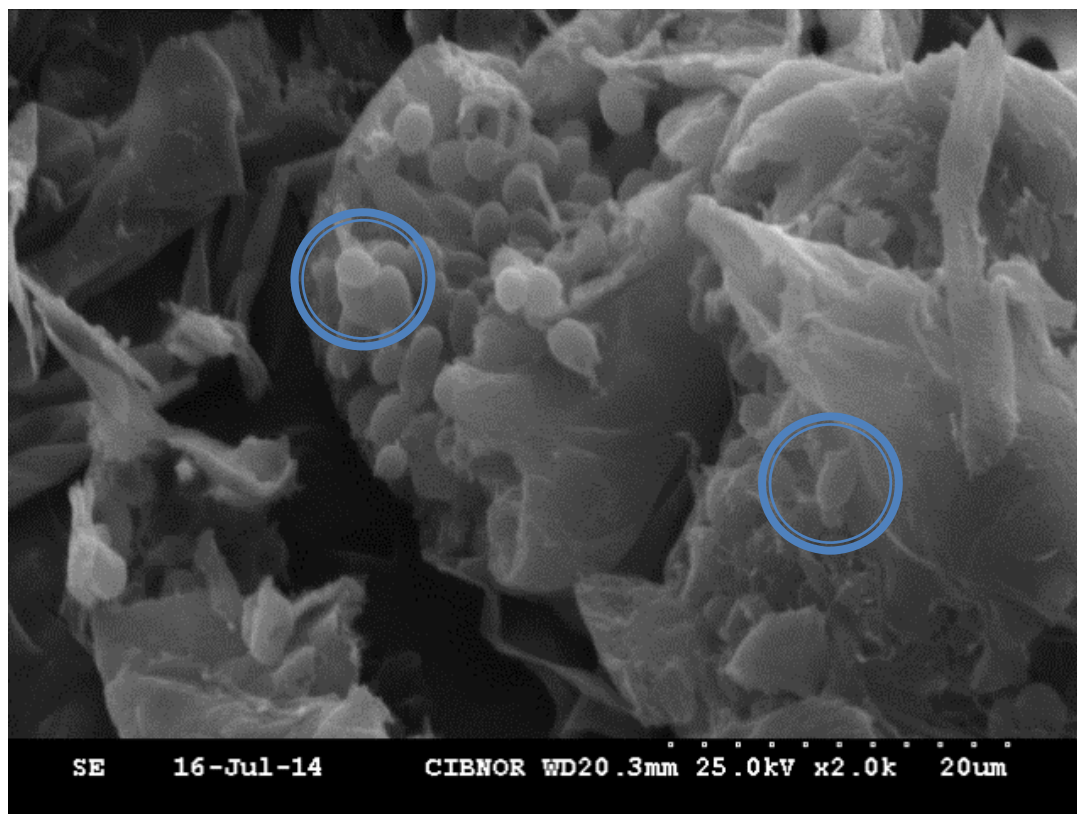


Figura 12. Microscopia electrónica de barrido a 2000X, interior del rotífero *B. rotundiformis* con levadura (tratamiento), la levadura en gemación (círculo).

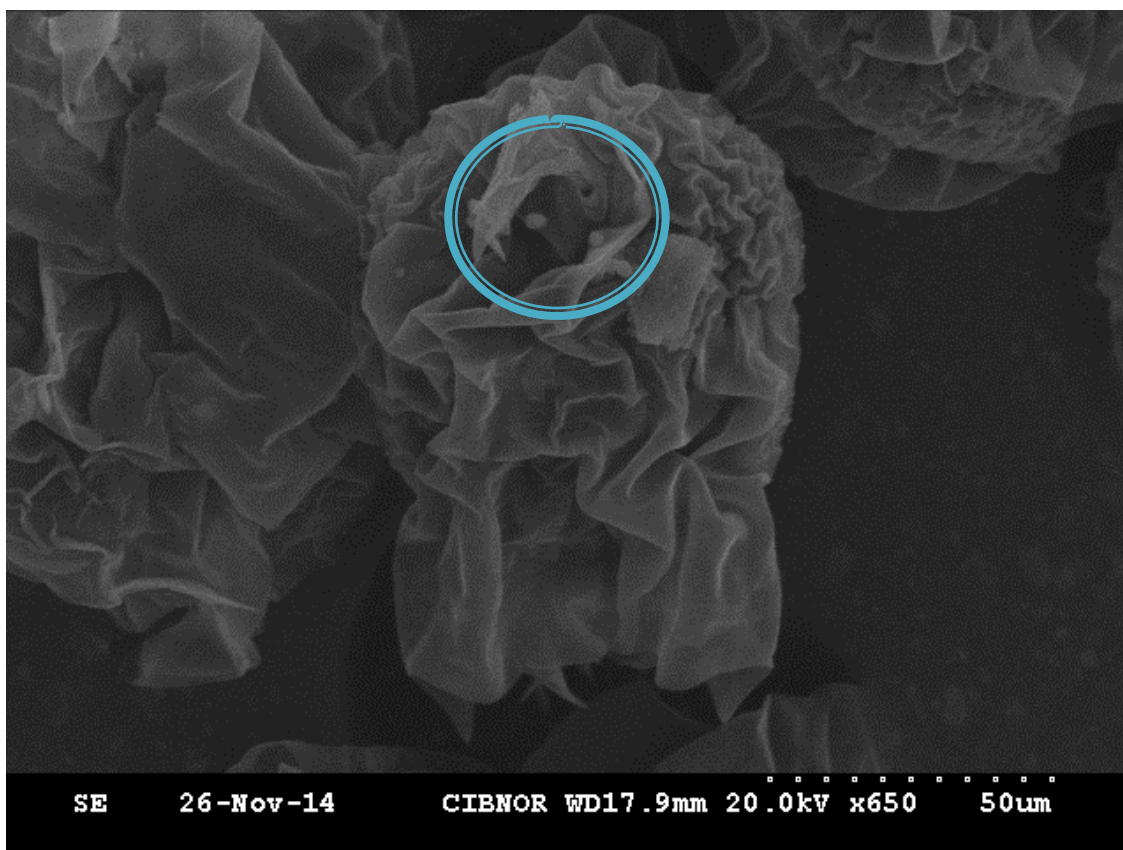


Figura 13. Microscopia electrónica de barrido 650X, en el círculo se distingue la levadura dentro del rotífero (Muestra directa del tratamiento).

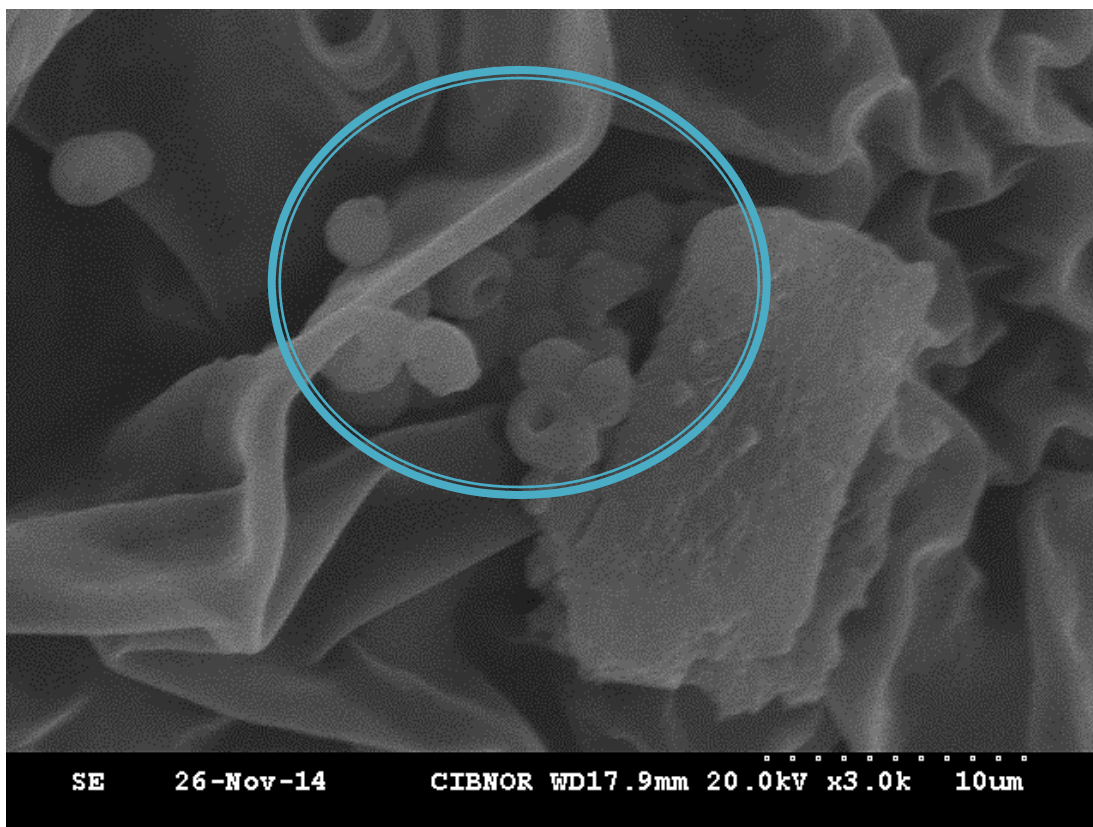


Figura 14. Microscopia electrónica de barrido 3000X, levadura dentro del rotífero empleado para la alimentación de las larvas.

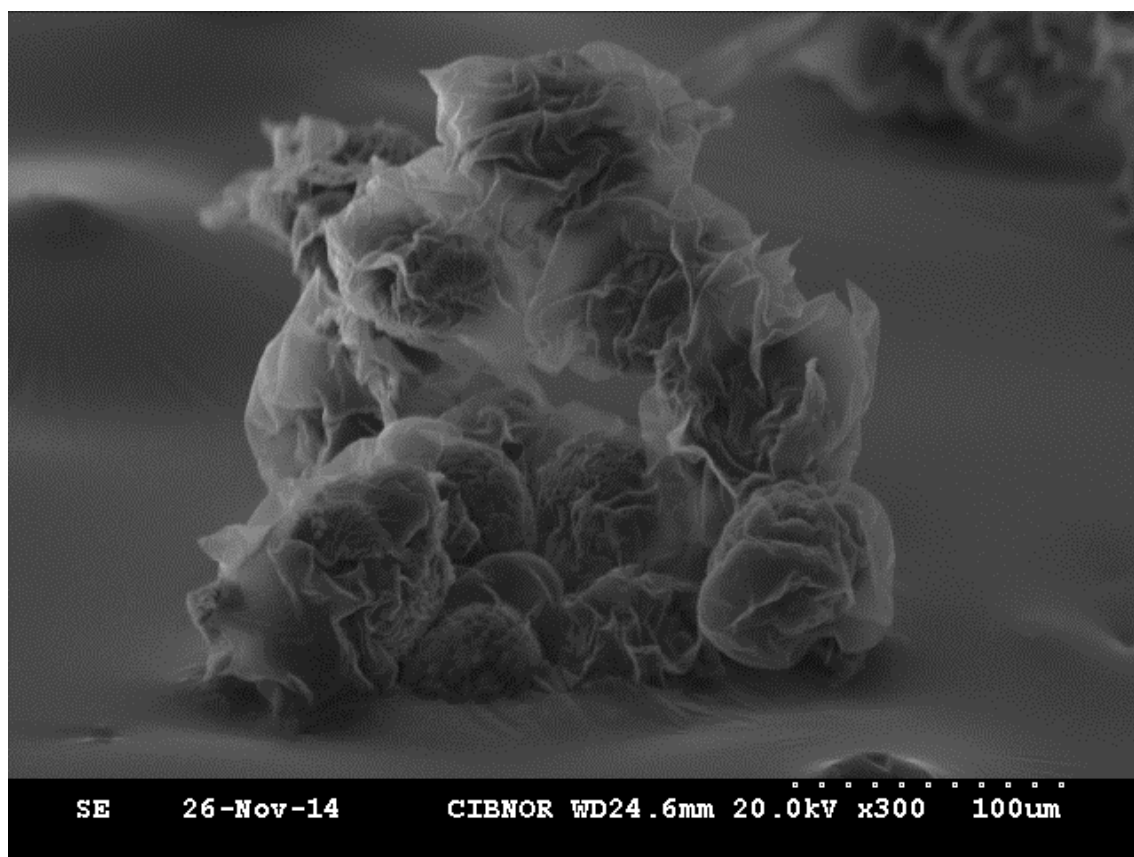


Figura 15. Microscopia electrónica de barrido 300X, rotífero control, no hay presencia de levaduras.

En la imagen anterior (figura 15) se exhiben los rotíferos que se tomaron como muestra para control, directamente del tanque, en orden de descartar cualquier tipo de contaminación ya sea de la levadura o de otros microorganismos. De igual manera se tomó una muestra de las levaduras empleadas para su análisis por microscopia electrónica de barrido.

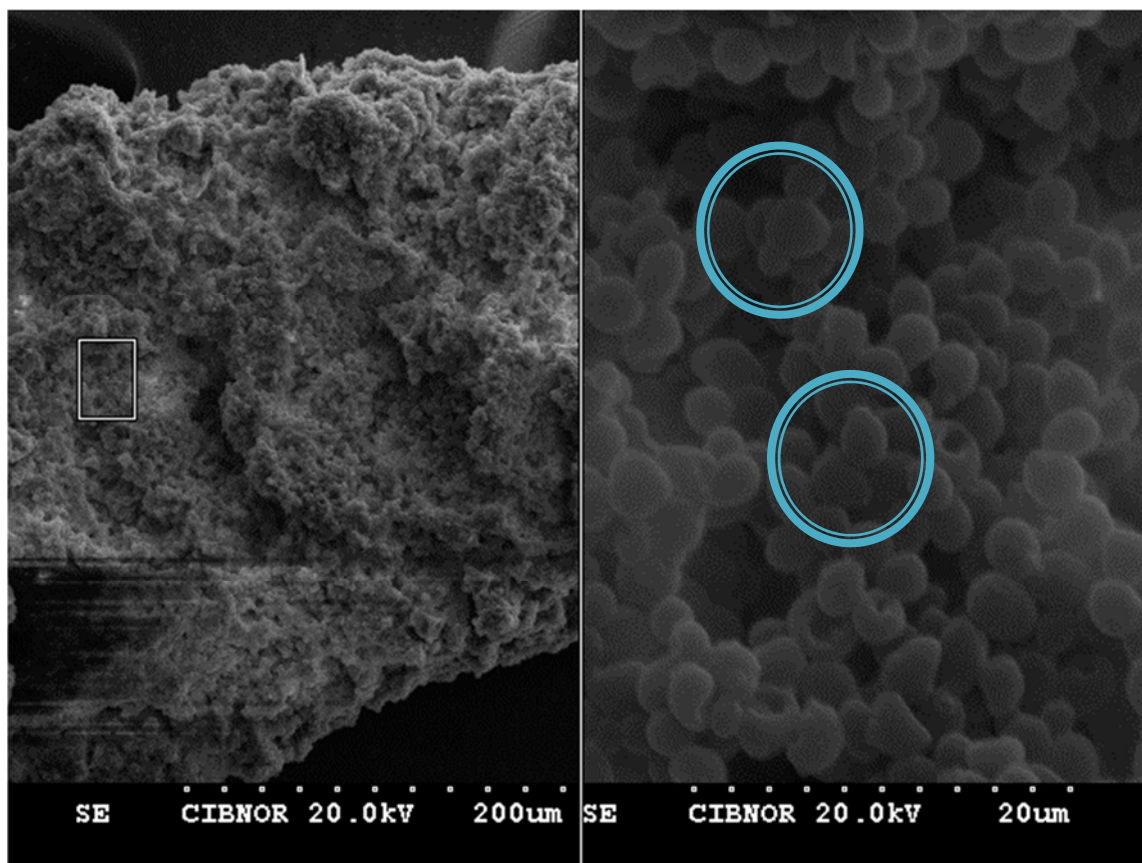


Figura 16. Microscopia electrónica de barrido diferentes aumentos, presencia de levaduras dentro del suplemento.

La fotografía (figura 16) muestra una parte ampliada de la muestra de levaduras empleado para suplementar a los rotíferos. En las levaduras que fueron suplementadas a los tanques de tratamiento no se detectaron otros microorganismos o fuentes de contaminación microbiana, aun en los aumentos más sensibles.

En el día 10 se muestrearon 5 larvas de cada tratamiento para obtener cortes histológicos en parafina, las larvas fueron colectadas aleatoriamente de todos los tanques y colocadas en solución de Davidson, el mismo procedimiento se repitió pero al día 15 que fue el término del experimento. Se obtuvieron imágenes de la región intestinal de las larvas al día 10 después de eclosión de ambos tratamientos.

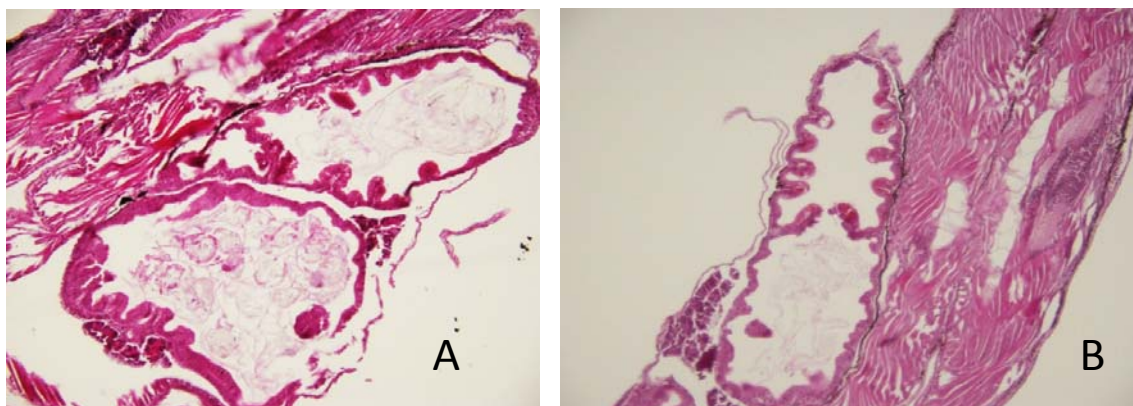


Figura 17. Micrografía del Corte histológico de la sección intestinal de larvas de *S. rivoliana* (A) alimentadas con levadura 10 y alimento vivo a los 10 DDE. Sección intestinal de larvas de *S. rivoliana* (B) alimentadas con alimento vivo a los 10 DDE. Tincion HE.

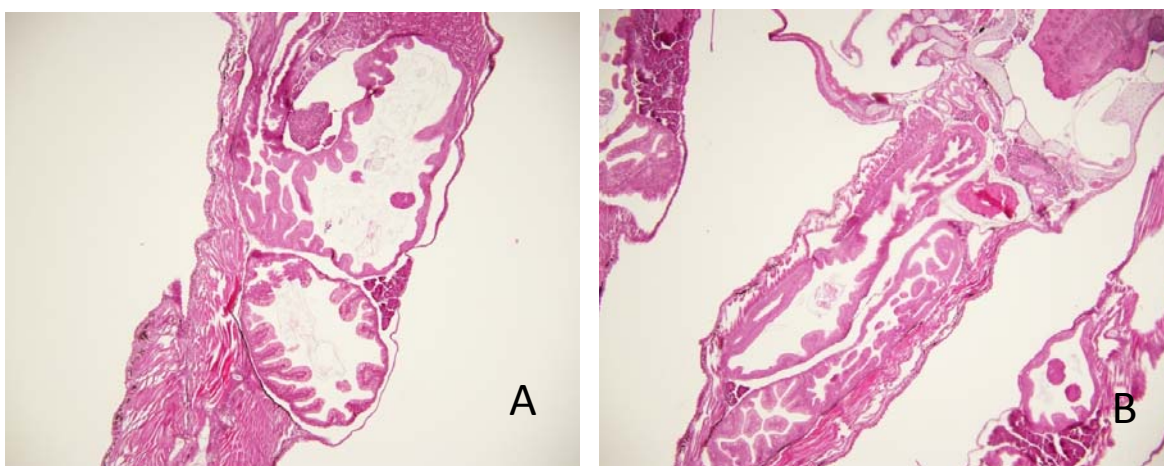


Figura 18. Micrografía del corte histológico en parafina y tinción HE de la región gastrointestinal de larvas de *S. rivoliana* al día 15 (B) alimentadas con alimento vivo sin levadura, y con alimento vivo con levadura (A).

La región gastrointestinal de las larvas control esta menos desarrollado que las larvas que se suplementaron con la levadura, los pliegues del intestino están más definidos y en proporción mayor que los de control, alimentados únicamente con rotífero enriquecido.

De los mismos cortes histológicos con parafina, se aplicó tinción Gram para encontrar levaduras dentro de las larvas, por lo que se empleó un microscopio óptico acoplado al procesador de imágenes Image – Pro Premier v9.1.

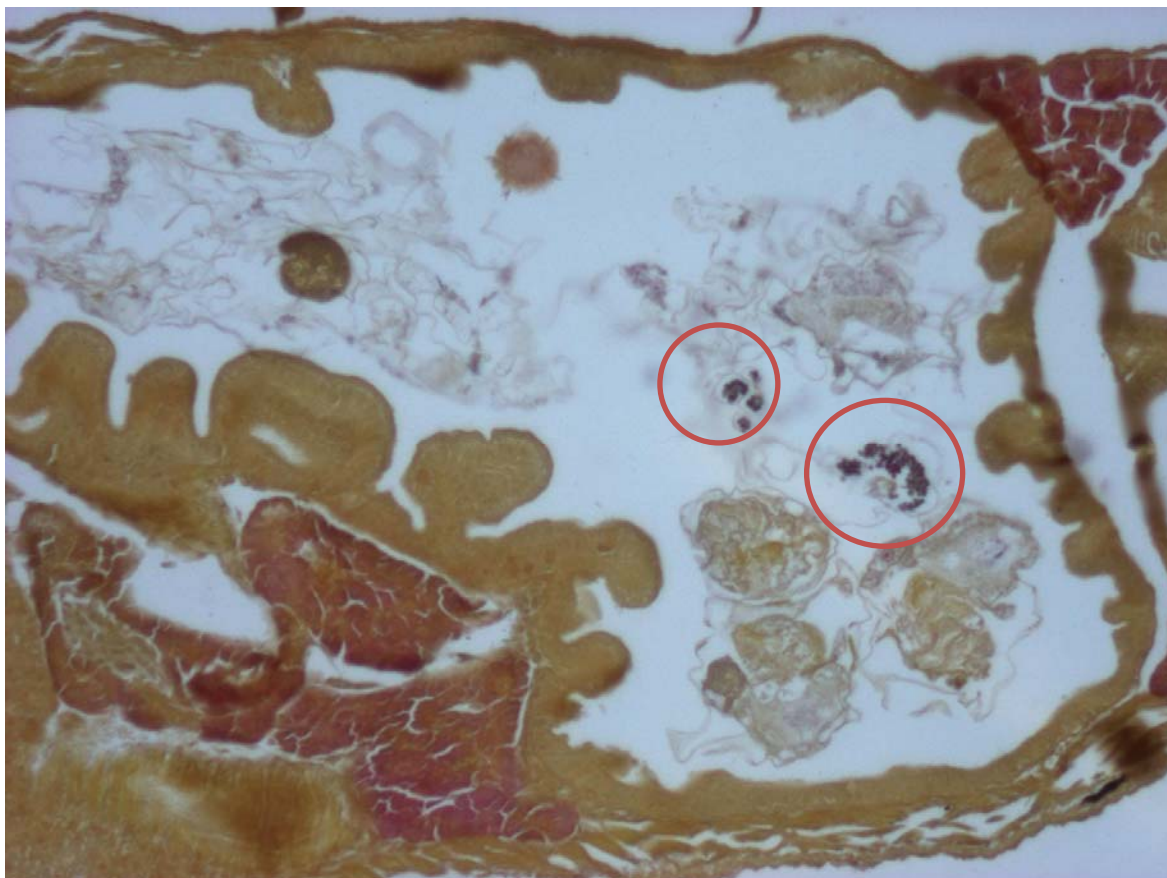


Figura 19. Tinción Gram aumento 10X, región gastrointestinal de larvas de *S. rivoliana* (tratamiento) al día 15 con presencia de levaduras (círculo).

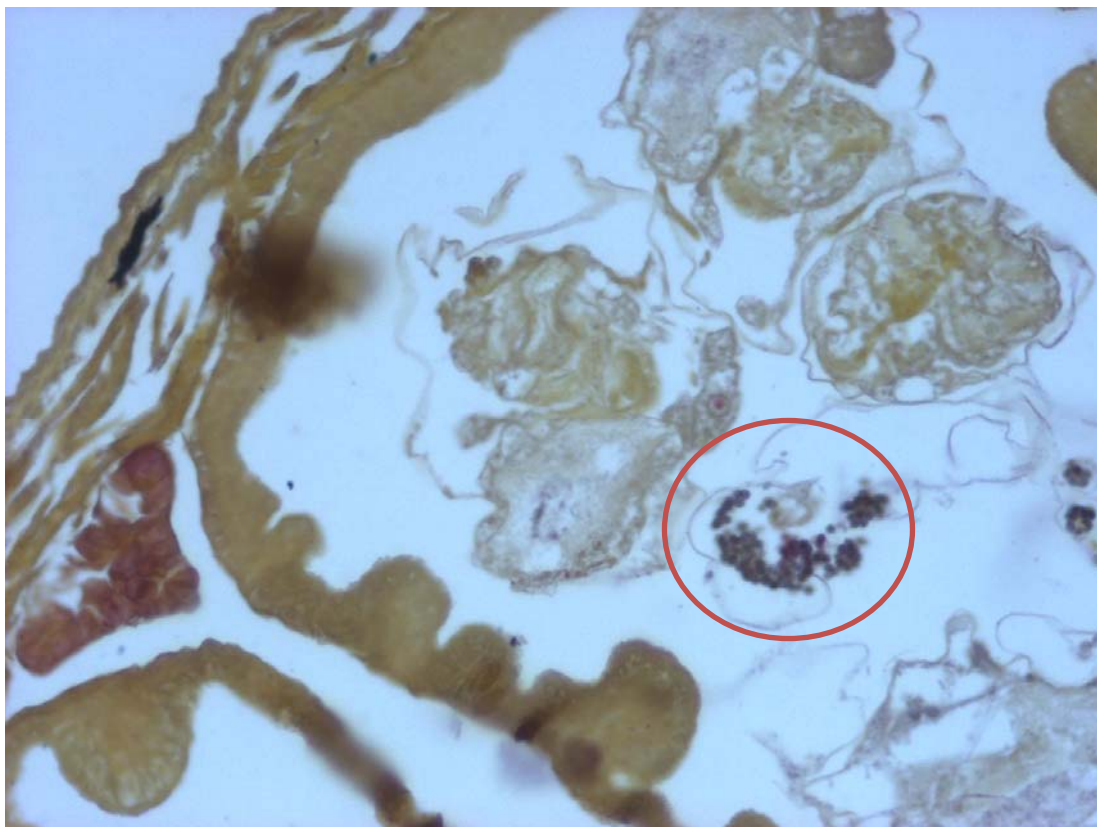


Figura 20. Tinción Gram aumento 20X, región gastrointestinal de larvas de *S. rivoliana* (tratamiento) al día 15, con presencia de levaduras (círculo rojo).

Se encontraron levaduras en la región intestinal de las larvas del día 15 en una de las muestras (figura 20, figura 21), se realizó un conteo de las levaduras por medio del software ImagePro Premier v9.1, y se encontraron en promedio por 3 replicas 123 levaduras. La tinción diferencial de Gram nos permite detectar levaduras dada su composición química de la pared celular, se puede apreciar la morfología en la figura 21, la cual coincide con *Debaryomyces hansenii*.

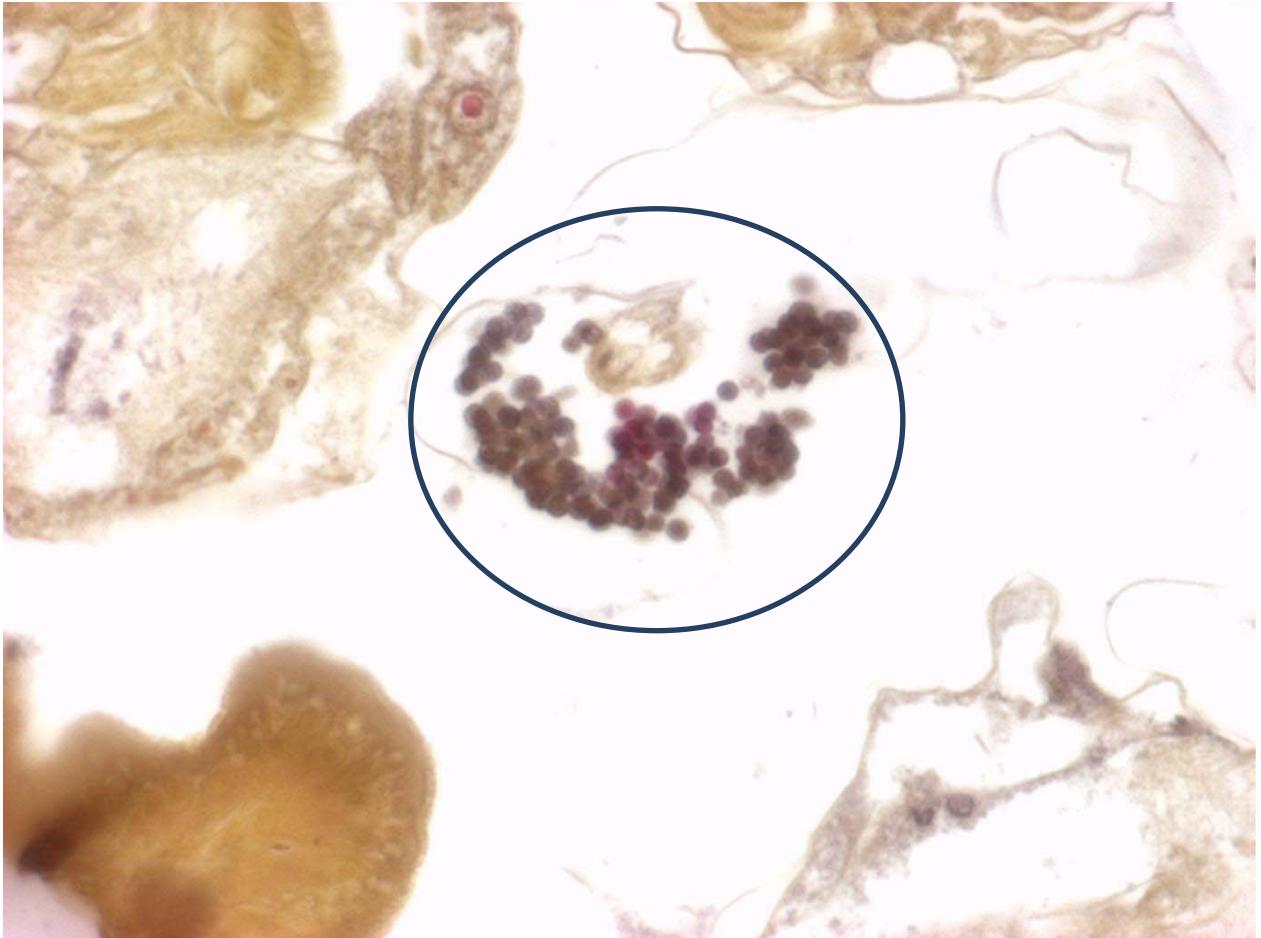


Figura 21. Tinción Gram aumento 40X, región gastrointestinal de larvas de *S. rivoliana* (tratamiento) al día 15

Objetivo 2.

Durante el bioensayo, se evaluó el crecimiento de larvas de cada uno de los tanques por muestreos aleatorios (n=5). En la siguiente tabla se encuentran las tallas en milímetros de cada larva muestreada, por tratamiento, por día.

Día	Tratamiento	Media	DE	Día	Tratamiento	Media	DE
E	CL	2.46	0.043428	8	CL	4.2174	0.101495
	SL	2.49	0.070711		SL	3.7792	0.05698
1	CL	2.5934	0.060161	9	CL	4.4074	0.049176
	SL	2.587	0.025278		SL	3.8792	0.101463
2	CL	2.6834	0.122674	10	CL	4.6332	0.05823
	SL	2.7408	0.052309		SL	4.1384	0.033276
3	CL	3.1568	0.027197	11	CL	4.7206	0.092633
	SL	3.1018	0.056848		SL	4.272	0.06904
4	CL	3.4122	0.071967	12	CL	4.8166	0.113311
	SL	3.4168	0.058896		SL	4.5238	0.165633
5	CL	3.6826	0.174483	13	CL	5.0714	0.041585
	SL	3.6818	0.085438		SL	4.5754	0.057379
6	CL	3.8372	0.16805	14	CL	5.1592	0.02456
	SL	3.7012	0.015849		SL	4.9558	0.092069
7	CL	4.0468	0.082615	15	CL	5.2822	0.017824
	SL	3.73	0.115994		SL	5.1494	0.032269

CL: con levadura; SL: sin levadura

Tabla III. Media de crecimiento por día, por tratamiento en **mm** (CL; con levadura, SL; sin levadura) y desviación estándar.

El estadístico de prueba *t* de Student (-0.909) establece que hay diferencias significativas entre los dos tratamientos en cuanto a la talla. Se realizó una prueba *F* solo para corroborar que las varianzas fueran obteniendo un valor de *P* de 0.37 lo que cae en la región de no rechazo.

El incremento en la talla es de 8.38% en total, sin embargo hubo días en los que el porcentaje de aumento de talla fue mayor a 9%.

En la siguiente grafica se puede apreciar el crecimiento del tratamiento SL contra el tratamiento CL.

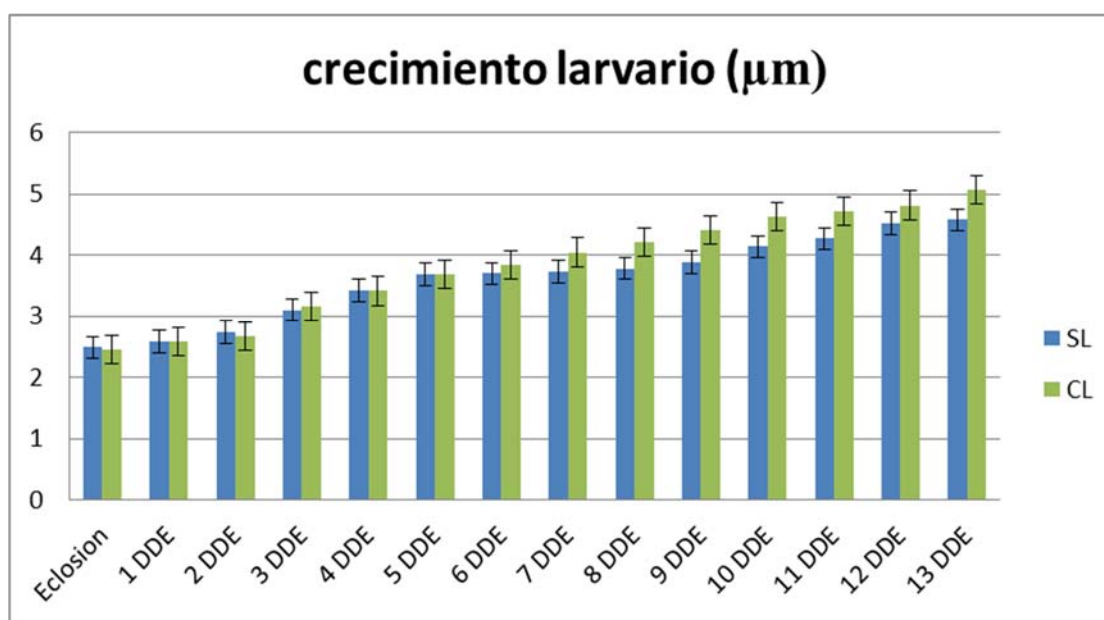


Figura 22. Eje X; longitud en milímetros. Eje Y; días después de eclosión (DDE).

Hay una diferencia significativa en los tratamientos al día 5 y 6 bajo 10 observaciones, después de dos días de iniciada la suplementación con levadura, el valor de P es de 0.00048, en la región de no rechazo, realizando 5 observaciones por tratamiento

El crecimiento de las larvas con la levadura fue más rápido, creciendo en promedio 8.38% a diferencia de las que no fueron suplementadas con la levadura y el punto de cambio inicia a partir del día 6 y es significativamente diferente según el estadístico *t* de Student, con valor de -4.43, en la región de no rechazo de diferencias significativas.

En cuanto a la supervivencia se estimaron 41,501 larvas, basados en la aproximación experimental que indica que en un mililitro hay un aproximado de

1275 huevos y que el porcentaje de eclosión fue de 93%, adicional a esto se contaron las larvas al final del experimento para encontrar el porcentaje de supervivencia.

	Tanque	Total larvas	% sup
CL	1	18	0.040336
	2	13	0.029132
	3	67	0.15014
	4	45	0.10084
SL	5	11	0.02465
	6	34	0.07619
	7	5	0.011204
	8	2	0.004482
INA	9	5	Al día 8

Tabla IV. Total de larvas al final del experimento y porcentaje de supervivencia, con levadura (CL) y sin levadura (SL).

Los porcentajes parecen mínimos, pero se debe toma en cuenta que el porcentaje más alto es resultado de la supervivencia de 67 individuos, es también de notar que la caída de la población fue drástica en los tanques de control que en los tanques suplementados (tabla IV).

La población de los tanques control se observó diezmada considerablemente después del inicio de la alimentación exógena, al igual en la población suplementada con levadura, consistente con los picos de mortalidad reportados, sin embargo la población en los tanques suplementados no cambio tan abruptamente, mientras que en los tanques control, la caída de la población fue

más notoria, debido a esto se optó por detenerlo en el día 15 con suficientes larvas de control para poder comparar (Figura 23).

Las larvas en el tanque de inanición llegaron al día 8 con 5 larvas, el día 9 ya no había larvas dentro del tanque, coincidente con reportes de experimentos de aprovechamiento de reservas.

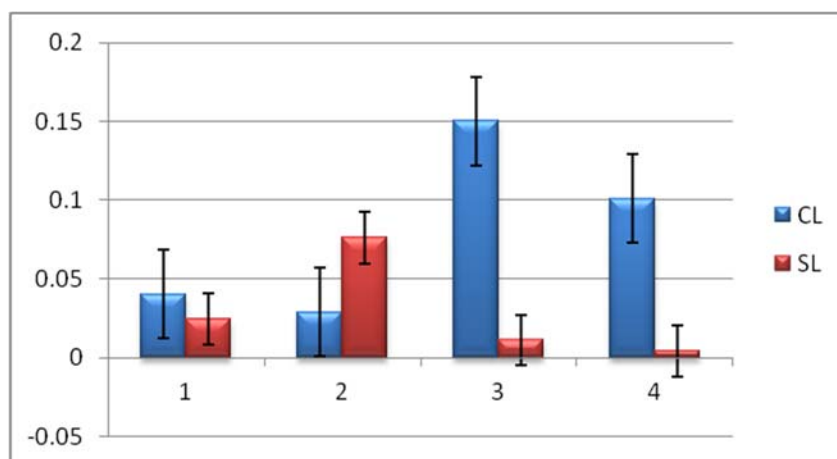


Figura 23. Porcentaje de supervivencia graficado. Las barras azules indican el tratamiento con levadura (CL), las barras rojas indican el tratamiento sin levadura (SL).

Se incluyen además medidas de las células de borde de cepillo, analizadas por medio de la prueba t de Student para este ensayo establece que hay diferencias significativas en la altura del borde de cepillo entre los tratamientos al realizar 10 réplicas por tratamiento.

sin levadura		con levadura	
SL1	1.722623	CL1	1.805364
SL2	1.827423	CL2	1.857348
SL3	1.852613	CL3	3.217084
SL4	1.827423	CL4	1.684565
SL5	1.507538	CL5	1.958115

SL6	1.640152		CL6	2.189094
SL7	2.067671		CL7	2.355279
SL8	2.002931		CL8	1.861585
SL9	1.577668		CL9	1.530211
SL10	2.344547		CL10	2.296177
SL	1.8370	media	CL	2.075482

CL: con levadura; SL: sin levadura.

Tabla V. Medidas de borde de cepillo en μm para ambos tratamientos (10 observaciones).

Podemos observar un incremento en la media de 12.95% para el borde de cepillo de las larvas que fueron suplementadas con la levadura, el estadístico t tuvo un valor de -1.6268, esto sugiere que hay una diferencia significativa entre ambos tratamientos.

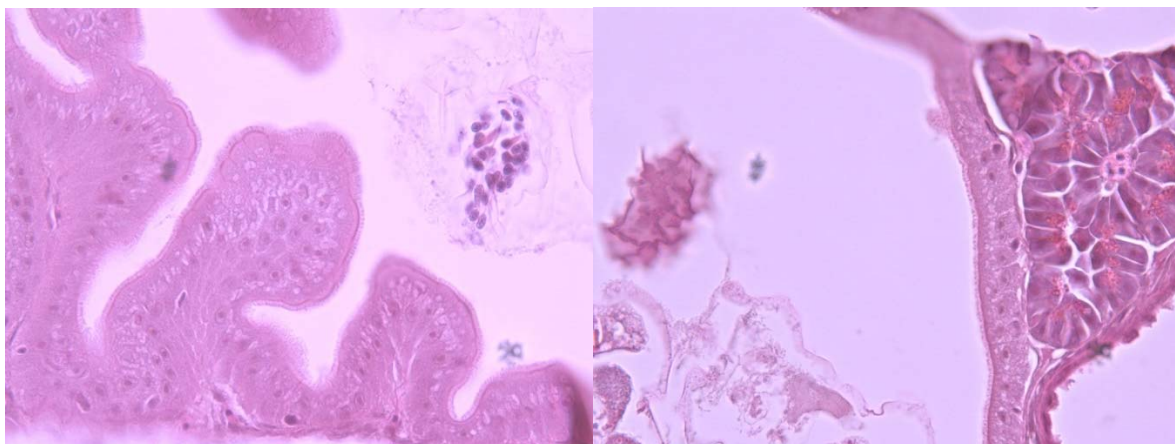


Figura 24. Izquierda: microfotografía del borde de cepillo de las larvas en tratamiento (CL); Derecha: borde de cepillo de las larvas sin levadura (SL).

El software nos indica un aumento en la longitud del borde de cepillo durante el tratamiento, realizamos 10 observaciones por cada microfotografía (10

microfotografías en total), para obtener las medias y poder compararlas, donde encontramos diferencias significativas.

DISCUSIÓN

El cultivo de *Seriola rivoliana* aunque ya de modo comercial (Ej. Kona Blue Farms), aún no cuenta con la suficiente información sobre los procesos biológicos que se llevan a cabo durante la producción, en nuestro país se conocen poco los requerimientos de esta especie.

El cultivo larvario es un cuello de botella para la actividad acuícola debido a las altas mortalidades que se dan durante los primeros días después de la eclosión y en el cambio de alimentación de endógeno a exógeno.

La alta mortalidad durante las primeras etapas del desarrollo es un obstáculo económico para el desarrollo del cultivo de peces en estanques o jaulas, o para liberar juveniles en aguas abiertas, para las poblaciones naturales la mortalidad en las primeras etapas es elevada. Por ejemplo, para *Seriola quinqueradiata* es menos de 1% para *Chrysophrys major* y *Oplegnathus fasciatus* es de 4 a 7%, para *Liza haematochila* y *Limanda yokohamae* es de 40 a 50% (Sifa, 1987). Grossi (2010) observó un pico marcado de mortalidad alrededor de los días 7 – 11 post eclosión, coincidiendo con la absorción del saco y el cambio a la alimentación exógena y una paulatina mortalidad a lo largo de todo el tratamiento. Benetti en 1997 indica dos picos de mortalidad, uno en los primeros días y otro concerniente a la etapa de cambio de alimentación, por canibalismo, el cual no se observó en nuestro experimento, sin embargo, en ensayos previos con *S. rivoliana* en días arriba del 15 después de eclosión, se pudo apreciar un canibalismo marcado, esto muy probablemente debido a la diferencia de tallas.

Durante el experimento se pudo observar agregación de larvas en las zonas del tanque donde se trasvasaba el alimento.

Para ambos tratamientos, se partió de un desove donde la eclosión fue a las 38 horas después de la puesta, a una temperatura de 24.5 ± 0.04 grados. Las condiciones que reporta Grossi (2012) es a 36 horas post fecundación a 23.1 ± 1.3

°C y Blacio (2002) señala un tiempo de 24.5 horas a 27.4°C. En *Seriola dumerili* la eclosión tiene lugar a las 30 horas a la misma temperatura 27.4°C (Blacio 2002); Papandroukalis *et al.* (2005), reportan una temperatura de 23 a 27°C y un tiempo de 35 horas; Masuma *et al.* (1990) a las 48 horas a 19.8°C. Por lo tanto, según la especie, existe una relación entre la eclosión con la temperatura, la cual, entre más fría esté el agua, se tardará más tiempo en eclosionar (el óptimo para *S. rivoliana* es entre 24 a 25°C).

El porcentaje de eclosión durante los diferentes ensayos se mantuvo por arriba del 90%, siendo similar a lo reportado por Grossi (2012) con un porcentaje de eclosión del 96.96% y 84.9% para dos replicas, con volúmenes de huevo de más de 100 mililitros, mejorando la calidad de los desoves con cada puesta desde la llegada de los organismos. La calidad de la puesta está determinada muchas veces por su alimentación, también podemos establecer la influencia de factores como las condiciones ambientales, la manipulación, posibles técnicas de inducción al desove, esto debido a que los factores van a variar dependiendo de la especie e influirán decisivamente en la maduración y en el desove de los reproductores (Alvarez – Lajonchère, 2006). Para el estudio se utilizó la fracción flotante, correspondiente a huevos de alta viabilidad ya que de acuerdo con Alvarez – Lajonchère, (2006) ocurrido el proceso de fecundación adecuadamente, los huevos viables serán los flotantes en un porcentaje muy alto (>90%). Esta selección se puede repetir en varias etapas del manejo de los huevos, incluso durante la propia incubación.

Objetivo 1.

Sobre la eficiencia del rotífero:

La especie *B. rotundiformis* ha sido evaluado como un filtrador no selectivo que puede absorber cualquier tipo de nutriente, por lo cual fue un antecedente importante y corroborado en este trabajo, y puede ser empleado como vector para introducir ácidos grasos, probióticos y otros factores que promueven el desarrollo del pez (Grossi, 2010). Muchos de los peces que empiezan su alimentación exógena seleccionan presas de tamaño pequeño, aun cuando las larvas mayores busquen presas de todos los tamaños. La preferencia de *B. rotundiformis* sobre otro rotífero se debe al tamaño de su fase adulta que se encuentra en un rango de las 180 micras.

Como podemos ver en la parte de los resultados, el rotífero *B. rotundiformis* encapsula una cantidad de levadura importante, misma que es llevada dentro del pez, (figuras 13, 14 y 15), por lo cual podemos determinar que es viable su uso en futuras investigaciones, sin embargo, una eficiencia excelente disminuiría la cantidad de rotíferos por mililitro en el tanque de manera drástica, cosa que no paso en este bioensayo, ya que las reducciones en la población de rotíferos (rotífero / ml) fueron de 1 a 3 rotíferos por mililitro por tanque en los primeros días (3 al 9 DDE).

La especie *S. rivoliana* tiene gran movilidad y al principio de su primera alimentación las larvas son solo visuales, (Blaxter, 1986) se pueden observar movimientos de seguimiento hacia la presa, las pueden ubicar y comer rápidamente. En trabajos anteriores se ha observado que al adicionar una mezcla de rotífero con nauplio de copépodo el estímulo es mayor, Buskey *et al* (1993) y reafirmado por Zavala *et al* (2012); estos autores observan que los patrones locomotores de las presas afectan la respuesta del pez, ya que el rotífero por sí solo no parece afectar significativamente la respuesta de la larva, mientras que los movimientos zigzagueantes del copépodo, confieren una respuesta depredadora

favorable (Delbare, 1996), que comparado con otras especies de peces como los lutjánidos que no los perciben como presa (Minton, Hawke, Tatum, 1983).

La captación de la levadura por el pez utilizando al rotífero como vector, ha sido satisfactoria, ya que se ha demostrado tanto por microscopía de fluorescencia como la electrónica, la presencia de levaduras dentro de rotífero y en el intestino del pez. Aun cuando las levaduras hayan sido observadas dentro del pez, no significa que estén colonizando su intestino, dado que las células de borde de cepillo son muy jóvenes y el intestino aún se encuentra en pleno desarrollo (establecimiento de la mucosa, crecimiento del borde de cepillo, etc), por lo que es necesario que en futuros experimentos se verifiquen estas suposiciones por medio de observaciones más frecuentes a lo largo del desarrollo ontogénico de la larva.

La incorporación de grandes cantidades de levadura (mas del 50% de los componentes de la dieta) se ha utilizado en peces como fuente alterna de la harina de pescado, sin embargo, no se observaron efectos significativos sobre el crecimiento (Métailler and Huelvan, 1993; Oliva-Teles and Gonçalves, 2001). Las levaduras por si mismas no tienen un valor nutricional alto debido a su falta de ácidos grasos altamente insaturados (Walford, Lam, 1993); por otro lado, los rotíferos alimentados únicamente con levadura no pueden crecer, por lo tanto los huevos se vuelven no viables (Gopakumar, 2004), es por ello que los rotíferos deben mantenerse alimentados hasta que se les vaya a emplear como vector para la levadura. Alternar la dosis de levadura con el enriquecedor aumenta el perfil nutricional del rotífero, lo hace móvil, por lo tanto, el movimiento es el óptimo para su reconocimiento por la larva.

El diámetro de la levadura ($>3 \mu\text{m}$) es mucho mayor que el diámetro de las células del epitelio (1.05 micras), por lo que parece no haber suficiente espacio para que las levaduras se adhieran dentro de la pared intestinal o en el borde de cepillo en desarrollo (1.2 a $1.8 \mu\text{m}$).

Gracias a la microscopía electrónica y a la tinción Gram en las muestras de histología pudimos observar las levaduras dentro del rotífero, que además de ser absorbidas por el rotífero éstas se encontraban en gemación, por lo que podemos decir que las levaduras llegan vivas al pez, que el rotífero solo las acumula y que la producción de poliaminas puede ser tanto dentro del rotífero como dentro del pez.

Se sabe que las levaduras se adhieren a la mucosa intestinal dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentran y para su adhesión intervienen interacciones hidrofóbicas (Andlid *et al.*, 1998); una vez establecidas las levaduras, la mucosa representa una rica fuente de energía y nutrientes para su proliferación (Andlid *et al.*, 1998). Se sabe que durante la ontogenia de la larva, suceden numerosos procesos y cambios morfofuncionales, por lo que mientras que el intestino no esté diferenciado y funcionalmente establecido o maduro, la secreción de la mucosa será limitada y por ende, el establecimiento de microorganismos será menos probable.

Estas observaciones se han propuesto debido a que cuando un microorganismo pretende colonizar el epitelio intestinal, debe reconocer varios carbohidratos conjugados con proteínas o lípidos que le sirven como receptores específicos para las adhesinas de éstos (Andlid, *et al.*, 1998).

La acción probiótica de las levaduras es la de liberar moléculas de interés para el hospedero, tales como las poliaminas, las cuales inducen la maduración intestinal, además de favorecer la respuesta inmune de la larva, lo que se traduce en un rápido crecimiento y mejor estado de salud.

Algunos autores opinan que no es necesaria la fijación del probiótico para que ejerza beneficios para el hospedero; a pesar de que el tránsito por el intestino sea relativamente rápido, es suficiente para que libere moléculas que de alguna forma benefician al hospedero (Gatesoupe, 2007).

Durand - Chaucheyras *et al.* (1998) demostró que *S. cerevisiae* no coloniza el rumen de cordero, donde la levadura estimula la actividad de algunos microbios. Por otro lado, los beneficios de la administración de levaduras como probióticos en la trucha arcoíris fueron notados a los cinco meses, pero existió una pobre colonización (Aubin *et al.*, 2005; Gatesoupe *et al.*, 2005).

Sin embargo al no estar adheridas se cree que las poliaminas son liberadas cuando las levaduras son separadas del rotífero por la digestión de la larva, se ha demostrado que en cultivo celular libre produce tanto putrescina y espermina como espermidina (Tovar *et al.*, 2002) y hay evidencia que aun dentro del rotífero, la levadura se sigue reproduciendo (figura 6).

Es bien sabido de la deficiencia nutricia que presentan los rotíferos para cubrir las necesidades de los organismos marinos cultivables, por lo que su valor nutricional depende de las condiciones y de la presencia de vitaminas, minerales, lípidos etc., encontradas en su medio de cultivo.

Existen escasos trabajos en la literatura donde se reporte la incorporación de levaduras vivas por medio de los rotíferos, cuando inicia la alimentación exógena de larvas de peces. En contraparte, existen numerosos reportes sobre el uso de levadura de pan (*S. cerevisiae*) para aumentar la población de rotíferos usados para los cultivos larvarios de distintas especies o como vectores de otros compuestos que pudieran incrementar el valor nutricional del rotífero como las vitaminas o minerales; sin embargo, no con el propósito que tiene el presente trabajo.

Ya previamente se habían hecho estudios para aumentar la aportación de Selenio, en larvas del bacalao (*Gadus morhua*) a través del enriquecimiento de levaduras y usando al rotífero (*Brachiomus plicatilis*) como vector (Penglase *et al.*, 2010).

Pese las altas mortalidades obtenidas en los cultivos larvarios del jurel, los resultados de este trabajo contribuirán para el mejoramiento de la tecnología del

cultivo de larvas de esta especie de interés comercial, teniendo la alternativa del uso de rotíferos enriquecidos con levaduras, bacterias u otros elementos que mejoren los cultivos larvarios.

Objetivo 2.-

Sobre el efecto de la administración temprana de levaduras productoras de poliaminas en la supervivencia y crecimiento:

Las levaduras pueden estimular la respuesta inmune en los peces, a través de los β -glucanos, así como de algunos otros componentes solubles de la levadura. Entre otros beneficios del empleo de levaduras está la mejora en el crecimiento, ya que acelera la maduración digestiva.

Los efectos benéficos de las levaduras parecen determinantes en el desarrollo de los animales, ya que afectan al crecimiento, supervivencia y conformación (Tovar – Ramírez et al., 2004). Se observó en nuestro experimento que el crecimiento de las larvas alimentadas con la levadura fue estadísticamente significativo para aseverar que alcanzaron una talla mayor.

Se han realizado estudios acerca de la administración de levaduras productoras de poliaminas en estadios post larvarios de peces como *Mycteroperca rosacea* (Reyes – Becerril et al., 2008 y 2011) con un incremento de supervivencia de los peces y una mejor inmunoestimulación. En etapas larvarias se cuenta con las experiencias de *Dicentrarchus labrax* (Tovar et al., 2002 y 2010) y la cabrilla arenosa *P. maculatofasciatus* (Guzmán-Villanueva, 2008), mediante los cuales se puso de manifiesto las ventajas del uso de levaduras en el rendimiento en cuanto a ganancia en peso, inmunoestimulación, maduración digestiva y calidad larvaria en cultivos experimentales.

S. rivoliana es una especie importante en Hawaii y Japón, hay estudios en *Seriola* como el de Moran (2007) con *Seriola lalandi* y Grossi (2010) con *Seriola rivoliana* que investigan sobre el desarrollo en la etapa larvaria, mas no existen estudios de la administración de levadura y sus efectos en el desarrollo, aun así, sirvieron como referencia para las observaciones y parte de la metodología.

Al analizar la talla de las larvas pudimos observar un aumento significativo en la longitud de las larvas suplementadas con levadura a partir del segundo día de alimentación, esto concuerda con lo encontrado por Tovar *et al.* (2004) quienes observaron una maduración mayor que en el grupo control, esto debido al aporte de poliaminas, las cuales influyen directamente por un mecanismo descrito por Dufour *et al.* (1988) donde las moléculas de espermidina y espermina entran al enterocito induciendo una cascada hormonal que afecta positivamente a los órganos como el páncreas y el hígado (Peulen *et al.*, 2000).

En el experimento de Tovar *et al.* (2004), atribuyen la influencia de las poliaminas sobre la maduración pancreática por la estimulación de la expresión de los transcritos de tripsina y lipasa, así como a una disminución de la transcripción de la amilasa. De acuerdo con Buts *et al.* (1993), las poliaminas inician y controlan la expresión de patrones “adultos” de funciones de las células intestinales actuando directamente en la expresión génica a un nivel transcripcional y postranscripcional.

Aun cuando putrescina, espermina y espermidina estén consideradas como factores de crecimiento, las poliaminas espermina y espermidina son las que tienen una influencia más específica en los mecanismos de maduración, por el contrario, la putrescina se convierte en metabolitos no poliamínicos (Bardócz *et al.*, 1993). No se observó una mortalidad mayor en el grupo suplementado, los niveles de levaduras adicionados a la dieta se mantuvieron siempre en el 1.1% de acuerdo con Reyes – Becerril y Tovar - Ramírez, ya que un exceso de levadura podría afectar el crecimiento y la supervivencia debido a los altos niveles de putrescina y estos efectos se han registrado en gallinas (Smith, 1990), se ha observado que espermina es aún más tóxica que putrescina (Sousadias, Smith, 1995), pero en nuestro ensayo no se observaron efectos adversos o un desempeño diferente de las larvas suplementadas.

Lo anterior se traduce en un mejor crecimiento, llegando a madurar anticipadamente, lo cual es soportado por el rol de las poliaminas en la

regeneración de tejidos y estimulación del crecimiento en general, es de notar que los organismos productores de poliaminas entran en coacción con los mecanismos de producción de poliaminas en el organismo, los cuales parecen insuficientes (Peulen *et al.*, 2002).

Como ha sido observado en otros trabajos, *D. hansenii* (cepa CBS8339) estimula el crecimiento cuando es administrada en el alimento para diversas especies de interés en acuicultura. Se observó en juveniles de cabrilla arenera una mejoría en el crecimiento después de 4 semanas de alimentación con la levadura, esto concuerda con lo obtenido por Tovar *et al.*, (2010) con lubina europea *D. labrax*, alimentadas al 1.1%, donde el crecimiento fue casi el doble del grupo control. Las larvas de *S. rivoliana* tuvieron un aumento de 8.38% en el tamaño con respecto a las larvas del grupo control. Se ha propuesto que las mejoras en el crecimiento son debidas muy probablemente a la secreción endoluminal de poliaminas (Tovar-Ramírez *et al.*, 2004).

En este trabajo, el crecimiento asociado a la levadura fue claramente identificada en las tallas de las larvas, ya que a simple vista era evidente que el grupo de larvas suplementadas tenía una mejor condición en cuanto a movimiento y respuesta ante el alimento vivo. Se observó también una diferencia en la supervivencia de las larvas, significativamente mayor en el grupo suplementado; Cahu y Zambonino – Infante (1995) indican que hay una correlación entre la supervivencia y una mayor actividad en las células de borde de cepillo.

Objetivo 3.-

Sobre el efecto de la incorporación de levaduras vivas sobre el desarrollo del tracto digestivo de *S. rivoliana* durante el periodo larvario.

Observamos un efecto importante al medir diferentes zonas del intestino del pez encontramos diferencias significativas en la altura del borde de cepillo, que se incrementa significativamente en el tratamiento con levadura. El desarrollo morfoanatómico, así como la maduración del intestino se caracteriza por un decremento en la actividad de la enzima citosólica leucina alanina peptidasa el cual se encuentra acompañado por un incremento en la actividad de las enzimas del borde de cepillo de los enterocitos como la aminopeptidasa, la maltasa o la fosfatasa alcalina por ejemplo. Este proceso de maduración es conocido por ser nutriente – sensible y consecuentemente, la disparidad entre la composición de la dieta y la capacidad digestiva de la larva pueden retrasar o prevenir la secuencia genética del desarrollo intestinal (Zambonino – Infante y Cahu, 2001). En este sentido, se pueden considerar como índices nutricionales para evaluar el cambio de una etapa primaria a una etapa adulta en aspectos digestivos.

Los efectos de la incorporación de probióticos, se ve reflejada primariamente en el tracto digestivo, puesto que la interacción entre la microflora adicionada, reacciona inmediatamente con las membranas con borde de cepillo de los enterocitos, de donde parten gran parte de los procesos que permiten una estimulación positiva en el hospedero. La administración oral de las levaduras, mejoran tanto la secreción de la IgA del lumen intestinal, así como su expresión en el borde de cepillo; neutralizan toxinas bacterianas; ejerce un papel antimicrobiano al competir por sitios de fijación al borde de cepillo; liberación de compuestos entre ellos enzimas (proteasas, fosfatasas), vitaminas, minerales, ácidos grasos de cadena corta; restablece la capacidad de permeabilidad intestinal (Zanello et al., 2009).

Existen reportes que indican que un animal bien alimentado, desarrolla una morfología intestinal diferente a uno sin alimentar. Estas diferencias van desde el

tamaño del borde de cepillo, el grosor del glicocálix, presencia de gotas lipídicas en los enterocitos (inclusiones no rodeadas por membranas). Fisiológicamente hablando, en peces bien alimentados, se incrementa la capacidad digestiva, aumenta actividad de las enzimas del borde de cepillo, factores inmunológicos, proliferación de transportadores de péptidos, transportadores de sodio/potasio (Hakim et al., 2009).

La incorporación de poliaminas en peces ha sido reportada por Pères et al., (1997) donde se agregó espermina purificada en dietas de juveniles, pero el efecto de las levaduras productoras de poliaminas destaca por la colonización y la liberación prolongada de estos compuestos, sin necesidad de agregarlos de nuevo ya que se producen y liberan *in situ* en el intestino (Tovar et al., 2004). Bardócz (1993) afirma que los requerimientos de poliaminas en los organismos son mayores en las fases de crecimiento intensivo, por lo cual es necesario asegurar la cantidad de poliaminas que se hacen llegar a las larvas.

CONCLUSIONES

1. La especie *S. rivoliana* es un buen candidato para la acuicultura en México y podemos facilitar las condiciones para que así suceda, incluyendo la suplementación con levaduras, las cuales han demostrado una influencia positiva sobre el desarrollo larvario, sin embargo, como toda especie marina, representa un reto tecnológico y biológico.
2. Al observar las microfotografías y las laminillas de histología concluimos que los rotíferos llevan viva a la levadura dentro del intestino de la larva, observamos que en el intestino las levaduras son liberadas cuando la larva digiere al rotífero, por lo cual este es eficaz como vector.
3. El rotífero por sí solo es una presa no muy recomendable, si es efectivo para poder llevar la levadura al tracto gastrointestinal de la larva, sin embargo sus movimientos (las larvas en las primeras etapas son visuales) y su perfil alimenticio le confieren cierta desventaja, una dieta alternada de rotífero con nauplios de copépodo puede favorecer la capacidad natural del pez de responder al estímulo visual de la presa.
4. Podemos observar que hay diferencias significativas en el crecimiento de las larvas suplementadas con levadura en comparación con el tratamiento control gracias al estadístico t, por lo cual concluimos que la levadura si afecta al crecimiento de la larva al ser administrada en las condiciones de cultivo.
5. El conteo final de las larvas revela un incremento de 75% en la supervivencia comparadas con el grupo de control, por lo cual concluimos que la levadura suplementada si influye en la supervivencia.

6. Las microfotografías y los paquetes informáticos nos indican una diferencia significativa entre los tratamientos, observando un aumento en la longitud del área de borde de cepillo, por ello las larvas se mostraron más grandes y lograron sobrevivir más ejemplares, ya que un mejor desarrollo del tracto digestivo influye en la supervivencia como en la talla gracias a la mayor captación de alimento.

7. Gracias a varios ensayos anteriores (resultados no mostrados) pudimos observar, que el cultivo en agua verde favorece la supervivencia de las larvas, aumenta ligeramente la cantidad de presas además de que los rotíferos acumulan parte del alga, que sirve como vehículo para la captación por el pez.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez – Lajonchère, L. 2006. Nutrición de Reproductores Marinos. Simposium Internacional de Nutrición. Pp 1 - 19.
- Andlid, T. Vázquez - Juárez R. Gustafsson, L. 1995. Yeast colonizing the intestine of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*). Microbiology and Ecology 30, 321 - 324.
- Andlid, T. Vázquez - Juárez, R. Gustafsson, L. 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 7, 115 - 126.
- Anuario CONAPESCA 2013. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca de México.
- Arcand, S. L., Mes – Masson, A. M., Provencher, D. Hudson, T. J. Tonin, P. N. 2004. Gene expression Microarray analysis and genomes databases facilitate the characterization of a chromosome 22 derived homogenously staining region. Molecular Carcinology, 41 (1): 17 -38.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.-J., Labbé, L., Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Research 36, 758–767.
- Balcazar, J. L. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, I. Cunningham, D. Vendrell, D. Muzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinarian Microbiology. 114, 173–186
- Balcazar, J. L. DeCamp, O. Vendrell, D. De Blas, I. Zarzuela – Ruiz, I. 2006. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. Microbial Ecology in Health and Disease. Universidad de Zaragoza. España. 18: 65 – 70.

- Bardócz, S. The role of dietary polyamines. 1993. European Journal of Clinical nutrition. 47, pp. 683 – 690.
- Benetti, D. D. 1997. Spawning and larval husbandry of flounder (*Paralichthys woolmani*) and Pacific yellowtail (*Seriola mazatlanana*), new candidate species for aquaculture. Aquaculture 155, 307-318.
- Blacio, E. 2002. CENAIM. Boletín informativo nº71.
- Blacio, E., Darquea, J. Rodríguez, S. 2001. Avances en el cultivo de Huayaípe, *Seriola rivoliana* (Valenciennes 1833) en las instalaciones del CENAIM. El Mundo Acuícola Vol 9 (1), 23-24.
- Blaxter J. H. S. (1986) Development of sense organs and behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. Transactions of the American Fisheries Society 115, 98–114.
- Blaxter, J. H. S. Hunter, J. R. 1982. The biology of clupeoid fish. Advances in Marine Biology. 28, 211 – 240.
- Breuer, U. Hams, H. 2006. *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. Yeast. Chichester, Inglaterra. 23 (6): 415 – 417.
- Buskey, E. J. Coulter C. Strom S. 1993. Locomotory patterns of microzooplankton: potential effects on food selectivity of larval fish. Bulletin of Marine Science 53, 29–43.
- Buts, J.P. De Keyser, N. Kolanowsky, J. Sokal, E. Van Hoof, F. 1993. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. Digestive Diseases and Sciences, 38 (6), 1091-1098.
- Cahu, C. L. Zambonino – Infante, J. L. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. Fish Physiology Biochemistry. 14, pp. 431 – 437.

Cerdà, J. Douglas, S. Reith, M. 2010. Genomic resources for flatfish research and their applications. *Journal of fish biology*. The Fisheries Society of the British Isles. Volume 77. Numero 5. Pp. 1045 – 1070.

Chabrillón, M. Rico, R. M. Balebona, M.C. Moriñigo, M. A. 2005. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of micro- organisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. piscicida . *Journal of Fish Diseases*. 28:229 - 37.

Chele, F. Vera – Vera, V. Blacio – Game. E. 2009. Cultivo de Huayaipa (*Seriola rivoliana*) en piscinas provistas de geomembranas. Escuela Superior Politecnica del Litoral. Guayaquil. Pp 3 – 4.

Çiftci, Y. (2003). Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics, 155(2002), 145–155.

Civera – Cerecedo, R. 2004, Álvarez - Gonzales, C. A. Moyano – López, F. J. Nutrición y alimentación de peces marinos. 8 – 11 p.

Coutteau, P. 1996. Determination of fatty acid requirements during weaning and first outgrowing of marine fish using a standard diet. *Proceedings of a workshop of fish and mollusk larviculture improvement of the commercial production of marine aquaculture species*. Chile.

Del Monte-Luna, P. 2004. Caracterización del Centro de Actividad Biológica del Golfo de Ulloa, BCS, bajo un enfoque de modelación ecológica. Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México. 85pp.

Delbare, P. Dhert, P. Lavens, P. 1996. Zooplankton. Manual of the production and use of live food for aquaculture. FAO. Fisheries Technical paper 361. 295 pp.

Dios, S. Novoa, B. Buonocore, F. Scapigliati, G. Figueras, A. 2008: Genomic Resources for Immunology and Disease of Salmonid and Non-Salmonid Fish, *Reviews in Fisheries Science*, 16:S1, 119-132.

Divanach, P. Boglione, C., Menu, B., Koumoundouros, G., Kentouri, M. y Cataudella, S. 1996. Abnormalities in finfish mariculture: and overview of the problem, causes and solutions. In: Chatain, B., Saroglia, M., Sweetan, J. and Lavens, P. (Eds.), *Sea bass and Sea bream culture: Problems and Prospects*. Oostende, Belgium. *European Aquaculture Society* 45: 6.

Douglas, S.E. Knickle, L.C. Kimball, J. Reith, M.E.. 2007. Comprehensive EST analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), a commercially relevant aquaculture species. *BMC Genomics*, 8: 144.

Dufour, C. Dandrifosse, G. Forget, P. Vermesse, F. Romain, N. Lepoint, P., 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology*, 95, 112-116.

Dumas, S. Rosales Velazquez, M. O. Contreras Olguín, M. Hernandez – Ceballos, D. E. Silverberg, N. 2004. Gonadal maturation in captivity and hormone induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Aquaculture*, 234; 614 – 623.

Durand - Chaucheyras, F. Fonty, G. Bertin, G. Théveniot, M. Gouet, P. 1998. Fate of levucell SCI-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reproductive Nutrition. Development*. 38: 275-280.

Dutton, P. 1992. Effects of experience on feeding success by larval white seabass *Atractoscion nobilis*. *Journal of Fish Biology* 41: 765-773.

Espinoza, N. Escala, E. Blacio, E. 2009. Estudio de la factibilidad técnica del cultivo del huayaibe (*Seriola rivoliana*). *Escuela Superior Politecnica del Litoral*. Guayaquil. Pp 3 – 5.

- Finne, E. F. Cooper, G. A. Koop, B. F. Hylland, K. Tollefsen, K. E. (2007). Toxicogenomic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes exposed to model chemicals and a synthetic mixture. *Aquatic Toxicology*. 81(3): 293–303.
- Fredrickson, A. G. Stephanopoulos, G. 1981. Microbial competition. *Science* 213: 972–979.
- Gatesoupe, F. J. 2005. Probiotics and Prebiotics for fish culture, at the parting of the ways. *Aqua feeds: Formulation and beyond*, 2 (3): pp 3 – 5.
- Gatesoupe, F. J. 2007. Live yeast in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*. 267 (1-4): pp 20 – 30.
- Goetz, F. W. MacKenzie, S. 2008. Functional genomics with microarrays in fish biology and fisheries. *Fish and Fisheries* . Wiley and sons. Estados Unidos 9 (4).
- Gopakumar, G. Jayaprakas, V. 2004. Life table parameters of *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis* in relation to salinity and temperature. *Journal of Marine Biology Association. India*, 46(1): 21-31
- Govoni, J. J. Boehlert, G. W. Watanabe Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of fishes*, 16 , 1 – 3.
- Gram, L. Lovold, T. Nielsen, J. Melchiorson, J. Spanggaard, B. 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* 199, 1–11.
- Grossi – Dopico, E. 2010. Primeras experiencias del cultivo del medregal negro (*Seriola rvioliana*, Valenciennes 1833) en Canarias. Tesis de Doctorado, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. España.

- Guzmán-Villanueva, L. T. 2008. Efecto de la levadura *Debaryomyces hansenii* silvestre e inhibida de su actividad ornitín-descarboxilasa sobre el desarrollo larvario de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría. Programa de Posgrado del CIBNOR.
- Hakim, Y., Harpaz, S., Z. 2009. Expression of brush border enzymes and transporters in the intestine of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following food deprivation, *Aquaculture*, 290: 110-115.
- Hasan, M. R. 2014. The State of World Fisheries: Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Hunter, J. R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. Marine fish larvae morphology, ecology and relations to fisheries. Washington Sea Grant Program. Seattle. Pp. 34- 77.
- Kozasa, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding, *Microbiologie Aliments Nutrition*, vol. 4, no. 2, pp. 121–135, 1986.
- Lanza – Espino, G., Arredondo – Figueroa, J. L. 1990. La acuicultura en México: de los conceptos a la producción. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F.
- Lim, L.C. 1993. Larviculture of the greasy grouper *Epinephelus tauvina* F. and the brownmarbled grouper *E. fuscoguttatus* F. in Singapore. *Journal World Aquaculture Society* 24: pp. 262 - 274.
- Linney, E. Upchurch, L. Donerly, S. 2004. Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicol Teratol*, 26(6): pp. 709–718.
- Magnelli, P. Cipollo, J. F. Abeijon, C. 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and a 1,6-glucan fine structure. *Anal Biochem* 301: pp. 136–150.

Marques, A. Dhont, J. Sorgeloos, P. Bossier, P. 2006. Immunostimulatory nature of β -glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish Shellfish Immunol* 20: pp. 682–692.

Masuma, S. Kanematu, M. K. Teruya, K. 1990. Embryonic and morphological development of larvae and juveniles of the amberjack, *Seriola dumerilii* (in Japanese with a summary in English). *Japanese Journal of Ichthyology*, Vol. 37 (2): pp. 164- 169.

Mathiesen, A. M. 2012. The state of world fisheries and aquaculture. FAO fisheries and aquaculture department. pp. 21-26.

Mazurais, D. Glynatsi, N. Darias, M. Christodouloupoulou, S. Cahu, C. Zambonino-Infante, J. L. Koumoundouros, G. 2009. Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. *Aquaculture*. 294: pp. 262-270.

McEwen, S. A. Fedorka – Cray, P. J. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis.*; 34: pp. S93 – S106.

McEwen, S.A. Fedorka-Cray, P.J. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis*. 34: pp. S93, S106.

Miles, D. J. C. Polchana, J. Lilley, J. H. Kanchanakhan, S. Thompson, K. D. Adams, A. 2001. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*; pp. 195:1-15.

Minton R. V. Hawke J. P. Tatum W. M. (1983) Hormone induced spawning of red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Aquaculture* 30, pp. 363–368.

Moran, D. Smith, C. K. Gara, B. Poortenaar C. W. 2007. Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish. (*Seriola lalandi Valenciennes 1833*). *Aquaculture*. 262: pp. 95–104.

Moreno – Figueroa, L. D. 2011. Efecto de la temperatura en el desarrollo larvario temprano del Huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922). Tesis de Maestría. Programa de posgrado de CIBNOR.

Papandroulakis, N. Mylonas, C. C. Maingot, E. Divanach, P. 2005. First results of greater amberjack (*Seriola dumerili*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture* 250: pp. 155-161.

Péres, A. Cahu, C. L. Zambonino-Infante, J.L. 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 16: pp. 479-485.

Peulen, O. Deloyer, P. Dandrifosse, G. 2002. Maturation of intestinal digestive and immune systems by food polyamines. In: Zabielski, R., Gregory, P.C., Westrom, B. (Ed), *Biology of the Intestine in Growing Animals*, Vol. 1. Elsevier, Amsterdam, pp. 145-167.

Peulen, O. Deloyer, P. Grandfils, C. Loret, S. Dandrifosse, G. 2000. Intestinal maturation induced by spermine in young animals. *Livestock Production Science* 66: pp .109–120.

Podrabsky, J.E. Somero, G.N.2004. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology*, 207: pp. 2237–2254.

Reyes – Becerril, M. Tovar-Ramírez, D. Ascencio Valle, F. Civera - Cerecedo, R. Gracia - Lopez, V. Barbosa - Solomieu, V. Ángeles – Esteban, M. 2011. Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*. 42(11). pp. 1676 - 1686

Roo, F.J., Izquierdo, M.S. Socorro, J.A., Caballero, M.J. 2001. Caracterización histológica del desarrollo del sistema visual en larvas de dorada *Sparus aurata* (Linnaeus 1758). Series monografías del ICCM 4: pp. 403-411.

Penglase, S. Nordgreen, A. Van der Meeren, T. Olsvik, P. A. Sæle, Ø. Sweetman, J. W. Baeverfjord, G. Helland, S. Hamre, K. 2010. Increasing the level of selenium in rotifers (*Brachionus plicatilis* 'Cayman') enhances the mRNA expression and activity of glutathione peroxidase in cod (*Gadus morhua* L.) larvae, *Aquaculture* 306 (1), 259-269.

Salminen, S. Bouley, C. Bouton-Ruault, M. C. Cummings, J.H. Franck, A. Gibson, G.R. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 80: pp. 147 -171.

Schrezenmeir, J. DeVrese, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, pp. 361S–364S, 2001.

Selvaraj, V. Sampath, K. & SekarV. (2005) Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology.* 19: pp. 293 - 306.

Selvaraj, V., Sampath, K. Sekar, V. (2006) Adjuvant and immunostimulatory effects of b-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114: pp. 15 - 24.

Servin, A. L. Coconnier, M. H. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17: pp. 741 - 54.

Sherr, B. F. Sherr, E.B. Fallon, R.D. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. and Environmental Microbiology*. 53 (5): pp. 958 - 965.

Sifa, L. Mathias, J. A. 1987. The critical period of high mortality of larvae fish; a discussion based on current research. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. China. 5(1): Pp 80 – 81.

Siwicki, A.K. Anderson, D.P. Rumsey, G.L. 1994 Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41: pp. 125 - 139.

Skiftesvik A.B., Browman H.I. & St-Pierre J.F. (2003) Life in green water: the effect of microalgae on the behaviour of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. In: *The Big Fish Bang*. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference (ed. by H.I. Browman & A.B. Skiftesvik). Institute of Marine Research, Bergen, Norway. pp. 97–103.

Smith – Vaniz, W. F. 1999. Carangidae. *FAO species identification guide for fishery purposes*. The living marine resources of the Western Central Pacific.

Smith, T. K. 1990. Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine metabolism. *P. S. E. B. M.* 194. Pp. 332 – 336.

Solé, M. Potrykus, J. Fernandez Díaz, C. Blasco, J., 2004. Variations on stress defenses defences and methallothionein levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stages. *Fish Physiology Biochemistry*. 30: pp. 57 – 66.

Sorgeloos, P. (1980) The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In: *The brine shrimp Artemia*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universal Press, Wetteren. Vol 3: pp. 25–46.

- Sorgeloos, P., Dhert, P. Candreva, P. 2001 Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200: pp. 147–159.
- Sousadias, M. G. Smith, T. K. 1995. Toxicity and growth promoting of spermine when fed to chicks. *Journal of Animal Science*. 73: pp 2375 – 2381.
- Tinh, N. T. N. Dierckens, K. Sorgeloos, P. Bossier, P. 2008. A review of the functionality of probiotics in larviculture food chain. *Marine biotechnology*. Estados Unidos. 10: pp. 1 – 12.
- Tovar – Ramirez, D. Mazurais, D. Gatesoupe, J. Quazuguel, J. F. Cahu, C. L. Zambonino – Infante, J. L. 2010. Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 300: pp. 142 – 14.
- Tovar-Ramirez, D. Infante J. Z. Cahu C, Gatesoupe F. J. Vazquez-Juarez, R (2004) Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture* 234: 415–427.
- Tovar-Ramirez, D. Zambonino, J. Cahu, C. Gatesoupe, F. J. Vazquez-Juarez, R. Lesel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204: 113–123.
- Tucker, J. W. 1998. *Marine Fish culture*. Kluwer Academic Publisher, Norwell, Massachussets. Estados Unidos. p. 750.
- Van der Meeren, T. Naas, K.E., 1997. Development of rearing techniques using large enclosed ecosystems in the mass production of marine fish fry. *Review Fish Science*. 5: pp. 367–390.
- Verschuere, L. Rombaut, G. Sorgeloos, P. Verstracte, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in acquaculture. *Microbiology, Molecular Biology Review*. 64: pp. 655- 671.

Vilhelmsson, O. Martin, S. A. M. Medale, F. Kaushik, S. J. Houlihan, D. F. 2004. Dietary plant-protein substitutes affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Br. J Nutr. 92: pp. 71 – 80.

Walford, J. Lam, T. J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture 109, 187–205.

Zambonino-Infante, J.L. Cahu, C.L. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. 130C: pp. 477-487.

Zanello, G., Meurens, F., Berri, M., Salmon, H., 2009. *Saccharomyces boulardii* effects on

Zavala – Leal, I. Dumas, S. Peña, R. Contreras – Olgún, M. Hernandez – Ceballos, D. 2012. Effects of culture conditions on feeding response of larval pacific Red Snapper (*Lutjanus peru*) at first Feeding. Aquaculture research. pp. 2 - 3.