



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

USO DE MICROAGREGADOS COMO PRIMER ALIMENTO EN LARVAS DE PEZ BLANCO (*Chirostoma estor*)

TESIS QUE PRESENTA:

BIOL. EDUARDO MARTÍNEZ ANGELES

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS

CO-DIRECTORA

DRA. MA. GISELA RÍOS DURÁN



MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. MARZO, 2016

DEDICATORIA

La culminación de ésta tesis fue posible gracias al esfuerzo, trabajo constante y el apoyo incondicional de familiares y amigos, quienes siempre estuvieron conmigo cada vez que me sentí fatigado o desilusionado. .

A mis padres Eduardo Martínez Ayala y Edelmira Angeles Chávez gracias por ser un gran ejemplo de vida, por el amor y apoyo incondicional que me han brindado. Pero sobre todo por enseñarme que el único camino al éxito es el trabajo y la dedicación constante. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

A mis hermanos Jorge y Jessi por brindarme su cariño, por los buenos y malos momentos que hemos compartido juntos y principalmente por estar conmigo cada vez que eh necesitado un abrazo o un consejo.

A mi gran familia, gracias por el amor y palabras de aliento que siempre eh recibido, en especial muchas gracias a las familias Martínez-Chávez y Martínez-Ayala por hacerme sentir como si fuese un miembro más, de corazón muchas gracias.

A mis amigos por su lealtad y confianza, especialmente a Maiko, Arturo, Beto, Cesar, Noelia, Moni, Lupita, David y Abraham quienes han estado presentes en las buenas y en las malas y con los cuales hoy tengo la dicha de seguir compartiendo experiencias de vida juntos.

A Edith por estar conmigo al pie del cañón, soportando largas jornadas de trabajo duro siempre con una sonrisa, gracias a ti hoy pude culminar este trabajo.

Y a Dios, por la dicha de ser parte de la maravillosa familia de la cual soy miembro, y por darme la fuerza necesaria para superar una y otra vez las dificultades y tropiezos presentes durante la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Carlos Martínez, por ser un excelente investigador y ejemplo de formación académica, pero más aún por ser una excelente persona, con calidad humana, gracias por la oportunidad de ser su alumno y por compartir conmigo algunas de sus experiencias y conocimientos como investigador, por la paciencia, correcciones, consejos, tiempo y buena disposición durante la elaboración de este trabajo.

A mi co-directora Dra. Ma. Gisela Ríos Durán, por ser una investigadora excepcional y sobre todo un excelente ser humano. Gracias por su sencillez e invaluable ayuda, siempre resolviendo atinada e inmediatamente mis dudas con mucha paciencia y amabilidad, por su apoyo otorgado durante el análisis estadístico y por su valiosa aportación en este trabajo, haciendo correcciones y contribuciones precisas para llevar a flote este proyecto.

A la Dra. Ruth Pedroza Islas por ser una excelente investigadora y extraordinaria persona, muchas gracias por tu amistad y excepcional trato durante mi estancia en el Laboratorio de Biopolímeros de la Universidad Iberoamericana. En especial, gracias por compartir conmigo tus valiosos conocimientos durante la realización de las microdietas para larvas de pez blanco.

A los Drs. Jorge Fonseca y Miguel A. Olvera por ser parte mi comité tutorial, en especial, gracias por su gran apoyo, correcciones y excelentes aportaciones para enriquecer este proyecto.

A los técnicos Jesús, Antonio, Lupita, Esther y Sibila por su amistad, pero sobre todo por compartir sus grandes conocimientos para llevar a cabo este proyecto. Así como también, a todos mis amigos y compañeros de laboratorio: Edith, Nancy, Liz, Memo, Esther, Saúl, Ricardo, Frida, Lázaro, Cristela, Anel, Jessi, Lupita, Eugenio, Pao, Miguel y Jonathan por su apoyo y las buenas vivencias compartidas durante este periodo.

A CONACyT, por el apoyo económico con el otorgamiento de la beca para manutención, y beca mixta para la realización de mi primera estancia de movilidad nacional.

CONTENIDO

I. RESUMEN GENERAL	1
II. GENERAL SUMMARY	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. ANTECEDENTES	7
IV.1 Descripción de la especie.....	7
IV.1.1 Características de las primeras larvas.....	8
IV.1.2 Estructuras bucales y faríngeas de larvas de <i>Chirostoma estor</i>	9
IV.1.3 Morfología e histología del tracto digestivo	10
IV.1.4 Capacidad digestiva durante la ontogenia larval	11
IV.2 La primera alimentación en larvas.....	16
IV.2.1 Destete de larvas.....	18
IV.2.2 Punto de no retorno y su importancia en la larvicultura.....	19
IV.3 Uso de microagregados y microencapsulados	19
IV.3.1 Tamaño de la dieta.....	23
IV.3.2 Distribución y consumo de microdieta.....	25
IV.4 Requerimiento de proteína en la dieta.....	25
V. JUSTIFICACIÓN	27
VI. HIPÓTESIS	28
VII. OBJETIVOS	28
VII.1 Objetivo general.....	28
VII.2 Objetivos específicos.....	28
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	29
VIII.1 Diseño experimental.....	30

VIII.1.1 Primer experimento	30
VIII.1.2 Segundo experimento	31
VIII.1.3 Química del agua	32
VIII.1.4 Análisis proximal.....	32
VIII.1.5 Análisis de distribución de tamaño de las microdietas	33
VIII.1.6 Morfología de las microdietas.....	33
VIII.1.7 Análisis de datos	33
VIII.2 Elaboración y análisis de dietas microagregadas	34
VIII.2.1 Elaboración de la emulsión simple (aceite-agua)	35
VIII.2.2 Secado de las dietas por spray	35
VIII.2.3 Cobertura de las microdietas.....	36
VIII.2.4 Tamaño de partícula.....	36
VIII.2.5 Flotabilidad de la partícula (Velocidad de hundimiento)	36
VIII.2.6 Humedad de las dietas microagregadas	36
VIII.2.7 Análisis de absorción de agua.....	37
IX. RESULTADOS	38
IX.1 Pre-experimento de alimentación de larvas de <i>C. estor</i>	38
IX.2 Tiempo mínimo de destete de larvas	39
IX.3 Mejor proporción de proteínas en la dieta	43
IX.4 Análisis proximales	46
IX.5 Distribución de tamaño de partícula de las dietas microagregadas.....	47
IX. 6 Morfología de la dieta	49
IX.7 Velocidad de hundimiento de las partículas	51
IX.8 Absorción de agua.....	51
X. DISCUSIÓN	53

X.1 Tiempo mínimo de destete	53
X.2 Mejor proporción de proteínas en la dieta	55
X.3 Distribución de tamaños de partícula.....	56
X.4 Morfología de la dieta	57
X.5 Velocidad de hundimiento	58
X.6 Absorción de agua de las microdietas	59
XI. CONCLUSIÓN	60
XII. BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1 Equipo utilizado para la determinación de absorción de agua.....**37**

Fig. 2 Porcentaje de supervivencia de larvas alimentadas con rotífero (*Brachionus plicatillis*) y larvas destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) a los 0 dpe. (n=100).....**39**

Fig. 3 Longitud total de larvas alimentadas con rotífero (*B. plicatillis*) y larvas destetadas con microdieta comercial (Otohime A1) desde los 0 dpe. (n=100).....**39**

Fig. 4 Peso seco individual final de larvas alimentadas durante 30 días con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) a 0, 5 y 10 dpe. R: Larvas alimentadas con rotífero, 0 dpe: destetadas con la microdieta comercial a los cero días post-eclosión. 5 dpe: destetadas a los cinco días post-eclosión y 10 dpe: destetadas a los 10 días post-eclosión. Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación ($p<0.05$).....**40**

Fig. 5 Longitud final de larvas alimentadas durante 30 días con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) a los 0, 5 y 10 dpe. R: Larvas alimentadas con rotífero, 0 dpe: destetadas con la microdieta comercial a los cero días post-eclosión. 5 dpe: destetadas a los cinco días post-eclosión y 10 dpe: destetadas a los 10 días post-eclosión. Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación ($p<0.05$).....**41**

Fig. 6 Supervivencia de larvas alimentadas durante 30 días con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) a los 0, 5 y 10 dpe. R: Larvas alimentadas con rotífero, 0 dpe: destetadas con la microdieta comercial a los cero días post-eclosión. 5 dpe: destetadas a los cinco días post-eclosión y 10 dpe: destetadas a los 10 días post-eclosión. Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación ($p < 0.05$).....**42**

Fig.7 Peso seco individual final (mg) de larvas alimentadas durante los primeros días post-eclosión con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas a los 10 dpe con dietas microagregadas, combinando diferentes proporciones de proteínas fibrosas y solubles. TO: Otohime, TLO: like-Otohime, T.25f:75 (25% fibrosa y 75% soluble), T.50f:50s (50% fibrosa y 50% soluble), T.75f:25s (75% fibrosa y 25% de soluble). Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).....**43**

Fig. 8 Longitud total individual final (mm) de larvas alimentadas durante los primeros días post-eclosión con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas a los 10 dpe con dietas microagregadas, combinando diferentes proporciones de proteínas fibrosas y solubles. TO: Otohime, TLO: like-Otohime, T.25f:75 (25% fibrosa y 75% soluble), T.50f:50s (50% fibrosa y 50% soluble), T.75f:25s (75% fibrosa y 25% de soluble).....**44**

Fig. 9 Supervivencia de larvas alimentadas durante los primeros días post-eclosión con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas a los 10 dpe con dietas microagregadas, combinando diferentes proporciones de proteínas fibrosas y solubles. TO: Otohime, TLO: like-Otohime, T.25f:75 (25% fibrosa y 75% soluble), T.50f:50s (50% fibrosa y 50% soluble), T.75f:25s (75% fibrosa y 25% de soluble).

Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación ($p=0.018$).....**45**

Fig. 10 Distribución de tamaños de partícula correspondientes a cada una de las dietas microagregadas utilizadas durante el experimento. A: Otohime; B: Like Otohime; C: 25f:75s; D: 50f:50s y E: 75f:25s.....**48**

Fig. 11. Fotografías de las dietas microagregadas. Los números romanos indican el tipo de microdieta, I: 25f:75; II: 50f:50s; III: 75f:25s; IV: “like-Otohime”; V: Otohime A1®. Mientras que las letras indican el aumento con el cual fueron tomadas las fotografías. A: 200x; B: 500x y C: 1000x.....**50**

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores (promedio \pm desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el experimento.....**43**

Tabla 2. Valores (promedio \pm desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el experimento.....**46**

Tabla 3. Valores (promedio \pm desviación estándar) de los análisis proximales de las diferentes microdietas utilizadas durante los experimentos (n=9).....**47**

Tabla 4. Valores (promedio \pm desviación estándar) de la velocidad de hundimiento de cada una de las microdietas utilizadas en los distintos tratamientos de alimentación.....**51**

Tabla 5. Valores (promedio \pm desviación estándar) de la absorción de agua (mL de agua/g) de cada una de las microdietas utilizadas en los distintos tratamientos de alimentación**52**

I. RESUMEN

La larvicultura de peces está basada principalmente en alimentos vivos (rotíferos, copépodos y nauplios de artemia), lo que incrementa los costos de producción. Es necesario el desarrollo de microdietas apropiadas para larvas, que permitan prescindir del alimento vivo. Las microdietas son alimentos específicos con una calidad estándar, de fácil almacenamiento y manejo, que pueden proveer los nutrientes necesarios para un adecuado crecimiento y alta supervivencia de larvas de peces. El objetivo del presente estudio fue desarrollar una microdieta como primer alimento para larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*). Para ello, se realizó un pre-experimento con larvas de 0 a 30 días post-eclosión (dpe), en donde se probaron dos tratamientos de alimentación, en uno las larvas fueron alimentadas con una microdieta comercial (Otohime A1®), mientras que en otro las larvas fueron alimentadas con rotíferos (*Brachionus plicatillis*). Los resultados mostraron que las larvas pueden consumir microdietas desde la eclosión. Con base en estos resultados, se realizó un primer experimento para determinar el tiempo mínimo de destete de larvas de *C. estor*, durante el cual se evaluó el desempeño de las larvas hasta los 30 dpe sometidas a cuatro tratamientos, un control en el que se alimentaron únicamente con rotífero, otro en que se alimentaron desde el día de la eclosión con Otohime A1® y otros dos en los que fueron alimentadas los primeros días con rotíferos (*B. plicatillis*) y posteriormente destetadas a los 5 y 10 dpe con Otohime A1®. Los resultados mostraron que el mejor tiempo para el destete de las larvas fue a los 10 dpe, obteniendo un crecimiento y supervivencia similar ($p > 0.05$) a las que fueron alimentadas sólo con rotíferos. Finalmente, se realizó un segundo experimento para evaluar dietas con diferentes proporciones de fuentes de proteínas fibrosas (f) y solubles (s) (25f:75s, 50f:50s y 75f:25s) y una dieta similar a la comercial denominada "Like Otohime". Las larvas alimentadas con Otohime A1® y la dieta "Like Otohime" no presentaron diferencias significativas en crecimiento y supervivencia ($p > 0.05$). Sin embargo, las alimentadas con la microdieta 25f:75s, presentaron un crecimiento significativamente mayor ($p = 0.037$) que las alimentadas con Otohime A1® y una mayor supervivencia ($p = 0.018$) que las alimentadas con las microdietas 50f:50s y 75f:25s. Se concluye que las larvas de *C. estor* pueden ser alimentadas desde el momento de su eclosión con dietas microagregadas. Sin embargo, cuando son destetadas a los 10 dpe la tasa de supervivencia y el crecimiento son mejores ($p < 0.05$). Además, una combinación de 25% de fuentes de proteína fibrosa y 75% de fuentes de proteína soluble en la dieta, incrementa significativamente el crecimiento y la supervivencia de las larvas.

Palabras clave: Microdieta, destete, larvas, crecimiento, supervivencia.

II. ABSTRACT

The fish larviculture is based primarily on live feed (rotifers, copepods and artemia nauplii), which increases the production costs. It is necessary to develop proper microdiets in order to replace live feeds. Microdiets are specific feeds with a standard quality, easy handle and storage, which can provide the nutrients needed for proper growth and high survival of fish larvae. The aim of this study was to develop a microdiet as first feed for Mexican silverside (*Chirostoma estor*) larvae. A pre-experiment was performed with newly-hatched larvae to compare the performance of larvae fed a commercial microdiet (Otohime A1®) and larvae fed rotifers (*Brachionus plicatillis*), up to 30 days post-hatching (dph). The results show that *C. estor* larvae can consume microdiets since hatching. Based on these results, a first experiment was performed to determine the minimum weaning time for *C. estor* larvae. During the experiment, the performance of newly-hatched larvae was evaluated with four different feeding treatments, one in which larvae were fed only with rotifers until 30 dph, other in which larvae were fed only with Otohime A1® since hatching, and the other two, in which larvae were fed the first days after hatching with rotifers (*B. plicatillis*) and weaned at 5 and 10 dph with Otohime A1®. The results showed that the best time for weaning larvae was 10 dph, obtaining similar survival and growth ($p>0.05$) than larvae fed only with rotifers. Finally, a second experiment was realized to evaluate the performance of larvae fed diets with different proportions of fibrous (f) and soluble (s) protein sources (25f:75s, 50f:50s y 75f:25s) and a diet similar to Otohime A1®, named "Like Otohime". The growth and survival of larvae fed with Otohime A1® and the diet "Like Otohime" were not significantly different ($p>0.05$). However, the larvae fed with microdiet "25f:75s", showed a significantly higher growth ($p=0.037$) than larvae fed with Otohime A1® and a higher survival ($p=0.018$) than larvae fed with microdiets 50f:50s and 75f:25s. It can be concluded that *C. estor* larvae can be weaned from the time of hatching using microdiets. However, when the larvae are weaned at 10 dph, the survival rate and growth are better ($p<0.05$). Furthermore, a combination of 25 % of fibrous protein sources and 75 % of soluble protein sources in the diet, significantly increases growth and survival of larvae.

Keywords: Microdiet, weaning, larvae, growth, survival.

III. INTRODUCCIÓN

Los peces son uno de los grupos más numerosos y diversos, (28,000 especies) y presentan una gran variedad de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento, lo que les permite ocupar casi cualquier tipo de hábitat y dominar las aguas de todo el planeta (Moyle y Cech 2000).

La alimentación de larvas es uno de los principales problemas en los cultivos de peces, principalmente marinos (Watanabe y Kiron 1994; Tucker 1998; Cahu y Zambombino-Infante 2001; Langdon 2003). La primera alimentación de las larvas es crítica, debido a que durante el periodo larvario se presenta la mayor mortalidad de los peces, pues las larvas no aceptan fácilmente alimentos preparados y el tamaño de la partícula debe ser menor a 250 μ para ajustarse a la boca de las larvas en crecimiento. (Villegas y Kanazawa 1980; Kanazawa *et al.* 1982; Langdon *et al.* 1985; Jones y Kurmaly 1987; Kanazawa y Teshima 1988;). Por lo anterior, el cultivo larvario de la mayoría de las especies de peces ha dependido hasta ahora, en su primera etapa, de la disponibilidad de presas vivas (rotíferos, copépodos o nauplios de artemia) como primer alimento (Buchet *et al.* 2000; Lazo 2000; D'Abramo 2002)

Muchas especies de peces que inicialmente requieren alimentos vivos en sus dietas necesitan ser entrenadas para aceptar alimentos preparados. Este entrenamiento, es conocido como "destete". Muchos experimentos han sido conducidos con el fin de adelantar el tiempo del destete en numerosas especies de peces (principalmente marinos). El destete es un problema significativo para las larvas de un gran número de especies de peces marinos que no aceptan fácilmente alimentos preparados, por lo que la fabricación de un alimento de calidad uniforme (en términos del contenido de ingredientes) con tamaños de partícula extremadamente pequeños sigue siendo un problema tecnológico. (Rodríguez-Aguilera 2009).

El pez blanco de Pátzcuaro es un atherinopsido de agua dulce, que comparte muchas características con peces marinos, debido a un ancestro común (Martínez-Palacios *et al.* 2007). Es un organismo zooplanctóforo y filtrador, que carece de estómago y su alimentación está basada principalmente en alimento vivo (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

El cultivo de larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*) es óptimo en ambientes salinos, y como en la larvicultura de especies marinas, su alimentación está casi totalmente basada en alimento vivo, por lo que aún no es posible lograr el destete antes de 2 ó 3 meses. Además, una vez que las larvas son destetadas, aún es necesario complementar las dietas artificiales con alimento vivo para evitar una elevada mortalidad y bajo crecimiento (Martínez-Palacios *et al.*, 2004)

De acuerdo con diversos autores, el alimento vivo es altamente eficiente para inducir crecimiento y supervivencia en las larvas (Cahu y Zambonino 1997). Sin embargo, este presenta la gran desventaja de poseer una calidad nutricional incierta (Muir y Sutton 1994; Ronnestad *et al.* 2001; Takeuchi *et al.* 2003) y para su disponibilidad requiere de una elevada inversión económica, tiempo, y mano de obra altamente calificada, conformando los llamados “cultivos auxiliares” (alimento vivo), los cuales incrementan los costos de producción durante las fases larvianas en cultivo (Cahu y Zambonino 2001; Copeman *et al.* 2001; García-Ortega *et al.* 2003).

El alto costo de los cultivos auxiliares, ha impulsado a los investigadores a desarrollar estrategias de alimentación que reduzcan casi al mínimo la etapa de alimentación con presas vivas, iniciando la alimentación inmediatamente después de la eclosión con dietas inertes o adelantando el tiempo del destete de las larvas, mediante el uso de dietas microagregadas (secadas por aspersión), elaboradas a base de carne de pescado, levaduras, pasta de soya, etc., tratando de sustituir total y/o parcialmente el uso de alimento vivo (Rodríguez-Aguilera 2009). Sin embargo, al momento de elaborar dichas dietas, es necesario tener en cuenta ciertas consideraciones como contar con alimentos de alta calidad que mantengan

un ambiente saludable en el agua, reduzcan el riesgo de enfermedades y permitan disminuir los costos que involucra la producción del alimento vivo (Villegas y Kanazawa 1980; Kanazawa *et al.* 1982; Langdon *et al.* 1985; Jones y Kurmaly 1987; Kanazawa y Teshima 1988; Martínez-Palacios *et al.* 2002)

Cuando se cambia directamente de alimento vivo a alimentos preparados, algunas veces se utilizan inicialmente alimentos húmedos, debido a que su textura suave es más parecida a la de los organismos vivos que a la de una partícula de alimento seco. Sin embargo, son muchos los factores (palatabilidad, tamaño de partícula, flotabilidad, etc.) que deben ser considerados al momento de formular una dieta inerte que tenga rendimientos de crecimiento y supervivencia larvaria similares o mejores que las presas vivas (Dinis *et al.* 2000; García-Ortega 2000 y Ronnestad *et al.* 2000). Por lo cual, la formulación es crucial para el desarrollo de una dieta artificial, puesto que condiciona el éxito o fracaso de la misma en la alimentación de las larvas.

El spray-drying o nebulización es una tecnología muy usada en la industria farmacéutica y alimentaria, la cual recientemente ha sido introducida en la industria de alimentos para larvicultura marina (principalmente de camarones peneidos), para la fabricación de alimento microparticulado o microdietas (Pedroza-Islas *et al.* 2000). No obstante, el secado por aspersion o spray drying es una técnica que ha sido poco explorada a pesar de que cuenta con gran potencial para ingredientes frescos y lábiles pues el producto obtenido presenta poca modificación química debido a la rapidez del proceso de secado (Masters 1985; Dziezack 1988).

A pesar del avance obtenido en la elaboración de las microdietas, son muchos los factores que deben ser considerados a la hora de formular una dieta inerte que tenga rendimientos de crecimiento y supervivencia larvaria similares o mejores que las presas vivas (García-Ortega 2000; Dinis *et al.* 2000; Ronnestad *et al.* 2000).

Hasta la fecha, sólo se había probado una microdieta comercial (INVE®) en larvas de pez blanco, con una mortalidad total de las larvas (Datos no publicados), por lo que se ha dependido totalmente de alimentos vivos para su primera alimentación y aún no es posible lograr su destete antes de 2 o 3 meses. Además, una vez que el pez es destetado aún es necesario complementar las dietas artificiales con alimento vivo, para evitar una elevada mortalidad y un bajo crecimiento (Martínez-Palacios *et al.* 2004).

Recientemente, se ha invertido mucho esfuerzo en el estudio de la biología y desarrollo del cultivo de *C. estor* (Martínez-Palacios *et al.* 2004; Martínez-Palacios *et al.* 2006; Ross *et al.* 2006), aunque aún es necesaria más investigación para entender la alimentación y nutrición de la especie, así como también para optimizar estrategias de alimentación y dietas para el cultivo. Aunque el manejo de la crianza y la incubación han sido desarrollados exitosamente, hasta el día hoy existe una dependencia de alimento vivo y existen algunos problemas con las dietas formuladas. Sin embargo, la investigación está en curso para reducir o incluso eliminar el alimento vivo tan pronto como sea posible. (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

Actualmente no existe información disponible sobre la calidad de los ingredientes proteínicos que deben constituir las primeras dietas para el destete de las larvas de pez blanco y se desconocen los requerimientos de proteína de las mismas. El objetivo del presente estudio es desarrollar una dieta microagregada para reducir el tiempo de destete en larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*) y al mismo tiempo evaluar diferentes tipos de proteínas en la dieta. Esta información es fundamental para desarrollar una dieta bien equilibrada que permita un mejor crecimiento, supervivencia y utilización del alimento por estas larvas, lo que permitirá un mejor manejo de la especie en sistemas intensivos de cultivo, reduciendo el uso de alimento vivo.

IV. ANTECEDENTES

IV.1 Descripción de la especie

El pez blanco (*Chirostoma estor*) es un antherinopsido dulceacuícola, nativo de la meseta central de México. Es considerado como la principal especie de la pesquería artesanal del lago de Pátzcuaro (hoy en total decadencia), donde por muchos años, ha sido la base de la subsistencia de los ribereños Purépechas. Esta especie tiene un alto valor en México, tanto cultural como económico. Sin embargo, sus poblaciones se encuentran en riesgo debido a la contaminación, la introducción de especies exóticas y la sobre explotación (Martínez-Palacios *et al.* 2002).

Una alternativa para recuperar las poblaciones del pez blanco, así como para crear fuentes de ingresos para los pescadores de la zona, es la implementación de su cultivo, puesto que esta especie nativa cuenta con un gran potencial para la acuicultura. En años recientes, ha incrementado el interés por su cultivo. Desde hace algunos años se han realizado varias pruebas para cultivar esta especie a escala experimental (Lara 1974; Armijo y Sasso 1976). Sin embargo, en los intentos que se han realizado a través de los años para implementar el cultivo de pez blanco, en general se ha obtenido una baja supervivencia en las etapas larvarias, principalmente debido al desconocimiento de los requerimientos de las larvas de estos peces (Martínez-Palacios *et al.* 2002). En la actualidad se tienen grandes avances en el desarrollo del cultivo de la especie y recientemente se ha comenzado a investigar sobre requerimientos básicos de su cultivo (Martínez-Palacios *et al.* 2007; 2008).

El pez blanco de Pátzcuaro es ovíparo, carece de hábitos de nidificación y cuidado parental. Su temporada de reproducción se intensifica durante los meses cálidos del año, principalmente de marzo a junio. En dicha especie, el cortejo de apareamiento consiste en la persecución de una hembra por varios machos que la rozan en repetidas ocasiones, realizando la ovoposición cuando se encuentran

cerca de algas filamentosas que usan como sustrato. Una hembra madura es capaz de desovar todo el año, pero lo hace con mayor intensidad en el periodo comprendido entre Marzo y Junio (Rosas 1976). La producción promedio de huevecillos por hembra va 15,000 a 20,000 por desove, son de color ligeramente ámbar, poseen de 6 a 9 filamentos interlobulares adherentes y su diámetro es de 900 a 1,000 μ (Solórzano 1963).

Por otro lado, los huevecillos de *C. estor* son pequeños, contrario a otras especies de agua dulce. Dichos huevos poseen una cantidad limitada de vítelo acompañado de un gran glóbulo de aceite que utilizan como reserva energética, la cual es consumida durante los primeros días del desarrollo larvario (Chapman 1992).

IV.1.1 Características de los huevos y primeras larvas

De acuerdo con Segner *et al.* (1994) las larvas de los peces tienen características específicas, tales como el desarrollo del tracto digestivo al inicio de la alimentación exógena, la cual puede ser una adaptación al tamaño del animal. Además, peces con huevos grandes, absorben su saco vitelino en largos periodos y presentan larvas de mayor tamaño, lo cual favorece una organogénesis avanzada del tracto digestivo al momento de la primera alimentación; mientras que peces con huevos muy pequeños, como es el caso de peces marinos, muestran una organogénesis incompleta del tubo digestivo al comienzo de la alimentación exógena.

Los huevos del pez blanco (*Chirostoma estor*) son de tamaño pequeño (entre 0.9 y 1.2 mm de diámetro) poseen de seis a ocho hilos adherentes y las larvas recién eclosionadas miden entre 4.5 y 5 mm de longitud total. Los huevos fertilizados tardan de siete a ocho días en eclosionar (a 25 °C) y el saco vitelino desaparece hacia el tercer día después de la eclosión (Campos 2000; Martínez-Palacios *et al.* 2002). No se ha definido la duración del período larvario de esta especie y se carece de conocimientos básicos acerca de los cambios funcionales y estructurales del aparato digestivo y del metabolismo de sus estadios

tempranos. Las larvas antes de la eclosión poseen un desarrollo extraordinario de los ojos que se hace patente en su habilidad de captura de presas en el momento de la eclosión (Martínez-Palacios *et al.* 2002).

IV.1.2 Estructuras bucales y faríngeas de larvas de *Chirostoma estor*

De acuerdo a un estudio realizado por Ross *et al.* (2006), el pez blanco es filtrador con una pequeña boca superior, protráctil, con estructuras especializadas de alimentación en los arcos branquiales y dientes faríngeos. La mandíbula inferior tiene cuatro hileras de dientes cónicos, simples, inconspicuos, los cuales son pequeños y frágiles. Estas estructuras son indicativas de un depredador pelágico que se alimenta de presas pequeñas.

Al evaluar las estructuras bucales y faríngeas de larvas de pez blanco con el fin de tratar de determinar algunos aspectos de la anatomía bucal de esta especie y esclarecer con base en ella sus hábitos alimenticios, se encontró que las larvas de *C. estor* a los 10 días de edad tienen una placa faríngea con solo dos dientes faríngeos monocúspides, los cuales a partir del día 80 son cada vez más numerosos y complejos hasta convertirse en un sistema complejo de trituración zooplanctófago cuando alcanza su estado juvenil y adulto. Además cuenta con numerosas espinas branquiales en todos los arcos que conforman en un sistema complejo de filtración para atrapar pequeñas presas. Sin embargo, esto no evita que la especie pueda incluir dentro de su dieta, de manera oportunista, Astacidos (Astacidos) de tamaño mediano y algunos peces cuando alcanza las tallas adultas (Martínez-Palacios *et al.* 2002; Ross *et al.* 2006). Así, los peces juveniles y adultos tienen un sistema de filtración típica de un zooplanctófago, aunque los peces adultos ocasionalmente se alimentan de peces y crustáceos pequeños (Ross *et al.* 2006).

La estructura y conformación de la canasta branquial es una característica notable de la cavidad ventral de la boca. El primer arco branquial cuenta con dos tipos de espinas branquiales: espinas largas, dirigidas hacia adelante, y una fila de espinas más pequeñas, idénticas a las dos filas de espinas más pequeñas que se

encuentran en los arcos branquiales 2 a 4. Las almohadillas de los arcos 2 a 4 se entrelazan exactamente, formando un filtro constituido de un tapete de almohadillas espinosas. La especie también posee notables dientes faríngeos dorsales y ventrales, aunque estos son rudimentarios en etapas tempranas. Las almohadillas faríngeas se desarrollan visiblemente en el quinto ceratobanquial, conforme el crecimiento del pez y los adultos tienen un gran número de dientes afilados inconspicuos con filas de grandes dientes molariformes sobre el borde posterior de la almohadilla ventral (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

Estas estructuras bucales de *C. estor* tienen muchas características de un filtrador de flujo transversal. De esta forma, agregados de zooplancton filtrado son presentados en forma concentrada a los dientes faríngeos en la parte posterior de la cavidad bucal, donde son pre-molidos antes de pasar al aparato digestivo para posteriormente ser triturados por poderosas enzimas (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

IV.1.3 Morfología e histología del tracto digestivo

El tracto digestivo del pez blanco (*C. estor*) es una estructura curvada simple, relativamente indiferenciada, sin un estómago o apéndice pilórico identificable (Ross *et al.* 2006). El esófago es un tubo muscular corto, el cual tiene una mucosa epitelial suavemente doblada, estratificada en la parte anterior pero estratificada y simple en la parte posterior. Las células epiteliales contienen sustancias mucosas en el citoplasma y la submucosa está compuesta por tejido conectivo algo más denso que el de la lámina propia. El intestino consiste de tres secciones: anterior, posterior y el recto. No existe evidencia morfológica o histológica de un estómago, no se localiza engrosamiento, ni aumento de la musculatura o presencia de apéndice pilórico hasta el tamaño máximo de la especie. La sección anterior, a la cual están conectados los conductos biliares, se localiza antes del rizo del tracto y es análoga al duodeno. La parte posterior del intestino es más muscular después del rizo (curva). La mucosa intestinal está compuesta por una sola capa de grandes células columnarias que contienen células caliciformes dispersas. Los pliegues de la mucosa son profundos a lo largo

del intestino hasta el recto, donde los pliegues se vuelven superficiales. El recto también tiene capas musculares engrosadas (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

La longitud total del tracto alimenticio en relación con la longitud del cuerpo se mantiene constante hasta el tamaño máximo de la especie y es relativamente pequeña de 0.3:1. La falta de un estómago o un apéndice pilórico es indicativa de un consumidor continuo accediendo a presas abundantes y altamente digeribles (Ross *et al.* 2006).

IV.1.4 Capacidad digestiva durante la ontogenia larval

De acuerdo con Cahu y Zambonino-Infante (2001), la organogénesis de larvas de peces (principalmente marinos) no es completamente lograda al momento de la eclosión, puesto que estudios histológicos han revelado que la anatomía del tracto digestivo experimenta cambios durante algunas semanas. No obstante, estudios bioquímicos realizados durante los últimos 20 años han demostrado que muchas enzimas digestivas están presentes en larvas tempranas, por lo que las larvas no carecen de enzimas digestivas. Además, las enzimas pancreáticas ya son detectadas antes de la apertura de la boca y su síntesis no es inducida por la digestión de la dieta. Sin embargo, los mecanismos de secreción del páncreas y la acción enzimática se vuelven cronológicamente eficientes después de su síntesis. Asimismo, la aparición de funciones digestivas, asociadas con transformaciones morfológicas, sigue una secuencia cronológica como en mamíferos, pero experimenta grandes cambios durante varias semanas (Cousin y Baudin-Laurencin 1985; Boulhic y Gabaudan 1992; Vu 1993). Sin embargo, una dieta inadecuada puede retrasar la aparición de los mecanismos de secreción ocasionando la muerte de las larvas, ya que un proceso adecuado de maduración digestiva está asociado con alta supervivencia de larvas (Cahu y Zambonino-Infante 2001).

Durante su desarrollo temprano, las larvas exhiben una gran capacidad hidrolítica, en relación con su peso. Algunos patrones de actividad enzimática son dependientes de la edad, pero pueden ser modulados por la composición de la

dieta. Por lo tanto, las larvas tienen la capacidad de digerir y crecer bien con dietas compuestas, si la dieta es bien adaptada a la especie (Cahu y Zambonino-Infante 2001). Aunque el sistema digestivo de muchas larvas de peces está bien equipado para procesar sus presas naturales (alimento vivo) durante su alimentación exógena (Govoni *et al.* 1986; Kjorsvik *et al.* 1991), ellas no son capaces de utilizar dietas microparticuladas con la misma eficiencia (Segner *et al.* 1993)

Hasta hoy en día, se considera que las dietas inertes son insuficientes para la alimentación de larvas de peces marinos, debido principalmente a su estricta dependencia en el alimento vivo, su pobre actividad enzimática y a que su sistema digestivo no es completamente funcional comparado con individuos juveniles de la misma especie (Yúfera *et al.* 2000).

Los cambios en el sistema digestivo de las larvas durante su desarrollo sugieren que los requerimientos nutricionales no son similares entre larvas y juveniles. Ciertamente una formulación que sostiene un buen crecimiento en juveniles induce pobres resultados en el crecimiento y la supervivencia de las larvas (Cahu y Zambonino-Infante 2001).

Las dificultades experimentadas a la fecha en el desarrollo de una dieta artificial adecuada para el cultivo de larvas *C. estor* y su tiempo relativamente largo de destete, han llevado a la investigación sobre la fisiología digestiva de las larvas. Dichos estudios son esenciales para entender sus requerimientos nutricionales, lo cual puede permitir el desarrollo de dietas artificiales adecuadas para esta etapa, y ayudar a determinar el tiempo más apropiado para el destete (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

De acuerdo con Pedersen *et al.* (1987), la capacidad digestiva está directamente relacionada con la cantidad de enzimas digestivas disponibles, necesarias para el rompimiento extracelular de un alimento. Además, la ontogenia de las enzimas digestivas está principalmente “pre-programada” y puede ser sutilmente modificada por la composición de la dieta (Henning *et al.* 1994). Por lo tanto, el análisis de enzimas puede utilizarse como herramienta para el

entendimiento de las condiciones nutricionales de las larvas en etapas tempranas de desarrollo. Al ser la actividad de las enzimas digestivas un buen indicador de la capacidad digestiva de las larvas, el momento de mayor actividad enzimática puede indicar que el individuo está fisiológicamente listo para digerir alimento exógeno (Gawlicka *et al.* 2000).

Existen muchas consideraciones a tener en cuenta al momento de desarrollar una microdieta. La primera guarda relación con la capacidad de las larvas para digerir las microdietas inertes. Esta capacidad se encuentra estrechamente relacionada con el tipo y cantidad de enzimas digestivas que poseen las larvas en el momento de su eclosión (Rodríguez-Aguilera 2009).

El primer hecho importante a señalar es que la mayoría de las larvas en el momento de la eclosión no poseen un estómago funcional. Esto hace que la digestión ácida a base de pepsina no se pueda llevar a cabo y se hable de una digestión alcalina en lugar de una ácida (Díaz *et al.* 1995). Esta digestión es regulada principalmente por la hormona peptídica Colecistoquinina (CCK), que regula entre otras la liberación de la bilis y de enzimas digestivas pancreáticas, mostrando además, cierta influencia sobre la actividad motora peristáltica y la regulación del vaciado de intestino y estómago en caso de existir (Ronnestad 2002). Así, las principales enzimas que participan en la digestión de las larvas, de acuerdo al nutriente o sustrato sobre el cual actúan, son:

-Proteasas: Enzimas que participan en la digestión de proteínas, péptidos y aminoácidos. En larvas de peces marinos, generalmente esta digestión se da a base de proteasas alcalinas secretadas por el páncreas (tripsina y quimotripsina), en la parte posterior del intestino. También participan en el proceso de digestión de proteínas, enzimas secretadas en la membrana intestinal (aminopeptidasas, fosfatasas alcalinas y carboxipeptidasas, entre otras) y en el interior de la célula (catepsinas) (Díaz *et al.* 1995; Moyano *et al.* 1995; Alarcón-López y Martínez-Díaz 2000; Lazo 2000; Ronnestad 2002).

-Lipasas: la digestión lipídica es iniciada por la presencia de sales biliares en el intestino anterior y es regulada por la presencia o ausencia de enzimas tales como lipasa neutra no-específica, lipasa pancreática específica y co-lipasa, entre otras (Alarcón-López y Martínez-Díaz 2000; Lazo 2000). En general, se sabe que los lípidos son utilizados como fuente primaria de energía justo después de la eclosión (Vázquez *et al.* 1994), de lo cual se asume que las larvas ya cuentan con una batería enzimática desarrollada para la utilización de lípidos desde antes de la eclosión.

- Amilasas y Maltasas: los carbohidratos no son tan relevantes para las larvas de peces que obtienen energía a partir de proteínas y lípidos, principalmente. Sin embargo, es importante señalar que su digestión en la etapa larval está mediada principalmente por dos tipos de enzimas, las amilasas y las maltasas (Alarcón-López y Martínez-Díaz 2000; Lazo 2000).

Algunas enzimas proteolíticas (proteasas o peptidasas) han sido propuestas como indicadores de la condición nutricional de las larvas de peces; estas enzimas intervienen en la utilización de proteínas y consecuentemente afectan el crecimiento del organismo (Dabrowski y Glogowski 1977). Como lo afirman Díaz *et al.* (1997), la actividad proteolítica es un aspecto decisivo para establecer si las larvas tienen la habilidad de utilizar dietas artificiales.

La actividad digestiva pancreática e intestinal es adquirida tempranamente en larvas de *C. estor*, y puede ser detectada al momento de la eclosión, como ocurre en otras especies (Martínez-Palacios *et al.* 2008). Con la excepción de la leucin alanin peptidasa, el perfil de las enzimas digestivas estudiado encaja con el modelo de maduración que se ha descrito para los peces marinos (Zambonino-Infante y Cahu 2001), en el cual tienen un aumento en la actividad a los 20 días después de la eclosión (dph) seguida por una disminución a los 30 dph. Estos perfiles de actividad enzimática tienen su origen en eventos como el fin de procesos de diferenciación y procesos de osificación que ocurren desde los 20

dph (Rojas *et al.* 2000), el cambio en el tipo de alimento vivo y el más probable cambio en su codificación genética (Cara *et al.* 2003).

Ríos Durán (2000) reportó una alta capacidad proteolítica alcalina con altos niveles de actividad enzimática tipo tripsina. Sin embargo, Toledo-Cuevas *et al.* (2011) recientemente encontraron incluso actividades de quimiotripsina más altas que las reportadas para peces que poseen un estómago (Baragi y Novell1986). Esta gran actividad puede ser una respuesta a la abundancia de oligopeptidos (Zambonino-Infante *et al.* 1997) encontrados en el alimento vivo y como una compensación por la ausencia de pepsina, la cual actúa sobre los mismos sitios. En contraste, bajas actividades de lipasa dependiente de bilis y α -amililasa fueron encontradas en todas las etapas de las larvas, mostrando niveles significativos durante el primer día post eclosión (dph), pero cayendo a los 10 dph, esto posiblemente está relacionado a la parte final de la lecitotrofia (Martínez-Palacios *et al.* 2008). Las peptidasas y fosfatasas alcalinas tienen los niveles más altos entre las enzimas del intestino, sugiriendo una maduración digestiva temprana, ya que las enzimas intestinales son buenos indicadores del establecimiento y desarrollo temprano de habilidades digestivas y de absorción (Zambonino-Infante y Cahu 2001).

Además, en el pez blanco la actividad de la leucina aminopeptidasa en el 20 dph es similar a la encontrada en el pez agástrico (sin estómago) *Rutilus rutilus*, pero mucho más alta que la encontrada a la misma edad en peces con estómago como *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.* 2005), *Salmo gairdneri* y *Coregonus sp.* (Lauff y Hoffer 1984). En general, estas altas actividades proteolíticas alcalinas probablemente compensan la ausencia de un estómago y la falta de actividades proteolíticas ácidas en *C. estor* (Martínez-Palacios *et al.* 2008). La alta actividad citosólica de la leucin alanin peptidasa encontrada durante las fases larvarias y por encima de 90 dph en juveniles de *C. estor* es similar a la encontrada en *R. rutilus*, otro pez agástrico (Lauff y Hoffer 1984), y es cuatro veces más grande que la encontrada en peces con estómago como *Dicentrarchus labrax* y *P. crocea* (Zambonino-Infante y Cahu 1994; Ma *et al.* 2005).

En resumen, las larvas de *C. estor* parecen tener un perfil de enzimas apropiado para digerir proteínas eficientemente, pero tienen gran dificultad para digerir carbohidratos. Estas también presentan una baja actividad de la lipasa dependiente de sales biliares, aunque se desconoce la actividad de la lipasa pancreática. A pesar de que los resultados muestran una maduración digestiva a lo largo del desarrollo larvario, la actividad enzimática citosólica sugiere una maduración digestiva tardía, o bien, un modelo diferente al descrito para peces marinos (Toledo-Cuevas *et al.* 2011). Las primeras actividades de las enzimas pancreáticas e intestinales probablemente preparan al pez para digerir reservas vitelinas y alimento vivo, pero su posible maduración tardía puede causar dificultad en la digestión de dietas artificiales. No obstante, son necesarios más estudios enzimáticos para caracterizar aún más la capacidad digestiva de estos peces sin estómago, así como para establecer un mejor tiempo en el cual la maduración digestiva permita el destete de las larvas (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

IV.2 La primera alimentación en larvas de peces

En peces, como en otros seres vivos, se denomina alimentación al proceso por el cual se adquiere la energía y nutrientes necesarios para el crecimiento, reproducción y la realización de todas las funciones metabólicas llevadas a cabo en cada organismo (Wetzel 2001). La alimentación y nutrición larvaria es muy importante en la acuicultura, ya que esto determina la disponibilidad de peces para su cultivo (Navarrete-Ramírez 2006). Actualmente, las estrategias utilizadas en la alimentación de larvas de peces marinos han incluido la utilización de presas vivas (rotíferos, copépodos y nauplios de artemia) y el desarrollo de microdietas (Lazo 2000). Sin embargo, muy pocas especies han sido cultivadas con éxito basándose únicamente en dietas artificiales durante sus primeros estadios (Jones *et al.* 1993).

Es por ello, que la producción extensa de larvas es una etapa sumamente crítica en el cultivo de cualquier especie de peces, debido a la gran mortalidad (Martínez-Palacios *et al.* 2008) ocasionada principalmente por el periodo de transición entre la reabsorción del saco vitelino y la primera alimentación exógena de las larvas (Jones y Houde 1986; Watanabe y Kiron 1994;) o bien, por un

sistema digestivo inmaduro que dificulta la digestión del alimento artificial (Hoffer y Nassir-Uddin1985). El sistema digestivo de las larvas de peces está adaptado para la digestión de organismos zooplanctónicos (alimento vivo). Aunque, su capacidad para procesar alimentos artificiales ha sido muy discutida (Segner *et al.* 1989). Además, existen algunos factores cruciales que determinan el tamaño y el tipo de alimento que se les debe proporcionar a las larvas, como son cambios morfológicos, el tamaño de la boca y la diferenciación del tracto digestivo (Blaxter 1988).

Debido a la gran inversión requerida en la larvicultura de cualquier especie acuícola, es indispensable reducir o eliminar el período en el que se proporciona alimento vivo, para remplazarlo por dietas elaboradas. Desafortunadamente, al proporcionar dietas artificiales a las larvas, estas presentan menores tasas de crecimiento y supervivencia que al suministrar alimento vivo, posiblemente debido a la poca capacidad de las larvas para digerir el alimento artificial o inerte (Hoffer y Nasir Uddin, 1985; Martínez-Palacios *et al.* 2002).

Con el fin de establecer un estándar o línea base de alimentación confiable y reproducible lejos del zooplancton colectado para alimentar a larvas de pescado blanco (*C. estor*) y teniendo en cuenta tanto el carácter predador de las larvas como el tamaño de su boca, algunos investigadores han llevado a cabo el cultivo masivo de rotíferos de agua dulce y marinos (Campos-Mendoza 2000; Martínez Palacios *et al.* 2002).

Los primeros trabajos realizados con el rotífero de agua dulce *Brachionus rubens* mostraron que solamente los neonatos podrían ser usados debido al tamaño de la boca de la larva de *C. estor* (Campos-Mendoza 2000), pero mediante el cultivo en salinidades entre 5% y 10%, es posible utilizar el rotífero *Brachionus plicatilis*, cuyos tamaños varían en longitud de 90 a 150 μm , eliminando la necesidad de clasificarlos. Además, estos rotíferos pueden ser proporcionados a las larvas de pez blanco, usando hasta 20 rotíferos por mililitro en densidades de 10 y 20 larvas por litro (Martínez-Palacios *et al.* 2002).

De acuerdo a un estudio realizado por Martínez-Palacios *et al.* (2003), los rotíferos son alimentados con *Chlorella spp.*, y cultivados en salinidades de 5 a 10%. La experiencia obtenida en dicho trabajo permitió establecer un programa de alimentación exitoso que disminuye sustancialmente la gran mortalidad inicial de *C. estor* en las primeras etapas, en el cual, las larvas son alimentadas con rotíferos durante los primeros 15 días, para posteriormente ser alimentados con nauplios de *Artemia franciscana* hasta el día 30 post-eclosión, cuando es iniciado el destete mediante la sustitución de las presas vivas por alimento artificial. Sin embargo, estudios recientes indican que las larvas de *C. estor* pueden ser alimentadas con rotíferos por los primeros 30 días sin afectar el crecimiento y supervivencia, lo cual a su vez permite la eliminación del uso de artemia, uno de los insumos más costosos durante el cultivo larvario (Martínez Palacios *et al.* 2008).

IV.2.1 Destete de las larvas

El destete es un problema significativo en cualquier especie ya sea dulceacuícola o marina. En el caso de peces marinos, esta fase puede darse después de algunas semanas de vida, mientras que en peces de agua dulce puede ocurrir en etapas tempranas de desarrollo; incluso algunas especies dulceacuícolas pueden recibir dietas artificiales desde el momento en que las larvas abren la boca (Cahu y Zambonino-Infante, 1995).

La sustitución de alimento vivo por dietas compuestas en larvas, es crucial para poder disminuir los costos de producción y al mismo tiempo asegurar una producción sustentable de alta y constante calidad de juveniles. Hasta el momento, la sustitución de alimento vivo por dietas compuestas, es solamente posible algunas semanas después de su eclosión en el cultivo de peces marinos, mientras que, como se mencionó anteriormente, peces de agua dulce pueden ser alimentados con dietas artificiales tan pronto abren su boca, como las truchas y las mismas carpas (Cahu y Zambonino-Infante 2001).

Los estudios realizados con larvas de *C. estor* sugieren que el destete raramente puede ser logrado antes de dos o tres meses de edad, asemejándose mucho más a peces marinos en este aspecto (Martínez-Palacios *et al.* 2004)

Una particularidad del pez blanco de Pátzcuaro, es que normalmente no es voraz cuando empieza a consumir alimento artificial y comienza a serlo hasta que han pasado varias semanas del destete. Además, presenta poca capacidad para almacenar alimento en el tracto digestivo, debido a que carece de estómago y posee un intestino corto, lo que lo convierte en un consumidor frecuente, lo cual no es extraño en un pez zooplanctófago (Martínez-Palacios *et al.* 2002).

IV.2.2 Punto de no retorno y su importancia en la larvicultura

La mayor mortalidad en la crianza de muchas especies de peces (principalmente marinos) se observa durante la fase larvaria, principalmente entre los cinco y 12 días de edad. Al final de la fase lecitotrófica, ocurre una transición de alimentación exclusivamente exógena (Navarrete-Ramírez 2006). El momento crítico, ocurre entre los seis y siete días post-eclosión, dependiendo de la temperatura y la especie en estudio (Mendoza *et al.* 2001). Si las larvas no disponen de alimento suficiente hasta dicha edad, entran en un punto de ayuno irreversible, conocido como “punto de no retorno” y tiempo después mueren (Minkoff y Broadhurst, 2000). Es sumamente importante conocer el punto de no retorno en las larvas, con la finalidad de averiguar el tiempo que persisten sus reservas y el límite para ofrecerles alimento. En el caso específico del pez blanco, el punto de no retorno se presenta en el día ocho después de la eclosión (Ríos-Durán *et al.* 2014).

IV.3 Uso de microagregados y microencapsulados

El alimento artificial para larvicultura marina se emplea en la suplementación, así como también en el reemplazo parcial o total del alimento vivo (Jones 1998). Dicho alimento puede clasificarse, de acuerdo a su presentación, en alimento seco y alimento líquido (Pedroza-Islas *et al.* 2000). Los alimentos secos gozan de gran popularidad por ser los primeros en ser lanzados al mercado.

Algunos autores como Kanazawa *et al.* (1982) describieron la preparación de alimento microligado y microcubierto para larvas de camarón, como una alternativa sencilla a la microencapsulación, la cual disminuye los problemas de lixiviación y estabilidad (Teshima *et al.* 1993) tan comunes en los alimentos secos.

Más tarde en el año de 1993, Villamar y Langdon sofisticaron la preparación del alimento microencapsulado mediante la creación de una doble capa que cubre el núcleo de las cápsulas; y más recientemente, se ha introducido al mercado el alimento líquido, elaborado por medio de lipoesferas hidroestabilizadas y microemulsiones estables (Pedroza-Islas *et al.* 2000).

Sin embargo, las técnicas para elaborar alimento seco se han adecuado paulatinamente conforme el mercado se va diversificando. El secado por aspersión o spray drying es una técnica que ha sido poco explorada para este fin (Medina Reyna *et al.* en prensa), a pesar de que cuenta con gran potencial para ingredientes frescos y lábiles pues el producto obtenido presenta poca modificación química debido a la rapidez del proceso (Masters 1985; Dziezack 1988). Un ejemplo de ello, es un estudio realizado por Pedroza-Islas *et al.* (2000) sobre el uso de ficocoloides en la nebulización de microdietas para el larvicultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), en donde diseñaron y evaluaron fisicoquímicamente un alimento nebulizado (microparticulado), elaborado a partir de productos pesqueros regionales y ligantes como el k-Carragenano (KAR) o Alginato (ALGIN), mediante la adaptación del proceso anteriormente mencionado conocido como “spray-drying o nebulización”. Por medio de este proceso, lograron producir dietas microparticuladas adecuadas para alimentar a estas larvas, debido a su gran digestibilidad.

Los intentos por sustituir el suministro de presas vivas por alimentos inertes durante el cultivo de larvas de peces en condiciones experimentales, han mostrado diversos resultados en crecimiento y supervivencia. Además, características particulares de los alimentos inertes como la textura, el sabor, el color o el tamaño de la partícula han sido algunos de los factores que modifican

estos resultados, pues cuando dichas características no son las adecuadas para las larvas, se altera la aceptación y digestibilidad del alimento (Önal y Langdon 2000; Yúfera *et al.* 2000; Langdon 2003; Pedrozas-Islas *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004).

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

Al momento de desarrollar dietas microparticuladas adecuadas para el destete temprano de larvas, es sumamente importante que las partículas alimenticias sean estables en el agua, apetecibles, además de nutricionalmente completas y digeribles para las larvas (Baskerville-Bridges y Kling 2000). Sin embargo, aún falta información respecto a las capacidades digestivas y requerimientos nutricionales de las larvas de muchas especies de peces, por lo que es importante examinar múltiples parámetros de las dietas microparticuladas para explicar mejor su éxito o fracaso (Bengston 1993). Además, se debe realizar un análisis inicial de la microdieta en la columna de agua, que incluya la tasa de sedimentación y lixiviación de la partícula. Debido a que la tasa de sedimentación limita el tiempo que las partículas permanecen suspendidas y disponibles para ser depredadas por las larvas (Baskerville-Bridges y Kling 2000). Por otro lado, altas tasas de lixiviación pueden comprometer rápidamente la calidad nutricional de la dieta, aunque puede ser necesario un poco de lixiviación para estimular el consumo del alimento. Adicionalmente, es recomendable monitorear la palatabilidad de la partícula para verificar si las larvas están aceptando o rechazando la microdieta (Baskerville-Bridges y Kling 2000).

Los principales problemas encontrados en el desarrollo de dietas microparticuladas para larvas de peces están relacionados con la naturaleza intrínseca de las partículas alimenticias, como el sabor, color, textura, formulación de la dieta y tamaño de partícula, puesto que estos factores afectan la aceptación, digestibilidad y lixiviación de los nutrientes en la dieta (Önal y Langdon 2000).

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

Otro problema relacionado con el consumo de microdietas, es su baja aceptación en comparación con el alimento vivo, lo que impide que las larvas puedan satisfacer sus requerimientos nutricionales (Person-Le Ruyet *et al.* 1993). No obstante, para que las microdietas puedan ser aceptadas, estas deben ser atractivas para las larvas y proporcionadas en condiciones propicias, debido a que el sistema sensorial de las larvas recién eclosionadas no está completamente desarrollado. De acuerdo con Önal y Langdon (2000), las condiciones ambientales facilitan una buena agudeza sensorial y probablemente son necesarias para maximizar la aceptabilidad la partícula.

La suma de todos los factores anteriormente mencionados, ha llevado a los investigadores a la búsqueda y propuesta de otro tipo de alimentos como los microagregados (alimentos secados por aspersión) elaborados a base de carne de pescado, levaduras, pasta de soya, etc., tratando de sustituir total y/o parcialmente

el alimento vivo. El secado por aspersión o “spray-drying”, es actualmente una de las tecnologías más utilizadas en la industria farmacéutica y alimentaria, la cual ha sido recientemente introducida en la larvicultura marina, ya que es un proceso ideal donde el producto final (microagregado) cumple con las normas de calidad en relación con la distribución del tamaño de partícula, el contenido de humedad residual, densidad aparente y morfología (Patel *et al.* 2009). Sin embargo, para lograr un secado por aspersión adecuado, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones como contar con alimentos de alta calidad que mantengan un ambiente saludable, que reduzcan el riesgo de enfermedades y permitan disminuir los costos que involucra la producción del alimento vivo (Pedroza-Islas *et al.* 2000). Además, una formulación eficiente basada en los requerimientos de la especie, requiere de una selección adecuada de ingredientes y una preparación apropiada que permita preservar la biodisponibilidad de los nutrientes (Yúfera *et al.* 2000).

Aunque a la fecha se ha realizado mucha investigación sobre dietas microparticuladas para larvas de peces, aún no se ha logrado desarrollar un alimento equivalente al alimento vivo. No obstante, algunas larvas de peces dulceacuícolas como la farra (*Coregonus lavaratus*), la carpa común (*Cyprinus carpio*), el Ayu (*Plecoglossus altivelus*) y la perca (*Micropterus dolomieuvi*) han sido criados totalmente con dietas artificiales (Jones *et al.* 1993). Sin embargo, el remplazo total de alimento vivo por dietas formuladas para larvas de peces marinos ha sido muy problemático y es algo por resolver (Önal y Langdon 2000).

IV.3.1 Tamaño de la dieta

Las dietas para larvas deben ser preparadas como micropartículas cuyos tamaños deben ser adecuados al tamaño de la boca de las mismas. En general, el tamaño de las micropartículas comerciales y experimentales, utilizadas comúnmente para destete de larvas de peces (principalmente marinos) oscila entre 50 y 600 μ de acuerdo a la edad y tamaño de boca (Cahu y Zambonino-Infante 1994; Cahu y Zambonino-Infante 2001).

Un tamaño preciso de las micropartículas es esencial en la alimentación de las larvas (Cahu y Zambonino-Infante, 2001), debido a que micropartículas muy pequeñas (menores a 50 micras de diámetro) no pueden ser fácilmente detectadas por las larvas, mientras que partículas muy grandes son difíciles de ingerir e incluso pueden promover una obstrucción de la válvula digestiva dependiendo de la especie (Walford *et al.* 1991).

Antes de elaborar cualquier tipo de microdieta para larvas de peces, es muy importante tener en cuenta que la composición de las micropartículas debe ser homogénea, por lo tanto los ingredientes deben ser incorporados en partículas muy finas. Por esta razón, las partículas de la harina deben ser más pequeñas que el tamaño final de la micropartícula. Además, algunos tipos de harina, como la de pescado, deben ser finamente molidas y tamizadas antes de ser incluidas en las microdietas (Cahu y Zambonino-Infante 2001). Por lo anterior los molinos de cualquier tipo poseen limitantes para reducir los tamaños de partícula a menos de 10 micras y es donde los homogenizadores en líquido tienen que ser utilizados, para alcanzar estos tamaños de partícula que serán usados como ingredientes de las micropartículas (Bibliografía ¿????)

En un estudio realizado con larvas de besugo, Fernández-Díaz *et al.* (1994) demostraron claramente que las larvas seleccionan el tamaño de las microcapsulas que ingieren de acuerdo a su tamaño y amplitud de la boca.

En el caso particular del pez blanco de Pátzcuaro (*C. estor*), se ha observado que las larvas tienen una gran selectividad en el tamaño del alimento que consumen, pues partículas igual o más grandes que el tamaño de su boca no pueden ser ingeridas. Además, el alimento proporcionado debe mantenerse el mayor tiempo posible en la superficie del agua o bien sedimentarse lentamente, debido a que las crías en esta especie al inicio de su alimentación no toman el alimento del fondo. Al mismo tiempo, es importante tomar en cuenta que habrá que ofrecer el alimento frecuentemente para que se encuentre siempre disponible para las larvas (Martínez-Palacios *et al.* 2002).

IV.3.2 Distribución y consumo de microdieta

Las dietas microparticuladas deben ser ofrecidas y distribuidas en exceso, al inicio del cultivo, debido que las larvas en estadio temprano tienen un movimiento limitado y el consumo es provocado por estímulos visuales y químicos, por lo que las microparticulas deben ser capturadas mientras caen en la columna de agua. Además, la intensidad de luz, color de las micropartículas y el color del tanque son esenciales en el consumo de la dieta (Cahu y Zambonino-Infante 2001). Algunos pigmentos, como astaxantina, han sido incorporados en las microdietas, más por una mayor visibilidad de la partícula que por su valor nutricional. Algunos aminoácidos libres como alanina, glicina, arginina y la betaína compuesta, han sido identificados como estimulantes químicos para el consumo de microdietas en larvas de dorada (Kolkovski *et al.* 1997).

De acuerdo con Cahu y Zambonino-Infante (2001), muchas especies de larvas, exhiben un comportamiento de captura e ingieren micropartículas inertes desde su primera alimentación, lo cual es particularmente sencillo observar examinando el contenido intestinal de las larvas bajo un microscopio óptico. Por lo tanto, de acuerdo con estos autores, el consumo no es un factor limitante para la alimentación de larvas con dietas compuestas.

IV.4 Requerimiento de proteína en la dieta

Las proteínas son uno de los nutrientes más importantes para los peces, ya que son necesarias para el crecimiento de tejido, mantenimiento, reproducción y entrar en las vías catabólicas como una importante fuente de energía. Los requerimientos de proteína de los peces están influenciados por diferentes factores como la edad, la calidad de los ingredientes en la dieta, la relación energía-proteína, la tasa de alimentación, etc., los cuales serán reflejados en el crecimiento y la calidad del pez (Tacon 1989).

En general, los requerimientos nutricionales de las larvas parecen ser diametralmente distintos a los de peces juveniles y reproductores. Por ejemplo, la incorporación de proteína hidrolizada en el alimento puede ser determinante para

el crecimiento y supervivencia de las larvas, mientras que dichas proteínas pueden o no inducir efectos benéficos en juveniles (Cahu y Zambonino-Infante 2001). Además, los requerimientos de proteína en larvas son más altos que en larvas y juveniles y estos que en adultos de la misma especie (Cahu y Zambonino-Infante 2001). Esta diferencia se atribuye a la alta tasa de crecimiento y el gran uso de proteína como fuente de energía en larvas (Dabrowski 1986).

Martínez-Palacios *et al.* (2007), realizaron un experimento con juveniles de *C. estor* usando dietas isoenergéticas con diferentes niveles de proteína, para determinar su requerimiento. El mejor consumo de alimento, ganancia de peso específico, crecimiento y supervivencia se lograron con niveles de proteína entre 400 y 500 g kg⁻¹. Un análisis de punto de quiebre (broken line) del aumento de peso individual contra el nivel de proteína mostró un requerimiento de proteína de 409 g kg⁻¹ para juveniles de *C. estor*. Esta información sobre los requerimientos de proteína son los primeros reportados para cualquier pez atheriniforme.

IV.5 Proporción de proteínas fibrosas y solubles en la dieta

En peces agástricos con intestino corto como el pez blanco (Martínez-Palacios *et al.* 2008), es sumamente importante la digestión intracelular o citosólica, ya que estudios recientes sugieren que las larvas de *C. estor* cuentan con un perfil de enzimas apropiado para digerir proteínas eficientemente (Toledo-Cuevas *et al.* 2011). Sin embargo, es posible que el pez blanco mantenga una digestión citosólica durante toda su vida, como sucede en otras especies sin estómago (Lauff y Hoffer 1984; Zambonino-Infante y Cahu 1994; Ma *et al.* 2005). Es probable que esta sea una de las razones por las cuales la especie no responde de manera óptima al uso de dietas artificiales y además es posible que se requieran proteínas de fácil digestión que puedan ser digeridas intracelularmente, como las proteínas solubles.

Pérez *et al.* (2012) realizaron un estudio con el fin de evaluar los efectos del uso de diferentes proporciones de proteína soluble en la dieta en el crecimiento, supervivencia y composición corporal de juveniles de *C. estor*. En el

cual, se probaron cinco dietas isoenergéticas (439 g Kg⁻¹ proteína y 124 g Kg⁻¹ lípidos) por triplicado, en las que se mezclaron proteínas solubles (PS) con Harina de pescado (HP), en diferentes proporciones: 100%HP; 75%HP: 25%PS; 50%HP: 50%PS; 25%HP: 75%PS y 12.5%HP: 87.5%PS. En donde, contrario a lo esperado, las dietas con mayor proporción de proteínas solubles no mostraron mejores crecimientos, ya que niveles intermedios (75HP:25PS y 50HP:50P) resultaron ser mejores para los juveniles de *C. estor*, mientras que el uso de dietas cuya única fuente proteínica es la harina de pescado (HP) repercute negativamente en el crecimiento y supervivencia de los animales. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar si las dietas con mayor proporción de proteínas solubles pudieran ser deficientes en alguno de los aminoácidos esenciales para estos peces y de esta forma saber si esto es una posible razón de la obtención del menor crecimiento en los organismos.

V. JUSTIFICACIÓN

No existe información disponible sobre la calidad de los ingredientes que deben constituir las primeras dietas para larvas de pez blanco, así como también se desconoce el tiempo adecuado de destete. Esta información es fundamental para desarrollar una adecuada formulación que permita un mejor crecimiento, supervivencia y utilización del alimento por las larvas de esta especie. El desarrollo de dietas *ad hoc* para las larvas de pez blanco permitirá un mejor manejo de la especie en sistemas intensivos de cultivo, reduciendo el uso de alimento vivo.

VI. HIPÓTESIS

Las larvas de pez blanco tienen la capacidad de consumir alimento microparticulado sin efectos negativos en el crecimiento y la supervivencia.

Una proporción de fuentes de proteína soluble en la dieta tiene un efecto en el crecimiento y la supervivencia de las larvas.

VII. OBJETIVOS

VII.1 Objetivo general

Determinar el tiempo de destete más adecuado para los peces, utilizando una microdieta comercial (Otohime A1®) y desarrollar una dieta microagregada como primer alimento para larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*).

VII.2 Objetivos específicos

1. Determinar el tiempo mínimo de destete en larvas de pez blanco utilizando una dieta comercial (Otohime A1®, Japón).
2. Diseñar una microdieta similar a una dieta comercial (like-Otohime), para probar la calidad de los ingredientes utilizados, la formulación y su eficiencia en el crecimiento y supervivencia de larvas de pez blanco.
3. Evaluar el desempeño de las larvas de pez blanco alimentadas con tres microdietas diseñadas, utilizando diferentes proporciones de proteína (fibrosa y soluble) comparadas con la microdieta comercial y like-Otohime para probar su eficacia en el crecimiento y supervivencia de las larvas.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Antes de realizar cualquier experimento, se realizó un pre-experimento para saber si las larvas de pez blanco podrían consumir una microdieta comercial (Otohime A1®), y averiguar si esta microdieta podría permitir una supervivencia de las larvas similar a la obtenida con alimento vivo. Para ello, se sembraron dos lotes de cien larvas cada uno, colocadas en dos tanques de recirculación con un volumen de 5L de agua, una temperatura promedio de $\pm 22^{\circ}\text{C}$, una salinidad de $\pm 7\text{ppm}$ y un fotoperiodo de luz continua (24:0), en donde se evaluaron dos tratamientos de alimentación:

T-1: Las larvas fueron alimentadas únicamente con la microdieta comercial (Otohime A1®) desde el momento de la eclosión hasta los 30 dpe.

T-C: Las larvas fueron alimentadas únicamente con rotífero (*B. plicatillis*) hasta los 30 dpe.

Al final del pre-experimento, se midió el crecimiento (longitud total) y supervivencia de las larvas en cada tratamiento. Probando que las larvas de *C. estor* consumen la dieta artificial como único alimento desde la eclosión y llegan hasta juveniles consumiendo solamente esta dieta.

Una vez que se demostró que las larvas podían consumir microdietas desde el momento de la eclosión, se llevaron a cabo dos experimentos de alimentación para estimar el mejor tiempo de destete, así como determinar cuál es la proporción de ingredientes proteínicos más adecuada en etapas tempranas de desarrollo. Para tal fin, se utilizaron larvas recién eclosionadas de *C. estor* producidas en el laboratorio de Acuicultura y Nutrición de Peces del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), Morelia, Michoacán, México.

VIII. 1 Diseño experimental

VIII. 1.1 Primer experimento

Para estimar el tiempo mínimo de destete en larvas de pez blanco, se evaluaron cuatro tratamientos de alimentación con cinco repeticiones cada uno, teniendo un total 20 unidades experimentales. El sistema experimental consistió en un sistema de recirculación con 20 tanques, en cada uno de los cuales se sembraron 100 larvas recién eclosionadas. Durante el desarrollo del experimento se evaluaron diferentes tiempos de destete con una microdieta comercial (Otohime A1®), cuya proporción es de 52% proteína y 21% de lípidos y se comparó el desempeño de las larvas con el obtenido por larvas alimentadas únicamente con rotíferos (*Brachionus plicatilis*). Los tratamientos experimentales se describen a continuación:

- **T1:** Las larvas fueron alimentadas únicamente con la microdieta desde el momento de la eclosión hasta los 30 días post-eclosión (dpe), sin consumo de alimento vivo (rotíferos).
- **T2:** Las larvas fueron alimentadas con rotíferos durante los primeros cinco dpe. Del día tres al cinco estas fueron alimentadas combinando rotífero y la microdieta (Otohime A1®). A partir del día cinco inició el destete de las larvas y estas fueron alimentadas únicamente con la microdieta hasta los 30 días dpe.
- **T3:** Las larvas fueron alimentadas con rotíferos durante los primeros 10 dpe. Del día siete al diez fueron alimentadas combinando rotíferos y la microdieta (Otohime A1®). A partir del día 10 se destetaron a las larvas y fueron alimentadas únicamente con la microdieta hasta los 30 días dpe.
- **Tratamiento control:** Las larvas fueron alimentadas únicamente con alimento vivo (rotíferos) desde el momento de la eclosión hasta los 30 días dpe.

Se evaluó el crecimiento (peso y longitud final) y supervivencia de las larvas.

VIII.1.2 Segundo experimento

Se realizó un segundo experimento para estimar la mejor proporción de fuentes de proteína fibrosas y solubles en la dieta, y al mismo tiempo, se probó la eficiencia de una dieta similar a la dieta comercial (Otohime A1®) a la cual se le denominó “like-Otohime”. A partir de los resultados obtenidos en el primer experimento, se escogió el tiempo mínimo de destete en el cual se obtuvo la mayor supervivencia de los organismos. Debido a que el mejor tiempo de destete en el cual se obtuvo el mayor crecimiento y supervivencia de las larvas fue en el día 10, las larvas fueron alimentadas con rotífero (*B. plicatilis*) durante los primeros 10 dpe, y fueron destetadas a partir de ese momento con las dietas experimentales.

Se evaluaron cinco tratamientos, correspondientes a cuatro dietas experimentales y un control, con cinco repeticiones cada uno, teniendo un total de 25 unidades experimentales. Se tuvieron entonces 25 tanques en un sistema de recirculación, en cada uno de los cuales se sembraron 100 larvas recién eclosionadas, para determinar cuál de las dietas permitiría una mejor supervivencia y crecimiento de las larvas. Los tratamientos experimentales se plantearon como se describen a continuación:

P1: Las larvas fueron alimentadas con rotíferos hasta los 10 dpe y posteriormente fueron destetadas con una microdieta cuya proporción fue de 75% de proteína fibrosa y 25% de proteína soluble hasta los 30 días dpe.

P2: Las larvas fueron alimentadas con rotíferos hasta los 10 dpe y posteriormente fueron destetadas con una microdieta cuya proporción fue de 50% de proteína fibrosa y 50% de proteína soluble hasta los 30 dpe.

P3: Las larvas fueron alimentadas con rotíferos hasta los 10 dpe y posteriormente fueron destetadas con una microdieta con una proporción de 25% de proteína fibrosa y 75% de proteína soluble hasta los 30 días dpe.

P4: Las larvas fueron alimentadas con rotíferos hasta los 10 dpe y posteriormente fueron destetadas con la microdieta similar a Otohime (*like-Otohime*) hasta los 30 dpe.

P5: Las larvas fueron alimentadas inicialmente con rotíferos y posteriormente fueron destetadas a los 10dpe para ser alimentadas únicamente con la microdieta comercial Otohime A1® hasta los 30 dpe.

Todos los tratamientos fueron comparados con el tratamiento control (P5: Destete con Otohime A1®). Se evaluó el crecimiento (en peso seco y longitud final) y la supervivencia de las larvas.

VIII.1.3 Química del agua

En ambos experimentos, se evaluó diariamente temperatura con la ayuda de un termómetro de mercurio, la salinidad con un refractómetro marca ATAGO S/Mill-E y el oxígeno disuelto con un equipo YSI 55/25. El pH se determinó por medio de un potenciómetro Fisher Modelo Accumet. El amonio y nitrito se determinaron por espectrofotometría cada tercer día con la ayuda de un Fotómetro modelo 9500 marca YSI.

VIII.1.4 Análisis proximal de ingredientes y microdietas

Se analizó el perfil bromatológico de los macro-ingredientes y la dieta basal (Otohime A1®) para formular las microdietas de todos los experimentos, así como de las microdietas una vez elaboradas. Se realizó un análisis de la humedad de las muestras mediante secado a 105 °C por 24 horas; y se analizaron la grasa cruda por extracción con éter utilizando una unidad de extracción automática Foss Tecator (2050 Soxtec Avanti); la proteína cruda (N x 6.25) mediante el método Dumas (Ebling, 1968) usando un analizador de Nitrógeno (Leco FP 528) y se analizó la ceniza por incineración a 550 °C en una mufla y finalmente se calculó el extracto libre de nitrógeno (ELN) de la siguiente manera: $ELN = 100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cenizas})$. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los

análisis de las dietas se realizaron de acuerdo con los métodos establecidos por la AOAC (2000).

VIII.1.5 Análisis de distribución de tamaño de las microdietas

Se obtuvieron distribuciones volumétricas y acumulativas de tamaño del alimento nebulizado con un analizador de tamaños de partículas Malvern 2600 SBOD (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra), usando un modelo log normal (Masters, 1985). Este equipo proporcionó un estimado del valor medio del diámetro al 50% de la fracción acumulativa del volumen (FAV). El diámetro medio (d50) y la desviación estándar aritmética ($s_a = 0.5 [d_{84} - d_{16}]$) se calculó a partir de la curva de distribución acumulativa.

VIII.1.6 Morfología de las microdietas

Una vez que se probó la eficacia (en términos de crecimiento y supervivencia de las larvas) de cada dieta microagregada, se examinaron la estructura externa y la forma de cada microdieta, posteriormente se tomaron fotografías al microscopio electrónico de barrido; las muestras se recubrieron con grafito y cobre metálico por medio de un evaporador de metales JEOL. A continuación dicha muestra se analizó con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6400 scanning microscope), con el cual se observaron diversas características del alimento nebulizado como: forma, pared y posibles fracturas (Rosemberg *et al.*, 1988).

VIII.1.7 Análisis de datos

Los resultados obtenidos para análisis proximales, parámetros de crecimiento y supervivencia fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA a una vía, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$). Se compararon las medias entre los diferentes tratamientos, y se realizaron pruebas de *post hoc* de Tukey ($\alpha = 0.05$).

VIII.2 Elaboración de dietas microagregadas

Una vez que se demostró que las larvas podían consumir la microdieta comercial e incluso pueden ser destetadas desde la eclosión, se procedió a elaborar las microdietas que fueron probadas en el segundo experimento. Para ello, se realizó una estancia de investigación en el Laboratorio de Biopolímeros de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Iberoamericana, Ciudad de México, en donde se elaboraron tres microdietas tomando como base la microdieta comercial Otohime A1® (55 % de proteína y 21% de lípidos). Para lo cual, se combinaron diferentes proporciones de fuentes de proteínas fibrosas (f) (músculo de pescado y calamar) y solubles (s) (WPC80, albúmina de huevo, caseinato de calcio, krill seco y germen de trigo), en proporciones que van de 75%f-25%s, 50%f-50%s y 25%f-75%s, respectivamente. Dichas microdietas fueron preparadas como microagregados.

Con base en resultados obtenidos con la microdieta comercial (Otohime A1®), se decidió elaborar una cuarta microdieta, similar a esta a la que se denominó “like-Otohime”, utilizando distintos tipos de ingredientes como músculo de calamar, pescado, krill seco, albúmina de huevo, aceite de pescado, aceite de canola, almidón, BHT, Lecitina, Orozuz, Goma guar, Stay C-35, Taurina, Colina, extracto de manzana, Betaina, Pre-mezcla de vitaminas y minerales con la finalidad de probar la eficiencia de los ingredientes utilizados y alcanzar o incluso superar los resultados obtenidos con Otohime A1®.

Para alcanzar una mejor flotabilidad de las partículas que serían ingeridas por las larvas, cada una de las microdietas experimentales fue cubierta con proteína soluble (WPC80), utilizando un secador de lecho fluidizado con el fin de otorgar mayor tiempo de estabilidad a la partícula. A continuación se describe detalladamente la fabricación, secado, cobertura, tamaño de partícula, análisis de humedad y absorción de agua de las dietas microagregadas:

Antes de iniciar la fabricación de las dietas microagregadas, se realizaron cuatro formulaciones distintas, tomando como línea base algunos ingredientes de

la microdieta comercial (krill seco, pescado, calamar, almidón de papa, aceite de pescado, betahina, lecitina de soya, goma guar, orozuz, extracto de manzana, entre otros) y utilizando el mismo nivel de proteínas y lípidos en la dieta (55% y 21%, respectivamente). Los ingredientes fueron pesados utilizando una balanza analítica. Posteriormente, la mayor parte de los ingredientes fueron mezclados con agua en un mezclador Caframo®, con excepción del WPC80, el caseinato de calcio y los aceites (pescado, lecitina de soya y canola) los cuales fueron utilizados separadamente para realizar una emulsión simple. Finalmente, dicha emulsión fue añadida a la mezcla que contenía el resto de los ingredientes hasta formar una solución homogénea, utilizando un homogeneizador Silverson® a una velocidad de aproximadamente 10,000 rpm, dependiendo de la muestra a homogenizar.

VIII.2.1 Elaboración de la emulsión simple (aceite-agua)

Para realizar la emulsión simple, el WPC80 y el caseinato de calcio fueron mezclados con agua mediante un mezclador Caframo® hasta formar una solución homogénea, posteriormente dicha mezcla fue colocada en un recipiente, sobre una vasija con hielo para evitar que dicho recipiente se rompiera y pudiera formarse la emulsión. El aceite de pescado, la lecitina de soya y el aceite de canola fueron mezclados en un vaso de precipitados con la ayuda de un agitador de vidrio hasta formar una mezcla de color uniforme (café oscuro). Posteriormente, la mezcla de los aceites (pescado, canola y lecitina de soya) fue añadida gota a gota sobre la mezcla de proteínas (WPC80 y caseinato de calcio) con la ayuda de un homogeneizador Silverson® a una velocidad promedio de 9,000 rpm., hasta completar la emulsión.

VIII.2.2 Secado de las dietas por spray

Para el secado de las dietas por spray se utilizó un secador por aspersion (Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark Model Minor 1982), con una capacidad de evaporación de 7kg. La solución final fue colocada sobre un vaso de precipitado de 1L, para posteriormente ser absorbida por medio de una bomba peristáltica hasta la boquilla de nebulización, donde el líquido fue atomizado a una presión de atomización de 2.8 bars (kg/cm²) y una velocidad de flujo de 30 ml/min. La mezcla

líquida fue atomizada con aire caliente en la cámara de secado, a temperatura de entrada de 185°C y una temperatura de salida de 76°C, dicha temperatura evaporó la humedad de la mezcla, aglutinando el material y formando partículas secas, las cuales se colectaron en la cámara de secado, utilizando un ciclón para recuperarlas de los gases de escape.

VIII.2.3 Cobertura de las microdietas

Una vez que las microdietas fueron secadas en el secador por aspersión (spray-drying), estas fueron cubiertas con WPC80 mediante un secador de lecho fluidizado (marca Aeromatic®), a fin de otorgar a las mismas una mayor flotabilidad en la columna de agua, para lo cual se utilizó una boquilla de cubierta de 1.1 mm. y un cono de atomización de 2.5 mm., a una presión de 0.8 bars (Kg/cm²). La velocidad de flujo o alimentación fue de 15 ml/min. El secado se realizó a una temperatura de entrada de 80 °C y una temperatura de salida de 60°C.

VIII.2.4 Tamaño de partícula

Se analizó el tamaño de partícula de cada una de las dietas microagregadas, utilizando un analizador de tamaño de partícula (Mastersizer 2000).

VIII.2.5 Flotabilidad de la partícula (Velocidad de hundimiento)

Posteriormente se realizaron pruebas de flotabilidad por triplicado de cada una de las dietas microagregadas, para lo cual se utilizó una probeta de 1L y un cronómetro, con el cual se estimó el tiempo que tardó la partícula en caer al fondo de la probeta (FAO, 1994).

VIII.2.6 Humedad de las dietas microagregadas

Las microdietas fueron introducidas a una estufa de secado a 80 °C por aproximadamente 20 minutos a fin de eliminar el exceso de humedad en las mismas. Posteriormente se pesaron 5 gramos de cada muestra para determinar

su humedad (en porcentaje) con la ayuda de una termobalanza (Ohaus® MB 45). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

VIII.2.7 Análisis de absorción de agua

Se analizó la absorción de agua de cada una de las dietas microagregadas, mediante el método propuesto por Torgersen y Toledo (1977). Dicho método consiste en un filtro bacteriológico Milipore de 4 cm de diámetro, sobre el cual se coloca un papel filtro tipo Whatman. El papel filtro es colocado sobre una base de plástico hueca, la cual está conectada a una manguera flexible, y está a su vez, a una pipeta graduada de 1 ó 2 ml, sostenida en posición horizontal y al mismo nivel que el papel filtro. Para estimar la absorción de agua de la muestra, la manguera se llenó con agua evitando la incorporación de burbujas y se colocó el papel filtro dejando que absorbiera agua por 5 min. Posteriormente, con un papel absorbente se eliminó el exceso de agua sobre el papel filtro hasta lograr llevar a cero la columna de agua en la pipeta. Una vez que la pipeta se llenó de agua y se colocó al mismo nivel que la base donde se encuentra el papel filtro, se colocaron 50 a 100 mg de muestra sobre el filtro húmedo, estos se esparcieron rápidamente formando una capa uniforme sobre el papel filtro mojado y se comenzó a contar el tiempo con la ayuda de un cronómetro para registrar el retroceso de la columna de agua en la pipeta, hasta que la muestra dejara de absorber agua, es decir, que la columna de agua dejara de moverse dentro de la pipeta y no hubiera variación en el tiempo (Figura 1).

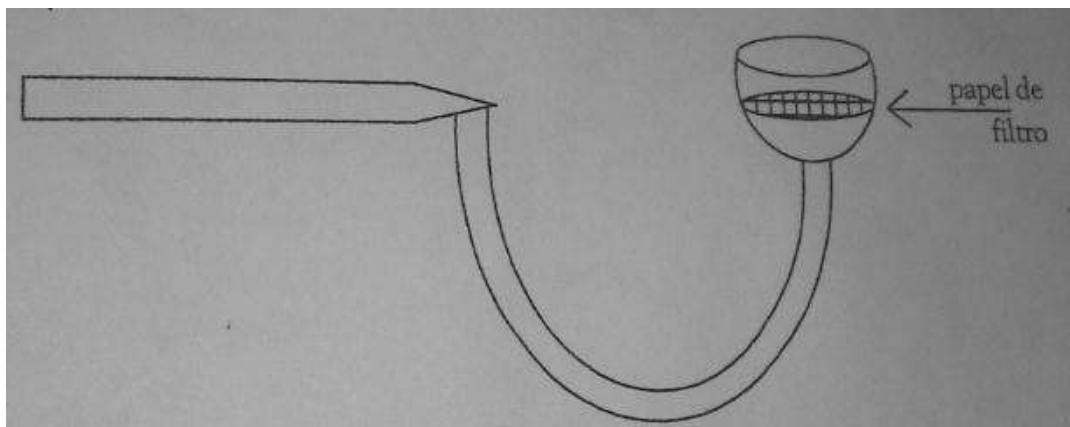


Figura 1. Equipo utilizado para la determinación de absorción de agua.

IX. RESULTADOS

IX.1 Pre-experimento de alimentación de larvas de *C. estor*

Los resultados del pre-experimento mostraron que las larvas de *C. estor* alimentadas únicamente con la micodieta comercial (Otohime A1®) desde el momento de la eclosión hasta los 30 dpe, tuvieron una menor supervivencia que las larvas alimentadas únicamente con rotífero (figura 2).

En cuanto a la longitud total del cuerpo, las larvas alimentadas con la micodieta tuvieron una longitud total promedio menor que las larvas alimentadas únicamente con rotífero (Figura3). Estos resultados cualitativos mostraron que las larvas pueden ser alimentadas con una micodieta desde el momento de la eclosión, por lo que una alimentación combinando rotífero y micodieta puede incrementar la supervivencia de las larvas. Sin embargo, es importante señalar que la baja supervivencia de las larvas pudo ser ocasionada, en parte, por la falta de alimentadores automáticos, ya que las larvas no eran alimentadas durante la noche y permanecían más de 10 horas en ayuno, además, de la poca experiencia en el manejo. Por lo cual, con el fin de evitar que las larvas murieran por factores externos al experimento, se determinó adquirir alimentadores automáticos (BOYU®) para los tratamientos en los cuales las larvas fueron alimentadas únicamente con la dieta microagregada.

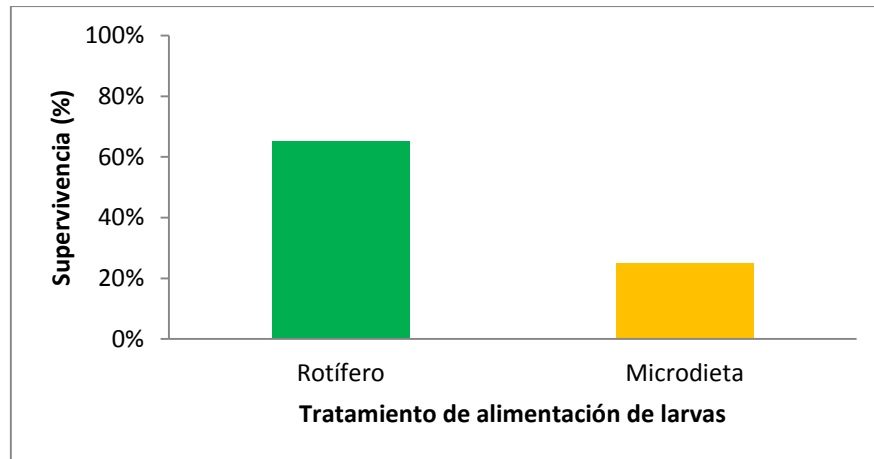


Figura 2. Porcentaje de supervivencia de larvas alimentadas con rotífero (*Brachionus plicatillis*) y larvas destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) a los 0 dpe (n=100).

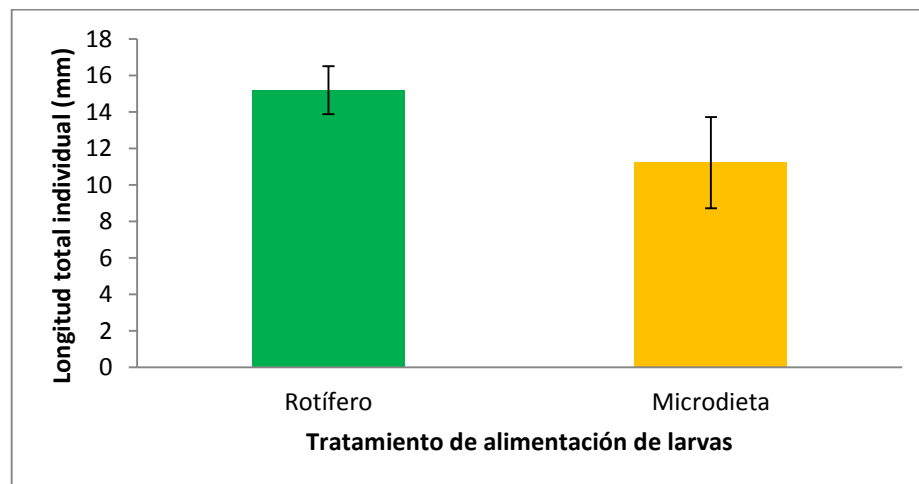


Figura 3. Longitud total de larvas alimentadas con rotífero (*B. plicatillis*) y larvas destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) desde los 0 dpe (n=100).

IX.2 Tiempo mínimo de destete de larvas

Los resultados de este experimento muestran que existen diferencias significativas en cuanto a peso seco, longitud y supervivencia larvaria ($p < 0.005$) entre los distintos tratamientos de alimentación.

Las larvas alimentadas únicamente con rotífero (R) en términos de peso seco promedio, No tuvieron diferencias significativas ($p>0.05$) con las larvas que fueron destetadas con la microdieta comercial a los 10 dpe y las larvas destetadas a los 5 dpe. Las larvas alimentadas con la microdieta comercial desde los 0dpe, obtuvieron el menor peso seco, y no presentaron diferencias significativas con aquellas destetadas a los 5 dpe (Figura 4). Existen diferencias significativas ($p<0.001$) en el peso de las larvas del tratamiento control, alimentadas únicamente con rotífero (R), y el tratamiento donde fueron alimentadas con la microdieta comercial desde los 0dpe, así como también, existen diferencias significativas ($p<0.05$) en el peso de las que fueron destetadas a los 10dpe y las larvas alimentadas con la microdieta comercial desde los 0dpe (Figura 4).

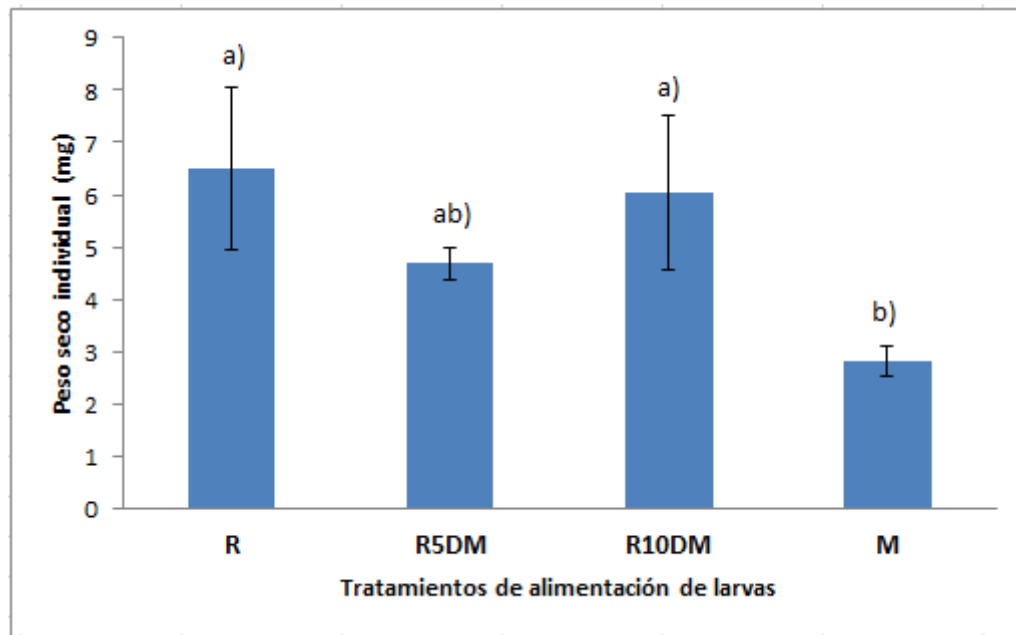


Figura 4. Peso seco individual final de larvas alimentadas durante 30 días con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) a los 0, 5 y 10 dpe. R: Larvas alimentadas con rotífero, 0 dpe: destetadas con la microdieta comercial a los cero días post-eclosión. 5 dpe: destetadas a los cinco días post-eclosión y 10 dpe: destetadas a los 10 días post-eclosión. Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación ($p<0.05$).

Las larvas alimentadas únicamente con rotífero (R), presentaron la mayor longitud, sin existir diferencias significativas ($p > 0.05$) con las que fueron destetadas con la microdieta a los 10 dpe. Las larvas que fueron destetadas a los 5 dpe y aquellas alimentadas con la microdieta desde los 0 dpe, tuvieron una menor longitud comparada con las dos anteriores (Figura 5). Existen diferencias significativas ($p < 0.001$) en la longitud de las larvas alimentadas únicamente con rotífero (R) y las que fueron alimentadas con la microdieta desde los 0 dpe. También existen diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las larvas alimentadas únicamente con rotífero (R) y las larvas destetadas a los 5 dpe.) (Figura 5).

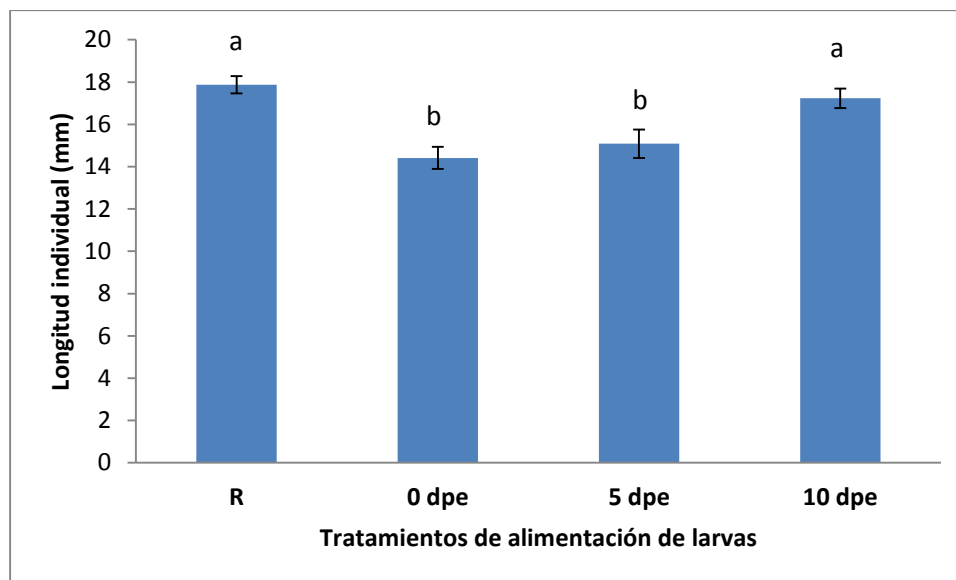


Figura 5. Longitud de larvas alimentadas durante 30 días con rotífero (*B. plicatilis*) y destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) a los 0, 5 y 10 dpe. R: Larvas alimentadas con rotífero, 0 dpe: destetadas con la microdieta comercial a los cero días post-eclosión. 5 dpe: destetadas a los cinco días post-eclosión y 10 dpe: destetadas a los 10 días post-eclosión. Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación ($p < 0.05$).

Las larvas de *C. estor* alimentadas únicamente con rotífero (R) presentaron la mayor tasa de supervivencia, sin presentarse diferencias significativas ($p > 0.05$) con las larvas destetadas a los 10 dpe. Las larvas destetadas a los cero y cinco

días post-eclosión (0 y 5 dpe) presentaron una supervivencia significativamente menor ($p < 0.05$) (Figura 6).

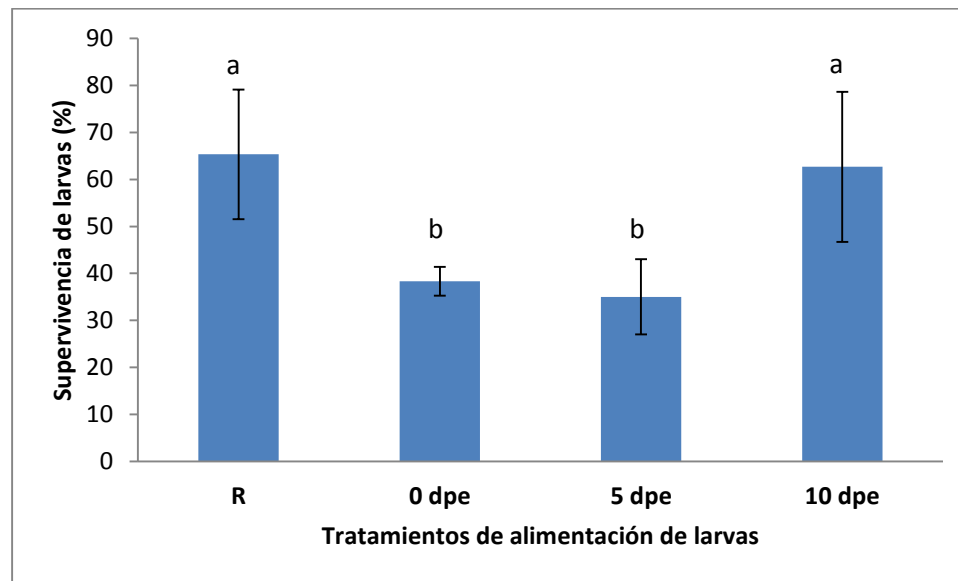


Figura 6. Supervivencia de larvas alimentadas durante 30 días con rotíferos (*B. plicatillis*) y destetadas con microdieta comercial (Otohime A1®) a los 0, 5 y 10 dpe. R: Larvas alimentadas con rotífero, 0 dpe: destetadas con la microdieta comercial a los cero días post-eclosión. 5 dpe: destetadas a los cinco días post-eclosión y 10 dpe: destetadas a los 10 días post-eclosión. Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación ($p < 0.05$).

La tabla 1 muestra los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos del agua registrados durante el experimento (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, nitrito, nitratos y amonio) de alimentación de larvas de *C. estor*.

Tabla 1. Valores (promedio \pm desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el experimento.

PARÁMETRO	VALOR
Temperatura (°C)	23.00 \pm 0.55
Salinidad (gL ⁻¹)	7.30 \pm 1.26
Oxígeno disuelto(mgL ⁻¹)	6.08 \pm 0.48
pH	8.44 \pm 0.15
Nitritos (mgL ⁻¹ NO ₂)	0.04 \pm 0.01
Nitratos (mgL ⁻¹ NO ₃)	3.46 \pm 0.59
Amonio (mgL ⁻¹ NH ₄)	0.04 \pm 0.02

IX.3 Mejor proporción de proteínas en la dieta

Los resultados muestran que únicamente existen diferencias significativas ($p=0.037$) entre el peso seco final de las larvas alimentadas con la microdieta 25f:75s y las alimentadas con la microdieta control Otohime A1® (TO) (Figura 7).

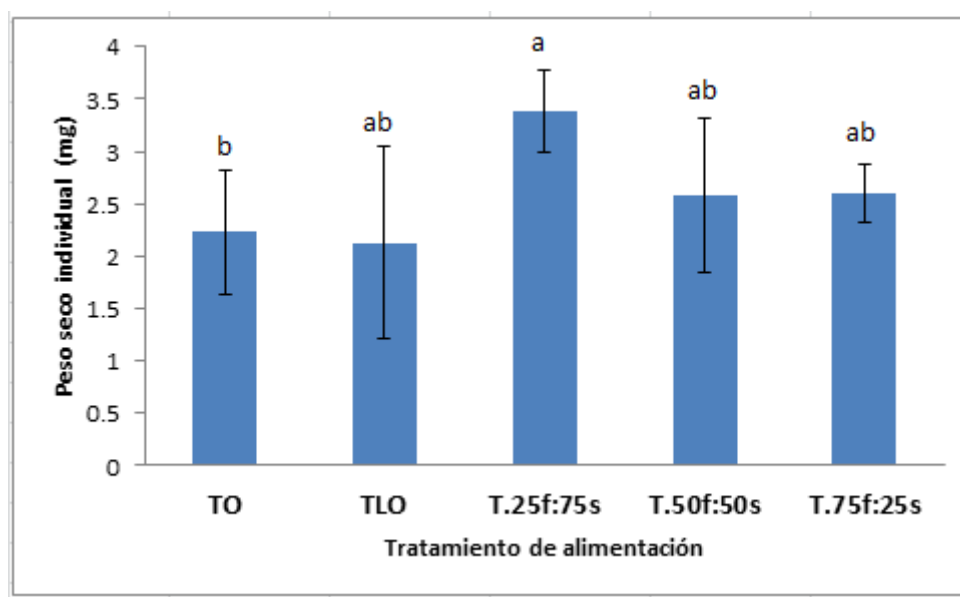


Figura 7. Peso seco individual final (mg) de larvas alimentadas durante los primeros días post-eclosión con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas a los 10 dpe con dietas microagregadas, combinando diferentes proporciones de proteínas fibrosas y solubles. TO: Otohime, TLO: like-Otohime, T.25f:75 (25% fibrosa y 75%

soluble), T.50f:50s (50% fibrosa y 50% soluble), T.75f:25s (75% fibrosa y 25% de soluble). Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Las larvas que fueron alimentadas con la microdieta control (Otohime A1®) y la microdieta “like-Otohime” obtuvieron la mayor longitud total. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos experimentales ($p > 0.05$) (Figura 8).

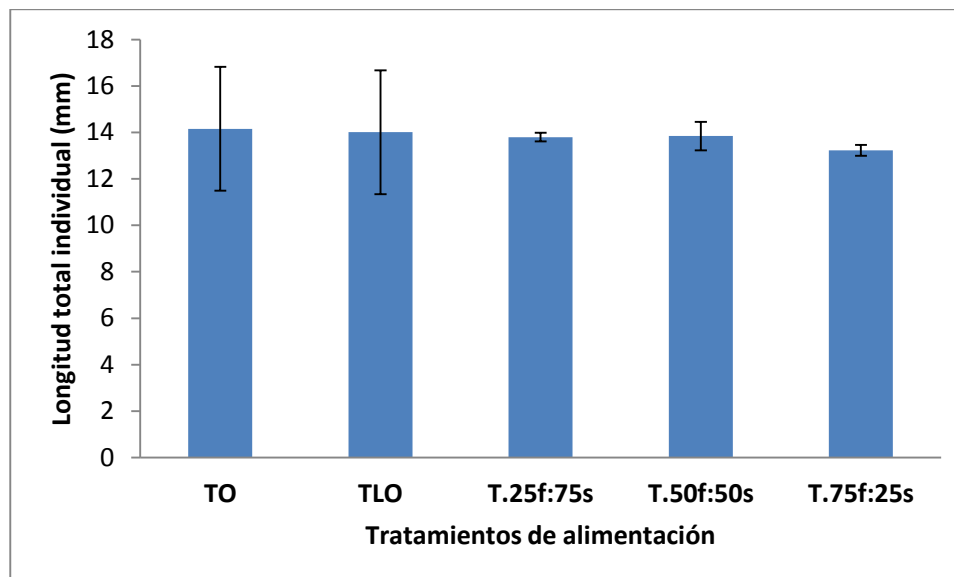


Figura 8. Longitud total individual final (mm) de larvas alimentadas durante los primeros días post-eclosión con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas a los 10 dpe con dietas microagregadas, combinando diferentes proporciones de proteínas fibrosas y solubles. TO: Otohime, TLO: like-Otohime, T.25f:75 (25% fibrosa y 75% soluble), T.50f:50s (50% fibrosa y 50% soluble), T.75f:25s (75% fibrosa y 25% de soluble).

Las larvas alimentadas con la microdieta cuya proporción es de 25% de proteína fibrosa y 75% de proteína soluble (25f:75s), tuvieron la mayor supervivencia, seguidas por las alimentadas con la microdieta “like-Otohime” y las larvas alimentadas con la microdieta control (Otohime A1®), sin presentarse diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellas. Mientras tanto, las larvas

alimentadas con las microdietas cuyas proporciones fueron de 50f:50s y 75f:25s, presentaron tasas de supervivencia significativamente menores en comparación con las tres anteriores (Figura 9).

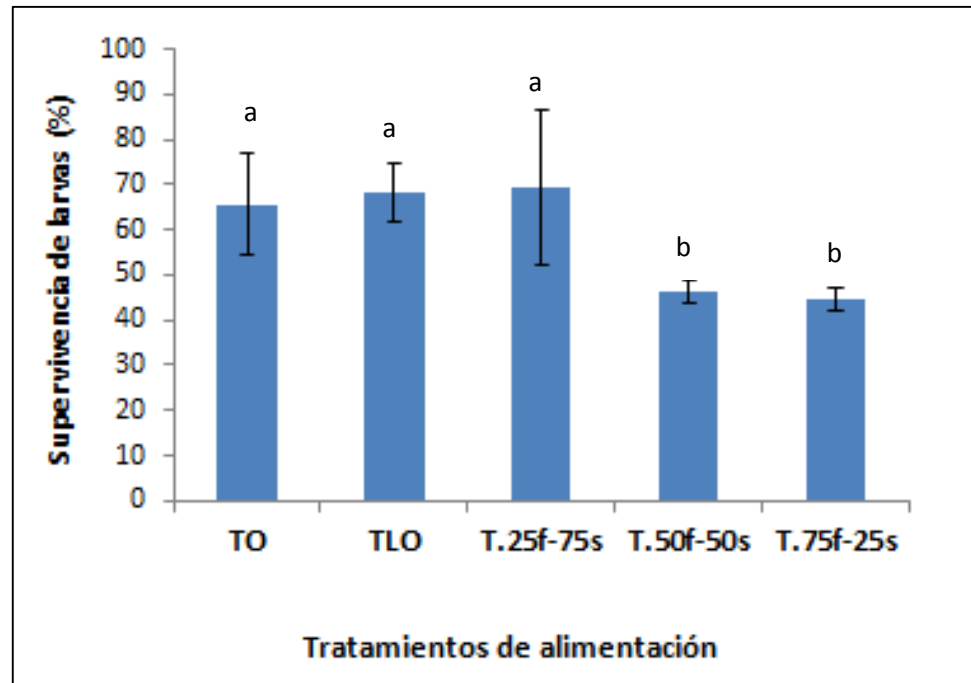


Figura 9. Supervivencia de larvas alimentadas durante los primeros días post-eclosión con rotífero (*B. plicatillis*) y destetadas a los 10 dpe con dietas microagregadas, combinando diferentes proporciones de proteínas fibrosas y solubles. TO: Otohime, TLO: like-Otohime, T.25f:75 (25% fibrosa y 75% soluble), T.50f:50s (50% fibrosa y 50% soluble), T.75f:25s (75% fibrosa y 25% de soluble). Índices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación ($p=0.018$).

La tabla 2 muestra los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el experimento (temperatura, salinidad, el oxígeno disuelto, pH, nitrito, nitratos y amonio) de alimentación de larvas de pez blanco.

Tabla 2. Valores (promedio \pm desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el experimento.

PARÁMETRO	VALOR
Temperatura °C	22.00 \pm 0.89
Salinidad (gL ⁻¹)	7.03 \pm 1.13
Oxígeno disuelto(mgL ⁻¹)	5.74 \pm 0.14
pH	8.53 \pm 0.21
Nitritos (mgL ⁻¹ NO ₂)	0.05 \pm 0.03
Nitratos (mgL ⁻¹ NO ₃)	3.21 \pm 0.97
Amonio (mgL ⁻¹ NH ₄)	0.05 \pm 0.05

IX.4 Análisis proximales

En la tabla 3 se muestran los valores promedio de los análisis proximales realizados en las diferentes dietas microagregadas. Como se puede observar, no existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de proteínas y lípidos de las microdietas utilizadas durante los experimentos de alimentación de larvas. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de humedad, si existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la microdietas “like-Otohime” y 25f:75s; “Like-Otohime” y la microdieta 75f:25s, así como también existen diferencias significativas entre la microdieta control (Otohime A1®) y la dieta 25f:75s. En cuanto al porcentaje de cenizas, existen diferencias significativas entre la microdieta 75f:25s y las microdietas 25f:75s y 50f:50s. Sin embargo, estas microdietas no son estadísticamente distintas en comparación con la microdieta control (Otohime A1®) y la microdieta “like-Otohime”.

Tabla 3. Composición proximal % (valores promedio \pm desviación estándar) de las diferentes microdietas utilizadas durante los experimentos (n=9). Superíndices diferentes en las columnas indican diferencias significativas.

Microdieta	% Proteína	% Lípidos	% Humedad	% Cenizas
Otohime A	52.19 \pm 0.3	21.2 \pm 1.6	4.25 \pm 0.1 ^a	10.3 \pm 0.1 ^{ab}
Like-Otohime	52.09 \pm 0.52	21.18 \pm 0.81	4.27 \pm 0.12 ^a	10.3 \pm 0.07 ^{ab}
25f:75s	52.88 \pm 0.65	17.12 \pm 0.1	3.23 \pm 0.18 ^b	9.66 \pm 0.2 ^b
50f:50s	52.65 \pm 0.89	18.76 \pm 0.27	3.51 \pm 0.26 ^{ab}	9.76 \pm 0.22 ^b
75f:25s	52.26 \pm 0.60	18.34 \pm 0.12	3.41 \pm 0.40 ^{ab}	10.59 \pm 0.34 ^a

IX.5 Distribución de tamaño de partícula de las dietas microagregadas

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el analizador de partículas (Mastersizer 2000), en general, el intervalo de tamaño de las partículas de las dietas experimentales fluctúa entre 1 y 100 μ aproximadamente. Con excepción del Otohime A1® y la microdieta “like-Otohime”, donde las partículas presentaron un intervalo de tamaños entre 2 y 150 μ aproximadamente (Figura 10).

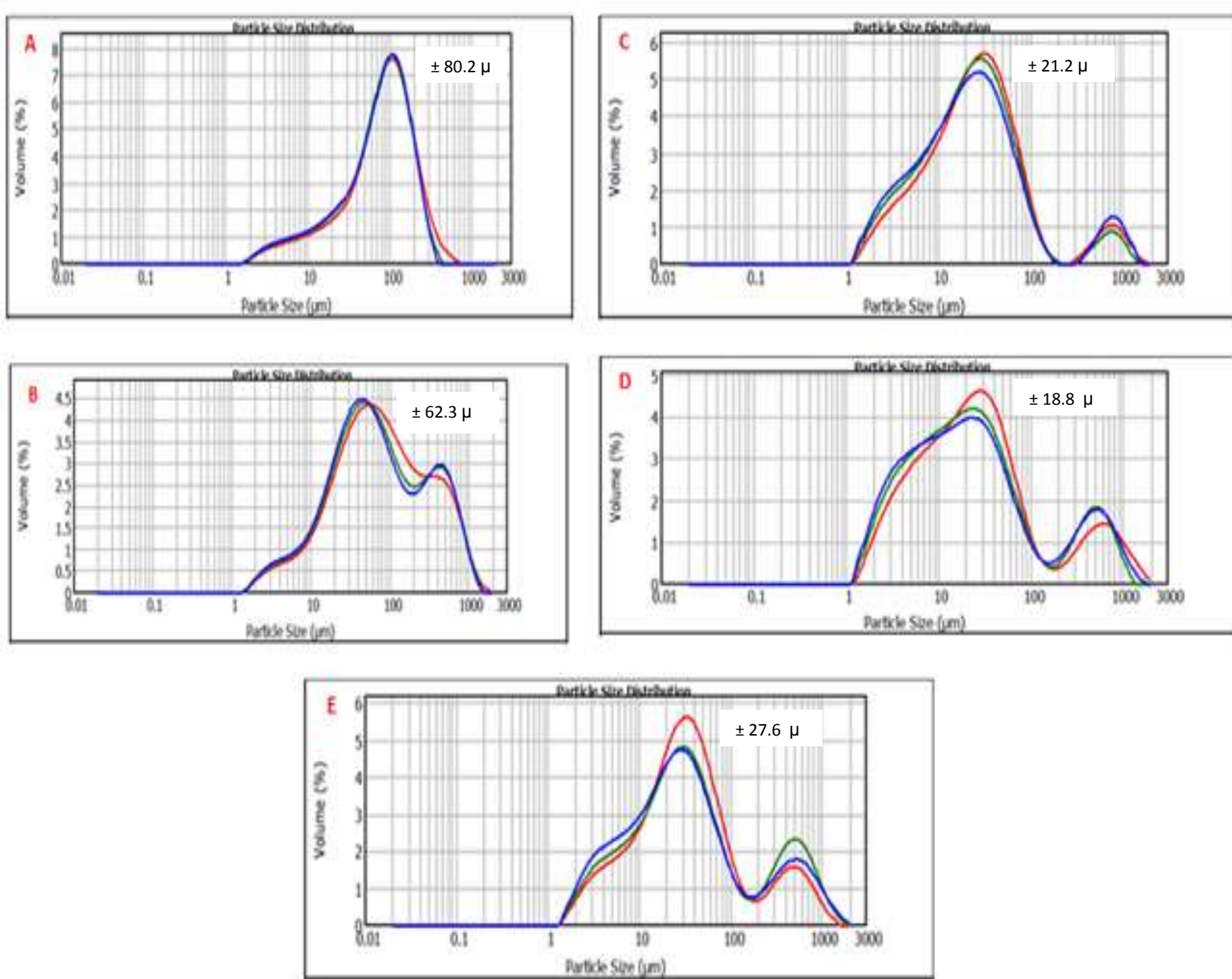


Figura 10. Distribución de tamaños de partícula correspondientes a cada una de las dietas microagregadas utilizadas durante el experimento. A: Otohime; B: like-Otohime; C: 25f:75s; D: 50f:50s y E: 75f:25s.

VIII. 6 Morfología de la dieta

La morfología general de las dietas microagregadas que combinan diferentes proporciones de proteína fue muy similar, en las cuales se observa una geometría externa recurrente de partículas esféricas con huecos poco profundos, propios de la nebulización o secado. Algunas de las microesferas presentaron tapas (comúnmente denominadas “caps”) y escasa formación de poros y pocas fracturas. Sin embargo, la morfología de estas microdietas (25f:75f, 50f:50s y 75f:25s) fue totalmente distinta en comparación con microdieta control (Otohime A1®) y “like-Otohime”, en las cuales se observa una partícula amorfa, similar a un aglomerado de ingredientes unidos por un ligante. A continuación, se observa la morfología de las microdietas experimentales, like-Otohime y Otohime A1® mediante fotografías tomadas con aumentos de 200, 500 y 1000x, utilizando un microscopio electrónico de barrido (Figuras 11).

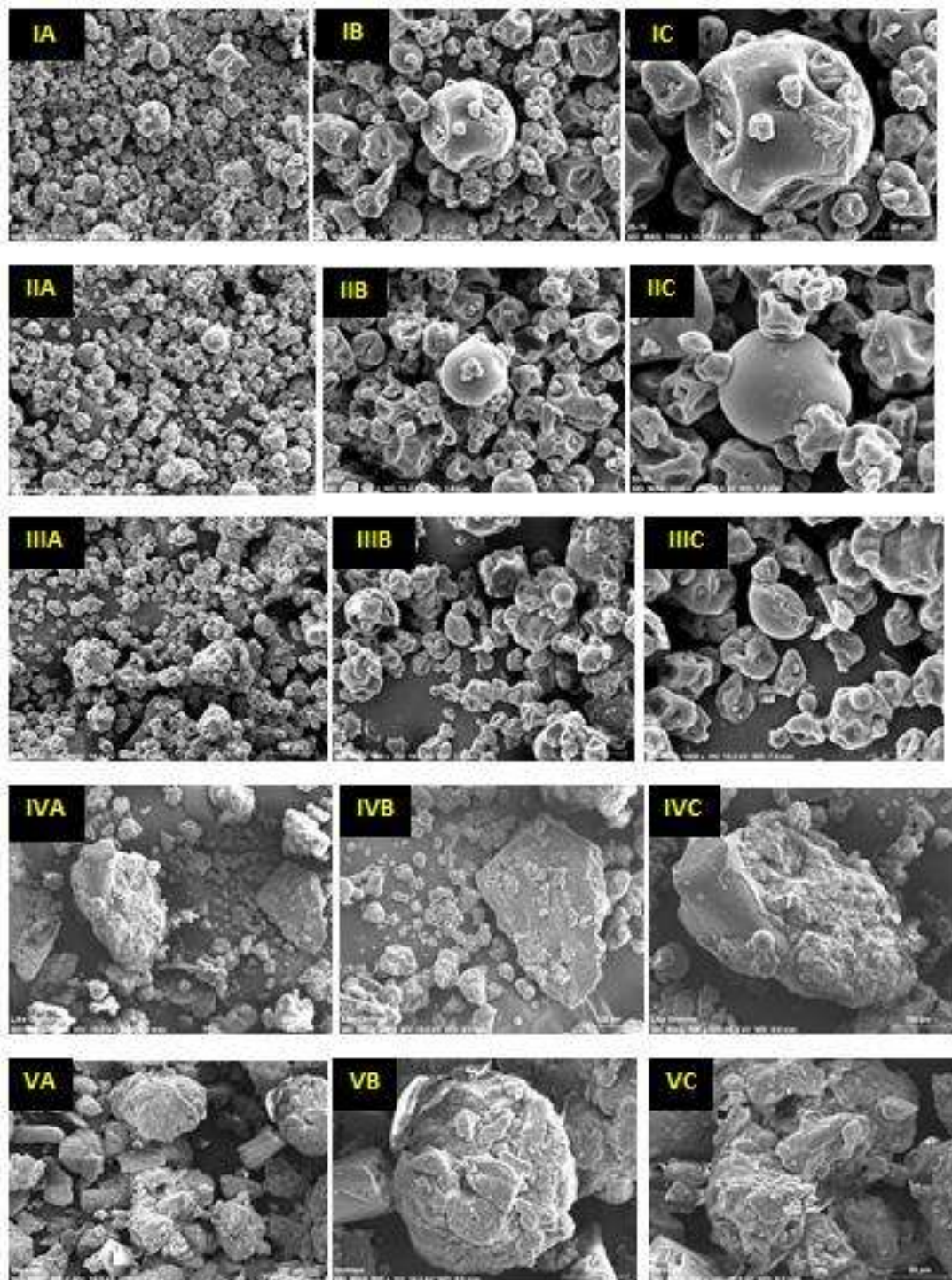


Figura 11. Fotografías de las dietas microagregadas. Los números romanos indican el tipo de microdieta, I: 25f:75; II: 50f:50s; III: 75f:25s; IV: “like-Otohime”; V: Otohime A1®. Mientras que las letras indican el aumento con el cual fueron tomadas las fotografías. A: 200x; B: 500x y C: 1000x.

IX.7 Velocidad de hundimiento de las partículas

La tabla 4 muestra los valores promedio de flotabilidad (velocidad de hundimiento) de cada una de las microdietas utilizadas durante la experimentación. En la cual, se observa que la microdieta control (Otohime A1®) presenta la mayor de flotabilidad de la partícula manteniéndose suspendida en la superficie por un tiempo de 72 minutos, seguida por la microdieta 25f:75s con un tiempo de 69 minutos. Mientras que las microdietas 50f:50s, 75f:25s y “like-Otohime” se mantuvieron suspendidas en la superficie por un tiempo menor a 61 minutos.

Tabla 4. Valores (promedio \pm desviación estándar) de la velocidad de hundimiento (min) de cada una de las microdietas utilizadas en los distintos tratamientos de alimentación.

Microdieta	Velocidad de hundimiento (min)
25f:75s	69 \pm 0.551
50f:50s	61 \pm 0.004
75f:25s	60 \pm 0.056
“Like-Otohime”	53 \pm 0.743
Otohime A1	72 \pm 0.831

IX.8 Absorción de agua

En la tabla 5 se muestran los valores promedio de la absorción de agua presente en cada una de las microdietas utilizadas durante la alimentación de las larvas. Cabe señalar que entre más alto es el valor de absorción de agua más digerible es la dieta, puesto que todas las reacciones enzimáticas ocurren medio acuoso. La microdieta que contiene 25% de proteína fibrosa y 75% de proteína soluble (25f:75s) tuvo el mayor valor de absorción de agua, al igual que la

microdieta que contiene 50% de fibrosa y 50% de soluble (50f:50s). Mientras que la microdieta control (Otohime A1®) y “like-Otohime” presentaron valores de absorción de agua menores.

Tabla 5. Valores (promedio \pm desviación estándar) de la absorción de agua (mL de agua/g) de cada una de las microdietas utilizadas en los distintos tratamientos de alimentación.

Microdieta	Absorción de agua (mL de agua/g)
25f:75s	1.33 \pm 0.043
50f:50s	1.33 \pm 0.123
75f:25s	1.27 \pm 0.017
“Like-Otohime”	0.62 \pm 0.022
Otohime	0.66 \pm 0.022

X. DISCUSIÓN

X.1 Tiempo mínimo de destete

El mayor desafío en la larvicultura de peces es la generación de alimentos que permitan un adecuado crecimiento y una alta supervivencia larvaria. Las larvas de peces marinos de forma natural, se alimentan del zooplancton disponible. Sin embargo, aun en estos casos la mortalidad llega a ser mayor al 90%, debido principalmente a problemas relacionados con la primera alimentación y depredación (Bengston 1993).

Los alimentos vivos para larvas de peces (rotíferos, copépodos y nauplios de artemia) tienden a ser sustituidos por diversos tipos de micropartículas para alimentar larvas de peces. Sin embargo, aún no se ha logrado producir un alimento equivalente al alimento vivo (Önal y Langdon 2000), aunque estudios recientes han demostrado que las larvas de peces pueden ser alimentadas exitosamente con dietas artificiales cuando son usadas como sustitutos parciales, o suplementos de alimentos vivos (Jones *et al.* 1993). e incluso algunas especies de agua dulce han sido totalmente cultivadas utilizando dietas artificiales; tal es el caso la farra *Coregonus lavaretus*, la carpa común *Cyprinus carpio*, el Ayu *Plecoglossus altivelus* y la lubina de boca pequeña *Micropterus dolomieu* (Jones *et al.* 1993). No obstante, el uso de dietas artificiales que sustituyen el alimento vivo para larvas de peces marinos ha sido problemático debido a que las larvas no aceptan fácilmente alimentos preparados (Önal y Langdon 2000).

Para lograr una producción económicamente factible en la acuicultura de peces juveniles (principalmente marinos), es importante desarrollar dietas microparticuladas, debido a que uno de los principales desafíos en la crianza de larvas es proporcionarles una nutrición adecuada, que les permita mantener un rápido crecimiento y desarrollo larval (Hauville *et al.* 2014). Sin embargo, son muchos los problemas relacionados con la elaboración de dietas artificiales para larvas. Uno de los principales es la baja tasa de aceptación comparada con alimentos vivos (Person Le Ruyet *et al.* 1993), o bien, la lixiviación de compuestos solubles presentes en la dieta, lo que impide una adecuada utilización del alimento

(García Gómez 2006). La lixiviación del alimento y particularmente de algunos compuestos nitrogenados como los aminoácidos u otros péptidos solubles, constituyen un atrayente que puede ser detectado y consumido por las larvas, promoviendo su destete (Kolkovski *et al.* 1997a; Hargreaves 1998; Kotrschal 2000 y Yúfera *et al.* 2002).

Durante más de una década, el periodo de pre-destete de larvas de peces ha sido reducido considerablemente, gracias a resultados concluyentes obtenidos en el laboratorio. Algunos ejemplos de ello son las investigaciones realizadas por Person Le Ruyet *et al.* (1993), quienes formularon una dieta adecuada para mantener un buen crecimiento y supervivencia en larvas de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) a partir de 40 dpe, cuando el destete de esta especie era realizado a los 55 dpe. Los resultados del presente estudio, muestran que las larvas de *C. estor* destetadas a los 10 dpe, no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) en crecimiento ni supervivencia respecto a las larvas alimentadas con presas vivas (*Brachionus plicatillis*), presentado en ambos casos una supervivencia mayor al 60%, por lo que las larvas de *C. estor* pueden ser destetadas utilizando dietas artificiales partir de 10 dpe. Existen diversos estudios en los que se ha evaluado el efecto del tiempo del destete en el desempeño de las larvas. Por ejemplo, Zambonino-Infante *et al.* (1997) en un estudio realizado en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), obtuvieron un crecimiento significativo ($p > 0.05$) y buena supervivencia, e incluso casi igual al obtenido en la alimentación con presas vivas, alimentando a las larvas únicamente con dietas formuladas a partir de 20 dpe. Recientemente, Cahu *et al.* (1998) reportaron un 35% de supervivencia en larvas de la misma especie, alimentadas exclusivamente con dietas artificiales desde la apertura de la boca, las cuales sobrevivieron hasta el final del experimento (28 dpe). De acuerdo a los autores, la tasa de supervivencia puede ser atribuida a la eficiencia de la dieta artificial, puesto que las larvas de lubina que no fueron alimentadas murieron a los 15 dpe. Además, se han obtenido tasas aceptables de supervivencia (40-50%) en otras especies marinas alimentadas con dietas artificiales desde la apertura de la boca como son el

besugo o dorada *Sparus aurata* (Fernández-Díaz y Yufera 1997) y el besugo rojo *Pagrus major* (Takeuchi *et al.* 1998). El tiempo mínimo de destete (10 dpe.) encontrado en larvas *C. estor*, concuerda con un estudio realizado por Yufera *et al.* (1999), en donde, dichos autores reportaron un crecimiento eficiente en larvas de besugo (*Sparus aurata*) destetándolas a partir de 8 días post-eclosión. Sin embargo, estos resultados difieren de algunos reportados por Person Le Ruyet *et al.* (1993) en larvas de lubina europea (*D. labrax*), en donde, la sustitución exitosa de presas vivas por dietas artificiales, fue realizada muchas semanas después de la eclosión (40 dpe). En dichos estudios, se insinúa que las larvas son incapaces de digerir dietas artificiales si la dieta no está bien adaptada a la especie.

X.2 Mejor proporción de proteínas en la dieta

En el presente estudio se encontró que la composición de la dieta, tiene un efecto significativo en el crecimiento y supervivencia de las larvas de pez blanco. De las cinco microdietas probadas durante la experimentación, la microdieta que combina 25% de fuentes de proteína fibrosa y 75% de fuentes de proteína soluble (25f:75s), parece ser la más adecuada para la alimentación de larvas de esta especie, puesto que las que fueron alimentadas con esta microdieta presentaron la mayor tasa de supervivencia (69.33) e incluso un crecimiento significativamente mayor ($p=0.037$) en comparación con las que se alimentaron con la microdieta control (Otohime A1®). La poca eficiencia del Otohime® como primer alimento para larvas de *C. estor*, coincide con la deficiente efectividad de esta dieta reportada por Hauville *et al.* (2014) para el destete de larvas de pámpano de Florida (*Trachinotus carolinus*), en donde dichos autores evaluaron tres tipos de microdietas y encontraron que las larvas alimentadas con Otohime® presentaron el menor crecimiento en relación del resto de las dietas utilizadas durante el experimento. Además, es importante señalar que durante el presente estudio, las larvas que fueron alimentadas con las microdietas Otohime A1® y “like-Otohime” no presentaron diferencias significativas en crecimiento y supervivencia,

lo que indica que la calidad de los ingredientes utilizados y la formulación son equivalentes en ambas dietas.

Por otro lado, las larvas alimentadas con la microdietas 25f:75s (25% fibrosa: 75% soluble), Otohime A1® y “like-Otohime” presentaron tasas de supervivencia significativamente mayores ($p=0.018$) con respecto a las que fueron alimentadas con las microdietas 50f:50s (50% fibrosa: 50% soluble) y 75f:25s (75% fibrosa: 25% soluble). Lo anterior parece estar relacionado con los hábitos zooplanctófagos de *C. estor*, puesto que el zooplancton presenta altas proporciones de proteínas solubles. Se ha reportado que del 67 % de proteína total presente en el rotífero (*B. plicatillis*), utilizado comúnmente para alimentar a las larvas de forma natural, al menos un 50.6% es soluble (Srivastava *et al.* 2005). Al igual que en los microcrustáceos del plancton, los cuales poseen proporciones parecidas de estas proteínas, con un valor promedio de $50.14 \pm 7.33\%$ (Kumari *et al.* 1993). Además, de acuerdo con un estudio realizado por Carvalho *et al.* (2004), la fracción de proteína soluble parece estar más disponible para la digestión y absorción de las larvas en relación con la fracción total de la proteína, debido a que la proteína soluble parece estar más disponible para las proteasas intestinales y al mismo tiempo puede ser introducida a la célula por pinocitosis, la cual tiene gran importancia en la utilización de proteínas de la dieta en las larvas (Watanabe 1981; Govoni *et al.* 1986). En un estudio realizado por Toledo-Cuevas *et al.* (2011) los resultados mostraron que las larvas de *C. estor* parecen tener un perfil de enzimas apropiado para digerir estas y otras proteínas eficientemente. En donde, la actividad de enzimas citosólicas sugieren una maduración digestiva tardía, o bien, un modelo diferente al descrito para peces marinos.

X.3 Distribución de tamaños de partícula

Un tamaño adecuado de partícula es esencial en la primera alimentación de larvas (Cahu y Zambonino-Infante 2001). De acuerdo con Fernández-Díaz *et al.* (1994), las larvas de dorada (*Sparus aurata*) seleccionan el tamaño de las

microdietas que ingieren, en relación con su tamaño y apertura de la boca. Por ejemplo, las larvas que presentaron una longitud total menor a 4.5 mm seleccionaron partículas con tamaños de entre 50-150 micras, mientras que larvas un poco más grandes seleccionaron partículas de 151-250 micras y las que tuvieron una longitud total de 6 mm ingirieron partículas mayores a 250 micras. Una de las posibles causas de la aceptación de las microdietas probadas durante el presente estudio, es atribuible al diámetro de las micropartículas, las cuales presentaron un amplio intervalo de distribución de tamaños (1-150 micras aproximadamente) con un promedio de 30 micras para ser ofrecidas a las larvas. Este intervalo de tamaños de partícula ha sido probado con éxito en larvas de otras especies como la dorada (*Sparus aurata*), utilizando un tamaño de partícula de 50-150 micras durante la primera alimentación y posteriormente aumentando dicho tamaño a 125-200 micras para alimentar larvas de 14 a 25 dpe (Cahu y Zambonino-Infante 1994).

X.4 Morfología de la dieta

En general, las dietas experimentales que combinan diferentes proporciones de proteínas presentaron una morfología homogénea, en donde se observa una geometría externa recurrente de partículas esféricas con huecos poco profundos (propios del secado por nebulización). De acuerdo con Rosemberg *et al.* (1988) la formación de los huecos se debe entre otras cosas a la pérdida de agua de las gotas deshidratadas durante las primeras fases del proceso. Algunas de las microesferas presentaron tapas (comúnmente denominadas “caps”). Pedroza-Islas *et al.* (2000) mencionan que dichas “caps” pudieran formarse a partir de un enfriamiento lento de la partícula pero con temperatura interna mayor, en donde el calentamiento del gas o vapor atrapado dentro de la esfera es muy rápido y el crecimiento externo del “cap” es aún más rápido que el encogimiento, debido a la pérdida de agua. También, es posible observar algunos poros y muy pocas fracturas presentes en las partículas. No obstante, la morfología de dichas dietas es totalmente distinta a la microdieta

control (Otohime A1®) y “like-Otohime”, en las cuales se observa una partícula amorfa, similar a un conglomerado de ingredientes unidos por un ligante, formando una estructura totalmente diferente debido claramente al tipo de ligantes utilizados.

X.5 Velocidad de hundimiento

Cuando se pretende desarrollar dietas microparticuladas adecuadas para el destete temprano de larvas, es indispensable que las partículas alimenticias sean estables en el agua y que sean atractivas, además de nutricionalmente completas y digeribles para las larvas. Por otro lado, la tasa de sedimentación limita el tiempo que la partícula permanece suspendida y disponible para ser depredadas por las larvas (Baskerville-Bridges y Kling 2000). Uno de los períodos más críticos en la vida de un pez es aquel en el que comienza su alimentación activa, la cual depende de la presencia y disponibilidad de un alimento adecuado (Ciechomski y Weiss 1974; Kjelson y Johnson 1976).

Una vez que el alimento artificial es introducido en la columna de agua, la dieta debe permanecer disponible y atrayendo a las larvas sin presentar una lixiviación excesiva de los nutrientes. Idealmente, la microdieta debe permanecer flotando neutralmente, pero esto es bastante difícil de lograr debido a las diferentes densidades del medio, por las variaciones de temperatura y/o salinidad. Muchas dietas que tienden a hundirse fácilmente, pueden mantenerse en la columna de agua con suficiente aireación. Sin embargo, los niveles de aireación requeridos pueden ser perjudiciales para las larvas, debido a la excesiva agitación y turbulencia provocada en la columna de agua (Bengston 1993). Es por ello que es sumamente importante que el alimento se encuentre en la superficie el mayor tiempo posible para ser consumido por las larvas. En el caso particular del presente estudio, la mayoría de las partículas de las microdietas experimentales se mantuvieron en la columna de agua por más de 60 minutos. Esto hizo que se programara la frecuencia alimenticia de las larvas cada hora a lo largo del

experimento, con la finalidad de que el alimento artificial estuviera siempre disponible para las larvas.

X.6 Absorción de agua de las microdietas

Una de las pruebas más simples propuesta por Torgersen y Toledo (1977) para estimar indirectamente la digestibilidad de una dieta en particular, es determinar su capacidad de absorción de agua en mL/g. De acuerdo con las pruebas realizadas durante el estudio, las dietas que pudieran tener una mayor digestibilidad por las larvas son las que combinan 25% de proteína fibrosa y 75% de proteína soluble (25f:75s) y la microdieta que combina 50% de proteína fibrosa y 50% de proteína soluble, pues son las que presentan mayor absorción de agua. Esto puede ser debido a que la fracción de proteína soluble parece estar más disponible para la digestión y absorción de las larvas (Carvalho *et al.* 2004). Estudios enzimáticos recientes, sugieren que las larvas de *C. estor* poseen un equipo enzimático desde los primeros estadios (Hernández-González 2014). Por lo tanto, estas larvas tienen la capacidad de prosperar alimentándose con dietas artificiales, si la dieta está bien diseñada. Los resultados sugieren que la microdieta 25f:75s, con la cual se obtuvo un mejor crecimiento (en peso seco) y una supervivencia significativamente mayor en comparación con las microdietas 50f:50s y 75f:25s, es la mejor dieta artificial probada hasta el momento, con resultados prometedores para lograr la sustitución de alimentos vivos en esta especie. No obstante, al tener la posibilidad de permitir el crecimiento de las larvas sin el concurso de alimento vivo, pueden utilizarse si la supervivencia actual puede superar en términos económicos el eliminar completamente el alimento vivo. Sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios para la formulación de dietas compuestas, que estén mejor adaptadas para larvas desde la apertura de la boca, las cuales podrían reemplazar totalmente el alimento vivo con una supervivencia igual o mejor.

La diferencia entre Otohime comercial y las dietas generadas en este trabajo se basan directamente en tres aspectos el primero; el tamaño y forma de partícula, segundo; mayor absorción de agua que de acuerdo con algunos autores se traduce en mayor digestibilidad y tercero: la proporción de proteínas solubles usada (que da textura, palatabilidad y forma a las partículas), pues la proporción y la calidad de los ingredientes lo prueba ya que la dieta “like-Otohime” que incluso tiene la misma textura que Otohime A1® carecen de una absorción de agua de más del 100% comparada con las dietas experimentales 25f:75s y 50f:50s lo que nos habla de una menor digestibilidad de estas dietas. Por otro lado el tamaño de la partícula es fundamental para ser ingerido y tanto “like-Otohime”, como Otohime A1® no poseen una proporción importante de partículas pequeñas e individuales que caracteriza a los alimentos con proteínas solubles (25f:75s, 50f:50s y 75f:25s) con un tamaño de partícula promedio menor a 30 μ .

XI. CONCLUSIÓN

Las larvas de *C. estor* pueden ser alimentadas con dietas artificiales desde el momento de la eclosión (0 dpe). Sin embargo, cuando las larvas son destetadas a partir de los 10 dpe, se obtienen mejores resultados en términos de crecimiento y supervivencia e incluso es posible alcanzar un rendimiento similar a larvas únicamente alimentadas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*). Sin embargo aun con una menor supervivencia y tomando en cuenta los costos de los alimentos vivos, se tiene la capacidad de utilizar la dieta diseñada 25f:75s como sustituto total de los alimentos vivos.

Las larvas de pez blanco que fueron alimentadas con la microdieta que contiene 25% de fuentes de proteína fibrosa y 75 % de fuentes de proteína soluble (25f:75s), obtuvieron el mejor crecimiento y supervivencia. Algunas características físicas de la dieta como su composición, su alta capacidad de absorción de agua

(1.33 mL de agua/g de dieta), su flotabilidad promedio (69 minutos), para permitir una alimentación con una óptima disponibilidad, el tamaño de promedio de la partícula ($\bar{x}=21.2 \mu$) que permite a larvas muy pequeñas tener acceso al alimento y su morfología, sugieren que la microdieta 25f:75s es la más adecuada, entre las evaluadas, para la alimentación de larvas de la especie en estadios tempranos de desarrollo.

Las larvas pueden alimentarse solo con la microdieta 25f:75s desde 0 dpe, tomando en cuenta que la mortalidad puede compensarse con el costo de los cultivos vivos, ya que de esta forma no se requiere de ningún alimento vivo para llegar al estado juvenil.

La microdieta “like-Otohime” prueba que sus ingredientes y su formulación es igual o mejor que el Otohime comercial en términos de crecimiento de las primeras larvas de *C. estor*.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón F. J. and Martínez M.I., 2000. Fisiología de la Digestión en Larvas de Peces Marinos y sus Aplicaciones al Cultivo Larvario en Masa <http://aquatic.unizar.es/n1/art501/fishlarva.htm>.
- Armijo, O.A. y Sasso, Y.L., 1976 Observaciones preliminares en acuarios sobre incubación y alevinaje de aterínidos (*Chirostoma spp.*) del Lago de Pátzcuaro, Mich. Fideicomiso para el Desarrollo de la fauna Acuática, Vol. 3, 13 p.
- Applebaum, S., 1985. Rearing of the Dove sole, *Solea solea* (L.), through larval stages using artificial diets. *Aquaculture* 49: 209-221.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists, 17th edn. E.U.A., Washington, DC, 1018 p.
- Baragi V. and Novell R.T., 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larval development. *Transactions of the American Fisheries Society*.115,478-484.
- Baskerville-Bridges, B., and Kling, L. J., 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 171-182.
- Bengtson, D. A., 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. *J. World Aquacult. Soc.* 24 (2): 285-293.

- Bergot, F., 1979. Carbohydrates in rainbow trout diets: effects of the level and source of carbohydrates and the number of meals on growth and body composition. *Aquaculture* 18,157-167.
- Blaxter, J. H. S., 1988. Pattern and variety in development. In Hoar, W. S. and Randall, D. J. (Eds.) *Fish Physiology*. Vol. IX: The physiology of developing fish. Part A: Eggs and larvae. Academic Press, Inc.
- Boulhic, M., Gabaudan, J., 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole *Solea solea*. *Aquaculture* 102. 373-396.
- Buchet V., Zambonino J. L. and Cahu Ch. L., 2000. Effect of Lipid Level in a Compound Diet on the Development of Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) Larvae. *Aquaculture* 184: 339-347.
- Bustos, R., Romo, L., Yáñez, K., Díaz, G., and Romo C., 2003. Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. *J. Food Engin.* 56: 289-293.
- Cahu Ch. and Zambonino-Infante J. L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: Effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109 A, 213-222.
- Cahu C.L., Zambonino-Infante J.L., Le Gall M.M. y Quazuguel P., 1995. Early Weaning of Seabass: Are Digestive Enzymes Limiting?. Larvi '95 – Fish & Shellfish larviculture Symposium. P. Lavens, E. Jasperse I. Roelants (Eds.). 1995 Gent, Belgium European Aquaculture Society, Special Publication N° 24: 268-271.

- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Escaffre, A.M., Bergot, P. and Kaushik, S., 1998. Preliminary results on sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 169: 1-7.
- Cahu Ch. and Zambonino-Infante J. L., 1997. Is the Digestive Capacity of Marine Fish Larvae Sufficient for Compound Diet Feeding?. *Aquaculture* 5: 151-160.
- Cahu Ch. and Zambonino-Infante J. L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200: 161-180.
- Campos, A., 2000. Comparación del crecimiento de tres especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae), en cultivo experimental dentro de sistemas parciales de recirculación de agua. Tesis de Maestría. U.M.S.N.H. Morelia, Michoacán. 70 p.
- Chapman, F. A., 1992. Culture of Hybrid Tilapia: A Reference Profile. Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, U.S.
- Ciechosmki, J.D. y Weiss, G. 1974. Estudios sobre la alimentación de larvas de merluza, *Merluccius merluccius hubbsi*, y de la anchoita, *Engraulis anchoita*, en el mar. *Physis*, serie A, Buenos Aires, 33(86):185-98.
- Copeman L. A., Parrish C. C., Brown J. A. y Harel M., 2001. Effects of Docohexaenoic, Eicosapentaenoic, and Arachidonic Acids on the Early Growth, Survival, Lipid Composition of YellowTail Flounder (*Limanda ferruginea*): A Live Food Enrichment Experiment. *Aquaculture* 210: 285-304.

- Carvalho, A.P., Sa, R., Oliva-Teles, A., Bergot, P., 2004. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture* 234: 319–333.
- Cousin, J.C. B., Baudin Laurencin, F., 1985. Morphogénese de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 47: 305-319.
- Cowey, C.B., Adron, J.W., Brown D.A., and Shanks A.M., 1975. Studies on the nutrition of marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice *Pleuronectes platessa* and the effect of dietary energy source on protein utilization in plaice. *British Journal of Nutrition* 33, 219-231.
- D'Abramo L. R., 2002. Challenges in Developing Successful Formulated Feed for Culture of Larval Fish and Crustaceans. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, Mexico. 143-151.*
- Dabrowski, K., 1986. Ontogenical aspects of nutritional requirements in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 85: 639-655.
- Dabrowski, K., 1991. Dietary Requirements for Freshwater Fish Larvae – In Search of a Common Thread. Larvi '91- Fish and Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium no.15: 9-10.
- Damon, R. A. y W. R. Harvey., 1987. Experimental designs, ANOVA and regressions. Harper and Row Pub. New York, N. Y. U.S.A. 508p.

- Díaz M., Moyano F.J., García-Carreño F.L., Alarcón F.J., Muñoz-Cueto J.A. and Sarasquete M.C., 1995. Determination of Protease Type Activity by Substrate-SDS Page Through Larval Development in Seabream (*Sparus aurata*). Larvi '95 – Fish and Shellfish larviculture Symposium. P. Lavens, E. Jaspers e I. Roelants (Eds.). 1995 Gent, *Belgium European Aquaculture Society*, Special Publication No. 24: 276-280.
- Dziezack, J. D., 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology* 42:136-148 Guist, G. G. 1990. Applications for seaweed hydrocolloids in prepared foods. En: I. Akatsuka (Ed.). *Introduction to Applied Phycol.* SPB Academic Pub. The Hague, The Netherlands. 391-400p.
- Dinis M. T., Ribeiro L., Conceicao L. E. C. and Aragao C., 2000. Larvae Digestión and New Experiments in *Solea senegalensis*. *CIHEAM-Options Mediterraneeennes* (2000): 193-204.
- Ebling, M.E., 1968. The Dumas method for nitrogen in feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51, 766–770.
- FAO., 1994. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Proyecto GCP/RLA/102/ITA “Apoyo a las actividades regionales de acuicultura en América latina y el caribe” — AQUILA II. México, D.F., <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/ab482s18.htm>.
- Fernández-Díaz, C., Pascual, E., Yufera, M., 1994. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.* 118, 323-328.
- Fernandez-Diaz, C. and Yufera, M., 1997. Detecting growth in gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae fed microcapsules. *Aquaculture* 153: 93-102.

- Fiogbé, E. D., Kestemont, P., 1995. An assessment of the protein and amino acid requirements in goldfish (*Carassius auratus*) larvae. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 282-289.
- Furuichi M., and Yone, Y., 1971. Studies on nutrition of red sea bream. 4. Nutritive value of dietary carbohydrate. Reports of the Fisheries Research Laboratory of Kyushu University 1, 75-81.
- García-Ortega, A., Abdo I. and Hernández, C., 2003. Weaning of Bullseye Puffer (*Sphoeroides annulatus*) from Live Food to Microparticulates Diets Made With Decapsulated Cyst of Artemia and Fishmeal. *Aquaculture International* 11: 183-194.
- García-Gómez, R. E., 2003. Efectos en el crecimiento y supervivencia de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* alimentadas con dietas microparticuladas en dos tiempos de destete. Tesis de Licenciatura, UABCS. México. 56pp.
- Gawlicka A., Mc. Laughlin, L., Hung S.S.O., de la Noue J., 1996. Limitations of carrageenan microbound diets for feeding White sturgeon, *Acipenser trramontanus* larvae. *Aquaculture* [3] 303-314.
- Govoni, J.J., Boehlert, G. and Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fish.*, 16, 59-77.
- Hargreaves, J.A., 1998. Nitrogen Biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166: 181-212.

- Hauville M, R., Zambonino-Infante J. L., Bell, G., Migaud, H., Main, K. L., 2014. Impacts of three different microdiets on Florida Pompano, *Trachinotus carolinus*, weaning success, growth, fatty acid incorporation and enzyme activity. *Aquaculture* 422-423, 268-276.
- Helland B. and Grisdale-Helland S.J., 1998. Growth, feed utilization and body composition of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in the ratio between the macronutrients. *Aquaculture* 166: 49-56.
- Hemre, G.I., Lie O., and Sundby A., 1993. Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morua*): metabolic responses to feeding and fasting. *Fish Physiology and Biochemistry* 10, 455-463.
- Hemre, G. I., Mommsen, T.P., and Krogdahl., 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* 8, 175-194.
- Henning, S. J., Rubin D. C., Shulman R.J., 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. In Johnson I. R (Ed.), *Physiology of Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 571-610.
- Hernández-González, M. A., 2014. Determinación del modelo de maduración digestiva del pez blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor*, bajo un régimen de alimento vivo. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 52 pp.
- Hilton J.W. and Atkinson J.L., 1982. Responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *British Journal of Nutrition* 47: 595-607.

Hoffer, R., and Nassir-Uddin A., 1985. Digestive processes during the development of the roach, *Rutilus rutilus* L. *J. Fish. Biol.* 26, 683-689.

Houlihan D.F., Pannevis M. and Heba H., 1991. Protein Turnover in Fish Larvae. Larvi '91-Fish and Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). *European Aquaculture Society*, Special Publication Gent, Belgium no.15: 16.

Jones . D.A., Kamarudin M.S., and Le Vay L., 1993. The potencial for replacement of live feeds in larval cultures. *J. of the World Aquaculture. Society.* 24, 199-210.

Jones A. and Houde E.D., 1986. Mass rearing of fish fry for aquaculture. In: Realism in Aquaculture: Achievements, feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 225,133-147.

Jones, D.S. and Kurmaly, K., 1987. Feeding and assimilation of Frippak and others feeds by crustacean larvae. *Journal of the Aquaculture Society.* 18. 17^a.

Jones, D.A., Kamarudin, S. M., and Le Vay, L., 1993. The potencial for replacement of live feeds in larval culture. *J. World Aquacult. Soc.* 24. 225-230.

Jones, D. A., Bridson, P., Freeman, M., Latchford, J., Martínez-Palacios, C. A., Misciatelli, N., Ribeiro, F. A. L. T., Sirvas-Rowlands, S., y Simoes, F., 1997. Progress in the Use of Artificial Feeds in Penaeid Larval Cultures. *J. Mar. Biotechnology.* In press.

Kanazawa, A., Tesima, S., Sasada, H. and Rahman, S.A., 1982. Culture of the prawn larvae with micro-particulate diets. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* 48. 195-199.

- Kanazawa, A. and Teshima, S., 1988. Development of macroparticulated diets for the larvae of fish, crustaceans and shellfish. *Yoshku*. 20(11). 97-104.
- Kaushik, S., 1979. Application of a biochemical method for estimation of amino acid needs in fish: quantitative arginine requirements of rainbow trout in different salinities. *Proceedings of the World Symposium on Finfish Nutrition Technology* 1, 20-23.
- Kjelson, M.A. and Johnson, G.N. 1976. Further observations of the feeding ecology of postlarval pinfish, *Lagodon rhomboides*, and spot, *Leiostomus xanthurus*. *Fish. Bull.*, Seattle, 74(2):423-32.
- Kjorsvik, E., van der Meeren, T., Kryvi, H., Arnfinnson, J. and Kvenseth, P.G., 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. *J. Fish Biol.*, 38: 1-15.
- Kolkovski, S., Koven, W., Tandler, A., 1997. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 155: 193-203.
- Kolkovski, S., Arieli, A. and Tandler, A., 1997a. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquacult. Internat.* 5: 527-536
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. W., Gertler, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 203-209.
- Kortschal, K., 2000. Taste (s) and olfaction (s) in fish: a review of specialized subsystems and central integration. *Eur. J. Physiol.* 439: 178-180.

- Krogdahl, A., Sundby, A., and Olli, J.J., 2004. Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture* 229: 335-360.
- Kumari L. K., Nair, V. R., and Gajbhiye S. N., 1993. Biochemical composition of zooplankton from the offshore oil fields of Bombay. *Proc. Nat. Acad. Sci., India* 63(B) II: 161-167.
- Langdon, C.. 2003. Microparticles types for delivery nutrients to marine fish larvae. *Acuaculture* 227: 259-275.
- Langdon, C.J., Levine, D.M. and Jones, D.A., 1985. Microparticulate feeds for marine suspension-feeders. *Journal of Microencapsulation*. 2(1). 1-11.
- Lara, V.A., 1974. Aspectos del cultivo extensivo del pescado blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor estor* Jordan 1879, En: Actas del Simposio sobre Acuicultura de América Latina. Documentos de Investigación. Montevideo, Uruguay. FAO Informes de Pesca, 159, 113–116.
- Lauff M. and Hoffer R., 1984 Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37: 335-346.
- Lee, C. S., 2003. Biotechnological advances in finfish hatchery production: a review. *Aquaculture* 227: 439-458.
- Lee, D.J., and Putnam, G.B., 1973. The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet. *Journal of Nutrition* 103: 916-922.
- Lazo J. P., 2000. Conocimiento Actual y Nuevas Perspectivas en el Desarrollo de Dietas para Larvas de Peces Marinos., Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D.,

- Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M.A., Civera-Cerecedo R. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19 al 22 de Noviembre del 2000. Mérida, Yucatán, México. 300-312.
- Ma H., Cahu C., Zambonino J., Yu H., Duan Q., Le Gall M.M. and Mai K., 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 245: 239-248.
- Martínez-Palacios, C.A., Barriga Tovar, E., Taylor, J.F., Rios Duran, G. and Ross, L.G., 2002. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor* Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 209: 369–377.
- Martínez-Palacios, C. A; Ríos-Durán, M. G; Campos-Mendoza, A; Toledo-Cuevas, M; Aguilar-Valdez, M.C. y L. G. Ross., 2002. Progresos en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor*). *Ciencia Nicolaita*, 32: 73-90.
- Martínez-Palacios C.A., Ríos-Durán M.G., Campos-Mendoza A., Toledo-Cuevas M., Aguilar-Valdez M.C. and Ross L.G., 2003 “Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro” en: “Historia y Avances del Cultivo de Pescado Blanco”. Instituto Nacional de la Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, México 290pp.
- Martínez-Palacios, C.A., Morte, J.C., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G., 2004. The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture* 238, 509 – 522.

- Martínez-Palacios C.A., Racotta I.S., Ríos-Duran M.G., Palacios E., Toledo-Cuevas M. y Ross L.G.. 2006. Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *BIOCELL* 30,137-148.
- Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán M.G., Ambriz-Cervantes, K.J., Jauncey K.J. Jauncey y Ross L. G., 2007. Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish. *Aquaculture Nutrition* 13: 304-310.
- Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán M.G., Fonseca-Madrigal J., Toledo-Cuevas M., Sotelo-López A., L. G. Ross 2008. Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880. *Aquaculture Research* 39: 738-747.
- Masters, K. 1985. *Spray-Drying Handbook*. 4th. ed. John Wiley y Sons. New York, NY. USA.
- Medina-Reyna, C.E., 1998. Diseño y Evaluación de un Alimento Nebulizado para la Larvicultura de Peneidos. Tesis de Maestría. CICESE. Ensenada B.C: México. 80 p.
- Mente E., Deguara S., Santos M.B., and Houlihan D., 2003. White muscle free amino acid concentrations following feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 225: 133-147.
- Merchie G., Lavens P., Verreth J., Olleiver F., Nelis H., De Leenheer A., Storch V., and Sorgeloos P., 1997. The effect of supplemental ascorbic acid in enriched live food for *Clarias gariepinus* larvae at start feeding. *Aquaculture* 151: 245-258.

- Minkoff and Broadhurst. 2000. Sobrevivencia, mortalidad, enfermedades, profilaxis y tratamiento. www.ibss.iuf.net/course/planos/problems.html.
- Mohapatra, M., Sahu, N.P. and Choudhari, A., 2003. Utilization of gelatinized carbohydrate in diets of *Labeo rohita* fry. *Aquaculture Nutrition* 9: 189-196.
- Mourente, G. and A. Rodríguez. 1997. Effects of salinity and dietary DHA (22:6n-3) content on lipid composition and performance of *Penaeus kerathurus* postlarvae. *Mar. Biol.* 128: 289-298.
- Moyano F.J., Alarcón F.J., Díaz M., Muñoz- Cueto J.A., Yufera M. and Sarasquete M.C., 1995. Changes of Digestive Enzyme Activities During larval Development in Seabream (*Sparus aurata*). Larvi '95 – Fish and Shellfish larviculture Symposium. P. Lavens, E. Jaspers e I. Roelants (Eds.). 1995 Gent, Belgium European Aquaculture Society, Special Publication No. 24: 297-300.
- Moyle, P.B. and Cech, J.J., Jr , 2000. Fishes. An Introduction to Ichthyology, 4th edn. Prentice Hall Inc., New Jersey, USA, pp. 612.
- Muir P. R. y Sutton D.C. 1994. Bacterial Degradation of Microencapsulated Foods Used in Larval Culture. *Journal of the World Aquaculture Society* (1994) Volumen 25 N°3: 371-378.
- Navarrete-Ramírez P., 2006. Determinación del Punto de No Retorno y efecto del enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* en el crecimiento y supervivencia en larvas del Pez Blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor*). Tesis de Licenciatura. UMSNH. 49pp.

- NRC 1993. *Nutrient Requirements of Fish. Nutrient Requeriments of Domestic Animals*. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council, National Academy Press, Washington, DC, 114 p.
- Önal, U. and Langdon, C., 2000. Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 157-170.
- Palacios E., Racotta I.S., Aparicio B., Arjona O. and Martínez-Palacios C.A., 2007. Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. *Fish Physiology and Biochemistry* 33, 81-91.
- Patel, R. P., Patel, M. P., and Suthar, A. M., 2009. Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*. 10, 44-47.
- Pedersen, B. H., Nilssen, E. M., Hjelmeland, K., 1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea arengus*) digesting copepod nauplii. *Marine Biology*, 94: 171-181.
- Pedroza-Islas R., Medina-Reyna C.E. y Acosta-Ruiz M.J., 2000. Uso de Ficocoloides en la Nebulizacion de Microdietas para Larvicultura Marina. *Revista Ciencia y Mar* 27-34.
- Pedroza-Islas, R., Gallardo, P., Vernon-Carter, E. L., García-Galano, T., Rosas, C., Pascual, C. and Gaxiola, G., 2004. Growth, survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquaculture Nutrition* 10: 167-173.
- Pérez H. L, Ríos-Durán M. G, Martínez-Palacios C. A., 2012. Efectos del uso de proteína soluble en la dieta, sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pez blanco

- de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*). Memorias del V Congreso CLANA: Integración Latinoamericana. Puerto Vallarta, Jalisco, 23-26 de octubre de 2012.
- Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J. C., Thébaud, L. and Mugnier, C., 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *J. World Aquac. Soc.* 24: 211-224.
- Ríos-Durán M.G., 2000. Actividad proteolítica en larvas de pez blanco *Chirostoma estor* copandaro (Pisces: Atherinidae): Implicaciones para su cultivo. Tesis de Maestría. UMSNH. 53pp.
- Robaina L. y M. Izquierdo. 2000. Methodological Strategies for the Determination of Nutrient Requirements in Finfish. *CIHEAM-Options Mediterraneeennes* (2000): 25-41.
- Rodríguez-Aguilera A., 2009. Avances y perspectivas en microdietas para larvas de peces. Universidad Católica de Temuco, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Acuicultura. *Acuatic*, 12, 1-18.
- Rojas C.P., Mares L.G.B., León F.J. y León G.M., 2000. Descripción del desarrollo larvario de pescado blanco *Menidia estor* Jordan (Pises Atherinidae) Informe final del Proyecto "Desarrollo y Crecimiento de larvas de Pescado Blanco". Proyecto CONACYT. INP. No. 1185. pB.9 509. 27pp.
- Rønnestad, I., 2002. Control and Efficiency of Digestive Function of Marine Fish Larvae. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, Mexico. 152-165.

- Ronnestad, I., Conceicao, L. E. C., Aragao C. y Dinis, M. T., 2000. Free Aminoacids are Absorbed Faster and Assimilated More Efficiently than Protein in Postlarval Senegal Sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Nutrition* 130: 2809-2812.
- Ronnestad, I., Rojas.García, C.R., Tonheim, S.K. y Conceicao, L.E.C., 2001. In Vivo Studies of Digestion and Nutrient Assimilation in Marine Fish Larvae. *Aquaculture* 201: 161-175.
- Ronnestad, I., Thorsen, A., Finn, R. N., 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177, 201-216.
- Rosemberg, M., Y. Talmon, e I. J. Kopelman. 1988. The microstructure of spray-dried microcapsules. *Food Microstructure* 7:15-23.
- Rosas, M. M., 1970. Pescado blanco (*Chirostoma estor*), su fomento y cultivo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras, Comisión Nacional de Pesca. México. 70 p.
- Ross, L.G., Martínez-Palacios, C.A., Aguilar-Valdez, M.A., Del, C., Beveridge, M.C.M. and Chavez Sanchez, Ma.C., 2006. Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor* Jordan 1880. *J. Fish Biol.*, 68, 1782–1794.
- Sargent J.R., Bell J.G., Bell M.V., Henderson R.J. and Tocher D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology* 11,183-198.

- Sargent J.R., Bell J.G., McEvoy L., Tocher D.R. and Estevez A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177,191-199.
- Segner, H., Rösch, R., Schmidt, H., Von Poeppinghausen, K. J., 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish. Biol.*, 35: 249-263.
- Segner, H., Rosch, R., Verreth, J. and Witt, U., 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 24, 121-134.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.*, 119: 471-486.
- Solorzano, P. A., 1963. Algunos aspectos biológicos del pescado blanco del lago de Pátzcuaro, Mich. (*Chirostoma estor* Jordan, 1879). Secretaria de Industria y Comercio, Dirección General de Pesca e Industrias conexas. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico- Pesqueras. México. 15pp.
- Srivastava, A., Hamre, K., Stoss, J., Chakrabarti, R., Tonheim, S. K., 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): With emphasis on the water soluble fraction. *Aquaculture* 254: 534–543.
- Stone, D.A., J, Allan, G.L., and Anderson, A.J., 2003. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bydanus bydanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. *Aquaculture Research* 34:109-121.

- Tacon A.G., 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. Programa cooperativo Gubernamental. FAO. Documento de campo 4. Brazil.572pp.
- Takeuchi, T., Ohkuma, N., Ishida, S., Ishizuka, W., Tomita, M., Hayasawa, H. and Miyakawa, H., 1998. Development of micro-particle diet for marine fish larvae. VIII Int. Symp. *Nutrition and Feeding of Fish*. Las Palmas, Spain, June 1-4. p.193.
- Takeuchi T., Wang Q., Furuita H., Hirota T., Ishida S and Hayasawa H., 2003. Development of Microparticle Diets for Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* Larvae. *Fisheries Science* 69: 547-554.
- Teshima, S., Kanazawa, A., y Koshio, S., 1993. Recent Developments in the Nutrition and Microparticulate Diets of Larval Prawns. *The Israeli J. of Aquaculture* 45(4):175-184.
- Toledo-Cuevas, E. M., Moyano López, F. J., Ramírez, D. T., Strüssmann, C. A., Álvarez-González, C. A., Martínez-Chávez, C. C. and Martínez-Palacios, C. A., 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, 42: 776–786.
- Torgensen, H., and Toledo, R. T., 1977. Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. *Journal of Food Science*, 42, 1615-1620.
- Tucker, J. W., 1998. *Marine Fish Culture*. Kluwer. EUA.
- Vázquez R., González S., Rodríguez A. and Mourente G., 1994. Biochemical Composition and Fatty Acid Content of Fertilized Eggs, Yolk Sac Stage

- Larvae and First-Feeding Larvae of the Senegal Sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 119: 273-286.
- Vetter, R. P., Hodson, R. E., Arnold, C. R., 1983. Energy metabolism in a rapidly developing marine fish egg, the red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 627-634.
- Villamar D.F. y C.I. Langdon, 1993. Delivery of dietary components to larval shrimps (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. *Mar. Biol.* 115: 635-642.
- Villegas, C.T. y Kanazawa, A., 1980. Rearing of the larval stages of prawn. *Penaeus japonicus*. Bate, using artificial diet. Mem. Kagoshima University Research Center for the South Pacific. 1(1). 43-49.
- Vu. T. T., 1983. Etude histoenzymologique des activités protéasiques dans le tube digestif des larves et des adultes de bar *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 109: 57-69.
- Yufera, M., Fernandez-Diaz, C. and Pascual, E., 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. *Aquaculture* 177: 249-256.
- Yufera, M., Fernández-Díaz, C., E. Pascual, M.C. Sarasquete, F. J. Moyano, M. Díaz, F. J. Alarcón, M. García-Gallego and G. Parra. 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition* 6; 143-152.
- Yufera, M., Kolkovski, S., Fernández-Díaz, and Dabrowski, k., 2002. Free amino acid leaching from a protein-walled microencapsulated diet for fish larvae. *Aquaculture* 214: 273-287.

- Walford, J., Lim, T. M., Lam, T. J., 1991. Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of sea bass (*Lates calcarifer*) larvae: do they ingest and digest protein-membrane microencapsulated? *Aquaculture* 92: 225-235.
- Wang, Q., Takeuchi, T., Hirota, T., Ishida, S., Miyakawa, H. and Hayasawa, H., 2004. Application of microparticle diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Fisheries Science* 70: 611-619.
- Watanabe, Y., 1981. Intracellular digestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvae or juveniles of some teleost. *Bull. Jpn. Soc. Sci.* 48, 37.42.
- Watanabe. T. y Kiron V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124: 223-251.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A., Quazuguel, P., Gall, M.M. Le, 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different Artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139, 129–138.
- Zambonino J. L., Cahu C. L. and Peres A. 1996. Partial Substitution of Di- and Tripeptides for Native Proteins in Sea Bass Diet Improves *Dicentrarchus labrax* Larval Development. *Journal of Nutrition* 127: 608-614.
- Zambonino-Infante J.L., Cahu C. and Peres A., 1997. Partial substitution of Di- and Tripeptides for native proteins in feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 225:133-147.

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

Zambonino Jose-Luis, Gisbert E, Sarasquete C, Navarro I, Gutierrez J, Cahu Chantal 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. *In Feeding and Digestive Functions of Fishes* (Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd).

Zambonino Jose-Luis, Cahu Chantal 2010. Effect of nutrition on marine fish development and quality. In *Recent advances in aquaculture research*. p. 103-124.

Zeitoun I.H., Ulrey D.E., Magee W.T., Gill J.L. & Bergen W.G., 1976. Quantifying nutrient requirements of fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33,167-172.