

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y  
ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

TESIS

EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA  
ALIMENTICIA EN LA MOJARRA  
TAHUINA, *Amphilophus trimaculatus*.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

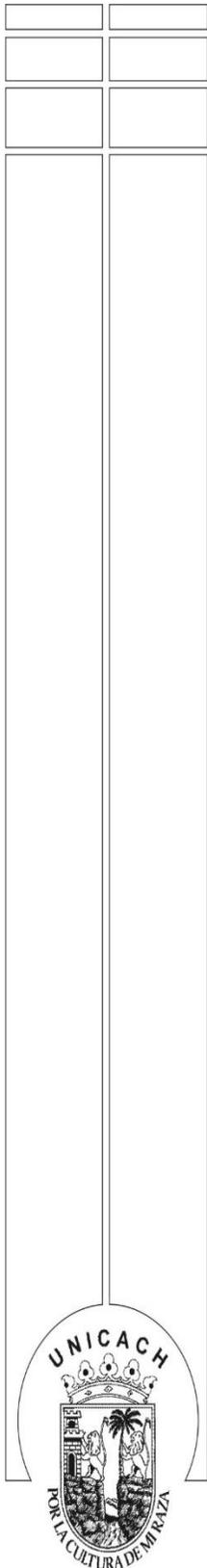
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MARINA Y MANEJO INTEGRAL DE  
CUENCAS

PRESENTA:

**FRANCISCO EMMANUEL VIDAL BELLO**

Tonalá, Chiapas

Febrero de 2018



# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

## TESIS

EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA  
ALIMENTICIA EN LA MOJARRA  
TAHUINA, *Amphilophus trimaculatus*.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA  
Y MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS

PRESENTA:

**FRANCISCO EMMANUEL VIDAL BELLO**

DIRECTOR:

**MC. ARKADY USCANGA MARTÍNEZ**

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS – CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

ASESORES:

**DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ**

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO, DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**MC. JOSÉ REYES DÍAZ GALLEGOS**

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS – CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS





Tonalá, Chiapas.  
25 de enero 2018.

C. Francisco Emmanuel Vidal Bello.

Pasante del Programa Educativo de: Lic. en Biología Marina y Manejo Integral de Cuencas.

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

**"Evaluación de la frecuencia alimenticia en la mojarra tahuina, *Amphilophus trimaculatus*."**

En la modalidad de TESIS

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores:

M. en C. Arkady Uscanga Martínez

M. en C. Delmar Cancino Hernández

M. en C. Natalia Perales García

Suplente:

M. en C. Carlos Alberto Gellida Esquinca

Firmas:

Ccp. Expediente

## DEDICATORIA

### **A Dios:**

Fue un largo camino, aun así, siempre caminaste conmigo.

*Escucha lo que te mando: Esfuérzate y sé valiente. No temas ni desmayes, que yo soy el Señor tu Dios, y estaré contigo por dondequiera que vayas. (Josué 1.9).*

### **A mi madre Minerva Vidal Bello y a mi hermana Beatriz Adriana:**

Los dos pilares que siempre me mantienen de pie.

### **A mis hermanos y sobrinos:**

Dicen que en las buenas y en las malas la familia siempre está contigo, ellos confirman esa teoría.

# AGRADECIMIENTOS

**A Dios** por prestarme salud, vida y permitirme lograr mis metas.

*Pidan y se les darán; busquen y encontrarán; llamen y se les abrirán (Mateo 7.7).*

**A mi mamá** Minerva Vidal Bello y **a mi hermana** Beatriz Adriana, por ser, consejeras, amigas, compañeras, ejemplos de amor y persistencia. No existe forma en que pueda regresarles todo el apoyo, amor, esfuerzo y sacrificio, que realizaron por mí.

**A mis hermanos** Jesús Miguel, José Juan, Bernardo, Luis Ramón, Jenny Guadalupe y Xóchitl de los Ángeles, por demostrar la gran fe que tienen en mí, por sus palabras de apoyo y de motivación.

**A mi director de tesis** el MC. Arkady Uskanga Martínez, por guiarme en el camino de la ciencia, por su confianza, amistad, consejos y gran apoyo.

**A los asesores** el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González y al MC. José Reyes Díaz Gallegos por su tiempo, indicaciones y aportaciones en la realización de esta investigación.

**A la maestra** Natalia Perales García y **al biólogo** William Rodríguez Valencia por la instrucción en el laboratorio, por su paciencia, sus grandes consejos y amistad.

**A los compañeros** Citlalli B. López Díaz, Sheridan D. Hernández Santos, Manuel E. Boo Sánchez y Magali Castillo Trujillo, ya que ellos son parte importante para el desarrollo de este trabajo.

Al Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola, del Centro de Investigaciones Costeras del Instituto de Ciencias Biológicas perteneciente a la UNICACH, por el uso de sus instalaciones, equipos y materiales necesarios para la realización práctica de este proyecto.

A todos ustedes, de corazón...

***“GRACIAS”***

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1 Frecuencia alimenticia .....	3
2.2 Enzimas digestivas .....	4
2.2.1 Las proteasas.....	5
2.2.2 Las amilasas .....	6
2.2.3 Las lipasas .....	6
2.2.4 Las fosfatasas ácidas y alcalinas .....	7
2.3 Especie en estudio.....	7
<b>III. ANTECEDENTES .....</b>	<b>9</b>
3.1 Frecuencia alimenticia .....	9
3.2 Enzimas digestivas .....	10
3.3 Especie en estudio.....	12
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos específicos .....	14
<b>V. SITIO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>15</b>
<b>VI. MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
6.1 Obtención de alevines.....	16
6.2 Unidad experimental .....	16
6.3 Diseño experimental .....	17
6.4 Alimentación.....	18
6.5 Biometrías.....	19
6.5.1 Crecimiento.....	19
6.5.2 Índices de crecimiento .....	20
6.6 Parámetros fisicoquímicos del agua .....	22

6.7 Análisis enzimático digestivo.....	22
6.7.1. Extracción de estómago e intestino .....	22
6.7.2. Extractos .....	23
6.7.3. Técnicas bioquímicas.....	24
6.8 Análisis de datos .....	27
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
7.1 Biometrías.....	28
7.1.1 Crecimiento.....	28
7.1.2 Índices zootécnicos.....	31
7.2 Análisis enzimáticos .....	32
7.2.1 Actividad enzimática digestiva.....	32
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>XI. REFERENCIAS .....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Horario de alimentación para la <i>A. trimaculatus</i> durante la etapa de alimentación. ....	18
Tabla 2. Peso (gr) de los organismos de <i>A. trimaculatus</i> los datos se expresan como promedio $\pm$ desviación estándar. Superíndices desiguales dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	28
Tabla 3. Longitud (mm) de los organismos de <i>A. trimaculatus</i> los datos se expresan como promedio $\pm$ desviación estándar. Superíndices desiguales dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	29
Tabla 4. Comparación entre tratamientos de la <i>A. trimaculatus</i> , bajo diferentes frecuencias de alimentación: TCA (tasa de crecimiento absoluta); TEP (tasa de eficiencia proteica); FCA (factor de conversión alimenticia); FC (factor de condición); ganancia en peso; supervivencia y CV (coeficiente de variación). (promedio $\pm$ desviación estándar). Superíndices desiguales dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	31
Tabla 5. Actividades enzimáticas entre tratamientos de la <i>A. trimaculatus</i> . Bajo diferentes frecuencias de alimentación: (proteasas ácidas, alcalinas, tripsina y quimotripsina). (promedio $\pm$ desviación estándar). Superíndices desiguales dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Instalaciones CEICO: A) Entrada del centro de investigaciones costeras; B) Laboratorio experimental acuícola; C) Laboratorio de nutrición acuícola.....	15
Figura 2. Obtención de alevines: A) Organismos reproductores de <i>A. trimaculatus</i> ; B) Desove de <i>A. trimaculatus</i> . ....	16
Figura 3. Sistema de estanques utilizado en el cultivo de este experimento.....	17
Figura 4. Alimento: A) Bulto de alimento ocupado en el experimento; B) recipientes en los que se dividía el alimento. ....	18
Figura 5. Biometrías: A) Vernier implementado en las biometrías; B) medición de peso.....	19
Figura 6. Disección de organismos <i>A. trimaculatus</i> .....	23
Figura 7. Preparación de extractos multienzimáticos: A) Estómagos e intestinos; B) Sonicador; C) Homogenizado de tejido; D) Centrifuga. ....	24
Figura 8. A) microplaca; B) lecturas en el multiskan.....	26
Figura 9. Peso final de los organismos <i>A. trimaculatus</i> en relación a la frecuencia alimenticia. ....	30
Figura 10. Longitud final de los organismos <i>A. trimaculatus</i> en relación a la frecuencia alimenticia.....	30

## RESUMEN

Este estudio se orientó a la aportación de datos para el conocimiento de los aspectos en el crecimiento perteneciente a la mojarra tahuina *Amphilophus trimaculatus*, la cual es un excelente candidato para el desarrollo de sistemas de producción en cautiverio. Sin embargo, existen campos del conocimiento que tienen que ser abordados para lograr un éxito completo en su cultivo. Los aspectos más relevantes a estudiar se relacionan con los procesos de alimentación y nutrición de esta especie. Esta investigación aporta datos relevantes, referente a la alimentación y cultivo de la mojarra tahuina, para establecer la cantidad de veces que se alimentan estos peces en cautiverio; asimismo, se obtuvieron datos de la relación frecuencia alimenticia y la actividad enzimática digestiva empleada en la hidrólisis de los nutrientes. Con ello se busca que los organismos consuman la cantidad adecuada del alimento optimizando así los recursos, tiempos invertidos en su cultivo, para obtener beneficios económicos y el buen rendimiento de estos organismos. La investigación tuvo el objetivo de establecer la frecuencia alimenticia óptima mediante el análisis de crecimiento, índices zootécnicos y la actividad enzimática digestiva de los juveniles de *A. trimaculatus*; Para ello se utilizaron organismos con un promedio de  $0.6 \pm 0.1$  g. evaluando cuatro frecuencias de alimentación (una, dos, tres y cuatro alimentaciones por día), dando un periodo de crecimiento de 70 días, en los cuales se realizaron biometrías cada 14 días para determinar peso, longitud e índices zootécnicos (Tasa de crecimiento absoluta, tasa de eficiencia proteínica, factor de conversión alimenticia, factor de conversión, coeficiente de variación, ganancia en peso y supervivencia). Posteriormente los organismos fueron sacrificados para análisis enzimático digestivo (proteasas ácidas y alcalinas, tripsina y quimotripsina). En lo que respecta al crecimiento se observó que existen diferencias significativas en los peces del tratamiento cuatro con un peso final de  $4.85 \pm 0.39$  g, y longitud total de  $57.90 \pm 1.41$  mm. Los índices zootécnicos no se comportaron de manera homogénea entre las pautas de alimentación. En la tasa de crecimiento absoluta ( $0.75 \pm 0.01$  g día<sup>-1</sup>), coeficiente de variación ( $0.769 \pm 0.057$ ) y ganancia en peso ( $640.78 \pm 51.59$  g) se obtuvo los mejores resultados en el tratamiento cuatro. La tasa de eficiencia proteínica y el factor de conversión alimenticia reportó sus mejores valores en los tratamientos tres ( $1.07 \pm 0.02$ ) y cuatro ( $1.10 \pm 0.05$ ). El factor de condición mostró su valor máximo en el tratamiento tres ( $2.55 \pm 0.10$ ). En relación con la actividad enzimática las proteasas alcalinas se

encontraron en mayor cantidad que las proteasas ácidas a excepción del tratamiento uno, donde proteasas ácidas y alcalinas estuvieron en  $24.02 \pm 1.76$  y  $23.15 \pm 2.69$  UEA mg proteína<sup>-1</sup> respectivamente. La tripsina en todas las frecuencias fue mayor que la quimotripsina. Esta investigación concluyó en indicar a la frecuencia cuatro como la óptima para esta especie, basados en los resultados obtenidos de los análisis de crecimiento e índices zootécnicos, además dicho tratamiento es capaz de soportar el aumento de actividades enzimáticas para la asimilación de nutrientes.

Palabras clave: *Amphilophus trimaculatus*, frecuencia alimenticia, índices zootécnicos, actividad enzimática.

# I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha existido desde tiempo milenario, siendo los egipcios los primeros en reportar registros de esta actividad. Dicha actividad se define como el cultivo de organismos acuáticos (peces, crustáceos, moluscos y plantas); también es una acción por la que se establece una forma de buscar la sustentabilidad y asegurar el abastecimiento de comida para los humanos (FAO, 2004; FAO, 2006). Esta actividad ha ido en incremento a nivel mundial (FAO, 2012; FAO, 2016), por lo que se ha convertido en una acción rentable, prueba de ello es el haber alcanzado otro record histórico en la producción acuícola a nivel mundial para el 2013, con una producción de 97 millones de toneladas; de los cuales 66.6 millones de toneladas correspondieron a peces comestibles. Aportando así el continente Americano 3 187 319 toneladas (América latina 2 565 107 toneladas, Caribe 28 736 toneladas y América del norte 593 476 toneladas) (FAO, 2014; FAO, 2015). El cultivo de organismos acuáticos ha aumentado su importancia, en otros países como exportadores de todo el mundo. Entre estos mercados de exportación resaltan: Brasil, México, la Federación de Rusia, Egipto, Asia y el Cercano Oriente en general (FAO, 2012; FAO, 2014).

El cultivo de organismos acuáticos en todo el mundo está conformado por un amplio rango de conocimientos básicos y aplicados sobre reproducción, genética, nutrición, alimentación, patologías y sistemas de producción de un gran abanico de especies cuyo aprovechamiento económico es ya una realidad. Estos conocimientos, sirven como base para el desarrollo del cultivo de nuevas especies (Sáenz de Rodrigañez *et al.*, 2009). Es importante destacar que, durante el desarrollo del cultivo de una especie, el alimento es el que mayor gasto genera alcanzando costos totales del 60% de la producción (Madrid *et al.*, 2005; Bacinar *et al.*, 2007; FAO, 2010). Además, la alimentación al ser básicamente un proceso de transformación energética requiere de su análisis para optimizar el grado de conversión alimenticia sin perder las propiedades energéticas del alimento

(Moyano, 2006). Por ello algunos de los principales retos del cultivo de organismos acuáticos es identificar los requerimientos nutricionales de las especies cultivadas, con el propósito de mejorar su rendimiento productivo, optimizar la ganancia de peso y tallas, disminuir la presencia de enfermedades e incrementar el margen de ganancia económica (Oliva, 2012).

En México las principales especies que se cultivan son la carpa, tilapia, trucha, ostión y bagre (FAO, 2005). Cabe destacar que algunas de estas especies son introducidas, esto se debe a que las técnicas para su cultivo están establecidas. Sin embargo, las especies introducidas involucran riesgos para la fauna local como son: degradación del ambiente receptor, competencia con las comunidades autóctonas, degradación genética de poblaciones, introducción de enfermedades y efectos socioeconómicos (Martínez y Ross, 1994).

Es muy importante mencionar que la frecuencia alimenticia va de la mano con las actividades de las enzimas digestivas; estas últimas nos permiten conocer la cantidad de alimento que puede consumir un pez y saber la cantidad de enzimas que destinan los organismos para degradar los nutrientes requeridos por el organismo.

Esta investigación aporta datos relevantes, referente a la alimentación y cultivo de la tahuina (*Amphilophus trimaculatus*) para establecer la cantidad de veces que se alimentan estos peces en cautiverio; así como la relación de enzima empleada en la digestión de los nutrientes. Con ello se busca que los organismos consuman la cantidad adecuada del alimento optimizando así los recursos y tiempos invertidos en su cultivo. Además de los beneficios económicos y el buen rendimiento de estos organismos.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Frecuencia alimenticia

Para que el cultivo de una especie sea rentable habrá que optimizar los gastos de producción y/u operación lo más eficaz posible, tomando en cuenta que el mayor gasto en la acuicultura semi-intensiva e intensiva es la alimentación, como ya se ha mencionado anteriormente (Madrid *et al.*, 2005; Bacinar *et al.*, 2007; FAO, 2010). No solo se trata de qué tipo de alimento se le suministre al pez, sino también la cantidad, debido a que un exceso de alimento significaría una mayor inversión económica y el excedente de alimento (alimento no consumido) deteriora la calidad de agua lo cual podría ocasionarnos problemas que terminarían afectando la producción y rentabilidad del cultivo (Priestley *et al.*, 2006; Bautista y Ruiz, 2011). Sin embargo, el disminuir los tiempos y suministro de alimentación trae consigo que los organismos no alcancen las tallas deseadas en los tiempos correspondientes (Riche *et al.*, 2004; Arias, 2007; Guerra *et al.*, 2009; Flores y Vergara, 2012). Por lo tanto, es importante el conocer la cantidad óptima de alimento a suministrar durante el cultivo de los peces.

También, hay que tomar en cuenta que la modificación de los hábitos alimenticios de una especie en cultivo puede afectar la efectividad con la que el alimento es asimilado, en gran parte esto se debe al cambio sobre las pautas en las que se suministra el alimento y la participación de las enzimas digestivas las cuales: pueden no ser producidas en cantidad suficiente para mantener una relación enzima/sustrato adecuada a la asimilación de dicho alimento (Moyano, 2006).

## 2.2 Enzimas digestivas

Dentro de la acuicultura se ha implementado diversos parámetros morfológicos, histológicos o bioquímicos con el fin de estimar el crecimiento y/o potencial de supervivencia de las larvas de peces silvestres (Ferron y Leggett, 1994). Dentro de la gran gama de análisis bioquímicos se ha estudiado la presencia de proteínas como lo es la expresión de proteína de choque térmico (HSPs por sus siglas en inglés *Heat Shock Proteins*) en específico la expresión de las proteínas de estrés HSP70 y HSP90 son viables para determinar el estrés de los organismos en la dorada y trucha (Cara *et al.*, 2005). Otro factor bioquímico son las enzimas, las cuales pueden ser usadas para distinguir a priori entre lotes de larvas con diferentes potenciales de supervivencia, así mismo la fisiología digestiva y la actividad de enzimas digestivas pueden ser utilizadas como indicador del estado nutricional (Cara *et al.*, 2004; Morote *et al.*, 2005; Leef *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015). La tripsina y quimotripsina suelen ser las enzimas más utilizadas como indicadores nutricionales (Cara *et al.*, 2004; Sunde *et al.*, 2004; Cara *et al.*, 2007). Generalmente los estudios realizados con base en enzimas digestivas tanto en su descripción o en estudios aplicados son extensos no solo en peces, también en crustáceos y moluscos. Dichos estudios, básicamente, se centran en describir las enzimas que se encuentran presentes y de cuantificarlas; en cuanto a los estudios aplicados la mayoría es en actividad enzimática, casi siempre relacionada con el alimento y estrés de los organismos; estos estudios analizan las funcionalidades de las enzimas, variación en la cantidad de enzimas segregadas, inhibidores o inactivadores de las enzimas (Moyano, 2006).

Para tener un contexto básico de estas enzimas se debe mencionar su definición y su clasificación: Lehninger (1984) describió a las enzimas como catalizadores biológicos que incrementan la rapidez o la velocidad de una reacción, sin verse alterada ella misma; la mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas, las cuales se han clasificado por parte de la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos:

Óxido reductasas (catalizan reacciones de óxido-reducción), Transferasas (catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra), Liasas (catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones a un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico), Isomerasas (catalizan reordenamientos intramoleculares), Ligasas (catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas), e Hidrolasas (catalizan rupturas hidrolíticas). De los cuales en el grupo de las hidrolasas se encuentran clasificadas la mayoría de las enzimas digestivas (Herrera, 2005).

### **2.2.1 Las proteasas**

Las proteasas son hidrolasas específicas en relación con los enlaces que fragmentan, dentro de los cuales, existen dos subgrupos: las exopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína) y las endopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos internos (Mathews y Van Holde, 1998). Así mismo, se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, donde se reconocen cuatro grupos principales:

- Serina-proteasas: poseen un grupo serina en el centro activo, así como histidina y ácido aspártico.
- Cisteina-proteasas: se caracterizan por la presencia del grupo cisteina (-SH) en su centro catalítico.
- Proteasas ácidas o aspárticas: se caracterizan por la presencia de ácido aspártico en el centro activo, y poseen máxima actividad a pH ácido.
- Metal-proteasas: poseen un residuo de ácido glutámico en el centro activo, y requieren de un catión divalente (Zn, Ca o Mg) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.

### 2.2.2 Las amilasas

Las amilasas catalizan la hidrólisis del enlace  $\alpha$ -1-4 del almidón y glucógeno. Se dividen en alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), o endo y exo amilasas. La  $\alpha$ -amilasa está presente en el jugo pancreático de una gran cantidad de animales (Archibal, 1987), ya que hidroliza indistintamente enlaces a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de glucosa y maltosa. Por su parte la  $\beta$ -amilasa hidroliza a los carbohidratos por el extremo no reductor, y se restringen exclusivamente al reino vegetal (Hirikado *et al.*, 1994) y algunos microorganismos.

### 2.2.3 Las lipasas

Estas enzimas han sido clasificadas en dos tipos principales:

- Esterasas, que preferentemente actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular que tienen una cierta capacidad de solubilizarse.
- Lipasas verdaderas que se distinguen porque hidrolizan sustratos poco solubles.

Dichas enzimas se han descrito en varios tejidos animales (páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático). En organismos superiores, la lipasa pancreática actúa específicamente sobre los enlaces éster exteriores (enlaces a 1 y 3), por lo que se produce principalmente una mezcla de ácidos grasos y monoglicéridos. La hidrólisis digestiva de los triglicéridos es activada por el ion  $\text{Ca}^{2+}$  y requiere de la presencia de un factor llamado colipasa (Canioni *et al.*, 1977).

#### **2.2.4 Las fosfatasas ácidas y alcalinas**

Las fosfatasas ácida y alcalina (ortofosfórico monoéster fosfohidrolasas EC 3.1.3.2 y 3.1.3.1) catalizan la separación de fósforo inorgánico (P) a partir de fosfato orgánico. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes capas tisulares del estómago. Su papel fisiológico en los vertebrados superiores está relacionado con los procesos de mineralización de los huesos (Harris, 1989), así como en procesos de transporte de nutrientes a través de membrana. De hecho, ambas fosfatasas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteínas y lípidos, e incluso de agua e iones en el caso de la fosfatasa alcalina (Dupuis *et al.*, 1991). Por otra parte, se ha demostrado en mamíferos que la disminución del nivel de actividad fosfatasa alcalina presente en la membrana de las células intestinales puede asociarse a estados de mal nutrición y enfermedad (Kumar y Chase, 1971).

#### **2.3 Especie en estudio**

En general los organismos pertenecientes a la familia Cichlidae son óptimos para su cultivo por su fácil adaptabilidad a sistemas modificados (Toledo y García, 2000), de igual manera los cíclidos son unos de los grupos con mayor biodiversidad mundial (Kullander, 2003). Se encuentran integrados en 112 géneros y 1 327 especies (Kullander, 2003; Nelson, 2006), de los cuales 12 géneros y 53 especies se distribuyen en México (Miller *et al.*, 2005). Una de estas especies es *Cichlasoma trimaculatum* (mojarra tahuina); la cual es de hábitos omnívoros, acepta fácilmente alimentos artificiales, es adaptable a sistemas cerrados y soporta la manipulación (Violante, 1995). Dichas cualidades la convierten en una especie ideal para la acuicultura local, además de su aceptabilidad en el mercado regional gracias a la tradición de consumo e importancia en las pesquerías artesanales (Gómez *et al.*, 2012).

La mojarra tahuina es una especie que habita medios estuarinos, y se adapta fácilmente a sistemas de agua dulce (Miller *et al.*, 2009). Fue clasificada

por Günther, en 1867 dentro de la clase Actinopterygii, perteneciente al orden de los Perciformes, como parte de la familia Cichlidae y género *Cichlasoma*. Dándole así el nombre binomial de *Cichlasoma trimaculatum* (FishBase, 2014). Sin embargo, hay que destacar que actualmente la especie se clasifica como *Amphilophus trimaculatus* (Rícan, 2016) y dicho nombre fue ocupada en el presente estudio.

La *A. trimaculatus* es un excelente candidato para el desarrollo de sistemas de producción en cultivos semi-intensivos e intensivos, sin embargo, existen campos del conocimiento que tienen que ser abordados para lograr un éxito completo en su cultivo. Los aspectos más relevantes a estudiar se relacionan con los procesos de alimentación y nutrición de esta especie, lo que permitirá conocer la frecuencia de alimentación, con ello se obtendrá un mejor manejo del cultivo evitando al máximo el desecho de sustancias nitrogenadas e incrementar la velocidad de crecimiento y la supervivencia de los organismos. Por estas razones en el presente trabajo se planteó el estudio de la frecuencia alimenticia, así como la acción de las enzimas digestivas durante el proceso de alimentación de la mojarra tahuina.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Frecuencia alimenticia

Los principales aspectos a identificar en la alimentación de organismos acuáticos son: la calidad, cantidad y frecuencia en la que se administra el alimento. La calidad del alimento se centra en contener los requerimientos óptimos (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales) de los organismos conforme a su etapa de crecimiento (Torres y Hurtado, 2012). De igual manera la cantidad de alimento a suministrar dependerá de la etapa del cultivo, calidad del alimento, variación estacional y por último la frecuencia alimenticia. La cual se determina como las veces en que se suministra el alimento, en ocasiones este aspecto es el que más se descuida (Kuri, 1991). La manera en que se suministra el alimento condiciona diversos aspectos como la tasa de crecimiento, los índices de conversión alimenticia y la calidad del agua. Por ello se busca la manera eficiente de optimizar los aspectos positivos y minimizar los negativos, relacionados con la frecuencia alimenticia (Madrid y López, 2001).

Los estudios relacionados con la frecuencia alimenticia se han realizados en diferentes grupos de organismos, por ejemplo; invertebrados como lo es el erizo de mar *Loxechinus albus* (Cárcamo *et al.*, 2005; Cárcamo, 2015). Este tipo de estudios también se han realizado en crustáceos como el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Robertson *et al.*, 1993; Velasco *et al.*, 1999; Carvalho y Nunes, 2006), el camarón tigre *Penaeus monodon* (Smith *et al.*, 2002) y la langosta de roca *Panulirus cygnus* (Johnston *et al.*, 2008).

En cuanto a peces se refieren se han realizado varios estudios relacionados con la frecuencia alimenticia, por ejemplo, en el estudio realizado por Harpaz *et al.* (2005), en peces conejo *Lates calcarifer* demostró que una reducción de alimento al 2% de la biomasa total da como consecuencia una desnutrición y afecta la tasa

de crecimiento, en este mismo estudio se determinó que para esta especie existe una mayor actividad enzimática durante el día. Otro ejemplo es el estudio realizado en juveniles de pez roca coreana *Sebastes schlegeli* la cual demuestra que una alimentación al día (a saciedad) es adecuado para la mejora de ganancia en peso, darles dos o más alimentaciones al día causa un mayor contenido de lípidos del cuerpo sin mejorar el crecimiento de los peces (Lee *et al.*, 2000).

En Cíclidos como la tilapia *Oreochromis niloticus* se ha determinado que una frecuencia alimenticia de tres veces al día aporta la mejor asimilación de nutrientes y crecimiento, también se establece que cuatro horas es el óptimo periodo de secreción y regreso de apetito (Riche *et al.*, 2004). En la especie *O. aureus* no se encontró diferencia significativa en cuanto a relación de ganancia en peso y la frecuencia alimenticia (Vega *et al.*, 2011) y en la tilapia roja (*O. sp.*), Arias en el 2007 estableció que la frecuencia alimenticia óptima para esta especie es de dos veces al día dando 20 minutos como tiempo de alimentación.

### **3.2 Enzimas digestivas**

En peces se han realizado diversos estudios relacionados con la actividad enzimática, dentro de estos se encuentran el estudio realizado por Álvarez, en el 2003 el cual evaluó la actividad enzimática digestiva y evaluación dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*). En el 2009 Perales realizó el estudio de ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*). En este mismo año se realizó el estudio la expresión del gen de tripsina durante la ontogenia inicial de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) (Arevalo, 2009). En el 2010 Zarate realizó la Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Los estudios relacionados con la actividad enzimática también se han realizado en invertebrados como el camarón *Litopenaeus vannamei* (Gamboa, 2001) y en la pigua *Macrobrachium carcinus*. (Manríquez *et al.*, 2011).

En cuanto a los Cíclidos y la actividad enzimática se encuentran estudios realizados como, la actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial de la mojarra Castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*) en donde las actividades lipasa, amilasa y quimotripsina se detectaron desde el tercer día, las actividades específicas tipo tripsina y proteasa ácida principales incrementos a tiempos muy próximos a los 24 y 21 después de fertilización, respectivamente. Este trabajo se concluyó que el momento más indicado para sustituir el alimento vivo por una dieta artificial es el día 11 después de fertilización para obtener un mejor crecimiento y supervivencia (Ramírez, 2008). Otro estudio es el descrito por Cuencas en el 2013: (Fisiología digestiva de la mojarra castarrica *C. urophthalmus*, Teleostei: Cichlidae). Dentro de la cual los estudios moleculares permitieron corroborar la expresión de  $\alpha$ -amilasa en embriones libres a los 3 días después de eclosión y se nota un incremento sostenido de la expresión génica de  $\alpha$ -amilasa a partir de los 20 días después de eclosión, este incremento resultó acorde con la presencia de un estómago estructural y funcionalmente diferenciados (incluyendo la presencia de glándulas gástricas funcionales), lo cual fue sincrónico con un páncreas plenamente funcional. En este mismo estudio se determinó que la actividad enzimática de proteasas intestinales, resultó ser mayor que la actividad derivada de proteasas estomacales. Dichas actividades, están restringida a distintas regiones del intestino, mostrando una clara zonación funcional.

En estudios relacionados con enzimas digestivas en la *A. trimaculatus* (*C. trimaculatum*) se encuentran, cambios en las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial en el cíclido de tres puntos *Cichlasoma trimaculatum* elaborada por Toledo *et al.*, en el 2014 en el cual reporta la aparición de la actividad enzimática, en específico la presencia de las proteasas ácidas en bajas actividades desde el momento de la eclosión de las larvas es decir desde el día cero después de eclosión (dde), la cual se incrementó para los días 9 y 15 dde; las proteasas alcalinas, tripsina y quimotripsina está presente desde el día seis dde durante la alimentación exógena con nauplios de Artemia; Todo lo anterior se vio

reflejado como estrategia para optimizar el aprovechamiento de los nutrientes del saco vitelino y el inicio de la alimentación exógena siendo el día 15 dde donde se registra la mayor actividad enzimática coincidiendo con el inicio de la alimentación dieta comercial. Así mismo en el 2016, Toledo et al., realizo la caracterización parcial de las proteasas digestivas del cíclido de tres puntos *Cichlasoma trimaculatum* (Gunter 1867) en el cual se determinó que existe una mayor actividad de proteasas alcalinas ( $3.95 \pm 0.32$  IU  $\text{mg}^{-1}$  de proteína) en comparación con las proteasas ácidas ( $2.01 \pm 0.57$  IU  $\text{mg}^{-1}$  de proteína). La temperatura óptima para las proteasas ácidas es de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ., el pH óptimo para la actividad proteasa ácida fue pH 2 y la temperatura óptima para las proteasas alcalinas es de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el pH optimo fue de 10. Ellos concluyen en base a sus resultados que la digestión en *C. trimaculatum* está constituida por una única proteasa de baja acidez en el estómago que se inhibió por completo, de igual manera indican que la digestión con proteasa alcalina es más alta y más estable a la variación de estos parámetros, y es altamente resistente a los inhibidores, lo cual sugiere que hay una alta capacidad digestiva alcalina para hidrolizar diferentes fuentes de proteínas. En consecuencia, esta especie puede considerarse un pez de agua dulce con hábitos nutricionales omnívoros.

### **3.3 Especie en estudio**

Con base en esta especie se han realizado diversos estudios de hábitat y ecología, un ejemplo es el estudio realizado por Ortiz (2011) “Análisis del crecimiento y madurez sexual de *C. trimaculatum* (*A. trimaculatus*) (Gunter, 1867), en el cual determino que las hembras alcanzan la madurez sexual en una talla menor que los machos además presentan un crecimiento alométrico positivo lo cual quiere decir que pesan más de lo que miden longitudinalmente. Por otra parte, Violante en 1995 aporto al conocimiento básico de esta especie, con organismos pertenecientes la laguna de Tres Palos Guerrero, México. Otro estudio es relacionado con la parasitología de esta especie fue elaborado por Violante et

*al.*, (2008) en el cual se destaca que los parásitos encontrados son en su mayoría generalistas y pocos específicos.

En cuanto a los conocimientos sobre la alimentación de esta especie, Yáñez-Arancibia (1978) la describió como una especie omnívora, estudios en actividades enzimáticas también las consideran con cualidades de hábitos alimenticios omnívoros (Toledo *et al.*, 2014; Toledo *et al.*, 2016).

Recientemente Rícan (2016) evaluó la diversidad y evolución de los peces Cíclidos de América Central, reclasificando varias especies, dentro de ellas la *C. trimaculatum*, dando el nombre binomial de *Amphilophus trimaculatus*. De igual manera la FishBase (2017) lo clasifica como *Amphilophus trimaculatum*. Para efecto de este documento será considerado *A. trimaculatus*.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Determinar la óptima frecuencia alimenticia mediante la actividad enzimática de los juveniles de *A. trimaculatus*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia alimenticia óptima para generar un mayor crecimiento en peso y talla de *A. trimaculatus*.
- Determinar la actividad enzimática de proteasas totales, tripsina y quimotripsina de acuerdo a las frecuencias alimenticias.
- Medir el efecto de las diferentes frecuencias alimenticias sobre los siguientes índices zootécnicos: TCA (Tasa de Crecimiento Absoluta); TEP (Tasa de Eficiencia Proteica); FCA (Factor de Conversión Alimenticia); FC (Factor de Condición); Ganancia en peso; Supervivencia y CV (Coeficiente de Variación).

## V. SITIO EXPERIMENTAL

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio experimental acuícola y en el Laboratorio de Sanidad y Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Costeras (CEICO) del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas en el municipio de Tonalá, Chiapas (Figura 1).



Figura 1. Instalaciones CEICO: A) Entrada del Centro de Investigaciones Costeras; B) Laboratorio experimental acuícola; C) Laboratorio de nutrición acuícola.

## VI. MÉTODOS

La determinación de la frecuencia alimenticia y la cuantificación de la actividad enzimática digestiva se realizaron de la siguiente manera:

### 6.1 Obtención de alevines

Los alevines de mojarra tahuina (Figura 2) se obtuvieron de desoves simultáneos bajo condiciones controladas en el Laboratorio de nutrición y producción acuícola del CEICO para obtener una cantidad de 300 peces de la misma edad, por lo que fue necesario seleccionar un lote de reproductores con aspectos fisiológicos aceptables con la finalidad de que los rasgos deseables sean expresados en generaciones subsiguientes y contar con organismos de características genéticas similares para lograr homogeneidad en los experimentos.

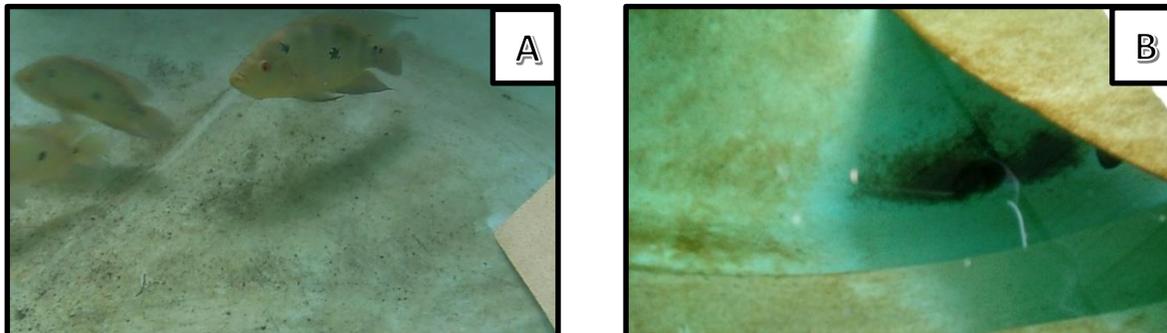


Figura 2. Obtención de alevines: A) Organismos reproductores de *A. trimaculatus*; B) Desove de *A. trimaculatus*.

### 6.2 Unidad experimental

El sistema que se utilizó durante el desarrollo de esta investigación es un sistema de recirculación cerrado (Figura 3), consta de 50 tanques cilindro cónico con un volumen total de 180 L cada uno; de los cuales solo se ocuparon 12 tanques. Dicho sistema incluye un filtro de arena sílica de diferentes tamaños de partículas

(filtro Triton II, marca Pentair) para la retención de macro partículas, también está compuesto por dos lámparas de UV (150 watts, marca Emperor Aquatics, INC) para eliminación de organismos patógenos, y dos filtros de bolsa (CLEAN & CLEAR, marca Pentae), que sirven para capturar los sólidos más pequeños que están suspendidos en el agua. El sistema de aireación fue alimentado por un blower de 2.5 HP marca Sweetwater, modelo S-51. Los recambios de agua se realizaron parcial o totalmente según indicaron los requerimientos físico-químicos de los organismos.

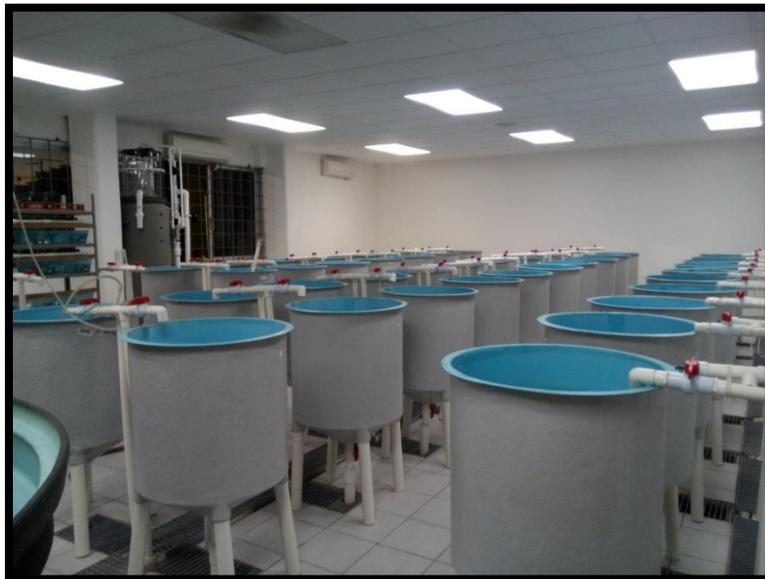


Figura 3. Sistema de estanques utilizado en el cultivo de este experimento.

### 6.3 Diseño experimental

En el bioensayo se evaluó el crecimiento (peso y longitud) y la actividad enzimática con base a cuatro frecuencias alimenticias. La asignación de los tratamientos en los tanques, así como la distribución de los peces se realizó de forma aleatoria, con tres replicas por tratamiento. Para el experimento se colocó 25 peces por tanque con un promedio de  $0.6 \pm 0.1$  g.

## 6.4 Alimentación

A los organismos se les proporciono el 10% de alimentación de acuerdo a su biomasa total, el pienso utilizado fue de la marca NUTRIPEC (figura 4) (53% de proteína y 15% de grasa) Purina® y se alimentaron de la siguiente manera (tabla 1).

Tabla 1. Horario de alimentación para la *A. trimaculatus* durante la etapa de alimentación.

Frecuencia de alimentación (veces al día)	Hora			
	08:00	11:00	14:00	17:00
1	X			
2	X	X		
3	X	X	X	
4	X	X	X	X



Figura 4. Alimento: A) Bulto de alimento ocupado en el experimento; B) Recipientes en los que se dividía el alimento.

El alimento proporcionado fue adecuado al tamaño de la boca de los peces para asegurarse que sea consumido, al término de cada alimentación el excedente de alimento se retiró de los tanques por medio de sifoneo para posteriormente ser secado (fue deshidratado en el horno de secado marca TERLAB), pesado en seco con una balanza analítica (marca ADAPTER, modelo HR-200), registrando los datos para realizar los cálculos de la eficiencia alimenticia y almacenado.

## 6.5 Biometrías

### 6.5.1 Crecimiento

Durante el desarrollo del experimento, se realizaron biometrías cada 15 días para llevar un registro del cambio en talla y peso de cada organismo (el peso se determinó con una balanza marca Sartorius modelo BL310 con una precisión de 0.01 g; y longitud total se midió con un vernier digital marca Electronic Digital Caliper con una precisión de 0.03 mm.) (Figura 5), además se modificaron los gramos de alimentos a suministrarse adecuándolos al porcentaje correspondiente de la biomasa total por estanque.

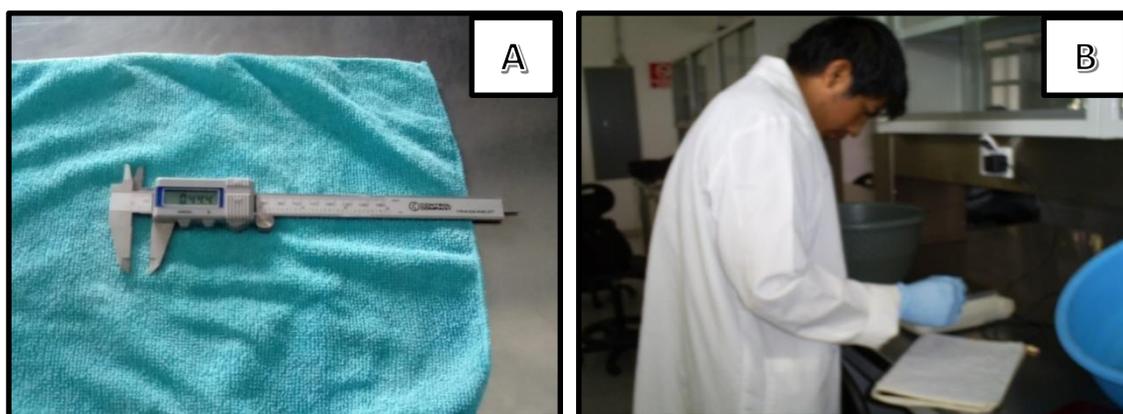


Figura 5. Biometrías: A) Vernier implementado en las biometrías; B) Medición de peso.

### 6.5.2 Índices de crecimiento

- Tasa de crecimiento absoluta:

$$TCA = \frac{(Pf - Pi)}{\text{días}}$$

Dónde:

Pf = Peso promedio final de los peces

Pi = Peso promedio inicial de los peces

(Gracia y Castelló, 1996.).

- Tasa de eficiencia proteica:

$$TEP = \frac{Pg}{Psp}$$

Dónde:

Pg = Peso fresco ganado por el pez

Psp = Peso seco de la proteína en el alimento suministrado

(Watanabe, 1988).

- Factor de conversión alimenticia:

$$FCA = \frac{Pa}{Pg}$$

Dónde:

Pa = Peso del alimento ingerido (calculado en base seca en este estudio)

Pg = Peso fresco ganado por el pez

(Hepher, 1993).

- Factor de condición:

$$FC = \frac{P_t}{L_t^3} \times 100$$

Dónde:

P<sub>t</sub> = Peso promedio de los peces al tiempo t

L<sub>t</sub> = Longitud promedio de los peces al tiempo t

(Weatherley y Gill, 1987; Steffens, 1989).

- Ganancia en peso:

$$\text{Ganancia en peso \%} = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100$$

Dónde:

P<sub>f</sub> = Peso final de los peces

P<sub>i</sub> = Peso inicial de los peces

- Coeficiente de variación

$$\text{Coeficiente de variación \%} = \frac{DE\ PPf}{PPf}$$

Dónde:

DE PPf = Desviación estándar del promedio del peso final

PPf = Promedio del peso final

(Biswas *et al*, 2010)

- Supervivencia.

$$S = (Ni / Nf) \times 100$$

Dónde:

Ni = Número inicial de organismos

Nf = Número final de organismos

## **6.6 Parámetros fisicoquímicos del agua**

Se efectuó un monitoreo diario de oxígeno disuelto y temperatura, una vez a la semana se monitoreó amonio total, pH, nitritos y nitratos en cada uno de los tanques, utilizando los siguientes equipos: temperatura (°C) y oxígeno disuelto (mg/l) oxímetro marca YSI modelo 556; para el pH se utilizó un equipo marca Thermo científico, modelo Orion 3star pH portable. Amonio, nitritos y nitratos (ppm) a través de métodos espectrofotométricos (Strickland y Parsons, 1972), utilizando un espectrofotómetro marca Thermo Cientific, modelo Genesis 10s UV-vis.

## **6.7 Análisis enzimático digestivo**

### **6.7.1. Extracción de estómago e intestino**

Los organismos sometidos al periodo de experimentación se sacrificaron con una sobredosis de anestésico de MS222 a una concentración de 1 g l<sup>-1</sup> (metanosulfonato tricaína, Argent, Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA), posteriormente se procedió a la extracción del sistema digestivo (estómago e intestino), las muestras se mantuvieron en hielo durante todo su proceso (Figura 6).

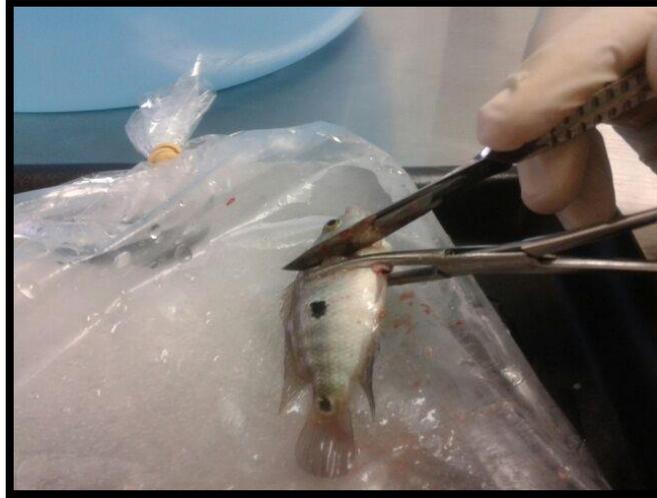


Figura 6. Disección de organismos *A. trimaculatus*.

### 6.7.2. Extractos

Los extractos multienzimáticos de estómagos e intestinos fueron pesados para agregarles buffer en relación 1:10 (peso/volumen), los *buffers* fueron: *buffer* Glicina-HCL al 0.1 M pH 2, para estómago, y en intestino el *buffer* Tris-HCL 30mM + CaCl<sub>2</sub> 12.5mM pH 7.5. Una vez agregados los *buffers* en cada muestra se homogenizo respectivamente, con ayuda de un sonicador (marca SONICS Vibra Cell) como se detalla en Moyano *et al.* (1996). El homogenizado resultante se vertió en tubos de 2 ml (marca Eppendorf), se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se extrajeron los sobrenadantes para ser depositados en otros tubos para su almacenamiento a -20 °C (Figura 7)

La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó por el Método de Bradford (Bradford, 1976) usando como estándar una curva patrón de albúmina sérica bovina a razón de 1 mg ml<sup>-1</sup>.

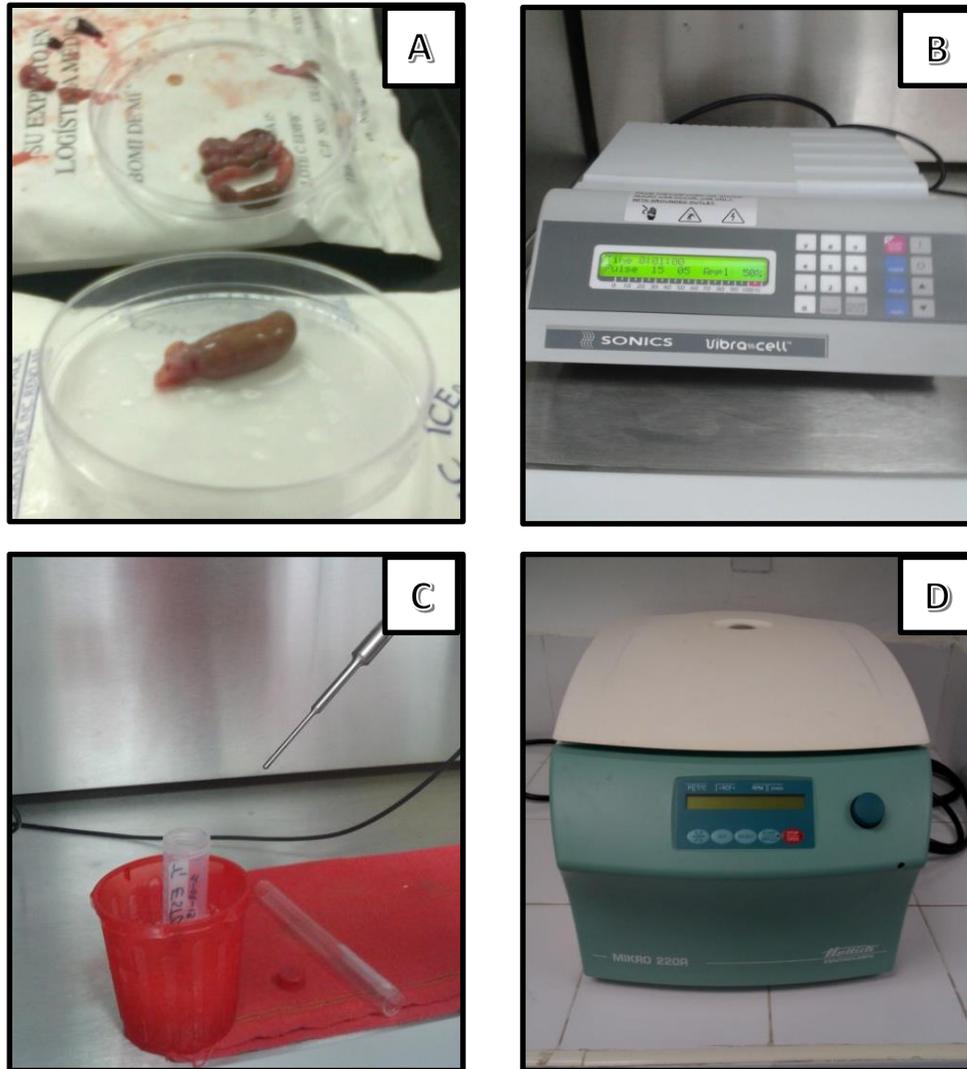


Figura 7. Preparación de extractos multienzimáticos: A) Estómagos e intestinos; B) Sonicador; C) Homogenizado de tejido; D) Centrifuga.

### 6.7.3. Técnicas bioquímicas

#### ➤ Proteasa ácida

Para la determinación de la actividad proteasa ácida se utilizó la técnica descrita por Anson, (1938). Se le agregó 10  $\mu$ l de extracto enzimático se colocó 0.5 ml de TCA al 20% (solo a los controles) para detener la reacción. Posteriormente, se le agregó 1 ml de hemoglobina (1%), en tampón Glicina-HCl 0.1 M a PH 2. (100 mg

de hemoglobina en 10 ml de tampón glicina). Se incubó en el baño maría a 37 °C en un lapso de tiempo de 15 minutos. Una vez transcurrido este lapso de tiempo se detuvo la reacción adicionando 0.5 ml de TCA al 20 %. El sobrenadante se colocó en reposo durante 20 min a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue colocado en cubetas de plástico para la medición de absorbancia en un espectrofotómetro a 280 nm. (marca Thermo Cientific).

➤ Proteasa alcalina

La actividad de las proteasas alcalinas se evaluó de acuerdo a la técnica descrita por Kunitz (1947) modificada por Walter (1984), se agregaron 20 µl de extracto enzimático, 0.5 ml de caseína Hammerstein al 1 %, tampón Tris-HCl 50 mM a pH 9.0, la mezcla se incubó durante 15 min a una temperatura de 37 °C, la reacción se detuvo agregando 0.5 ml de TCA al 20 %. Posteriormente se mantuvo la mezcla de reacción durante 10 min en refrigeración a 4 °C, se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min a 4 °C. La absorbancia de los péptidos solubles liberados por el TCA se midió a 280 nm en un espectrofotómetro UV/visible. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de tirosina liberado en 1 min, usando el coeficiente de extinción molar de la tirosina ( $0.005 \text{ ml}/\mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), todas las medidas se hicieron por triplicado.

➤ Quimotripsina

Para esta actividad se implementó la técnica descrita por DelMar *et al.* (1979). En microplaca (marca BRAND *plates*), se colocaron 10 µl de extracto (en las réplicas se colocó extracto y en los blancos fue agua destilada), 167 µl de Tris-HCl (60 mM, pH 7.5), 10 µl CaCl<sub>2</sub> (192 mM, en Tris.HCl, pH 7.5), y 5 µl de SAAPNA (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide, a 19.2 mM). Posteriormente la placa se introdujo en un MULTISKAN FC (marca Thermo SCIENTIFIC) (Fig. 8) previamente programado para agitar durante 30 segundos y realizar lecturas de Abs a 405 nm

cada 15 seg, durante 30 min. Una unidad de actividad fue definida como un 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilina liberada por minuto de quimotripsina según su respectivo sustrato.

➤ Tripsina

La actividad de la tripsina se midió con la técnica descrita por Erlanger *et al.* (1961). En microplaca (marca BRAND plates), se colocó 10  $\mu\text{l}$  de extracto (en las réplicas se colocó extracto y en los blancos fue agua destilada), 167  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl (60 mM, pH 7.5), 10  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (192 mM, en Tris.HCl, pH 7.5), y 5  $\mu\text{l}$  de BAPNA ( $\text{N}\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida a 19.2 mM). Posteriormente la microplaca se introdujo en un MULTISKAN FC (marca Thermo SCIENTIFIC) previamente programado para agitar durante 30 segundos y realizar lecturas de Abs a 405 nm cada 15 seg, durante 30 min (figura 8). Una unidad de actividad fue definida como un 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilina liberada por minuto de tripsina según su respectivo sustrato.

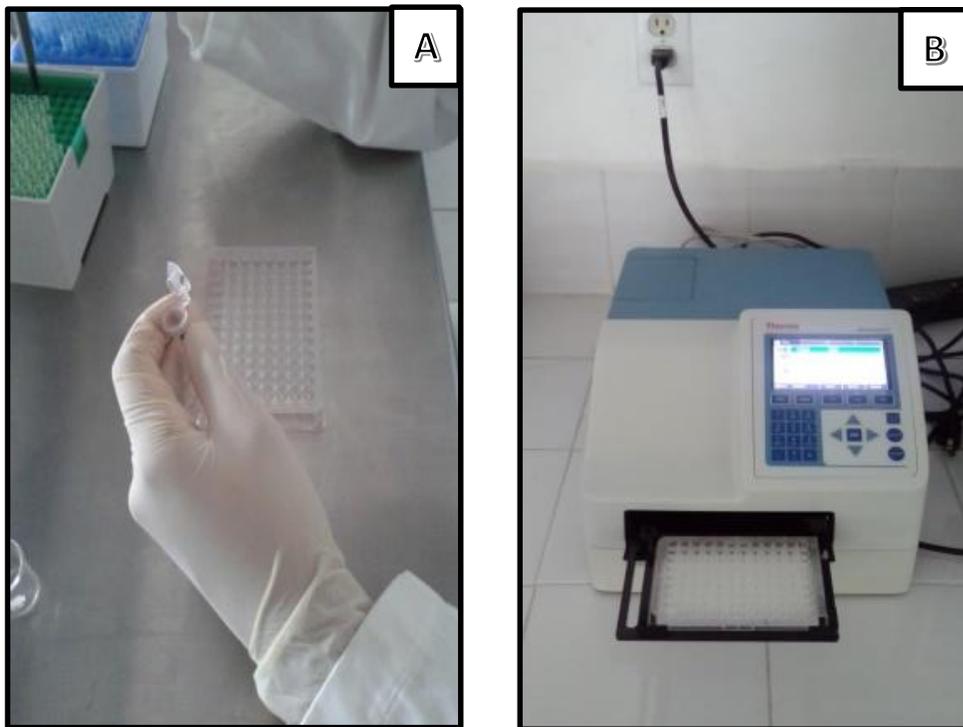


Figura 8. A) Microplaca; B) Lecturas en el Multiskan.

## 6.8 Análisis de datos

Los datos de peso y longitud obtenidos de los muestreos fueron introducidos en la base de datos, para luego ser procesados y evaluados a través de un análisis de varianza simple (One-way ANOVA), a fin de evaluar el efecto de las dietas sobre los peces, aplicándose el Test de comparación múltiple de promedios Tukey, ( $P \leq 0.05$ ), cuando se detectaron diferencias significativas.

Para los índices de crecimiento los valores promedio ( $P < 0.05$ ), y evaluados a través de un análisis de varianza simple (One-way ANOVA), a fin de observar el efecto de los tratamientos sobre los peces, aplicándose el Test de comparación múltiple de promedios Tukey, ( $P \leq 0.05$ ).

Las actividades enzimáticas se analizaron los valores por hora. De igual manera se registraron los valores promedio por frecuencia alimenticia de la *A. trimaculatus*, y evaluados a través de un análisis de varianza simple (One-way ANOVA), aplicándose el Test de comparación múltiple de promedios Tukey, ( $P \leq 0.05$ ).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Biometrías

#### 7.1.1 Crecimiento

Con base en las biometrías realizadas cada 14 días en las cuatro diferentes frecuencias alimenticias, se elaboró la tabla 2 y 3, en donde se presenta el crecimiento de la mojarra tahuina (*A. trimaculatus*).

Con referencia al peso de estos organismos podemos ver que a partir del día 42 hasta el día 70 en el cual concluyo el experimento, los peces del tratamiento cuatro presentaron mayor peso ( $4.85 \pm 0.39$  g) y longitud ( $57.90 \pm 1.41$  mm) en relación al resto de los tratamientos (tabla 2 y 3). Sin embargo, el tratamiento dos fue el que presento el peso ( $2.63 \pm 0.07$  g) y longitud ( $49.26 \pm 3.30$  mm) más bajo respectivamente.

Tabla 2. Peso (gr) de los organismos de *A. trimaculatus* los datos se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar. Superíndices desiguales dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Tiempo (días)	Tratamientos			
	1	2	3	4
0	$0.68 \pm 0.02$	$0.63 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.01$	$0.66 \pm 0.10$
14	$0.83 \pm 0.02^a$	$0.77 \pm 0.04^b$	$0.85 \pm 0.01^a$	$0.90 \pm 0.04^a$
28	$1.19 \pm 0.06^{bc}$	$1.12 \pm 0.08^b$	$1.33 \pm 0.02^c$	$1.47 \pm 0.23^{ac}$
42	$1.71 \pm 0.09^b$	$1.52 \pm 0.16^b$	$1.89 \pm 0.15^c$	$2.07 \pm 0.29^{ac}$
56	$2.26 \pm 0.08^b$	$2.15 \pm 0.34^b$	$2.94 \pm 0.20^a$	$3.42 \pm 0.36^a$
70	$2.93 \pm 0.24^b$	$2.63 \pm 0.07^b$	$3.99 \pm 0.30^a$	$4.85 \pm 0.39^a$

Tabla 3. Longitud (mm) de los organismos de *A. trimaculatus* los datos se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar. Superíndices desiguales dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Tiempo (días)	Tratamientos			
	1	2	3	4
<b>0</b>	31.44 $\pm$ 0.23	29.85 $\pm$ 0.70	31.03 $\pm$ 0.61	27.76 $\pm$ 0.46
<b>14</b>	34.06 $\pm$ 0.26	33.01 $\pm$ 0.21	33.75 $\pm$ 0.15	34.58 $\pm$ 1.32
<b>28</b>	39.08 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	37.98 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup>	39.81 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	40.81 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup>
<b>42</b>	43.41 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	41.80 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	43.59 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	45.30 $\pm$ 2.37 <sup>a</sup>
<b>56</b>	45.86 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	44.81 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	48.02 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>	50.59 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>
<b>70</b>	50.71 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>	49.26 $\pm$ 3.30 <sup>b</sup>	53.80 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>	57.90 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>

Al final del ensayo se realizó una prueba estadística con una probabilidad de  $p < 0.05$ , donde nos muestra diferencias significativas. El tratamiento cuatro es el que presenta el mayor crecimiento (talla y peso) de los peces; con el tratamiento tres se obtuvo un crecimiento relativamente aceptable; sin embargo, hay que destacar que el tratamiento que presenta el menor crecimiento es el tratamiento dos (Figuras 9 y 10)

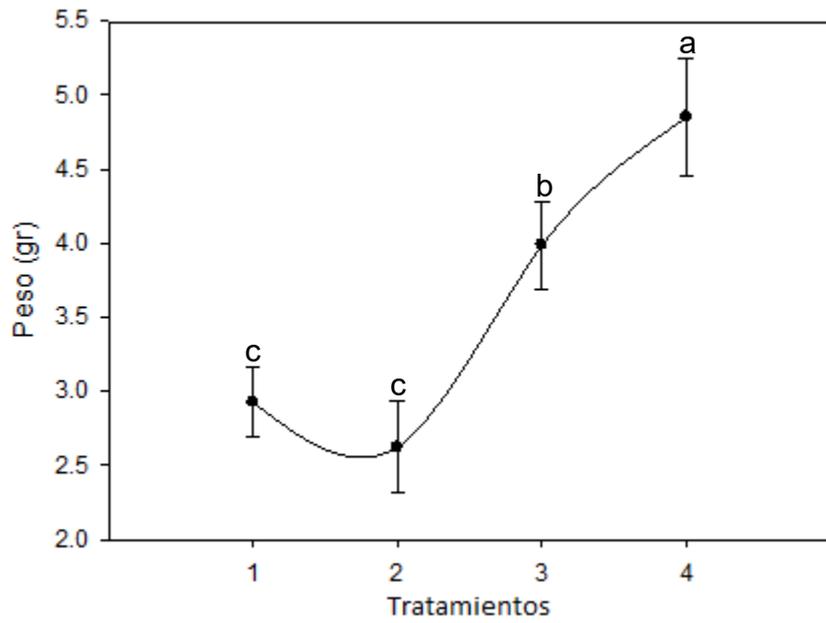


Figura 9. Peso final de los organismos *A. trimaculatus* en relación a la frecuencia alimenticia.

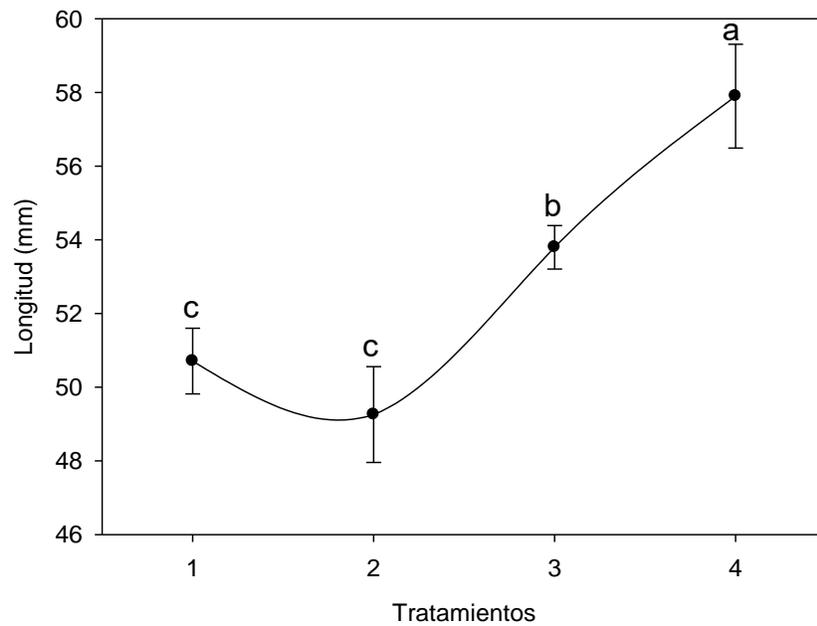


Figura 10. Longitud final de los organismos *A. trimaculatus* en relación a la frecuencia alimenticia.

### 7.1.2 Índices zootécnicos

Los índices zootécnicos cuantificados durante el experimento son mostrados en la tabla 4. En los cuales hubo diferencia significativa entre los tratamientos; En la TCA, CV, y ganancia en peso se obtuvo los mejores resultados en el tratamiento cuatro. La TEP y el FCA reporto sus mejores valores en los tratamientos tres y cuatro. El FC dio su valor máximo en el tratamiento tres.

Tabla 4. Comparación entre tratamientos de la *A trimaculatus*, bajo diferentes frecuencias de alimentación: TCA (Tasa de Crecimiento Absoluta); TEP (Tasa de Eficiencia Proteica); FCA (Factor de Conversión Alimenticia); FC (Factor de Condición); Ganancia en peso; Supervivencia y CV (Coeficiente de Variación). (Promedio  $\pm$  desviación estándar). Superíndices desiguales dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

PARAMETROS	TRATAMIENTOS			
	1	2	3	4
<b>TCA (g día<sup>-1</sup>)</b>	0.040 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>	0.036 $\pm$ 0.013 <sup>b</sup>	0.060 $\pm$ 0.005 <sup>ab</sup>	0.075 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>
<b>TEP (% día<sup>-1</sup>)</b>	0.83 $\pm$ 0.96 <sup>b</sup>	0.86 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	1.07 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>FCA</b>	2.52 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	2.47 $\pm$ 0.43 <sup>ab</sup>	1.95 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.90 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
<b>FC</b>	2.25 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.16 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	2.55 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.49 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
<b>Ganancia en peso (%)</b>	332.22 $\pm$ 46.80 <sup>b</sup>	319.7 $\pm$ 106.6 <sup>b</sup>	510.30 $\pm$ 49.68 <sup>ab</sup>	640.78 $\pm$ 51.59 <sup>a</sup>
<b>Supervivencia (%)</b>	94.67 $\pm$ 4.62	94 $\pm$ 2.83	94.67 $\pm$ 4.62	90.67 $\pm$ 2.31
<b>CV</b>	0.626 $\pm$ 0.036 <sup>b</sup>	0.683 $\pm$ 0.034 <sup>ab</sup>	0.652 $\pm$ 0.023 <sup>b</sup>	0.769 $\pm$ 0.057 <sup>a</sup>

## 7.2 Análisis Enzimáticos

### 7.2.1 Actividad enzimática digestiva

Las actividades enzimáticas se concentraron en una la tabla 5, registrando los valores por cada tratamiento. De igual manera se registraron los valores promedio por frecuencia alimenticia de la *A. trimaculatus*, y evaluados.

Tabla 5. Actividades enzimáticas entre tratamientos de la *A. trimaculatus*. bajo diferentes frecuencias de alimentación: (proteasas ácidas, alcalinas, tripsina y quimotripsina). (Promedio  $\pm$  desviación estándar). Superíndices desiguales dentro de cada columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Tratamiento	Proteasas			
	Ácidas	Alcalinas	Tripsina	Quimotripsina
	U/organismo	U/organismo	mU/mg de proteína soluble	mU/mg de proteína soluble
	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
1	24.02 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>	23.15 $\pm$ 2.69 <sup>c</sup>	31.52 $\pm$ 3.21 <sup>c</sup>	166.00 $\pm$ 15.84 <sup>a</sup>
2	30.90 $\pm$ 9.41 <sup>b</sup>	40.41 $\pm$ 1.84 <sup>bc</sup>	39.85 $\pm$ 3.33 <sup>c</sup>	96.06 $\pm$ 17.74 <sup>b</sup>
3	28.25 $\pm$ 1.79 <sup>b</sup>	86.18 $\pm$ 5.00 <sup>a</sup>	53.23 $\pm$ 12.62 <sup>b</sup>	128.18 $\pm$ 53.72 <sup>ab</sup>
4	46.46 $\pm$ 9.21 <sup>a</sup>	68.56 $\pm$ 35.08 <sup>ab</sup>	65.82 $\pm$ 26.14 <sup>a</sup>	94.77 $\pm$ 6.82 <sup>b</sup>

## VIII. DISCUSIÓN

En lo que respecta al crecimiento, se observó que existen diferencias significativas en los peces del tratamiento cuatro, presentando un mayor peso en relación a los otros tratamientos, mostrando un peso final de  $4.85 \pm 0.39$  g. en comparación al resto de los tratamientos. Caso similar se observó en la longitud total presentando un crecimiento de  $57.90 \pm 1.41$  mm, estos resultados concuerdan con lo reportado con la especie *L. calcarifer* en los que se les proporcionaron cuatro tratamientos de alimentación, dichos organismos presentaron mayor ganancia en peso y longitud cuando se les proporciono tres y cuatro alimentaciones al día (Biswas *et al.*, 2010). Lo cual podría atribuirse la cualidad de algunas especies donde aumentar las veces en que se suministra el alimento es proporcional a un aumento de crecimiento (Schnaittacher *et al.*, 2005; Turker y Yildirim, 2011; Zhao *et al.*, 2016). Tal es el caso de los híbridos de esturión (Luo *et al.*, 2015) sugieren que una alimentación de 3.7 % de peso corporal día<sup>-1</sup>, dividida en seis alimentaciones es la estrategia de alimentación más eficiente, ya que proporciona mayor crecimiento y producción, con un bajo costo de alimentación. Para juveniles de *Carassius auratus gibelio*, seis comidas al día es lo más óptimo, probablemente esto se deba a que el aumento de la frecuencia de alimentación tendría un efecto positivo en el crecimiento, podría mejorar la absorción sincrona de aminoácidos dietéticos y mostrar el efecto de ahorro de proteínas (Zhao *et al.*, 2016). En cuanto a *Plecoglossus altivelis* cuatro y seis comidas al día era deseable para lograr la mejora en la supervivencia y el crecimiento de los peces, también se menciona que la supervivencia y el crecimiento más bajos se observaron en post-larvas que recibían una comida en dos días en ambas tasas de alimentación, y demostrando un cuerpo de color negro probablemente debido a la falta de nutrientes necesarios para el crecimiento normal de pescado, causado por la insuficiente alimentación (Cho *et al.*, 2003). Esto puede estar relacionado con el hecho de que el dar una o dos comidas al día causa un menor crecimiento en los peces causando que ellos no generaran los requerimientos de nutrientes y energía suficiente para su mantenimiento y desarrollo somático (Biswas *et al.*, 2010).

Caso contrario a otras especies las cuales un menor número de alimentaciones al día es lo más adecuado para su cultivo; esto podría atribuirse a que para algunas especies un exceso de alimentación puede causar una sobrecarga gastrointestinal (Booth *et al.*, 2008, citado por Biswas *et al.*, 2010) y tener un mejor desempeño de crecimiento con pocas pautas de alimentación, tal es el caso de *Channa striatus* la cual su óptimo crecimiento es con una o dos alimentaciones, darle más alimentaciones provoca menor productividad y menor eficiencia alimentaria, una probable causa de este comportamiento es la actividad de forrajeo y canibalismo de dicha especie (Muntazaina *et al.*, 2017). La *Sardinella brasiliensis* demostró tener un mejor rendimiento con solo dos alimentaciones al día, darle hasta seis alimentaciones no causaba diferencia significativa entre ellos (Baloi *et al.*, 2016). Otra de las especies que tienen una alimentación media es la *Megalobrama amblycephala*, donde Hong-yang *et al.* (2015) reportan que tanto las frecuencias de alimentación bajas como altas pueden resultar en retraso del crecimiento, falta de eficiencia en la alimentación, disminución de las actividades enzimáticas intestinales y baja expresión de IGF-I de dicha especie, demostrando que tres alimentaciones al día es lo óptimo para esta especie. De tal forma que sub alimentar o sobre cargar la alimentación del pez causa problemas de crecimiento y económicos, por lo tanto, es indispensable buscar la alimentación óptima de cada especie, para la *A. trimaculatus* una alimentación de cuatro veces al día sería la más indicada.

Con relación a los Cíclidos, en algunos casos puede no existir diferencias significativas en las pautas de alimentación, tal como en el estudio realizado para *O. aureus* demostrando no haber diferencias significativas en alimentar una o hasta siete veces al día, a causa de un mal manejo en el control de los estanques obteniendo así alimento vivo disponible a lo largo del día aun cuando se controle en alimento comercial (Vega *et al.*, 2011). Para evitar fluctuaciones por agentes externos el presente estudio de la *A. trimaculatus* se realizó en un sistema cerrado y parámetros controlados.

Los índices zootécnicos no se comportaron de manera homogénea entre las pautas de alimentación, obteniendo así varias diferencias significativas. En la tasa de crecimiento absoluto se reportó un mínimo de  $0.040 \pm 0.005$  g días<sup>-1</sup> y un valor máximo de  $0.75 \pm 0.01$  g días<sup>-1</sup> obtenido en tratamiento cuatro. De igual manera, la ganancia en peso obtuvo su mejor valor en la frecuencia cuatro ( $640.78 \pm 51.59$ ) y un valor mínimo de  $319.7 \pm 106.6$  esto difiere con los resultados de Luo *et al.* (2015) y Muntaziana *et al.*, (2017) quienes reportan la mejor ganancia en peso con dos alimentaciones al día ( $570.3 \pm 6.3$  g días<sup>-1</sup> y  $316.23 \pm 36.94$  g días<sup>-1</sup> respectivamente). Por su parte, Hong-Yan *et al.* (2015) asocian este comportamiento con el aumento en la frecuencia de alimentación. Otro de los índices que obtuvo su mejor resultado en cuatro alimentaciones al día fue el coeficiente de variación con un valor de  $0.769 \pm 0.057$  esto difiere de lo reportado por Schnaittacher *et al.* (2005); Baloi *et al.* (2016) y Biswas *et al.* (2010) los cuales no obtuvieron diferencia significativa en este índice, indicando que entre menor sea la variabilidad en las tallas mejor será el aprovechamiento total del cultivo evitando competencias de alimentación y canibalismo.

La tasa de eficiencia proteínica (PER) obtuvo un valor mínimo  $0.83 \pm 0.96$  y un valor máximo  $1.10 \pm 0.05$  los tratamientos tres y cuatro, los cuales fueron los más óptimos en comparación a los tratamientos uno y dos. Contrario a lo reportado por Vega *et al.* en el 2011 (valor mínimo de  $1.83 \pm 0.12$ ; máximo  $2.16 \pm 0.10$ ; quien evaluó alimentaciones en *O. aureus*) y por Garcia *et al.* en el 2015 (valor mínimo  $2.38 \pm 0.01$ ; valor máximo  $2.76 \pm 0.08$ , quienes trabajaron con *O. niloticus*), los cuales no encontraron diferencia significativa en este índice. Por otro lado, el factor de conversión alimenticia (FCA) en el presente estudio reportó sus mejores valores en los tratamientos tres y cuatro, teniendo diferencia significativa con los tratamientos uno y dos, es decir entre más alimentaciones existe un incremento de este índice lo cual es similar a lo reportado Muntaziana *et al.* (2017) quienes reportaron su valor máximo con ocho alimentaciones al día ( $1.36 \pm 0.03$ ) y un mínimo en dos alimentaciones al día ( $1.20 \pm 0.06$ ); sin embargo, nuestros resultados difieren de lo reportado por Biswas *et al.* (2010), ya que el encuentra su

mejor FCA en el tratamiento tres (tres alimentaciones al día), demostrando, que no siempre un aumento en la frecuencia de alimentación, significara un mejo factor de conversión alimenticia. Lo cual difiere con lo reportado para *Hippoglossus hippoglossus L.* y para híbridos de pez luna (Schnaittacher *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1998) los cuales reportan nula o poca influencia de las pautas de alimentación en la TCA.

El Factor de condición (FC) dio un valor mínimo de  $2.16 \pm 0.16$  y un valor máximo de  $2.55 \pm 0.10$ , este último se obtuvo en el tratamiento tres. Dichos valores fueron mayores a los reportados por García *et al.* (2015), quienes obtuvieron un valor mínimo  $1.75 \pm 0.14$  los cuales son valores más bajos a los reportados en el presente estudio cuando se suministró una y dos alimentaciones al día, lo cual coincide con lo reportado por Baloi *et al.* (2016) los cuales indican que el valor más desfavorable se encuentra en una alimentación al día; atribuyéndolo a que el apoyo nutricional del pescado era insuficiente para sus requerimientos metabólicos con solo una alimentación por día.

Por otra parte, la supervivencia obtenida en todos los tratamientos en este estudio, fue mayor a un 90 %, indicando que los organismos soportan altos niveles de estrés a causa de constante manipulación en cautiverio y bajas cantidades de alimentación.

En relación con la actividad enzimática se estudiaron proteasas ácidas y alcalinas en U organismo<sup>-1</sup>; las proteasas alcalinas se encontraron en mayor cantidad que las proteasas ácidas a excepción del tratamiento uno, donde proteasas ácidas y alcalinas estuvieron en  $24.02 \pm 1.76$  y  $23.15 \pm 2.69$  respectivamente. En el caso de tripsina y quimotripsina se cuantificaron mU/mg de proteína soluble siendo en todos los casos mayor quimotripsina que tripsina lo cual coincide con lo reportado por Sunde *et al.*, (2004) reporto que la quimotripsina

mostró una actividad específica consistentemente mayor que la tripsina en salmones del Atlántico (*Salmo salar L.*). Para el ciclido *O. niloticus* cuyo estudio mostró valores de actividad de quimotripsina que representaban el doble de tripsina, atribuyendo esto a la producción más constante de algunas enzimas, causado como resultado de una estrategia fisiológica ligada tanto a la presencia continua de alimento en el intestino como a su drenaje continuo (Uscanga *et al.*, 2010).

Una de las teorías propuestas por Cara *et al.* (2004) indica que la reducción en la cantidad de alimento ingerido llevó a un incremento en la actividad proteasa, que determinó una mejor digestión de la fracción proteica y compensó la menor ingesta. Lo cual explicaría el valor más alto de quimotripsina en una sola alimentación al día en el presente experimento siendo esta de  $166.00 \pm 15.84$  mU mg de proteína<sup>-1</sup>. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que una mayor secreción de tripsina y quimotripsina también determina un aumento del coste metabólico para los individuos que sólo será favorable si la pérdida fecal de los aminoácidos contenidos en las enzimas se compensa con un suministro mayor de esas moléculas en el intestino como resultado de una mejor digestión (Cara *et al.*, 2007).

## IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de crecimiento en peso ( $4.85 \pm 0.39$  g) y longitud ( $57.90 \pm 1.41$  mm) se determina que los organismos de *A. trimaculatus* requieren de cuatro alimentaciones para manifestar su máximo rendimiento. Los índices zootécnicos (TCA, TEP, FCA, FC, CV, ganancia en peso y; supervivencia) sugieren como óptimos los tratamientos tres y cuatro.

En cuanto a las actividades enzimáticas se observó que conforme aumentan las pautas de alimentación, existe un incremento en las cantidades de proteasa totales sin reflejar un patrón en la relación de actividades ácidas y alcalinas; el caso de la actividad quimotripsina siempre fue mayor que la actividad tripsina.

En contra parte, este estudio establece que una o dos alimentaciones al día causa un lento crecimiento, pero no se afecta drásticamente la supervivencia de *A. trimaculatus* (siendo mayor a un 90% de supervivencia).

Por lo tanto, la presente investigación concluye en indicar a la frecuencia cuatro como la óptima para esta especie, basados en los resultados obtenidos de los análisis de crecimiento (en peso y talla) e índices zootécnicos, además dicho tratamiento es capaz de soportar el aumento de actividades enzimáticas para la asimilación de nutrientes. Tales resultados serán útiles como información básica en la optimización de recursos en sistemas de cultivo para la *A. trimaculatus*.

## XI. REFERENCIAS

- Álvarez C.A. (2003). Actividad enzimática digestiva y evaluación dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *paralabrax maculatofasciatus* (percoidei: serranidae). Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario De Ciencias Marinas. La Paz Baja, California Sur, México.
- Anson ML. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J Gen Physiol. 22: 79–89.
- Archibal, A.L. (1987). Comparison of the serum amylases of farm animals. Biochem.Physiol. 88: 963-968.
- Arévalo L.M. (2009). Expresión del Gen de Tripsina Durante la Ontogenia Inicial de la Mojarra Tenguayaca (*Petenia Splendida*). Tesis de Licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México.
- Arias A.W. (2007). Efecto de la estrategia de alimentación con tiempo definido sobre el crecimiento y la conversión alimenticia para la tilapia roja "*Oreochromis sp*". Tesis para obtener el grado de ingeniería en acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Ecuador.
- Baloi, M., de Carvalho, Sterzelecki, F.C., Passini, G., Cerqueria, V.R. (2016). Effects of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition of juveniles Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindacher 1879). Aquaculture Research. 47: 554–560.
- Bascinar, N., Çakmak, E., Çavdar, Y., Aksungur N. (2007). The Effect of Feeding Frequency on Growth Performance and Feed Conversion Rate of Black Sea Trout (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 7: 13-17.
- Bautista J.C. Ruiz J.M. (2011). Calidad de agua para el cultivo de tilapia en estanques de geomembrana. Revista Fuente. 8: 10-14.

- Biswas, G. Thirunavukkarasu, A.R., Sundaray, J.K., Kailasam, M. (2010). Optimization of feeding frequency of Asian seabass (*Lates calcarifer*) fry reared in net cages under brackishwater environment. *Aquaculture*. 305: 26–31.
- Booth, M.A., Tucker, B.J., Allan, G.L., Fielder, D.S. (2008). Effect of feeding regime and fish size on weight gain, feed intake and gastric evacuation in juvenile Australian snapper *Pagrus auratus*. *Aquaculture*. 282: 104–110.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Canioni, P., Julien, R., Rathelot, J., Sarda, L. (1977). Pancreatic and microbial lipases: a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. *Lipids*. 12: 393-397.
- Cara B., Moyano F.C., Zambonino J.L., Fauvel C. (2004). Actividad tripsina y quimotripsina como indicadores de condición larvaria: estudio de restricción alimentaria y calidad de puesta. *Comunicación Científica*. Pp. 547-556.
- Cara B., Moyano F.J., Zambonino J.L., Fauvel C. (2007). Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *Journal of Fish Biology*. 70: 1798–1808.
- Cara J.B., Aluru N., Moyano F.J., Vijayan M.M. (2005). Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 142: 426–431.
- Cárcamo P.F. (2015). Effects of food type and feeding frequency on the performance of early juveniles of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea): Implications for aquaculture and restocking. *Aquaculture*. 436:172–178.
- Cárcamo P.F., Candia A.I., Chaparro O.R. (2005). Larval development and metamorphosis in the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata:

- Echinoidea): Effects of diet type and feeding frequency. *Aquaculture*. 249: 375–386.
- Carvalho E.A., Nunes A.J. (2006). Effects of feeding frequency on feed leaching loss and grow-out patterns of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed under a diurnal feeding regime in pond enclosures. *Aquaculture*. 252: 494–502.
- Cho, S.H., Lim, Y.S., Lee, J.H., Lee J.K., Park, S. (2003). Effects of Feeding Rate and Feeding Frequency on Survival, Growth, and Body Composition of Ayu Post-Larvae *Plecoglossus altivelis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 34: 1.
- Cuencas C.A. (2013). Fisiología digestiva de la mojarra Castarrica *Cichlasoma urophthalmus* (Teleostei: Cichlidae). Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. La Paz Baja California Sur. México.
- DelMar EG, Largman C, Broderick JW, Geokas MC. (1979). A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem*. 99: 316–320.
- Dupuis, Y., Tardival, S., Poremska, Z. Y Fournier, P. 1991. Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *Int. J. Biochem*. 23:175-180.
- Erlanger BF, Kokorsky N, Cohen W. (1961). The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 96: 271–278.
- FAO (2004). Informe de la consulta de expertos sobre la aplicación de cuestiones asociadas con la inclusión de especies acuáticas explotadas comercialmente en los apéndices de la CITES. En: Informe de Pesca N° 741. Food and Agriculture Organization (of the ONU). Disponible vía <http://www.fao.org/docrep/008/y5751s/y5751s00.htm/>. (Consultado el 20 de octubre de 2014).

- FAO (2005). Visión general del sector acuícola nacional-México. Disponible en la World Wide Web: [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_mexico/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es) Consultado el 23 de enero del 2015.
- FAO (2006). Informe de políticas, Seguridad alimentaria, Numero 2. Junio de 2006, Roma. [ftp://ftp.fao.org/es/ESA/policybriefs/pb\\_02\\_es.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/ESA/policybriefs/pb_02_es.pdf) (Consultado el 20 de octubre de 2014).
- FAO (2010). Report of the FAO Expert Workshop on On-farm feeding and feed management in aquaculture. Manila, the Philippines. Pp. 13–15.
- FAO (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf> (Consultado el 20 de octubre de 2014).
- FAO (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf> (Consultado el 8 de marzo de 2015).
- FAO (2015). Food and agriculture organization of the united nations, statistics división. On line query available at [http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp\\_8364409141364265759.xml&outtype=html](http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_8364409141364265759.xml&outtype=html). (Consultado el 29 de agosto de 2017).
- FAO (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf> (Consultado el 29 de agosto de 2017).
- Ferron, A., Leggett, W.C. (1994). An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv. Mar. Biol.* 30: 217–303.
- FishBase (2014). Publicación World Wide Web electrónica. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (Consultado el 20 de octubre de 2014).

- FishBase (2017). Publicación World Wide Web electrónica. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (Consultado el 29 de agosto de 2017).
- Flores, H., Vergara, A., (2012). Efecto de reducir la frecuencia de alimentación en la supervivencia, crecimiento, conversión y conducta alimenticia en juveniles de salmón del Atlántico *Salmo salar* (Linnaeus, 1758): experiencia a nivel productivo. Latin American Journal of Aquatic Research. Pp. 536-544.
- Gamboa J. (2001). Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia. Tesis de maestría. Escuela Superior Politecnica del Litoral-Facultad De Ingeniería Marítima Y Ciencias Del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Garcia, B., Hernandez, Y., Alvarez, C.A., Martinez, R., Contreras, W.M., Civera, R., Nolasco, H. (2015). Pasta de coco en dietas prácticas para juveniles de tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (Percoidei: Cichlidae). Acta Agrícola Y Pecuaria. 1: 43-50.
- Gómez, A., Velázquez, E., Rodiles, R., González A., González, A., Castro, J.L. (2012). Lista sistemática de la ictiofauna en la Reserva de la Biosfera La Encrucijada, Chiapas, México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 83: 674-686.
- Gracia-López, V. F., Castelló-Orvay (1996). Crecimiento del mero *Epinephelus marginatus* bajo distintas condiciones de cultivo. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Segundo Simposium. Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile, Universidad Católica del Norte, Asociación Latinoamericana de Acuicultura, Coquimbo, Chile.
- Guerra, F., Lozano, F., García, C., Rodríguez, L., Cubas, R., Panduro, D., Chu-koo. (2009). Efecto de tres frecuencias de alimentación en el crecimiento, utilización de alimento y sobrevivencia de juveniles de doncella *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). FOLIA Amazónica. 18: 81–87.
- Gunther, A. (1867). On the fishes of the states of Central America, founded upon specimens collected in fresh and marine waters of various parts of that country

- by Messrs. Salvin, Godman and Capt. J.M. Dow., Proc. Zool. Soc. Lond. 3: 600-604.
- Harpaz S., Hakim Y., Barki A., Karplus I., Slosman T., Eroldogan O.T. (2005). Effects of different feeding levels during day and/or night on growth and brush-border enzyme activity in juvenile *Lates calcarifer* reared in freshwater recirculating tanks. *Aquaculture*. 248: 325–335.
- Harris, H. (1989). The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186, 133-150. Dupuis, Y., S. Tardival, Z. Poremska y P. Fournier. 1991. Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *Int. J. Biochem.* 23: 175-180.
- Herrera, M.A. (2005). “Desarrollo de la capacidad pancreática digestiva durante la Ontogenia de Larvas de Pez Blanco del Lago de Pátzcuaro. Tesis de licenciatura en la facultad de biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Hirikado, M., Hirata, K., Uemarsu, Y., Hatooka, Y., Kazama, M. (1994). Assay for activities of  $\beta$ -amylase and glucoamylase used in food processing. *J. Food Hyg. Soc. Japan*. 35: 28-33.
- Hong-Yan, T., Ding-Dong, Z., Xiang-Fei, L., Chun-Nuan, Z., Yu, Q., Wen-Bin, L., (2015). Optimum feeding frequency of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*. 437: 60–66.
- Johnston D., Melville-Smith R., Hendriks B., Phillips B., (2008). Growth rates and survival of western rock lobster (*Panulirus cygnus*) at two temperatures (ambient and 23 °C) and two feeding frequencies. *Aquaculture*. 279: 77–84
- Kullander, S.O. (2003). Family Cichlidae (cichlids). Checklist of the freshwater fishes of south and Central America. EDIPUCRS, Porto alegre, Brasil, Pp. 605-654.
- Kumar, V., Chase, H.P. (1971). Undernutrition and intestinal dipeptide hydrolase activity in rat. *J. Nutr.* 101: 1509-1514.

- Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J Gen Physiol.* 30: 291–310.
- Kuri, N.E. (1991). Consideraciones generales del proceso de alimentación enfocadas al empleo de alimentos balanceados en acuicultura intensiva. *Hidrobiológica.* Pp. 56-64.
- Lee S., Hwang U., Cho S.H. (2000). Effects of feeding frequency and dietary moisture content on growth, body composition and gastric evacuation of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture.* 187: 399–409.
- Leef M.J., Carter C.G., Nowak.B.F. (2012) Assessment of nutritional status and digestive physiology in southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* fed a modified baitfish diet. *Aquaculture.* 353: 162–168.
- Lehninger, A. L. (1984). *Enzimas. Bioquímica.* 2ª ed. Omega. Barcelona, España. Pp. 1198.
- Luo, L., Li, T., Xing, W., Xue, M., Ma, Z., Jiang, N., Li, W. (2015). Effects of feeding rates and feeding frequency on the growth performances of juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser schrencki* Brandt♀ × *A. baeri* Brandt♂. *Aquaculture.* 448: 229–233.
- Madrid, J.A., López, P.M. (2001). *Alimentación Voluntaria en Peces de Cultivo.* Murcia, España. Pp 25.
- Madrid, J.A., Mendiola, P., Ángeles, M., rubio, V.C., Sánchez F.J. (2005). Alimentación voluntaria en peces de cultivo. En: *Acuicultura, pesca y marisqueo en el Golfo de Cádiz.* Servicio de Publicaciones y Divulgación. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía (DL: SE-6014-2005): Sevilla. 85: 615-640.
- Manríquez T.J., Álvarez C.A., Arias L., Guerrero M. Viader J.M., Aguilar J.A. (2011). Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. *Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de*

- Nutrición Acuícola, 23-25 de noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4.
- Martínez, C.A., Ross, L.G., (1994). Biología y cultivo de la mojarra latinoamericana *Cichlasoma urophthalmus*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) –Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). México, D. F.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. (1998). Bioquímica. 2ª ed. Mc Graw-Hill. España. Pp. 1283.
- Miller, R.R., Minckley, W.L., Norris, S.M. (2009). Peces Dulceacuícolas de México. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad/El Colegio de la Frontera Sur/Sociedad Ictiológica Mexicana, A.C. /Desert Fishes Council. México. Pp. 559.
- Miller, R.R., Minkley, W.L., Norris, S.M. (2005). Freshwater fishes of Mexico. University of Chicago, U.S.A. Pp 490.
- Morote, E., Rodríguez, M., Mancera, J.M., Moyano, F.J., Muñoz, J.L. (2005). Digestive enzymes indicating nutritional condition in octopus paralarvae *Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797. Boletín. Instituto Español de Oceanografía. 21: 1-4.
- Moyano F.J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 15-17 noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J., Sarasquete, M.C. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). Comp. Biochem. Physiol. 122: 327-332.
- Muntaziana, A. M. P., Nurul Amin, S. M., Kamarudin, M. S., Rahim, A., Romano, N. (2017). Feeding frequency influences the survival, growth and body lipid

- content of striped snakehead, *Channa striatus* (Bloch) fry. *Aquac Res.* 48: 2602–2606.
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world*. 4<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc (Eds.), N.Y., U.S.A. Pp. 601.
- Oliva A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *J Fish D.* 35: 83-108.
- Ortiz. V.M. (2011). Análisis del crecimiento y madurez sexual de *Cichlasoma trimaculatum* (Gunther, 1867) de la subcuenca río Atoyac-Paso de la Reina de la cuenca río Atoyac, Oaxaca. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación Para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.
- Perales N., (2009). Ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de maestría. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México.
- Priestley S.M., Stevenson A.E., Alexander L.G. (2006). The influence of feeding frequency on growth and body condition of the common Goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Nutrition.* 136:1979-1981.
- Ramírez, G.L. (2008). “Estudio de la actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial de la mojarra Castarrica *Cichlasoma urophthalmus*”. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. Villahermosa, Tabasco México.
- Rícan O., Piálek O., Dragová K., Novák J. (2016). Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. *Vertebrate Zoology.* Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung. Pp 66.
- Riche M., Haley D.I., Oetker M., Garbrecht S., Garling D.L. (2004). Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture.* 234: 657–673.

- Robertson L., Lawrence A.L., Castille F.L. (1993). Effect of feeding frequency and feeding time on growth of *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture and Fisheries Management*. 24: 1-6.
- Sáenz de Rodríguez, M.A., (2009). Optimización de fórmulas alimenticias de primera edad para peces marinos. Tesis de doctorado. Departamento de Biología Aplicada. Universidad de Almería. Almería, España.
- Schnaittacher, G., King W., Berlinsky D. (2005). The effects of feeding frequency on growth of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture Research*. 36: 370-377.
- Smith D.M., Burford M.A., Tabrett S.J., Irvin S.J., Ward L. (2002). The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. 207: 125–136.
- Steffens, E. (1989). Principles of fish nutrition. Halsted Press. U.S.A. Pp. 384.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa. Pp. 309.
- Sunde J., Eiane, S.A., Rustad A., Jensen H.B., Opstvedt J., Nygard E. Venturini G., Rungruangsak K. (2004). Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*. 10: 261–277.
- Toledo, F.J., Uscanga A., Guerrero R., Márquez. G., Martínez R., Camarillo S., Perales N., Rodríguez W., Gómez M.A., Álvarez C.A. (2014). Changes on digestive enzymes during initial ontogeny in the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum*. *Fish Physiol Biochem*. DOI 10.1007/s10695-014-0023-8.
- Toledo-Solís, F., Márquez-Couturier, G., Uscanga-Martínez, A., Guerrero-Zárate, R., Perales-García, N., Martínez-García, R., & Álvarez-González, C. (2016). Partial characterization of digestive proteases of the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum* (Günther 1867). *Aquaculture Nutrition*, 22: 1230-1238.

- Toledo, S.J., García, M. C. (2000). Nutrición y alimentación de tilapia cultivada en América Latina y el Caribe. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18. La Paz, B.C.S., México.
- Torres D.N., Hurtado V.L. (2012). Requerimientos nutricionales para Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) Orinoquia. Universidad de Los Llanos Meta, Colombia. 16: 63-68.
- Turker A., Yildirim O. (2011). The effect of feeding frequency on growth performance and body composition in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in cold seawater. African Journal of Biotechnology. 10: 9479–9484.
- Uscanga, A., Moyano, F. J., Alvarez, C. A. (2010). Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish physiology and biochemistry. 36: 1079-1085.
- Vega, F., Rojas, C.C., Espinosa, L.D., Zúñiga, L.M., Nolasco, H. (2011). Efecto de la frecuencia de alimentación sobre el crecimiento y supervivencia de *Oreochromis aureus* en cultivos experimentales. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria.12.
- Velasco M., Lawrence A.L., Castille F.L. (1999). Effect of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, in zero-water exchange culture tanks. Aquaculture. 179: 141–148.
- Violante, G.J. (1995). Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum* (Gunter, 1868), en la laguna de Tres Palos Guerrero, México, y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría. Facultad de ciencias marinas. Universidad de Colima. Manzanillo, Colima. Pp.70.
- Violante, J., Aguirre, M.L., Rojas, A. (2008). Comunidad de parásitos metazoarios de la charra *Cichlasoma trimaculatum* en la laguna de Tres Palos, Guerrero, México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 79: 405- 412.

- Walter H.E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HJ (ed) Methods of enzymatic analysis, vol V. Verlag Chemie, Weinham, Pp 270–277.
- Wang, N., Hayward R. S., Noltie D. B., (1998). Effect of feeding frequency on food consumption, growth, size. variation, and feeding pattern of age-0 hybrid sunfish. *Aquaculture*. 165: 261-267.
- Watanabe, T., (1988). Fish Nutrition and Mariculture. JICA. Tokio, Japan. Pp. 233.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. (1987). The biology of fish growth. Academic Press. Orlando, Florida. Pp. 443.
- Yáñez-Arancibia, A. (1978). Taxonomía, ecología y estructura de las comunidades de peces en lagunas costeras con bocas efímeras del Pacífico de México Centro de Ciencias del Mar y Limnología. Pub. esp. Pp. 306.
- Zarate R. (2010). Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Mérida. Mérida, Yucatán México.
- Zhao Y., Hu Y., Zhou X.Q., Zeng X.Y., Feng L., Liu Y., Jiang W.D., Li S.H., Li D.B., Wu X.Q., Wu C.M., Jiang J. (2015). Effects of dietary glutamate supplementation on growth performance, digestive enzyme activities and antioxidant capacity in intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*. DOI 10.1111/anu.12215.
- Zhao, S., Han, D., Zhu, X., Jin, J., Yang, Y., Xie, S., (2016). Effects of feeding frequency and dietary protein levels on juvenile allogynogenetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) var. CAS III: growth, feed utilization and serum free essential amino acids dynamics. *Aquaculture Research*. 47: 290–303.