



Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura

**Efecto de dietas
micro-encapsuladas
suplementadas con enzimas
digestivas, sobre el desarrollo
de post-larvas de
*Fenneropenaeus indicus***

**Susana Sirvas Cornejo, David A. Jones,
John W. Latchford**

**EFEECTO DE DIETAS MICRO-ENCAPSULADAS SUPLEMENTADAS
CON ENZIMAS DIGESTIVAS, SOBRE EL DESARROLLO
DE POST-LARVAS DE FENNEROPENAEUS INDICUS**

Primera edición digital

Diciembre, 2014

Lima - Perú

**© Susana Sirvas Cornejo
David A. Jones
John W. Latchford**

PLD 1713

Editor: Víctor López Guzmán



**<http://www.guzlop-editoras.com/>
guzlopster@gmail.com
[facebook.com/guzlop](https://www.facebook.com/guzlop)
twitter.com/guzlopster
731 2457 / 959 552 765
Lima - Perú**

PROYECTO LIBRO DIGITAL (PLD)

El proyecto libro digital propone que los apuntes de clases, las tesis y los avances en investigación (papers) de las profesoras y profesores de las universidades peruanas sean convertidos en libro digital y difundidos por internet en forma gratuita a través de nuestra página web. Los recursos económicos disponibles para este proyecto provienen de las utilidades nuestras por los trabajos de edición y publicación a terceros, por lo tanto, son limitados.

Un libro digital, también conocido como e-book, eBook, ecolibro o libro electrónico, es una versión electrónica de la digitalización y diagramación de un libro que originariamente es editado para ser impreso en papel y que puede encontrarse en internet o en CD-ROM. Por, lo tanto, no reemplaza al libro impreso.

Entre las ventajas del libro digital se tienen:

- su accesibilidad (se puede leer en cualquier parte que tenga electricidad),
- su difusión globalizada (mediante internet nos da una gran independencia geográfica),
- su incorporación a la carrera tecnológica y la posibilidad de disminuir la brecha digital (inseparable de la competición por la influencia cultural),
- su aprovechamiento a los cambios de hábitos de los estudiantes asociados al internet y a las redes sociales (siendo la oportunidad de difundir, de una forma diferente, el conocimiento),
- su realización permitirá disminuir o anular la percepción de nuestras élites políticas frente a la supuesta incompetencia de nuestras profesoras y profesores de producir libros, ponencias y trabajos de investigación de alta calidad en los contenidos, y, que su existencia no está circunscrita solo a las letras.

Algunos objetivos que esperamos alcanzar:

- Que el estudiante, como usuario final, tenga el curso que está llevando desarrollado como un libro (con todas las características de un libro impreso) en formato digital.
- Que las profesoras y profesores actualicen la información dada a los estudiantes, mejorando sus contenidos, aplicaciones y ejemplos; pudiendo evaluar sus aportes y coherencia en los cursos que dicta.
- Que las profesoras y profesores, y estudiantes logren una familiaridad con el uso de estas nuevas tecnologías.
- El libro digital bien elaborado, permitirá dar un buen nivel de conocimientos a las alumnas y alumnos de las universidades nacionales y, especialmente, a los del interior del país donde la calidad de la educación actualmente es muy deficiente tanto por la infraestructura física como por el personal docente.
- El personal docente jugará un rol de tutor, facilitador y conductor de proyectos

de investigación de las alumnas y alumnos tomando como base el libro digital y las direcciones electrónicas recomendadas.

- Que este proyecto ayude a las universidades nacionales en las acreditaciones internacionales y mejorar la sustentación de sus presupuestos anuales en el Congreso.

En el aspecto legal:

- Las autoras o autores ceden sus derechos para esta edición digital, sin perder su autoría, permitiendo que su obra sea puesta en internet como descarga gratuita.

- Las autoras o autores pueden hacer nuevas ediciones basadas o no en esta versión digital.

Lima - Perú, enero del 2011

“El conocimiento es útil solo si se difunde y aplica”

Víctor López Guzmán
Editor

Efecto de dietas micro-encapsuladas suplementadas con enzimas digestivas, sobre el desarrollo de post-larvas de *Fenneropenaeus indicus*

Susana Sirvas Cornejo¹, David A. Jones², John W. Latchford²

¹Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV),
Calle Roma 340, Miraflores, Lima, Perú
e-mail: susansirvas@hotmail.com

²University of Wales, Bangor, Anglesey, LL59 5AB, Wales, United Kingdom
e-mail: wendavjones@wanadoo.es
oss016@bangor.ac.uk

Palabras Clave: *Fenneropenaeus*, enzimas digestivas, dietas micro-encapsuladas, genéticamente modificado.

Resumen

Se prepararon dietas micro-encapsuladas (MED) y se suplementaron con 2 cepas bacterianas genéticamente modificadas productoras de enzimas digestivas. Una productora de una proteasa del tipo tripsina (cepa *E coli* XL1p635), y otra productora de una lipasa (cepa *E. coli* XL1p7). Se alimentaron *Fenneropenaeus indicus* al estadio postlarval 1 (PL1) durante 15 días con estas dietas, se midió la longitud total, y se registró la supervivencia, cada 2 días. Los resultados fueron analizados con ANOVA y con el Análisis Secuencial de Tukey Kramer.

Introducción

La demanda creciente por especies de penaeidos y las limitaciones de dichos recursos naturales, han conducido a su cultivo intenso. El reemplazo de alimento natural con dietas micro-encapsuladas, ha evitado el tener que depender de una fuente de alimento de calidad variable. Sin embargo, las dietas micro-encapsuladas no son completamente digeridas por las larvas y post-larvas, debido a su escasa producción de enzimas digestivas durante estadios de metamorfosis. La adición de enzimas digestivas a partir de mamíferos, ha sido previamente estudiada (Kolkovski *et al.*, 1993). Microorganismos productores de estas enzimas, entre ellas una

proteasa del tipo tripsina (Sirvas, 1999), podrían representar una fuente más económica de obtención de dichas enzimas, y su uso como suplemento en dietas micro-encapsuladas para post-larvas de camarón, fue considerado en el presente trabajo.

Metodología

Preparación de las dietas

Se usó una dieta comercial (Fripak CD2) como base para la preparación de las dietas suplementadas. La composición de CD2 fue: proteína 52 %, lípidos 12 %, ácidos grasos insaturados 2 %, cenizas 20 %, fibra 1 %, y agua 13 %. Se trituraron 5 g de CD2, se agregó 50 mL de agua destilada, y se mezcló. Se agregó 6 g de hemoglobina, y se mezcló con un mezclador eléctrico. Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos para extraer el sobrenadante conteniendo los constituyentes de la dieta, y se almacenó a 4°C toda la noche.

Microencapsulación

Las dietas se micro-encapsularon modificando el método de Jones (1984) (Número de Patentes Británicas: 79437454 y 2103568). En un vaso de 50 mL se colocaron 25 mL de ciclohexano con lecitina al 2 % (P/V), y se agitó a 3000 rpm por 2 min. Por otra parte, en un vaso de 10 mL se mezclaron 2.5 mL de dieta con 21 % (P/V) de la correspondiente cepa bacteriana liofilizada (Sirvas, 1999), y se mezcló con una bagueta de vidrio. Luego se agregó la dieta al ciclohexano (en agitación), durante 1 minuto. Después de 2 a 3 minutos, se agregó una mezcla de 10 mL de ciclohexano con 0.2 mL de bicloruro succínico, durante 1 minuto. Luego de aproximadamente 8 minutos, se detuvo el agitador, y se verificó la formación y el tamaño de las micro-cápsulas, bajo el microscopio. Se eliminó el solvente, y las micro-cápsulas se lavaron 2 veces en 50 mL de ciclohexano. Se realizó un último lavado en etanol, y las cápsulas se dejaron secar en una campana extractora por 1 hora. La composición de las dietas micro-encapsuladas fue la siguiente:

Dieta CD2:	Dieta artificial comercial Frippak CD2.
Dieta D2:	5 g CD2 + 5 g Hb + 50 mL H ₂ O
Dieta XL1:	5 g CD2 + 6 g Hb + 50 mL H ₂ O + 1 % XL1
Dieta 635:	5 g CD2 + 6 g Hb + 50 mL H ₂ O + 1 % 635
Dieta 7:	5 g CD2 + 6 g Hb + 50 mL H ₂ O + 1 % 7

Donde: Hb = hemoglobina, XL1 = cepa *E. coli* XL1BluepUC19, 635 = cepa *E. coli* XL1p635 (conteniendo el gen para proteasa el tipo tripsina), y 7 = cepa *E. coli* XLp1 (conteniendo el gen para lipasa).

La estabilidad de las micro-cápsulas en agua de mar a 28°C, fue monitoreada, durante 5.5 h.

Preparación de los bioensayos

Se distribuyeron post-larvas de *Fenneropenaeus indicus* al estadio de PL1, en 15 recipientes conteniendo 5 L de agua de mar, a una densidad poblacional de 20 animales por recipiente. El agua fue pasada a través de filtros con tamaños decrecientes de 20 a 5 µm, y colada a través de una columna de fraccionamiento. Los bioensayos tuvieron una duración de 15 días. El agua tenía un pH de 8.0 – 8.3, una salinidad de 3,3 ‰ y una temperatura de 28°C (+/- 1°C). Se emplearon piedras aireadoras para la oxigenar los recipientes y se realizaron cambios de agua cada 2 días (100 %).

Las post-larvas fueron alimentadas con 3 porciones iguales a las 9:00, 13:00 y alas 18:00 h. La tasa de alimentación fue del 15 % de la biomasa. La cantidad de alimento requerido para los 3 recipientes réplica, fue rehidratada en 6 mL de agua destilada estéril, agregando 2 mL de esta solución a cada uno de los 3 recipientes, usando una jeringa de 2 mL. Se midió la longitud total (desde la punta del *rostrum* hasta la punta del telson) de 15 PLs al asar por cada tratamiento, cada 2 días. Se registró la supervivencia de los PLs cada 2 días.

Resultados y Discusión

Micro-cápsulas

El tamaño promedio de las micro-cápsulas fue: Dieta CD2 = 41.1 µm, dieta D2 = 148.0 µm, dieta XL1 = 218.0 µm, dieta XL1p635 = 218.0 µm, y dieta XL1p7 = 218.0 µm. La figura 1 muestra las micro-cápsulas antes y durante la digestión por parte de la cepa XL1p635. El 53 % de las micro-cápsulas es digerido por la bacteria en agua de mar a 28°C después de 2.5 h, y el 75 % después de 5.5 h.

Desarrollo de las post-larvas

Las post-larvas aceptaron las 5 dietas ofrecidas, aunque aquellas alimentadas con las micro-cápsulas más grandes (dietas D2, XL1, 635 y 7) tomaron más tiempo manejando su alimento antes de poder ingerirlo, que aquellas alimentadas con micro-cápsulas más pequeñas (dieta CD2).

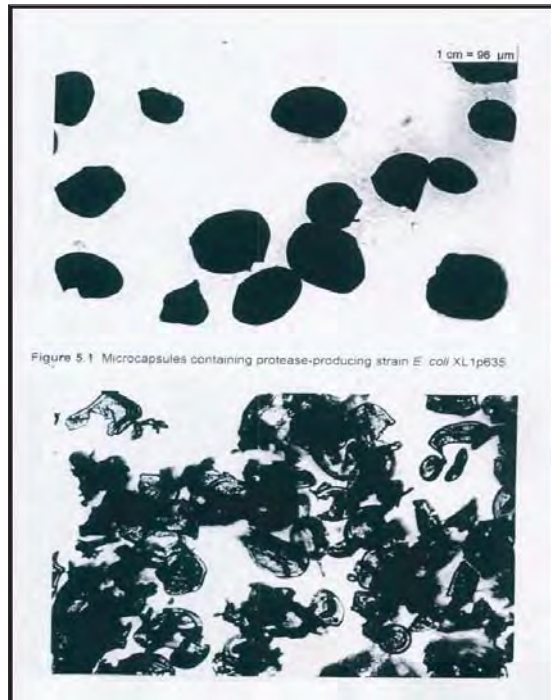


Figura 1. Micro-cápsulas conteniendo la cepa *E. coli* XL1p635, antes y después del proceso de digestión

La tabla I muestra las tasas de crecimiento de las post-larvas alimentadas con las 5 dietas. Los camarones alimentados con la dieta 635 tuvieron la mejor tasa de crecimiento de 0.26 mm día^{-1} , seguidos por aquellos alimentados con la dieta CD2 de 0.21 mm día^{-1} , y luego los alimentados con la dieta 7, 0.20 mm día^{-1} . La tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas XL1 y D2 fue relativamente baja, 0.15 y 0.14 mm día^{-1} respectivamente. La tasa de crecimiento de las post-larvas alimentadas con la dieta 635 resultó ser significativamente más rápida que la de aquellas alimentadas con las dietas D2, XL1, y 7 ($p < 0.001$).

La figura 2 muestra el incremento de longitud (mm) de las post-larvas alimentadas con las 5 dietas micro-encapsuladas, durante los primeros 15 días del estadio postlarval.

Tabla I. Tasas de crecimiento (mm día⁻¹) y desviaciones estándar de post-larvas de *Fenneropenaeus indicus* alimentadas con las dietas CD2, D2, XL1, 635, y 7.

Dietas	Tasa crec.	D. Est.	Valor t	Probabilidad
CD2	0.21386	0.01255	17.04	< 0.001
D2	0.14327	0.01141	12.56	< 0.001
XL1	0.15709	0.01196	13.13	< 0.001
635	0.26161	0.01255	20.85	< 0.001
7	0.20529	0.01141	17.99	< 0.001

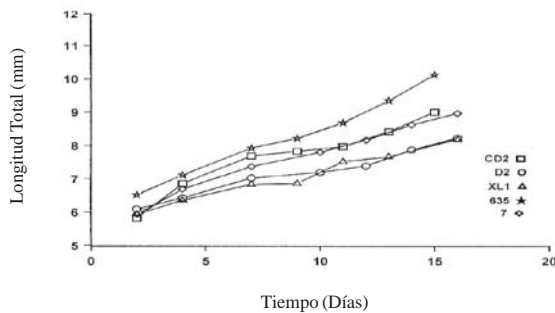


Figura 2. Efecto de cinco dietas micro-encapsuladas en el desarrollo de post-larvas de *Fenneropenaeus indicus*.

Tabla II. Media y desviación estándar del porcentaje de supervivencia de post-larvas de *Fenneropenaeus indicus* alimentadas con las dietas CD2, D2, XL1, 635 y 7, después de 15 días de bioensayo.

Dieta	Media % supervivencia	D. Est.	Nº de Réplicas
CD2	83.333	7.638	3
D2	76.667	10.408	3
XL1	55.000	10.000	3
635	83.333	2.887	3
7	71.667	2.887	3

Supervivencia de las post-larvas

La tabla II muestra la media y desviación estándar del porcentaje de supervivencia de las post-larvas de *Fenneropenaeus indicus* alimentadas con las dietas CD2, D2, XL1, 635, y 7, después de 15 días de bioensayo. Las post-larvas alimentadas

con las dietas CD2 y 635, mostraron una supervivencia del 83,3 %, seguidas de aquellas alimentadas con la dieta D2, con 76,6 %. Las post-larvas alimentadas con la dieta 7 tuvieron una supervivencia del 71,6 %, y el porcentaje de supervivencia más bajo, 55 %, le correspondió a las post-larvas alimentadas con la dieta XL1. Enzimas producidas por bacterias genéticamente modificadas, pueden mejorar la digestibilidad de dietas micro-encapsuladas para post-larvas de camarón. Partículas más pequeñas son más fáciles de ingerir que las más grandes. Las micro-cápsulas preparadas en nuestro laboratorio eran más grandes (150 μm) que las comerciales (40 μm), y aquellas que contenían cepas bacterianas aún más grandes (250 μm). Por lo tanto las post-larvas alimentadas con las micro-cápsulas grandes utilizaron más energía para manejar su alimento antes de ingerirlo. Maugle *et al.* (1983) alimentaron juveniles de *Marsupenaeus japonicus* con micro-cápsulas de 10 a 100 μm , e incrementaron el desarrollo de langostinos, activando sus zimógenos de proteasa endógenos, a través del suplemento exógeno de tripsina en la dieta. Itami y Takahashi (1991), obtuvieron un alimento con un tamaño de partícula de 50 μm utilizando el método de dispersión en seco, después de incluir células muertas de *Vibrio* en dietas micro-encapsuladas, para mejorar la supervivencia de larvas de *Penaeus monodon*. Trabajos sobre enzimas digestivas en larvas de especies de penaeidos han demostrado que las proteasas del tipo tripsina, forman el 80 % de las enzimas digestivas en larvas tempranas de penaeidos (Jones *et al.*, 1979; Lovett & Felder, 1990 a, b). En cambio, se ha hallado que no hay actividad de lipasas, lo cual sugiere que no se requieren grandes cantidades de lipasas. La mejor tasa de crecimiento mostrada por los camarones alimentados con la dieta 635, se debió probablemente a que la cepa XL1p635 era productora de una proteasa del tipo tripsina, principal requerimiento nutricional de los PLs en esa etapa de su desarrollo.

Estos resultados concuerdan con los de Kolkovski (1993), quien demostró el beneficio de la adición de pancreatina a dietas de larvas de *Sparus aurata*. La diferencia entre el peso seco inicial y final de larvas, fue de 100 % para aquellas alimentadas con suplemento de pancreatina, y sólo del 40 % para las del control.

La supervivencia fue en general la misma para las post-larvas alimentadas con el suplemento de proteasa, que para aquellas del control CD2. Sin embargo, fue relativamente baja para las post-larvas alimentadas con la dieta XL1, que además de tener un tamaño de partícula grande, no tenía suplemento enzimático.

Los resultados de este estudio demuestran que dietas micro-encapsuladas suplementadas con células bacterianas productoras de enzimas digestivas, pueden sostener el desarrollo de post-larvas de *Fenneropenaeus indicus*, durante los pri-

meros 15 días de etapa post-larval, además de promover un nivel de supervivencia satisfactorio. En el futuro estas dietas podrían potencialmente reemplazar el alimento vivo durante este periodo de desarrollo.

Referencias

- Itami, T.; Takahashi, Y. 1991. Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed *Vibrio* cells to microencapsulated diet. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3: 151-152.
- Jones, D.A.; Holland, D. L; Jabborie, S. 1984. Current status of microencapsulated diets for aquaculture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 10: 275-288.
- Kolkovski, S.; Tandler, A.; Kissil, G.; Gertler, A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation growth survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae Linnaeus) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12: 203-209.
- Lovett, D.L.; Felder, D. L. 1990a Ontogenetic change in digestive enzyme activity in larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biological Bulletin*, 178: 144-159.
- Lovett, D. L.; Felder, D. L. 1990b Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Biological Bulletin*, 178: 160-174.
- Magle, P. D.; Deshimaru, O.; Katayama, T.; Nagatani, T.; Simpson, K. L 1983. Effect of microencapsulated amylase and bovine trypsin dietary supplements on growth and metabolism of shrimp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 49: 1421-1427.
- Sirvas, S. 1999. The effect of diets supplemented with a genetically modified bacterium on the growth of *Penaeus indicus*. PhD Thesis. University of Wales, Bangor, 188 p.



Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura

Coloquio Internacional
27 de Junio - 1 de Julio de 2005
Iquitos, Perú

Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica

Editores:

J.-F. Renno

C. García-Dávila

F. Duponchelle

J. Nuñez

