

91
2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Evaluación de la actividad quitinolítica del camarón blanco del Golfo, Penaeus setiferus. Comparación entre poblaciones silvestres y poblaciones en condiciones controladas de cultivo"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LAURA ALICIA MARIN BONILLA



MEXICO, D. F.



1995

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron 1a pasante(s) Marín Bonilla Laura Alicia

con número de cuenta 8733730 - 5 con el Título: _____

Evaluación de la actividad quitinolítica del camarón blanco del Golfo,

Penaeus setiferus. Comparación entre poblaciones silvestres y poblaciones

en condiciones controladas de cultivo.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo.

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Doctor	Alfonso Miguel	Torre Blanco	
Director de Tesis			
Doctor	Carlos	Rosas Vázquez	
Doctora	Martha Gabriela	Gaxiola Cortés	
Doctor	René de Jesús	Cárdenas Vázquez	
Suplente			
Bióloga	María de los Remedios	Josefina Ramírez Rangel	
Suplente			

**Evaluación de la actividad quitinolítica del camarón blanco del Golfo,
Penaeus setiferus. Comparación entre poblaciones silvestres y
poblaciones en condiciones controladas de cultivo.**

**Esta tesis fué realizada bajo la dirección del
Doctor Alfonso Torre Blanco, en el Laboratorio
de Bioquímica de la Facultad de Ciencias
de la Universidad Nacional Autónoma de México,
con el apoyo de una beca para tesis de
licenciatura, otorgada por Fundación UNAM.**

**"EL FUTURO PERTENECE A QUIENES CREEN
EN LA BELLEZA DE SUS SUEÑOS"**

Eleonor Roosevelt.

DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermano:

porque el cariño, el apoyo, el estímulo y principalmente la vida que siempre me han dado han sido la base para cumplir mis metas.

A toda mi familia:

porque cada uno es un ejemplo a seguir y porque esa unión familiar que conservamos me da la fuerza que me impulsa a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfonso Torre Blanco por sus admirables enseñanzas, y por todo el apoyo y la confianza que me ha tenido.

Al Dr. Carlos Rosas por introducirme al fabuloso mundo de la camaronicultura y por su ayuda incondicional.

A la Dra. Gabriela Gaxiola por su orientación, apoyo y valiosas sugerencias para la realización de esta tesis.

Al Dr. René Cárdenas y a Remedios por aceptar ser parte de mi jurado.

Al Programa Fundación UNAM por otorgarme la beca.

A mis padres por estar siempre conmigo apoyandome y alentandome.

A mi hermano por el gran apoyo, la paciencia y la ayuda que siempre me das.

A Eduardo por su amor, apoyo y comprensión.

A todos los del Laboratorio de Bioquímica: Remedios, Carmen, Angélica, Ma. Carmen, por su amistad, ayuda y valiosos consejos.

A todos los del Laboratorio de Ecofisiología: Gabriel, Pedro, Fabián, Laura, Cecy, Guille, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando lo necesité.

A Jose Luis por ser un gran amigo, y por el apoyo que siempre me ofreciste.

A todos mis amigos: las 7 maravillas, Iván, Gastón, Jorge, Felipe, Paola, y todos los que faltan, por hacer inolvidablemente especial el transcurso de la carrera.

A mi tía Paquita por ayudarme en todo el papeleo.

A Tomás y al Lic. Andrés Reda por que sin su ayuda y paciencia no hubiera sido posible realizar esta tesis

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
I. Material biológico.....	8
A) Población silvestre.....	8
B) Población de laboratorio.....	9
II. Preparación de los extractos enzimáticos.....	11
III. Determinación del contenido total de proteína.....	11
IV. Determinación de la actividad quitinolítica.....	11
V. Estandarización del método.....	12
VI. Sistematización de datos.....	13
RESULTADOS.....	14
I. Estandarización del método.....	15
II. Actividad quitinolítica específica.....	18
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
APÉNDICE.....	34

INTRODUCCIÓN

En México, el camarón es el principal recurso pesquero por el valor económico que representa en ambos litorales, ya que contribuye con el 70% de las divisas totales producidas por el sector (FIRA, 1991).

La capacidad productiva de las poblaciones de camarón ha llegado a su límite y en algunos casos hasta lo ha rebasado debido a la carga excesiva a la que ha sido sometida por la intensa captura industrial. Esto ha ocasionado que el volumen de producción se estabilice y que la captura de camarón sea cada vez menos rentable. Como consecuencia, el producto es cada vez menos accesible debido a su alto valor comercial. Esta situación ha motivado en el sector pesquero, una inquietud tendiente a la búsqueda de nuevas alternativas y técnicas que permitan incrementar la disponibilidad, producción y oferta del recurso. Una de estas alternativas es el cultivo.

La acuicultura es la actividad dirigida a producir y cultivar organismos acuáticos (peces, crustáceos, moluscos, etc.) en condiciones controladas y en diversos ambientes (aguas dulces, salobres y marinas), con la finalidad de generar alimentos que contribuyan a la alimentación humana (FIRA, 1991). Cuenta con un gran potencial para cumplir con su finalidad, pero para lograrlo es necesario conocer mejor la biología de las especies y resolver los problemas que plantea su alimentación.

Uno de los sistemas de acuicultura que ha presentado un rápido crecimiento es el dedicado al cultivo de camarón del género *Penaeus*. Un problema real que aún no ha podido ser resuelto para el cultivo de este género es la integración de alimentos y regímenes alimenticios que cubran los requerimientos nutricionales acordes a cada especie.

Por lo anterior, es de importancia fundamental conocer la fisiología de los organismos, sobre todo en los aspectos relacionados con su nutrición. La identificación de las enzimas digestivas, el conocimiento de sus cambios durante el desarrollo y su modo de acción son necesarios para la formulación de dietas adaptadas a la fisiología de las especies, así como también, el conocimiento de sus características bioquímicas constituye un aspecto básico de gran importancia (González *et al.*, 1994).

El camarón blanco, *Penaeus setiferus* es una especie del Golfo de México cuya distribución abarca desde la costa atlántica norte de los Estados Unidos de Norteamérica hasta la Península de Yucatán. Es la especie comercial más importante del área, siendo su principal zona de captura en nuestro país la llamada Sonda de Campeche (Pérez, 1973; Brown *et al.*, 1979). Durante su ciclo de vida, esta especie lleva a cabo migraciones que le permiten desarrollarse y cubrir los requerimientos nutricionales de cada etapa de su desarrollo. Las postlarvas habitan las zonas de pastos marinos (principalmente del género *Thalasia* y *Holodula*). Cuando son juveniles los camarones migran hacia la costa en aguas menos profundas, con baja salinidad y ricas en materia orgánica tales como: zonas de manglar, esteros, lagunas, etc. donde crecen hasta alcanzar estadios de adulto o preadulto. Posteriormente migran a mar abierto para madurar y reproducirse (Fenucci, 1988). Ver Fig. 1.

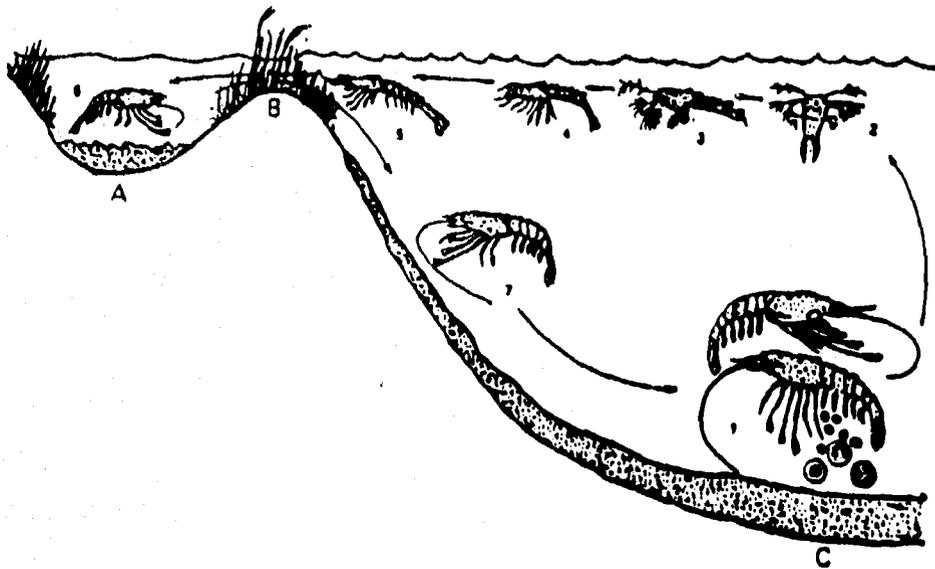


Fig. 1. Ciclo de vida de un camarón penaeoide típico. 1: maduración y reproducción; 2: nauplii; 3: protozoos; 4: mysis; 5: postlarvas; 6: juveniles; 7: adultos. A: zona de poca profundidad; B: zona de pastos; C: mar abierto (Fenucci, 1988).

Como resultado de varios estudios y del análisis del contenido estomacal se ha concluido que los camarones son omnívoros oportunistas y que se alimentan ramoneando la superficie de los fondos. En su dieta natural incluyen una amplia variedad de entidades alimenticias tales como fito y zooplankton, vegetales y animales de mayor tamaño y detrito de diversos orígenes (Fernández *et al.*, 1987). El alimento de tipo animal está compuesto principalmente de crustáceos (decápodos, copépodos harpacticoides, ostrácodos, anfípodos y tanáidos), anélidos (poliquetos y oligoquetos), nemátodos, moluscos (gastropodos) y foraminíferos; el alimento de tipo vegetal comprende microalgas (diatomeas, algas epifitas y edáficas), algas filamentosas, pastos y detritus de plantas vasculares (Gleason y Zimmerman, 1984; Gleason y Wellington, 1988; McTigue y Zimmerman, 1991; O'Brien, 1994).

En la dieta de los camarones la quitina puede comprender una importante porción sobre todo si se considera que muchos organismos presa son también crustáceos. Además se sabe que en laboratorio los camarones ingieren sus propias exuvias y heces fecales que pueden aportar una cantidad importante de quitina. (Goodrich y Morita, 1977a; Fox, 1993; Clark *et al.*, 1993). En relación con esto, Boddeke (1983) encontró en el contenido estomacal de *P. duorarum* un 94 % de fragmentos de crustáceos presa (Clark *et al.*, 1993). Además de estas formas naturales de incorporación de quitina, las dietas comerciales para camarones contienen quitina como una consecuencia de usar harina de cabeza de camarón derivada del procesamiento de desechos (Clark *et al.*, 1993; Fox, 1993).

Por lo anterior se sugiere que los camarones pueden ser capaces de utilizar la quitina de las dietas suministradas, pero hay poca información disponible sobre su aporte nutricional. Una de las interrogantes que surgieron consiste en conocer el papel que juega la quitina que es incorporada en la dieta. Para esto, ha sido necesario evaluar la digestión del alimento mediante el análisis de las enzimas digestivas. Los cambios en la actividad de las enzimas digestivas durante el desarrollo han sido estudiados en relativamente pocas especies de decápodos: *Palaeomon serratus*, *Homarus americanus*, *P. japonicus* y en *P. setiferus* (González *et al.*, 1994).

La quitina es un polímero lineal insoluble de amino-azúcares unidos por enlaces $\beta(1-4)$, predominantemente N-acetilglucosamina (NAG) y en un menor grado también glucosamina (Spindler-Barth, 1990), ver Fig. 2. La quitina es uno de los polisacáridos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en invertebrados marinos, insectos, hongos y levaduras, y representa el carbohidrato que cuenta con el segundo lugar del total de biomasa. En el caso de muchas especies de crustáceos, la quitina se encuentra en el exoesqueleto, en las paredes del intestino, y en la membrana peritrófica (Clark *et al.*, 1993).

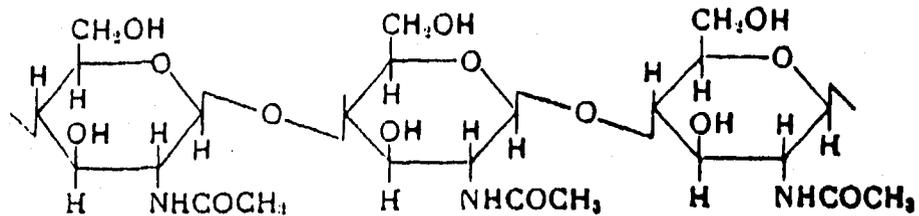
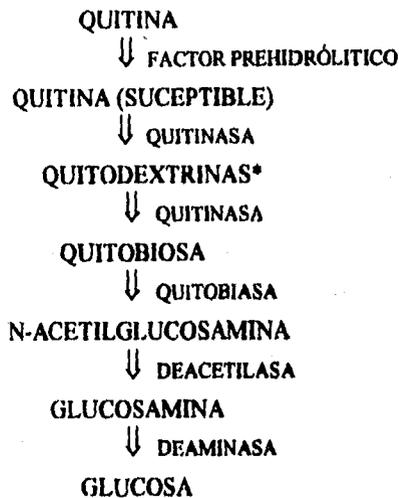


Fig. 2. Estructura química de la quitina.

La quitina es degradada por una serie de enzimas denominadas quitinasas. Las quitinasas hidrolizan una unión entre el C1 y C4 de dos N-acetilglucosaminas consecutivas de quitina. Se han caracterizado varios tipos de quitinasas:

- Endoquitinasas, enzimas que dividen o cortan dentro del polímero de quitina produciendo fragmentos de menor peso molecular.
- Exoquitinasas (EC 3.2.1.14), enzimas que cortan en los extremos del polímero liberando quitobiosa (dímeros de N-acetilglucosamina).
- β -N-acetilglucosaminidasas, liberadoras de monómeros de N-acetilglucosamina de quitina, y
- Quitobiasas (EC 3.2.1.30), que hidrolizan quitobiosa produciendo N-acetilglucosamina libre (Flach *et al.*, 1992).

La secuencia general para la degradación de quitina es la siguiente (Hood y Meyers, 1977):



*Residuos de quitina soluble de cadena corta.

Frecuentemente, la presencia de quitinasas se asocia a organismos que contienen quitina (Goodrich y Morita, 1977b). Sin embargo, algunos organismos que no contienen quitina también producen quitinasas, por ejemplo, una amplia variedad de bacterias, algunas plantas superiores (Flach *et al.*, 1992) y organismos depredadores de animales que tienen exoesqueletos de quitina.

El origen de quitinasas fue atribuida por Goodrich y Morita (1977a) y Hanson y Goodwin (1977) a la presencia de bacterias quitinolíticas y secreciones endógenas. Hood y Meyers (1974) y Dempsey y Kitting (1987) demostraron que los camarones peneidos poseen una microflora intestinal con la capacidad de producir quitinasas; y recientemente, Kono *et al.* (1990) reportaron un origen endógeno para quitinasas (Clark *et al.*, 1993).

El primer reporte sobre la degradación biológica de la quitina fue presentado por Benecke en 1905. Este autor describió una bacteria, *Bacillus chitinovorous*, con la capacidad de utilizar quitina como fuente de alimento (Goodrich y Morita, 1977b). Fue en

1911 cuando Bernard estableció un factor antifungal termosensible y difusible en bulbos de orquídeas y describió por primera vez una quitinasa. Más tarde Karrer y Hofmann, en 1929 la describieron en un caracol (Flach *et al.*, 1992).

El interés sobre las quitinasas tomó auge a partir de las investigaciones de Jeuniaux, entre las cuales hizo una caracterización de las quitinasas (Jeuniaux, 1966), las incluyó en la lista de hidrolasas del tracto digestivo de vertebrados (Goodrich y Morita, 1977b), y posteriormente, en 1971 reportó la incidencia de quitina en invertebrados (Goodrich y Morita, 1977b).

La actividad quitinolítica se asociaba anteriormente al proceso de muda de los artrópodos y crustáceos (Clark *et al.*, 1988), sin embargo, se ha consignado la existencia de quitinasas en el tracto digestivo de muchas especies de invertebrados y vertebrados. Varios estudios detectaron quitinasas en el tracto digestivo de peces (Goodrich y Morita, 1977a y 1977b; Clark *et al.*, 1988) y de crustáceos (Lynn, 1990; Spindler-Barth *et al.*, 1990) demostrando con esto, que las quitinasas no solamente están involucradas en la reabsorción de partes de la vieja cutícula, sino que también tienen función de enzimas degradadoras y digestivas. Esto fué examinado en diversas especies de crustáceos (Arnould y Jeuniaux, 1982).

La primera indicación de cambios en la actividad quitinolítica en el integumento de crustáceos, durante el ciclo de la muda, fué presentada por Jeuniaux (Spindler-Barth *et al.*, 1990). Spindler-Barth *et al.* (1990) consignaron diferencias en la actividad quitinolítica en el integumento e intestino medio, durante el ciclo de muda, señalando que estas diferencias se debían a que ambos órganos se encuentran bajo distintos mecanismos de control.

Esta necesidad de evaluar los procesos quitinolíticos asociados con las determinantes fisiológicas de la ecología de *P. setiferus*, ha sido objeto de diversos estudios. Clark *et al.* (1993) consignaron la existencia de la digestibilidad de quitina en camarones peneidos (*P. vannamei*, *P. setiferus* y *P. duorarum*) y que ésta varía con la especie. Hood y Meyers (1977) realizaron un análisis de la actividad quitinolítica propia del camarón blanco *P. setiferus* y de la derivada de sus endosimbiontes bacterianos. Estos autores demostraron la relevancia del total de procesos quitinolíticos en la biología de peneidos y sugirieron que la transformación metabólica de quitina juega un papel vital en el metabolismo de crustáceos. También se cuenta con investigaciones sobre los cambios de actividades enzimáticas digestivas con respecto a la dieta, talla u otros factores (Lee y

Lawrence, 1985; Fox, 1993) y durante el ciclo de vida (Lovett y Felder, 1990a y b; Fang y Lee, 1992; González *et al.*, 1994).

Sin embargo en especial para *P. setiferus* no se han realizado estudios sobre las posibles diferencias asociadas con el mantenimiento de los organismos en condiciones controladas, con respecto a los organismos provenientes del medio natural. Por ello se diseñó la presente investigación cuyos objetivos fueron:

- a) Evaluar la actividad quitinolítica de *P. setiferus* en tres estadios del desarrollo: postlarvas, juveniles y adultos.
- b) Comparar las actividades quitinolíticas de las postlarvas, juveniles y adultos de *P. setiferus* provenientes del medio natural, con los organismos obtenidos y mantenidos en el laboratorio.

En relación con los objetivos y conjuntando la información que se tiene se propuso como hipótesis de trabajo los siguientes puntos:

- a) Que existan diferencias en la actividad quitinolítica de las postlarvas de acuerdo al ambiente en que se desarrollan.
- b) Que la actividad quitinolítica sea distinta en las diferentes etapas de desarrollo; esperándose un incremento de la actividad en estadios más avanzados.

MATERIALES Y METODOS

I.- Material biológico.

A) **Población silvestre.** Las postlarvas y juveniles se colectaron en la Laguna de Términos, Cd. del Carmen, Campeche; localizada al suroeste del Golfo de México a $91^{\circ} 51'$ de longitud oeste y $18^{\circ} 27'$ de latitud norte (Mapa 1 del apéndice). Las postlarvas se capturaron en la parte noreste de Boca del Carmen (Estación 1) y los juveniles en Palizada Vieja (Estación 2). Los adultos se colectaron en la Sonda de Campeche, frente a Isla del Carmen (Estación 3). Ver Mapa 1 del apéndice.

La captura de postlarvas se realizó a una profundidad de 75 cm, con una red de patín con apertura de malla de 500 μm . Los juveniles fueron capturados a una profundidad de 1 m, con una red de prueba camaronesa con apertura de malla de 2.5 cm. Los camarones adultos se capturaron a una profundidad de 7 m, con una red de trasmallo con apertura de malla 4.2 cm.

Los organismos se identificaron en el campo hasta nivel de especie, *Penaeus setiferus*, de acuerdo a caracteres morfológicos externos.

Los caracteres tomados para las postlarvas fueron los descritos por Ringo y Zamora (1968):

1. Rostrum no extendido hacia el borde distal del ojo.
2. Tercer pereópodo no extendido más allá del borde distal del ojo.
3. Espinas rostrales posteriores unidas.
4. Espinas rostrales ventrales relativamente distantes.
5. Base antenal redondeada.

La identificación de juveniles y adultos fué hecha por los siguientes caracteres:

1. Dientes rostrales dorsales y ventrales.
2. No acanalado (sin surco en el rostro).
3. Télico abierto en hembras.

B) Población de laboratorio. Estas poblaciones las otorgó el Proyecto Camarón UNAM-INP (Facultad de Ciencias e Instituto Nacional de la Pesca) en el Centro Regional de Investigaciones Pesqueras (C.R.I.P.) Lerma-Campeche, Camp. Los organismos se mantuvieron y alimentaron bajo condiciones controladas de laboratorio.

Las postlarvas y los juveniles provinieron de desoves de hembras maduras en cautiverio e inseminadas en el laboratorio.

La alimentación proporcionada en el laboratorio en cada fase fué la siguiente:

-Fase larval:

Chaetoceros ceratosporum

Tetraselmis chuii

Nauplios de *Artemia franciscana*

Alimento microencapsulado comercial marca Argent (50% de proteína).

-Fase postlarval:

Artemia franciscana

Alimento peletizado con 35% de proteína, elaborado con harina de pescado y soya.

-Fase juvenil:

A. franciscana

Alimento peletizado con 35% de proteína.

-Adultos:

Mezcla de alimento fresco compuesta por calamar (*Loligo sp.*) y un oligoqueto (*Pantodrilus bermudensis*).

Cada vez que se observaban exuvias libres, camarones muertos y heces fecales, éstos fueron removidos.

Para obtener los preparados enzimáticos, en las postlarvas se emplearon los organismos completos debido a que las tallas tan pequeñas imposibilitaron la extracción del hepatopáncreas (A, Fig. 3). Para los juveniles se empleó el cefalotórax completo (B,

Fig. 3). En el caso de los adultos se disectó el hepatopáncreas completo (C, Fig. 3). Inmediatamente, todas las muestras se congelaron en hielo seco para su transporte. Una vez en el laboratorio se mantuvieron a -1°C hasta su análisis bioquímico.

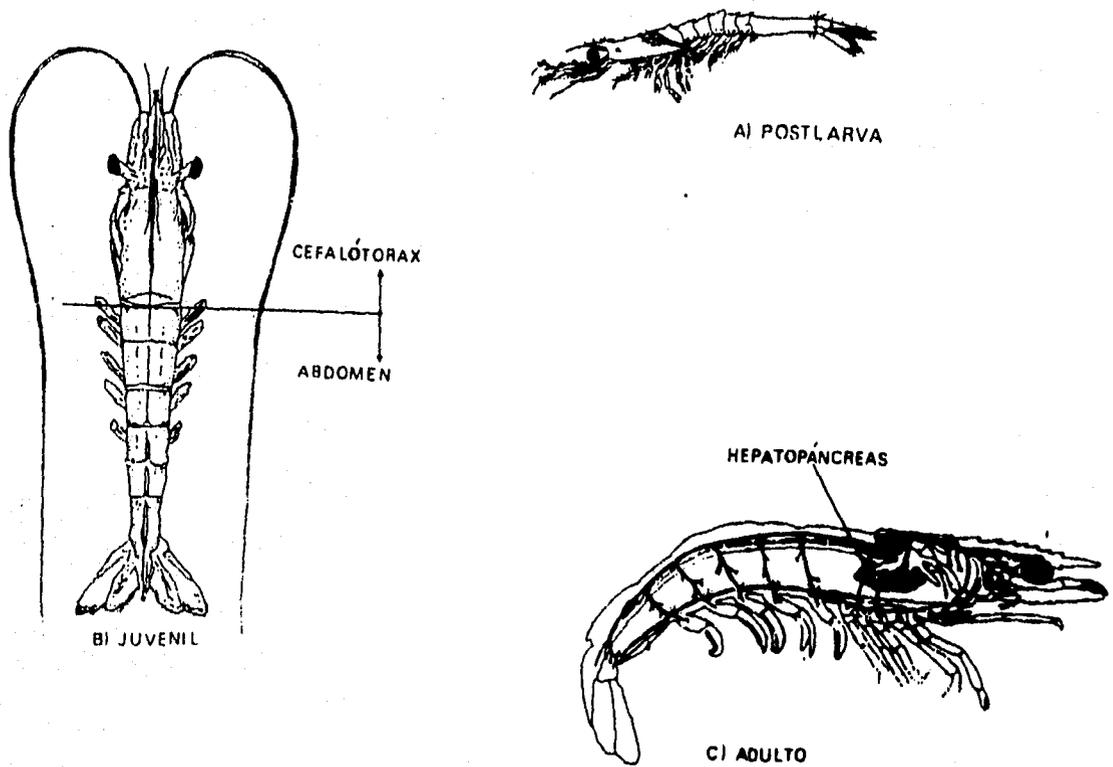


Fig. 3. Partes empleadas de cada estadio de desarrollo para la preparación de los extractos enzimáticos. A: postlarva completa; B: cefalotórax de juveniles; C: hepatopáncreas de adulto.

II.- Preparación de los extractos enzimáticos.

Los extractos enzimáticos de las diferentes poblaciones se obtuvieron de postlarvas completas, cefalotórax de juveniles y hepatopáncreas de adultos (Fig. 3).

Las muestras se homogenaron tomando un grupo representativo de cada población; en el caso particular de los adultos, cada hepatopáncreas se procesó individualmente. Para lo anterior se utilizó un homogenizador de tejidos marca Polytron y se agregó:

- 1 ml de agua por cada 500 mg del peso total de postlarvas completas,
- 1 ml de agua por cada 300 mg del peso total de cefalotórax de camarones juveniles,
- 1 ml de agua por cada 200 mg del peso total de un hepatopáncreas de camarón adulto.

Posteriormente el extracto resultante de postlarvas y de cefalotórax fué centrifugado a 42,100 x g, 4°C, por 30 min. El extracto de hepatopáncreas se ultracentrifugó a 183,000 x g, 4°C, por 30 min. En todos los casos el sobrenadante fué separado del sedimento, dividido en alícuotas y congelado a -71 °C hasta su uso.

III.- Determinación del contenido total de proteína.

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford,1976) utilizando los reactivos de Bio-Rad Laboratorios. Se emplearon diluciones 1:10, 1:20 y 1:40 por duplicado, para cada extracto enzimático. Y se utilizó albúmina sérica bovina como proteína estándar.

IV.- Determinación de la actividad quitinolítica.

La actividad quitinolítica se cuantificó mediante la endohidrólisis del sustrato quitina-azure según el método de Clark *et al.* (1988), con algunas modificaciones.

El procedimiento fué el siguiente: 5.0 mg de quitina-azure marca Sigma se incubaron en amortiguador de citrato 0.08 M pH 6 en un volumen total de 1.2 ml. El ensayo se llevó a cabo en tubos de 13 x 100 mm con tapa de rosca, a 35 ± 1 °C, con agitación constante. Al final de 2 horas de incubación, los tubos se centrifugaron a 13,300

rpm, durante 2 minutos, a temperatura ambiente; y el sobrenadante se leyó a 575 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-64.

El análisis de cada muestra se hizo por duplicado con 0.1, 0.2 y 0.4 ml de extracto enzimático para las pruebas 1, 2 y 3 respectivamente, con una prueba control que no contenía extracto enzimático.

V.- Estandarización del método.

El pH óptimo se determinó cuantificando la actividad quitinolítica con 2 y 4 horas de incubación a los pH: 2, 4, 6 y 8. Se utilizó amortiguador de citrato 0.08 M para los pH: 2, 4 y 6, y amortiguador Tris(hidroximetil)aminometano 0.08 M para el pH 8.

El efecto del tiempo de incubación sobre la actividad quitinolítica se evaluó a 1, 2, 4 y 8 hrs. Se hicieron 2 pruebas; en la primera se utilizaron 0.25 mg de quitinasa de *Streptomyces griseus* marca Sigma y en la segunda 0.5 mg. En ambas, la cantidad de sustrato que se utilizó para cada tubo fué de 10 mg.

El efecto de la concentración de la enzima fué analizado utilizando quitinasa comercial y extractos enzimáticos de hepatopáncreas de adultos. Se tomaron lecturas variando la concentración de proteína: 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg para quitina comercial incubando 2 y 24 horas; 0.738, 3.69 y 7.38 mg de proteína para el primer extracto enzimático de hepatopáncreas y 0.116, 0.232, 0.464 y 0.928 mg de proteína para el segundo; los extractos de hepatopáncreas se incubaron durante 2 horas, y la cantidad de sustrato utilizada en los tres casos para cada tubo fué de 10 mg.

El efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad quitinolítica se probó con 2.5, 5.0 y 10 mg de sustrato, y para ello se empleó un extracto enzimático de hepatopáncreas y 2 horas de incubación.

IV.- Sistematización de datos.

La actividad quitinolítica fué transformada a unidades de quitinasa de acuerdo a la siguiente ecuación:

Una unidad de quitinasa (U_q) es igual a un incremento de 0.1 de densidad óptica (D.O.) sobre hora.

$$1(U_q) = \Delta \text{D.O.} (0.1) / \text{hr}$$

Una vez hechas las transformaciones, la actividad quitinolítica específica se definió como:

$$U_q / \text{mg de proteína}$$

Finalmente se calculó el promedio total de las actividades específicas de cada muestra, obteniendo para cada una su desviación estándar.

Para comparar las actividades específicas quitinolíticas obtenidas en las poblaciones de medio natural y de laboratorio se aplicó una prueba de t. Para el caso específico de las postlarvas y para comparar las actividades quitinolíticas específicas entre estadios se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. En todos los casos se empleó una probabilidad de 0.05 (Zar, 1984).

RESULTADOS

De las poblaciones silvestres se procesó un total de 270 postlarvas (14.22 g), un total de 34 cefalotórax de juveniles (49.8 g) y 6 hepatopáncreas referidos como H1, H2, H3, H4, H5 y H6 con un peso individual de 0.62, 1.72, 1.59, 1.62, 1.13 y 0.84 g respectivamente.

De las poblaciones de laboratorio se procesó un total de 2,397 postlarvas de 13 días de edad (PL 13), con un peso de 7.44 g; 542 postlarvas de 21 días de edad (PL 21) con un peso de 4.96 g; 59 cefalotórax de juveniles, con un peso de 10.37 g; y 5 hepatopáncreas con un peso individual de 1.12, 1.01, 0.91, 0.79 g y 0.94 g respectivamente.

Las postlarvas y los juveniles de laboratorio presentaron un peso promedio menor que las poblaciones silvestres. Esto se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Peso promedio de cada tipo de muestra.

MUESTRA	PESO PROMEDIO DE LA POBLACIÓN SILVESTRE (g)	PESO PROMEDIO DE LA POBLACIÓN DE LABORATORIO (g)
Postlarvas completas	0.053	PL 13 = 0.003 PL 21 = 0.009
Cefalotórax de juveniles	1.465	0.176
Hepatopáncreas de adultos	1.253 ± 0.46	0.954 ± 0.12

En esta tabla se muestra el peso promedio de cada tipo de muestra con su respectiva desviación estándar.

I.- Estandarización del método

Para obtener el mejor pH, se probó el efecto de diferentes pHs sobre la actividad quitinolítica (Tabla 2). Como se puede observar en la Figura 4 del apéndice, la actividad quitinolítica mostró un máximo a pH 6 por lo cual se eligió este pH para llevar a cabo los experimentos.

Tabla 2. Actividad quitinolítica a diferentes pH.

pH	Δ D.O. 575 nm (2 horas de incubación)	Δ D.O. 575 nm (4 horas de incubación)
2	0.007	0.006
4	0.019	0.017
6	0.121	0.142
8	0.114	0.123

El efecto del pH en la actividad de quitinasas fué determinado en un rango de pH entre 2 y 8.

La actividad quitinolítica está expresada en unidades de densidad óptica (D.O.).

Como se puede observar en la Tabla 3 y en la Figura 5 del apéndice, el comportamiento con dos concentraciones diferentes de enzima es similar. Se observó que el incremento en la D.O. no es directamente proporcional al tiempo de incubación. De acuerdo a los datos observados se escogió un tiempo de incubación de 2 horas porque la relación entre la D.O. y la concentración de la enzima solamente es lineal a este tiempo.

Tabla 3. Actividad quitinolítica a diferentes tiempos de incubación.

TIEMPO DE INCUBACIÓN (horas)	Δ D.O. 575 nm (0.25 mg de proteína)	Δ D.O. 575 nm (0.5 mg de proteína)
1	0.015	0.0440
2	0.026	0.0575
4	0.040	0.0710
8	0.056	0.0845

El tiempo de incubación se determinó entre 1 y 8 horas.

Los resultados obtenidos de experimentos al variar la cantidad de proteína muestran que la actividad quitinolítica aumenta de manera proporcional como efecto del incremento de proteína tomando 2 horas de incubación (Tabla 4, Fig. 6 del apéndice). Subsecuentes mediciones llevadas a cabo, también con 2 horas de incubación, con diferentes concentraciones de enzima mostraron que el incremento en la D.O. fué proporcional a la concentración de enzima (Tabla 5 y 6, Fig. 7 del apéndice).

Tabla 4. Efecto de la concentración de la enzima sobre la actividad quitinolítica. Quitinasa comercial de *Streptomyces griseus*.

CANTIDAD DE ENZIMA (mg de proteína)	Δ D.O. 575 nm (2 horas de incubación)	Δ D.O. 575 nm (24 horas de incubación)
0.1	0.0095	0.060
0.2	0.0205	0.093
0.4	0.0455	0.175
0.8	0.0775	0.231

Tabla 5. Efecto de la concentración de la enzima sobre la actividad quitinolítica. Extracto enzimático de hepatopáncreas de camarón.

CANTIDAD DE ENZIMA (mg de proteína de extracto)	Δ D.O. 575 nm
0.738	0.109
3.69	0.556
7.38	1.100

Tabla 6. Efecto de la concentración de la enzima sobre la actividad quitinolítica.
2o. extracto enzimático de hepatopáncreas de camarón.

CANTIDAD DE PROTEÍNA (mg)	Δ D.O. 575 nm
0.116	0.057
0.232	0.125
0.464	0.257
0.928	0.508

Al variar la cantidad de sustrato, se observó muy poca variación en las lecturas de densidad óptica y mucho menor entre los valores de 5 y 10 mg, por lo cual se determinó utilizar 5 mg de sustrato para los experimentos (Tabla 7 y Fig. 8 del apéndice).

Tabla 7. Actividad quitinolítica con distinta cantidad de sustrato (quitina-azure)

CANTIDAD DE SUSTRATO (mg)	Δ D.O. 575 nm
2.5	0.062
5.0	0.067
10.0	0.070

La cantidad de sustrato fué evaluada con 2.5, 5.0 y 10 mg.

II.- Actividad Quitinolítica Específica.

En la Tabla 8 se puede observar la actividad quitinolítica específica de cada tipo de muestra de las poblaciones silvestres. La actividad de los hepatopáncreas de adultos osciló entre 0.314 y 0.746 U_q / mg de proteína exceptuando el hepatopáncreas 2 que tuvo una actividad muy alta con un valor promedio de 2.552 U_q / mg de proteína. Los valores del hepatopáncreas 2 no son un error ya que en un segundo análisis se obtuvieron los mismos valores. El valor promedio de este hepatopáncreas no fué considerado para obtener el promedio general debido a que se encontró muy por encima de los demás.

Entre las poblaciones silvestres de adultos, juveniles y postlarvas, la estadística mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). La población de menor actividad quitinolítica específica fué la de juveniles, y la de mayor, la de postlarvas.

Tabla 8. Actividad quitinolítica específica de las poblaciones silvestres.

MUESTRA	ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA ESPECÍFICA (U _q / mg proteína)			
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
Adultos:				
H1	0.738	0.753	0.745	0.745
H2	2.375	2.604	2.677	2.552
H3	0.514	0.484	0.539	0.512
H4	0.288	0.288	0.368	0.315
H5	0.518	0.539	0.635	0.564
H6	0.430	0.409	0.421	0.420
Promedio total				0.511 ^A
Juveniles:				
Cefalotórax	0.244	0.289	0.376	0.303 ^B
Postlarvas:				
Animal completo	0.800	0.600	0.760	0.720 ^C

Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la Tabla 9 se muestra la actividad quitinolítica específica de las poblaciones de laboratorio con su respectivo promedio. Se puede observar que la actividad quitinolítica específica de los hepatopáncreas de adultos osciló entre 0.398 y 0.766 U_q / mg de proteína. La estadística mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones de adultos vs. juveniles y adultos vs. postlarvas (PL13 y PL21); y mostró diferencias no significativas ($p > 0.05$) entre las poblaciones de juveniles vs. postlarvas (PL13 y PL21) y PL13 vs. PL21. Cabe hacer notar que el comportamiento que presentaron las poblaciones de laboratorio fue diferente al de las poblaciones silvestres. En las poblaciones silvestres, los juveniles, como ya antes se había mencionado, presentaron una actividad menor que los adultos y las postlarvas. En las poblaciones de laboratorio, los adultos fueron los que presentaron la mayor actividad y tanto juveniles como postlarvas (PL13 y PL21) presentaron la menor actividad quitinolítica.

Tabla 9. Actividad quitinolítica específica de las poblaciones de laboratorio.

MUESTRA	ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA ESPECÍFICA (U _q / mg proteína)			
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
Adultos:				
H1	0.415	0.381	0.398	0.398
H2	0.490	0.430	0.460	0.459
H3	0.670	0.490	0.430	0.528
H4	0.521	0.497	0.471	0.496
H5	0.790	0.790	0.717	0.766
Promedio total				0.530 ^A
Juveniles:				
Cefalotórax	0.167	0.146	0.141	0.151 ^B
Postlarvas:				
Animal completo (PL 13)	0.143	0.141	0.161	0.148 ^B
Animal completo (PL 21)	0.204	0.201	0.161	0.189 ^B

Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la Tabla 10 se presenta un resumen de la actividad quitinolítica específica promedio de cada tipo de muestra con su desviación estándar con la cual es posible comparar de maera más clara a las poblaciones (también ver Fig. 9 del apéndice).

Tabla 10. Actividad quitinolítica específica promedio de cada tipo de muestra.

MUESTRA	ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA ESPECÍFICA (U_q / mg proteína) \pm SD	
	Población silvestre	Población de laboratorio
Adultos	0.511 \pm 0.153 ^A	0.530 \pm 0.140 ^A
Juveniles	0.303 \pm 0.067 ^B	0.151 \pm 0.014 ^a
Postlarvas	0.720 \pm 0.106 ^C	PL 13 = 0.148 \pm 0.011 ^a PL 21 = 0.189 \pm 0.024 ^a

Superíndices distintos en la misma columna o en el mismo renglón indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

La estadística indicó diferencias no significativas ($p > 0.05$) entre la actividad específica de adultos de la población silvestre y de la población de laboratorio. A diferencia de lo anterior, los juveniles y las postlarvas presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre poblaciones silvestres y poblaciones de laboratorio. Las poblaciones de juveniles y postlarvas de laboratorio presentaron menor actividad que las silvestres.

DISCUSIÓN

Los ensayos para medir actividad quitinolítica descritos en la literatura son numerosos. En ellos se han incluido como sustratos: quitina natural procedente de exoesqueletos de artrópodos y de la pared celular de hongos, preparaciones de quitina coloidal, quitina marcada radioactivamente, glicol-quitina, quitina coloreada o teñida con azul remazol brillante o con violeta remazol brillante y una gran cantidad de sustratos sintéticos (Flatch *et al.*, 1992).

La evaluación de la actividad de las quitinasas es analizada a través del monitoreo de los cambios en el tamaño molecular de un sustrato por mediciones de viscosidad, determinación de oligosacáridos para endoquitinasas o de N-acetil-glucosamina (NAG) para β -N-acetilglucosaminidasas (Flatch *et al.*, 1992). Sin embargo, el indicador más común de la digestión de quitina en muchos experimentos es la NAG (Clark *et al.*, 1993).

En el presente trabajo se usó el método reportado por Clark *et al.* (1993), que utiliza quitina-azure. La quitina-azure es una quitina insoluble con moléculas teñidas al azar, sustituidas en unidades de NAG. La endohidrólisis de este sustrato es medida por la absorbancia de los fragmentos solubilizados de la quitina teñida liberados por la acción enzimática de las endoquitinasas. Esta técnica fue elegida por su sensibilidad y por medir, fundamentalmente, la actividad enzimática que inicia el proceso de degradación de la quitina. Además, por ser una técnica sencilla, rápida, económica y fácilmente reproducible.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio durante la estandarización del método confirmaron que éste es confiable dentro del rango de pH 6 y 8, con un tiempo de incubación de 2 horas y utilizando 5 mg de sustrato (quitina-azure). Así mismo, se determinó el rango de actividad en el que la respuesta es lineal o directamente proporcional a la actividad.

En cuanto al peso promedio que se obtuvo para cada tipo de muestra, no debe ser considerado como un peso netamente real ya que pudo verse afectado por la deshidratación parcial resultante de la congelación, previa al procesamiento bioquímico de las muestras. Por lo tanto, los pesos de las muestras no son comparables con los de otros experimentos pero son importantes en este trabajo para centrarse en la edad de los camarones y establecer diferencias entre las poblaciones de este estudio.

Como se pudo observar en los resultados, el peso promedio de las muestras representativas de cada estadio, es menor en las poblaciones de laboratorio que en las poblaciones silvestres. Una probable explicación a estas diferencias es que se estuvieran comparando poblaciones de diferente edad.

La edad de las poblaciones de laboratorio es fácilmente determinada ya que durante el ciclo de vida de los camarones se efectúa un detallado seguimiento que nos permite reconocer el tiempo de cada fase de desarrollo. Sin embargo, contrariamente, no es posible saber con exactitud la edad de las poblaciones silvestres.

Por otro lado, es probable también que las condiciones en las que los organismos son mantenidos en el laboratorio, den como resultado un crecimiento y desarrollo más lentos que el que experimentan en su medio natural. Se sabe que la utilización de dietas artificiales no sustituye los excelentes resultados de sobrevivencia y crecimiento conseguidos con el alimento natural (Fernández *et al.*, 1987).

La ontogenia de los camarones del género *Penaeus* es única entre los crustáceos decápodos. Todos los estados larvarios son libres nadadores y las transformaciones morfológicas a adulto ocurren gradualmente durante varias semanas, sin transformaciones abruptas en el estado decapodito o en los estados que inmediatamente le preceden (Lovett y Felder, 1990a).

Después de la eclosión en mar abierto en la plataforma continental, las larvas de peneidos pasan a través de 5 estados naupliares (N_1 - N_5) en los cuales no se alimentan, 3 estados protozoales (Z_1 - Z_3) y 3 estados mysis (M_1 - M_3) antes de la metamorfosis a decapodito (P_1). La metamorfosis está acompañada de un cambio abrupto de hábito planctónico a bentónico. En las primeras dos semanas de vida postmetamórfica, las postlarvas migran hacia las costas, a zonas de crianza, presentando cambios en sus hábitos alimenticios y un rápido crecimiento. El camarón blanco del Golfo migra hacia zonas estuarinas con pastos marinos, principalmente de los géneros *Thalasia* y *Holothule*, los cuales proporcionan protección y su biota asociada proporciona alimento (O'Brien, 1994). Posteriormente los camarones retornan como subadultos a áreas alejadas de la costa (Gleason y Zimmerman, 1984; Lovett y Felder, 1989; Mc Tighe y Zimmerman, 1991).

En estado Z_1 , las larvas de *P. setiferus* comienzan a alimentarse de algas. En M_3 las larvas cambian de una alimentación por filtración a una alimentación principalmente

raptorial que continúa hasta empezar a declinar en Pl_1 . La dieta cambia de ser predominantemente a base de algas en los primeros estados postlarvales, a incluir una mayor porción substancial de materia animal en estados postlarvales posteriores (Pl_{28} - Pl_{35}) (Lovett y Felder, 1990a). Aunque los camarones peneidos mantienen durante todas las fases de su ciclo de vida el carácter omnívoro de sus hábitos alimenticios, se sabe que una vez que inician su vida bentónica, la dieta puede ser esencialmente carnívora, marcándose esta tendencia conforme aumenta la edad (Fernández *et al.*, 1987).

El alimento de origen animal que consumen las postlarvas de los peneidos es muy diverso y se encuentra dominado principalmente por copépodos harpacticoides, nemátodos, anfipodos, tanaidos y poliquetos (Gleason y Wellington, 1988).

La fase de desarrollo postlarval (Pl_1 - Pl_{14}) representa un periodo en el cual se presentan altas tasas de mortalidad, según la experiencia de los acuicultores. Y justamente durante parte de este periodo (Pl_1 - Pl_4) Lovett y Felder (1990a) demostraron una disminución de actividades enzimáticas digestivas específicas, que coincide en la ontogenia con la degeneración del tubo digestivo. En los estadios larvales y primeras etapas postlarvales los ciegos anteriores y laterales del intestino medio son los encargados de secretar las enzimas digestivas. Durante las dos primeras semanas de vida postmetamórfica estas estructuras degeneran y se fusionan para formar un divertículo anterior del intestino medio, perdiendo su función secretora de enzimas digestivas. Subsecuente a este periodo, estos autores observaron un aumento en la actividad de las enzimas digestivas durante el desarrollo postlarval que coincide con la diferenciación del intestino medio en la forma del adulto que se encuentra ya presente en Pl_{35} , y con un incremento alométrico en la talla relativa del hepatopáncreas (Lovett y Felder, 1990a).

En la naturaleza, los juveniles y adultos son predominantemente carnívoros, con una dieta que comunmente consiste de pequeños moluscos, crustáceos, ofiuroideos, oligoquetos, poliquetos y foraminíferos (Dall *et al.*, 1991; Mc Tighe y Zimmerman, 1991; O'Brien, 1994). Los camarones juveniles aumentan la diversidad de su alimento de acuerdo con su crecimiento. El grado de carnivoría cambia con la ontogenia, incrementándose conforme aumenta la talla. Los juveniles de mayor tamaño integran en su dieta presas que son más difíciles de capturar y comer. Esto sugiere que la habilidad depredadora de los camarones se relaciona con la talla y con el poder de las estructuras alimentarias (por ejemplo, quelas y partes bucales) (O'Brien, 1994).

De acuerdo al grado de carnivoría consignado en la literatura para los distintos estadios del desarrollo de *P. setiferus*, cabría esperar que en la población silvestre, la actividad quitinolítica de los adultos fuera mayor que la actividad de los juveniles y la de ambas fuera mayor que la actividad de las postlarvas. Sin embargo, en la población silvestre estudiada ahora, esto no se observó en su totalidad. La actividad quitinolítica de los camarones adultos fué mayor que la actividad de los juveniles y la actividad quitinolítica que presentaron las postlarvas fué más alta que la de los otros estadios.

Este hallazgo podría sugerir que, después de la disminución de las actividades enzimáticas digestivas que ocurre durante la metamorfosis, hubiera un disparo en la actividad quitinolítica como una respuesta a la presencia de niveles altos de quitina en la dieta por la "nueva" alimentación carnívora. Este disparo en la actividad quitinolítica de las postlarvas silvestres probablemente podría estar relacionado con el aumento de las actividades digestivas observado por Lovett y Felder (1990a) en Pl_{28} - Pl_{35} coincidente con la diferenciación del intestino medio. El hecho de que el peso promedio de las postlarvas de la población silvestre sea mayor que el de las postlarvas de laboratorio sugiere que la edad de las primeras es mayor que las de laboratorio y que su estadio de desarrollo podría estar más cercano al de Pl_{28} - Pl_{35} estudiado por Lovett y Felder.

Por otro lado, ante la consideración de que las postlarvas son menos carnívoras que los juveniles y adultos, y por lo tanto que ingieren una menor cantidad de quitina, Lee y Lawrence (1985) propusieron que los alimentos con insuficiente contenido de sustrato pueden ser el origen de la estimulación de la actividad enzimática digestiva correspondiente a los camarones. No obstante, ellos aclaran que la expresión de una aparente elevación en las actividades específicas como efecto de una insuficiencia de sustrato podría también deberse a una disminución en el contenido proteico de la glándula digestiva.

Lovett y Felder (1990a) propusieron que en la correlación del cambio ontogénico de las actividades enzimáticas con el cambio en los hábitos alimenticios, los cambios ontogénicos en la actividad pueden estar programados y pueden reflejar una regulación temporal genética de la síntesis enzimática. A pesar de esto, en este trabajo, las diferencias establecidas en ambas poblaciones pudieran señalar que las actividades quitinolíticas no sean puramente el reflejo de una regulación temporal genética de la síntesis enzimática y que habría que tomar en consideración otros factores externos al animal como son las distintas dietas, los distintos hábitats en que se desarrollan, las densidades de población,

etc. Por otro lado, cabe aclarar que estos autores no compararon los niveles de actividades enzimáticas digestivas presentes en los estadios larvarios y postlarvarios con los de juveniles y adultos.

Las poblaciones de laboratorio, a las cuales se les suministró alimento balanceado con un acceso limitado a fuentes de quitina, mostraron diferencias menores en los niveles de actividad quitinolítica entre los distintos estadios de desarrollo que las poblaciones silvestres.

En el laboratorio, las postlarvas presentaron una actividad quitinolítica similar a la de los juveniles y menor que la de los adultos; al mismo tiempo mostraron una actividad significativamente menor que las postlarvas silvestres ($p < 0.05$). Esto último podría deberse, como anteriormente se mencionó, a que las postlarvas silvestres y las postlarvas de laboratorio no sean de la misma edad. Por otro lado, una disminución en el acceso a fuentes de quitina en estas poblaciones también probablemente podría explicar el menor nivel de actividad quitinolítica manifestado por las postlarvas y los juveniles, comparado con el de las poblaciones silvestres. Cabe recordar que en las dietas proporcionadas, la fuente de quitina para postlarvas y juveniles solamente provino del exoesqueleto de las artemias, en cambio, a los adultos se les proporcionó alimento fresco compuesto por *Pantodrilus bermudensis*, un oligoqueto estuarino que tiene púas de quitina, y el calamar *Loligo sp.* que tiene una franja dura de quitina llamada rádula. Así, el hecho de que los adultos se alimenten de dietas que podrían proporcionar una mayor fuente de quitina probablemente nos permite explicar la similar actividad que presentaron ambas poblaciones.

En el paso de larva a adulto, un camarón experimenta cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos muy drásticos (Fang y Lee, 1992). Los cambios ontogénicos en la actividad de las enzimas digestivas según González *et al.* (1994), tienen su base en los cambios morfológicos del sistema digestivo, pero también reflejan los grandes cambios en los hábitos de vida y alimentarios. Los requerimientos nutricionales son diferentes en cada estadio y pueden estar parcialmente reflejados por la tasa de las actividades enzimáticas digestivas (Fang y Lee, 1992).

Cabe aclarar que en la interpretación de los resultados de este trabajo se debe tomar en cuenta que la actividad quitinolítica correspondiente a postlarvas y juveniles podría provenir de 2 fuentes de quitinasa: las quitinasas del integumento que están

relacionadas con la reabsorción de partes de la vieja cutícula durante el proceso de muda y las quitinasas de la glándula digestiva que degradan y digieren la quitina. En cambio, la actividad quitinolítica cuantificada en los adultos proviene solamente del hepatopáncreas.

El valor nutritivo de la quitina no ha podido ser esclarecido, no obstante se sabe que es importante en el metabolismo. La degradación de quitina produce N-acetilglucosamina, la cual dicen Hood y Meyers (1977), que es utilizada por los camarones en preferencia a glucosa. Una vez que la acetilglucosamina es liberada, entra a la hemolinfa y puede ser utilizada para la síntesis de nueva quitina (Hood y Meyers, 1977). Arosemena (1984), quien hizo una valoración nutricional de la harina de cabezas de camarón, consideró que la presencia de quitina en las dietas es importante como precursor de una fuente de glucosamina, un azúcar que puede aprovechar el camarón como fuente de carbono y de nitrógeno.

Este trabajo contribuye en gran parte al conocimiento de las actividades enzimáticas digestivas de *P. setiferus*. Aporta la evidencia de que las actividades quitinolíticas en el estadio postlarval y juvenil son significativamente diferentes entre poblaciones silvestres y poblaciones de laboratorio. Las causas deben ser analizadas con mayor profundidad y es necesario la complementación de otros estudios para obtener un panorama más amplio sobre el papel que juega la quitina en la dieta.

La presencia de actividad quitinolítica en *P. setiferus* en tres estadios del desarrollo: postlarva, juvenil y adulto, así como la evidencia de que los camarones son carnívoros, por lo tanto consumen quitina, la cual degradan y asimilan, puede ser un buen índice de la utilización de quitina como fuente nutritiva. Sin embargo, es posible que los requerimientos nutricionales sean diferentes en cada etapa del desarrollo.

De los resultados obtenidos se puede recomendar en la dieta de postlarvas y juveniles, en su fase productiva, la suplementación de alguna fuente para la obtención de quitina. Los términos obtenidos de ensayos que utilizan quitina purificada sugieren que este tipo de quitina puede subestimar la actividad quitinolítica (Fox, 1993). Así mismo, se ha observado que la actividad de quitinasas puede aumentar con la presencia de proteína; por lo tanto la quitina nativa obtenida de la harina de cabeza de camarón puede ser de gran valor nutricional (Arosemena, 1984).

CONCLUSIONES

- 1. La actividad quitinolítica digestiva se encuentra presente en postlarvas, juveniles y adultos de *P. setiferus* de poblaciones silvestres y poblaciones de laboratorio.**
- 2. La magnitud de la actividad varía de acuerdo al ambiente en que viven y en cada estadio de desarrollo.**
- 3. Las poblaciones de postlarvas y juveniles de laboratorio presentan una actividad inferior que las poblaciones silvestres. Los adultos silvestres y de laboratorio presentan una actividad similar.**

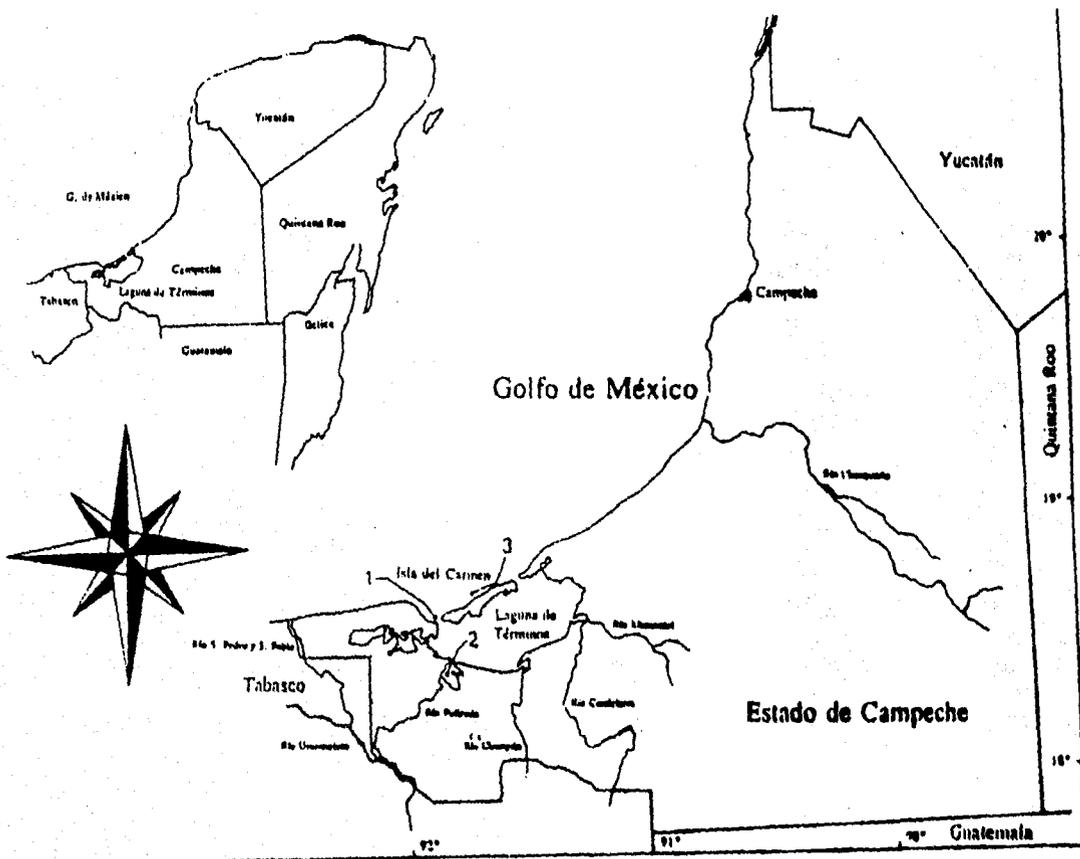
BIBLIOGRAFÍA

1. Arnould, C., and Jeuniaux, C., 1982. Les enzymes hydrolytiques du système digestif chez les crustacés pagurides. *Cah. Biol. mar.*, 13: 89-103.
2. Arosemena, G., 1985. Valoración nutricional de la harina de cabezas de camarón. Subproducto de desecho. *Rev. Med. Panamá*, 10: 48-55.
3. Benecke, W., 1905. Über *Bacillus chitinovorous* einen chitin zersetzenden Spaltpilz. *Bot. Ztg (Abt. I)*, 63: 227-242.
4. Bernard, N., 1911. Sur la fonction fungicide des bulbes d'ophrydées. *Am. Sci. Nat. Bot. Paris*, 14: 221-234.
5. Boddeke, R., 1983. Survival strategies of penaeid shrimps and their significance for shrimp culture. *Proc. First International Biennial Conf. Warm Water Aquaculture - Crustacea, Laie, Hawaii*, 1: 514-523.
6. Bradford, M. N., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72: 248-254.
7. Brown, A., McVey, J., Middleditch, B. S., and Lawrence, A. L., 1979. Maturation of white shrimp (*Penaeus setiferus*) in captivity. *Proc. World Maricul. Soc.*, 10: 435-444.
8. Clark, D. J., Lawrence, A. L., and Swakon, D. H. D., 1993. Apparent chitin digestibility in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 109: 51-57.
9. Clark, J., Quayle, K. A., Macdonald, N. L., and Stark, J. R., 1988. Metabolism in marine flatfish-V. Chitinolytic activities in Dover Sole, *Solea solea* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 90 (B): 379-384.
10. Dall, W., Smith, D. M., and Moore, L. E., 1991. Biochemical composition of some prey species of *Penaeus esculentus* Haswell (Penaeidae: Decapoda). *Aquaculture*, 96: 151-166.
11. Dempsey, A. C., and Kitting, C. L., 1987. Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana*, 52 (1): 90-94.
12. Fang, L.-S., and Lee, B.-N., 1992. Ontogenic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103B (4): 1033-1037.
13. Fenucci, J. L., 1988. Manual para la cría de camarones peneidos. *FAO-Italia*, pp 79.
14. Fernández, R., Celada, J. D., y Muñoz, F., 1987. Nutrición y alimentación de crustáceos. En: J. Espinoza de los Monteros y U. Labarta (eds.). *Nutrición en Acuicultura II*. Ed. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura. España, pp 316.
15. FIRA. Boletín Informativo., 1991. Criterios generales para el diseño de una explotación camarónica, 23 (224): pp 64.

16. Flach, J., Pilet, P.-E., and Jollès, P., 1992. What's new in chitinase research?. *Experientia*, 48: 701-716.
17. Fox, C. J., 1993. The effect of dietary chitin on the growth, survival and chitinase levels in the digestive gland of juvenile *Penaeus monodon* (Fab.). *Aquaculture*, 109: 39-49.
18. Gleason, D. F., and Wellington, G. M., 1988. Food resources of postlarval brown shrimp (*Penaeus aztecus*) in a Texas salt marsh. *Mar. Biol.*, 97: 329-337.
19. Gleason, D. F., and Zimmerman, R. J., 1984. Herbivory potential of postlarval brown shrimp associated with salt marshes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 84: 235-246.
20. González, R., Fraga, V., y Carrillo, O., 1994. Cambios ontogenéticos en la actividad de las principales enzimas digestivas de *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 15 (3): 262-267.
21. Goodrich, T. D., and Morita, R. Y., 1977a. Incidence and estimation of chitinase activity associated with marine fish and other estuarine samples. *Mar. Biol.*, 41: 349-353.
22. Goodrich, T. D., and Morita, R. Y., 1977b. Bacterial chitinase in the stomachs of marine fishes from Yaquina Bay, Oregon, USA. *Mar. Biol.*, 41:355-360.
23. Hanson, J. A., and Goodwin, H. L., 1977., Shrimp and prawn farming in the western hemisphere. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, PA., pp 43.
24. Hood, M. A., and Meyers, S. P., 1974. Microbial aspects of penaeid shrimp digestion. *Gulf Carib. Fish. Inst.*, 26: 81-91.
25. Hood, M. A., and Meyers, S. P., 1977. Microbiological and chitinoclastic activities associated with *Penaeus setiferus*. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, 33: 235-241.
26. Jeuniaux, C., 1966. Chitinases. *Meth. Enzym.*, 8: 644-650.
27. Jeuniaux, C., 1971. Chitinous structures. In: *Comprehensive biochemistry*, 26 (C): 595-632.
28. Karrer, P., and Hofmann, A., 1929. Über den enzymatischen Abbau von Chitin und Chitosan I. *Helv. chim. Acta*, 12: 616-637.
29. Lee, P. G., and Lawrence, A. L., 1985. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus. *J. World Maricul. Soc.*, 16: 275-287.
30. Lovett, D. L., and Felder, D. L., 1989. Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). *J. Morphol.*, 201: 253-2272.
31. Lovett, D. L., and Felder, D. L., 1990a. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.*, 173: 144-159.

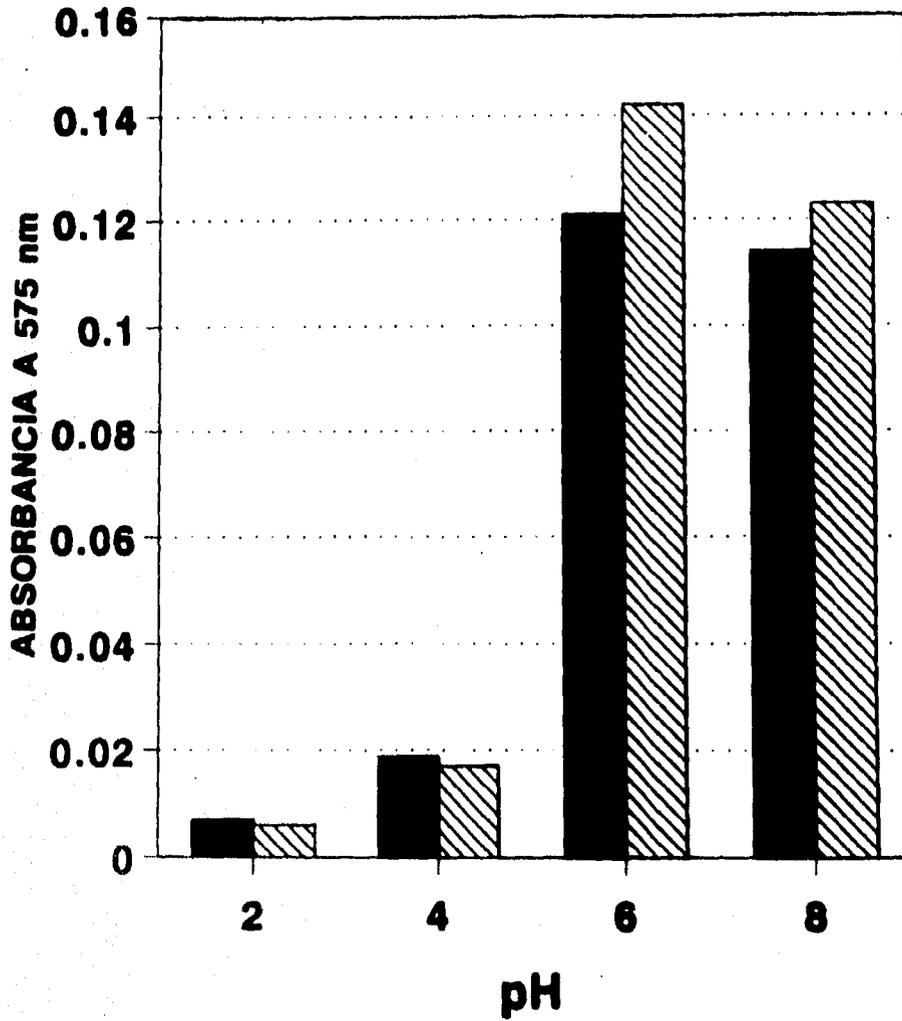
32. Lovett, D. L., and Felder, D. L., 1990b. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.*, 178: 160-174.
33. Lynn, K. R., 1990. Chitinases and chitobiases from the american lobster (*Homarus americanus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 96B (4): 761-766.
34. McTigue, T. A., and Zimmerman, R. J., 1991. Carnivory vs. herbivory in juvenile *Penaeus setiferus* (Linnaeus) and *Penaeus aztecus* (Ivès). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 151: 1-16.
35. O'Brien, C. J., 1994. Ontogenetic changes in the diet of juvenile brown tiger prawns *Penaeus esculentus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 112:195-200.
36. Pérez, F. I., 1973. Western atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. *Fishery Bull.*, 67 (3): 461-591.
37. Ringo, R. D., and Zamora, G., 1968. A penaeid postlarval character of taxonomic value. *Bull. Mar. Science*, 18 (2): 471-476.
38. Splindler-Barth, M., Wormhoudt, A. V., and Spindler K.-D., 1990. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle. *Mar. Biol.*, 106: 49-52.
39. Zar, J. H., 1984. *Biostatistical analysis*. 2a. de. Prentice Hall, Englewood, Cliff, New Jersey. 07632: pp 500.

APÉNDICE



Mapa 1. Localización de las zonas de colecta. Estación 1: Boca del Carmen;
 Estación 2: Palizada Vieja; Estación 3: Sonda de Campeche.

pH OPTIMO

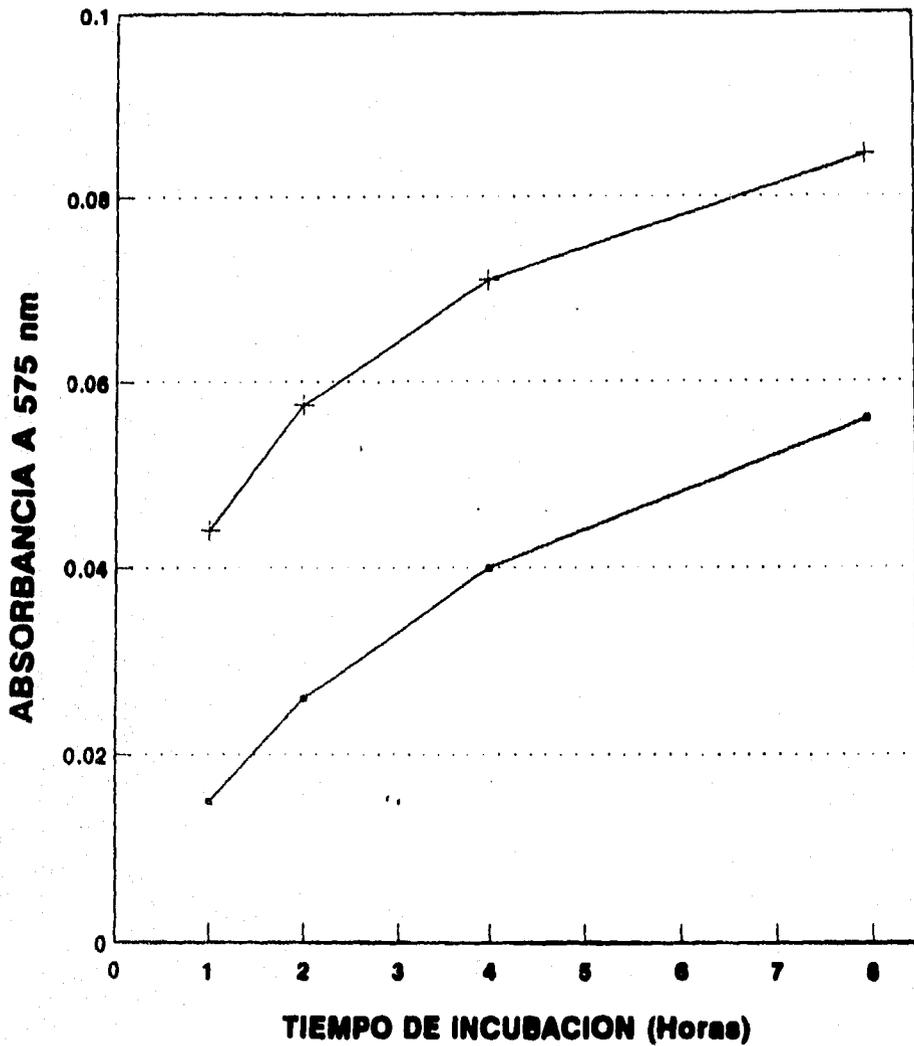


Tiempo de incubación

■ 2 horas ▨ 4 horas

Fig. 4. Efecto del pH sobre la actividad quitinolítica.

TIEMPO OPTIMO DE INCUBACION



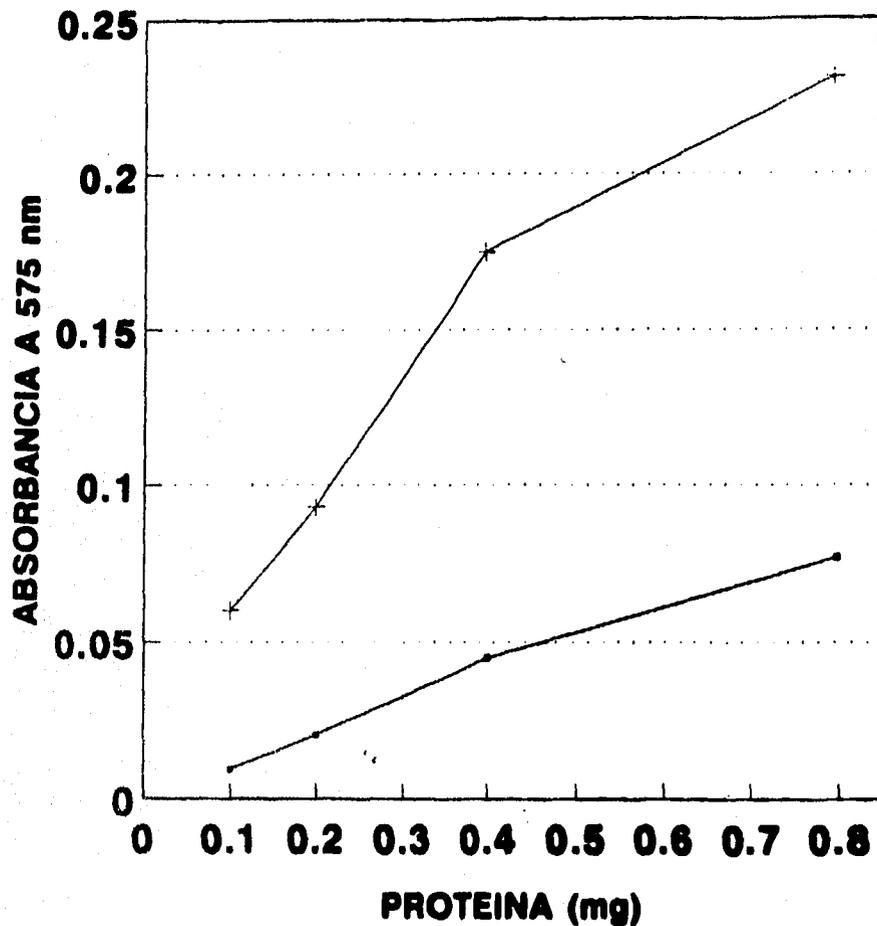
Cantidad de enzima

→ 0.0125 ml + 0.0250 ml

Fig.5 . Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad quitinolítica.

CONCENTRACION DE PROTEINA

Quitinasa comercial



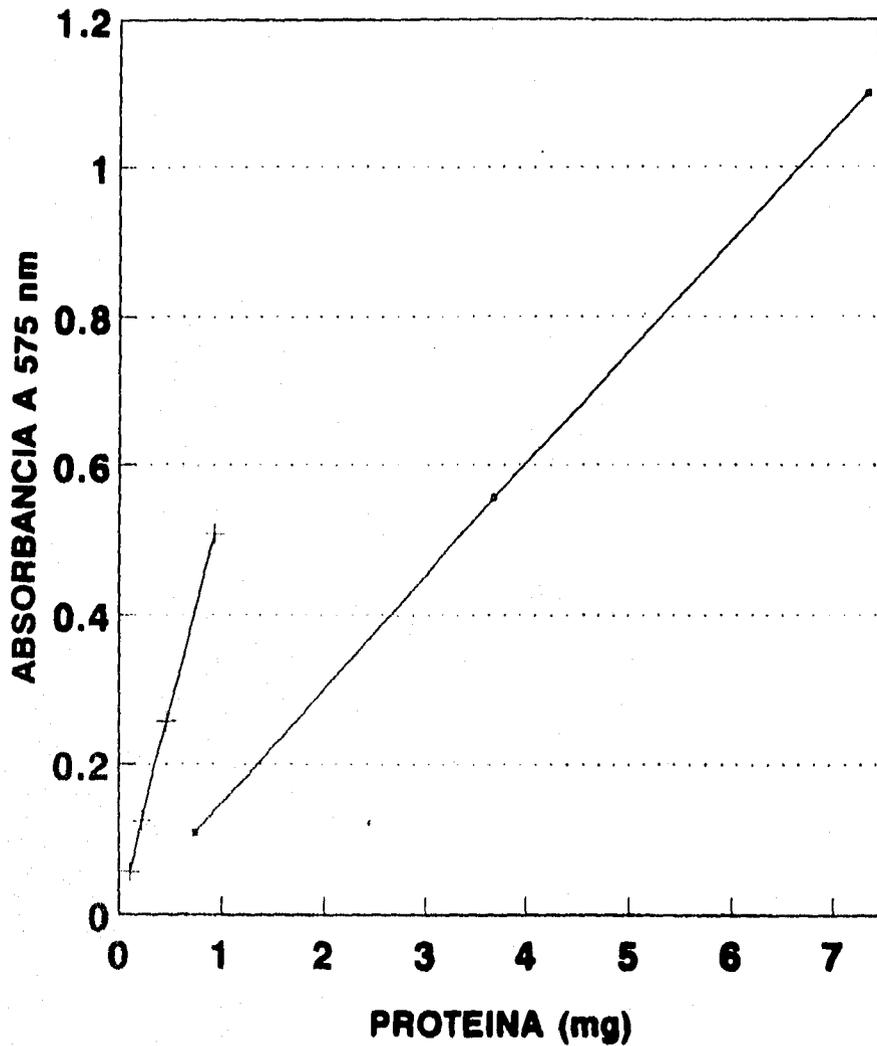
Tiempo de incubación

—•— 2 horas —+— 24 horas

Fig 6. Efecto de la concentración de quitinasa comercial sobre la actividad quitinolítica.

CONCENTRACION DE PROTEINA

Extractos enzimáticos de hepatopáncreas



No. hepatopáncreas

—■— hepatopáncreas 1 + hepatopáncreas 2

Fig. 7. Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad quitinolítica

ACTIVIDAD QUITINOLITICA ESPECIFICA

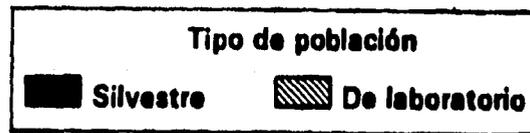
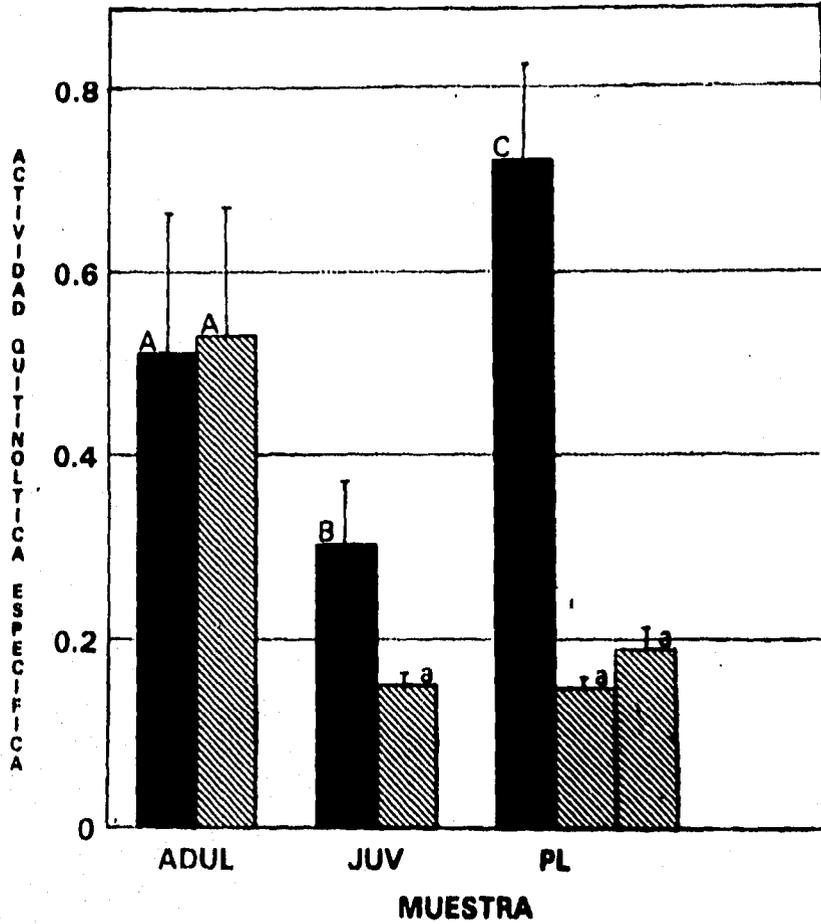


Fig. 8. Actividades específicas promedio de cada tipo de muestra.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).