



2) ABSTRACT

Traditionally shrimp larval culture has been carried out using live feeds. In recent years the industry has begun to complement feeds with artificial diets. However, the efforts to completely substitute live feeds still have not given the desired results. It has been proposed that the amino acid profile present in the body of the organisms could be used as a reference for the nutritional requirements of the animals. For this reason the data obtained on the amino acid profile of different larval stages of *Penaeus vannamei* were used to elaborate a microencapsulated feed produced by a commercial company (diet A), and another microencapsulated feed with a different amino acid profile (diet B). With these two diets, four feeding trials were carried out under controlled laboratory conditions. Furthermore, one treatment using live feed (microalgae and *Artemia sp* nauplii), two treatments using a single dose of live algae (SDLA) followed by artificial diets, and two treatments combining the artificial feeds with live feed were evaluated. Survival with the live feed was in the order of 80% with good growth and larval development. Diets A and B on the other hand displayed mortalities between 80-90% after the second and third day of the experiment. Treatments using SDLA resulted in better survivorship, but only for the first 3 days of the trial, then survivorship decreased to a percentage similar to that found for diets A and B. Finally, the treatments using live feed in combination with the artificial diets, tested in an experiment lasting 5 days, increased survivorship in comparison to the treatments using the artificial diets alone, and the treatments using SDLA, however, survivorship was very low (close to 18%), and development delayed, but without a significant statistical difference ($P < 0.05$). The results obtained with the experimental diets, show that larval growth, survivorship and development is not directly related to the amino acid profile of the diets, but is due to other factors, such as, lack of some essential compounds, or due to the presence of some toxic compounds generated during the storage, or in the manufacture of the microcapsules.



3) INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es de gran importancia actualmente en todo el mundo y en especial para países en vías de desarrollo como lo es México.

Uno de los aspectos principales a desarrollar dentro del cultivo de camarón es el establecimiento de alimentos adecuados, para lo cual se requiere conocer los requerimientos nutricionales de la especie (Akiyama *et al.*, 1993).

Algunos autores han determinado el requerimiento de distintos nutrimentos de algunas de las especies más cultivadas de camarones, mediante estudios con dietas prácticas y purificadas, evaluando el efecto en el crecimiento y tasa de conversión alimenticia, al variar los niveles de inclusión de un ingrediente problema.

El requerimiento de estos nutrimentos ha sido establecido principalmente para juveniles y adultos de camarón, y pocos estudios se han realizado para los estadios larvarios (Watanabe y Kiron, 1994).

La proteína es uno de los ingredientes más importantes a considerar en la alimentación de los animales que son cultivados dentro de la actividad de acuicultura, por el elevado requerimiento que tienen los organismos de este sustrato, y por el costo elevado de incluir en la ración alimenticia ingredientes ricos en proteína.

Con el objeto de hacer óptima la cantidad de proteína a emplear dentro de las dietas, se han venido desarrollando diversos estudios acerca de los aminoácidos que la constituyen, tratando de determinar cuales son más importantes en la alimentación, la cantidad en que deben estar presentes en la proteína a suministrar, así como la capacidad del organismo de digerir la proteína y asimilar los distintos aminoácidos.

Estudios recientes destacan la importancia del balance de los aminoácidos en las dietas utilizadas, ya que se ha visto estos deben encontrarse en el momento justo y en una proporción determinada que permita la síntesis de las proteínas propias del organismo y en consecuencia su crecimiento y salud.

En los peces se ha encontrado alta correlación de la cantidad de aminoácidos del cuerpo mismo de los organismos y el requerimiento que tienen de éstos (Tacon, 1987), esto plantea la posibilidad de estudiar el perfil de aminoácidos del cuerpo del organismo y en base a esto formular dietas con la proteína adecuada.

Establecer el requerimiento de proteína y aminoácidos en base al análisis del cuerpo de los organismos resulta especialmente útil en el caso de los estadios larvarios, ya que los estudios convencionales de los requerimientos nutricionales son difíciles de aplicar en ellos, dado su reducido tamaño.

La alimentación de los camarones peneidos durante sus estadios larvarios se ha llevado a cabo por medio de alimento vivo, con diversas especies de microalgas y con nauplios de *Artemia sp.* (Emmerson, 1980; Alfonso y Leal, 1985; Kuban *et al.*, 1985; Sánchez, 1986; Gallardo *et al.*, 1995), lo cual tiene como problema el requerir espacio dentro de la instalación de producción, un excesivo trabajo en mantener estos cultivos de apoyo y emplear mano de obra altamente calificada.

En el caso de la tecnología de alimentos se han venido desarrollando y perfeccionando métodos que permiten elaborar alimentos microparticulados, caracterizados principalmente por tener un tamaño reducido y mantener la proporción preestablecida de ingredientes en su interior (Kanazawa, 1982).

Se han probado distintas formas de elaboración para mejorar el rendimiento en la producción y las características fisico-químicas de los alimentos microparticulados, como son la estabilidad en el agua, la pérdida de material interno, la aceptación por los

organismos y la capacidad para asimilarlas una vez que son ingeridas (Villamar y Langdon, 1993; López-Alvarado *et al.*, 1994), teniéndose grandes avances en todos estos aspectos; sin embargo, falta aún desarrollar alimentos artificiales con una calidad de formulación tal, que permita sustituir el alimento vivo en su totalidad en la alimentación de larvas de peneidos.

Al conocer el perfil de aminoácidos del cuerpo de las larvas de camarón *P. vannamei*, y proponerse como el patrón indicado para cumplir con el requerimiento de esta especie, será posible formular de manera más precisa, para lograr cultivos larvarios exitosos, basados exclusivamente en una alimentación artificial.

En base a las ideas anteriormente expuestas, el objetivo del presente estudio fue calcular el requerimiento de aminoácidos teórico de larvas de *P. vannamei*, en base a los aminogramas obtenidos en un trabajo anterior (en el trabajo de Cruz-Reyes, 1997), y utilizar estos datos para tratar de optimar un alimento larvario comercial modificando su perfil de aminoácidos mediante la adición de aminoácidos puros. Finalmente, evaluar mediante bioensayos de alimentación, si este tipo de dieta permite cultivos larvarios con mejores resultados que los obtenidos hasta la fecha con dietas artificiales comerciales.

4) ANTECEDENTES

4.1) INICIOS DEL CULTIVO DE LARVAS DE CAMARÓN

En el presente siglo se ha tenido gran interés en el desarrollo de la acuicultura, ya que se ha visto su gran potencial para producir proteína de buena calidad, la cual es cada día más requerida por la creciente población humana, y debido a que se estima que la obtención de recursos por medio de la pesca si se mantienen los niveles actuales de captura, puede llegar a sus límites de explotación en un tiempo no muy lejano.

El dominio en el cultivo de una especie consiste en primer lugar en conocer su ciclo de vida, describiendo los cambios que sufre el organismo, las necesidades ambientales y nutricionales en cada estadio, posteriormente se plantea promover la reproducción y obtener buen crecimiento en el menor tiempo hasta llegar a la talla comercial.

Dentro de los organismos cultivados en la actividad de acuicultura, se ha puesto gran interés en dominar el manejo de las diferentes especies de camarones peneidos, esto debido en gran parte a la elevada demanda y aceptación por parte de los consumidores en todo el mundo, y por resultar un negocio redituable.

Para establecer el cultivo de camarón manipulando el ciclo de vida completo, es necesario lograr el mantenimiento exitoso durante los primeros estadios de su desarrollo. La inducción al desove en camarones peneidos se realizó por primera vez a nivel de laboratorio en el año de 1934 por Hudinaga; además, el primer trabajo que se reporta en donde se describe el desarrollo larvario de un camarón peneido fue realizado por este mismo autor en 1942, donde se detallan los cambios morfológicos que ocurren en el desarrollo de *Penaeus japonicus* (Cruz-Suárez, 1988).

En el caso del camarón blanco *Penaeus vannamei*; especie que se encuentra en la costa occidental de México, los estudios sobre su desarrollo larvario fueron realizados por

Kitani (1986). Este investigador describe los estadios de nauplio y establece las características morfológicas útiles en la identificación de esta especie en sus diferentes subestadios larvarios (ver anexo 1).

El camarón blanco *Penaeus vannamei* ha sido una de las especies más cultivadas en México, debido a sus características de rápida adaptación a las condiciones ambientales de los sistemas de cultivo. El abastecimiento de las larvas a las granjas de engorda se realiza por tres fuentes: a) por la producción en laboratorios nacionales, b) captura del medio silvestre, y c) importación de países con laboratorios certificados (SEPESCA, 1994). Dado que la tendencia es hacia un aumento en la producción de camarón por acuicultura, el abastecimiento de larvas producidas en laboratorios tiende a tomar gran importancia para abastecer la demanda.

4.2) CULTIVOS LARVARIOS CON ALIMENTO VIVO

En los laboratorios comerciales de producción de larvas de camarón desde hace algún tiempo se tienen establecidas rutinas de alimentación mediante alimento vivo, el cual consiste en diversas especies de microalgas y nauplios de *Artemia sp.* El logro de los cultivos larvarios utilizando alimento vivo es producto de la investigación y experiencia mediante la cual se han ido estableciendo el tipo y cantidad de microalgas que dan buenos resultados para determinada especie de camarón. De la gran cantidad de trabajos que se han venido realizando al respecto se puede mencionar a Simon (1978), quien estudia la forma de establecer el cultivo de la diatomea *Chaetoceros gracilis* para ser utilizada en la alimentación de zoeas de *Penaeus stylirostris* y *Penaeus vannamei*, sugiriendo procedimientos simples y económicos para la proliferación de esta microalga. Reporta buenos resultados en sobrevivencia de las larvas de camarón de ambas especies estudiadas y encuentra una concentración óptima de las microalgas de entre 30,000 a 100,000 cel/ml para alimentar las larvas, y reporta como problema ocasional en el mantenimiento de las microalgas, un aumento acelerado de su población, con la subsecuente caída y pérdida de ésta. Posteriormente Emmerson (1980), realizó el cultivo de larvas de *Penaeus indicus*

basado en el suministro de *Thalassiosira weissflogii*, *Brachionus plicatilis* y nauplios de *Artemia sp.*, logra una sobrevivencia promedio del 95.8% de las larvas cultivadas desde nauplio 6 hasta postlarva 1. En el trabajo se discuten los mecanismos de filtración de las larvas y se investiga el efecto del aumento de células de microalgas en el medio sobre los diferentes estadios larvarios, encontrando correlación entre la filtración y crecimiento con la cantidad de alimento vivo presente, y determinando los niveles de saturación, donde un aumento de partículas alimenticias en el agua no promueve mejoría en todos los parámetros evaluados. En 1984 este mismo autor realiza estudios para establecer el momento adecuado en que *Penaeus indicus* aprovecha mejor los rotíferos y la *Artemia sp.* Por otro lado Yúfera *et al.* (1984), establecen que las larvas de *Penaeus kerathurus* se alimentan bien de rotíferos a partir de zoea 2 hasta postlarva 2, mientras que la *Artemia sp.* es bien consumida a partir de misis 2. Se observó que las larvas requieren presas mayores que el rotífero al entrar a postlarva y en ausencia de presas se presenta un elevado canibalismo. Alfonso y Leal (1985) estudian la influencia de algunas especies de algas unicelulares sobre el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de protozoas de camarón rosado *Penaeus notialis*. Las especies de microalgas utilizadas fueron *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis chuii* y *Chlorella kessleri*. Se probaron diferentes concentraciones y combinaciones de estas, encontrando un desarrollo y sobrevivencia elevada (89%) cuando se alimentó con una combinación de *T. chuii* y *C. kessleri*. Por su parte Kuban, *et al.* (1985), realizan el cultivo de larvas de camarón de cuatro diferentes especies, alimentándolas con seis combinaciones de microalgas de diferentes especies, encontrando una respuesta diferente según la especie de camarón y de microalga utilizada. Mientras que en el estudio de Sánchez (1986) de tres especies de microalgas utilizadas en el cultivo larvario, *Isochrysis sp.* dio los mejores resultados con 53% de sobrevivencia. Loya-Javellana (1989) estudia la cantidad óptima de *Tetraselmis sp.* en los cultivos larvarios de *Penaeus monodon*, encontrando una respuesta de saturación al aumentar en exceso la densidad de alimento. Por otro lado Samocha *et al.* (1989) estudian el cultivo de larvas de *Penaeus semisulcatus* mediante nauplios de *Artemia sp.* y rotíferos (*Brachionus plicatilis*), encontrando que la *Artemia sp.* parece ser más ventajosa cuando se realizan cultivos masivos de esta especie de camarón. Recientemente Gallardo *et al.* (1995) proponen un programa de alimentación para el cultivo larvario de

microdietas, las cuales se pueden encontrar como alimentos microparticulados, microligados, microagregados, microcubiertos o microencapsulados, dependiendo principalmente de la relación que existe entre las partículas de los ingredientes que la constituyen, con la matriz que sirve como un aglutinante, cementante o como una cubierta que envuelve por completo las partículas de alimento. En el caso de las dietas microencapsuladas los ingredientes que constituyen la partícula de alimento se encuentran rodeados por completo (encapsulados) por una matriz cuyo fin principal es aumentar su estabilidad en el agua.

4.4) CULTIVOS LARVARIOS CON DIETAS ARTIFICIALES

Kanazawa *et al.* (1982) estudiaron distintos tipos de dietas microparticuladas para el cultivo larvario de *Penaeus japonicus*, donde algunas dietas microencapsuladas con membranas de nylon-proteína y con zeina sostuvieron el crecimiento de las larvas desde zoea 1 hasta postlarva 1. En términos de tasa de sobrevivencia y crecimiento, las dietas de material pulverizado y unidas con zeina dieron los mejores resultados. El valor de la dieta microligada con zeina fue comparable con el desempeño del alimento vivo (*Chaetoceros gracilis* y *Artemia sp.*). El desarrollo alcanzado por las larvas con el alimento microparticulado se llevó a cabo en un lapso de 8 días con una sobrevivencia del 94%. Finalmente en este trabajo se menciona la importancia de los lípidos en obtener una dieta adecuada, ya que se deben incluir en la dieta los ácidos grasos que son esenciales para el organismo y que permiten obtener buenos resultados en la nutrición. Posteriormente Jones *et al.* (1987) realizaron un estudio para evaluar el desempeño de alimentos microencapsulados en el cultivo larvario de tres especies de camarones (*Penaeus monodon*, *P. vannamei* y *P. stylirostris*), en granjas comerciales de Ecuador, Taiwan y Filipinas. Las dietas consistieron en alimentos microencapsulados con una membrana biodegradable diseñada para protegerlas de la degradación bacteriana, pero permitiendo la emisión de sustancias atrayentes. Los autores mencionan que cuando las condiciones de cultivo son adecuadas, con abundante aireación que permita mantener en suspensión a las partículas en el agua, se tienen buenos resultados de desarrollo y sobrevivencia lo que permite sustituir

parcialmente el uso de alimento vivo en los cultivos larvarios. Tiempo después, Kurmaly *et al.* (1989) realizaron un estudio con el objeto de reemplazar parcial o totalmente el alimento vivo en la alimentación larvaria de *Penaeus monodon*, mediante alimentos microparticulados o por la combinación de ambos. Los resultados presentados demuestran, en primera instancia, lo práctico que resulta el establecimiento del cultivo larvario mediante alimentos microencapsulados. Usando partículas alimenticias menores a 20 μm y entre 40-90 μm , a concentraciones entre 20 a 45 $\mu\text{g/ml}$, se mantuvieron los cultivos larvarios desde protozoa 1 hasta postlarva 1, utilizando alimentos microparticulados tanto en presencia o ausencia de alimento vivo. Los autores señalan que la alta sobrevivencia general de las larvas mantenidas en medios combinados de alimento artificial y microalgas requiere mayor investigación, para determinar si esta combinación representa un balance más adecuado en la dieta, una dieta más digerible, o inclusive si las microalgas funcionan como biofiltros removiendo los desechos tóxicos del agua de cultivo. Finalmente señalan que en general los alimentos estudiados fueron capaces de promover un reemplazo razonable del alimento vivo. Por su parte Bautista *et al.* (1989), estudiaron el desempeño de dietas microparticuladas utilizando kapa-carragenina como agente ligante para la alimentación de larvas de *Penaeus monodon*, logrando mantener el cultivo desde zoea 1 hasta postlarva 1 usando cinco tratamientos experimentales que incluían dietas comerciales y alimento vivo. Las larvas alimentadas con la dieta experimental en combinación con alimento natural, el cual consistió de microalgas (*Chaetoceros calcitrans*) y *Artemia sp.*, dieron los mejores resultados de sobrevivencia (69.6%), sin encontrar diferencias significativas al alimentar exclusivamente con alimento vivo, o con el alimento experimental como único alimento. Los autores sugieren la posibilidad de desarrollar alimentos microparticulados con el uso de kapa-carragenina, capaces de sustituir parcial o totalmente el uso de las microalgas tradicionalmente utilizadas. Otros cultivos exitosos donde se alimentó con dietas artificiales son reportados por Jones *et al* (1979) y Teshima y Kanazawa (1983), en los cuales se sugiere la posibilidad de sustituir al alimento vivo en los cultivos larvarios de camarón.

Por otro lado, mientras se han reportado resultados positivos empleando dietas artificiales, se encuentran trabajos recientes que mencionan resultados negativos al tratar de

desarrollar y/o probar dietas artificiales (Elendt, 1990; García y Báez, 1994; Muir y Sutton, 1994) de tal manera que se afectan parámetros del cultivo, como son, la sobrevivencia, tamaño y tiempo de desarrollo de las larvas o calidad de agua, cuando se compara con cultivos larvarios alimentados exclusivamente con alimento vivo (Galgani y Aquacop, 1988; Le Vay *et al.* 1993; Rahman, 1996), por lo que se han seguido desarrollando investigaciones para obtener nuevos tipos de dietas artificiales, es así que Villamar y Langdon (1993) reconocen la importancia en desarrollar alimentos microparticulados con una estabilidad mayor en el agua a la que presentan muchos de ellos, por lo que estos investigadores realizan su trabajo con el fin de desarrollar un nuevo tipo de micropartícula de pared lipídica y un núcleo de ingredientes unidos por un gel de gelatina, a las que llaman microcápsulas complejas. Encuentran una alta estabilidad de las partículas en el agua y con ello demuestran su biodisponibilidad al encontrar que se libera su contenido en el lumen de las larvas estudiadas de camarón (*P. vannamei*). Finalmente sugieren el uso de micropartículas de gran estabilidad, como una herramienta útil en el estudio de los requerimientos en la nutrición de larvas de camarón. Por otro lado López-Alvarado *et al.* (1994) estudian tres diferentes métodos para la elaboración de micropartículas como alimento para larvas de peces marinos, con el objeto de evaluar la retención de aminoácidos agregados en las partículas. Las partículas elaboradas fueron del tipo microligadas, microcubiertas y microencapsuladas, encontrando los mejores resultados con dietas microencapsuladas. La unión de los aminoácidos en dietas microligadas con zeína, carragenina o alginatos dieron resultados pobres, con una pérdida del 80% al 90% de éstos en los primeros minutos de inmersión en el agua. Determinan que la microencapsulación de aminoácidos cristalinos con cápsulas de pared proteínica dan mejores resultados de retención de aminoácidos cristalinos, donde se observa que la retención es de 60%, además se observa que solo algunos aminoácidos son los que se pierden en gran medida, principalmente los de naturaleza hidrosoluble como el ácido aspártico y glutámico y algunos otros como la histidina y alanina. Señalan que el tipo de microencapsulación con una pared lipídica es la que impide de forma más efectiva la pérdida de aminoácidos libres; sin embargo, en el caso de las micropartículas de pared lipídica solo pudieron ser digeridas

en el tubo digestivo de las larvas de pez estudiadas, en organismos de una edad mayor a 40 días y no en las primeras larvas.

Como parte de los esfuerzos por entender las variables que permitan buenos resultados en los cultivos larvarios se han realizado estudios para conocer la importancia que juegan la densidad de siembra de las larvas (Emmerson y Andrews, 1981) y la calidad de agua del sistema de cultivo (Castille, *et al.*, 1981; Ceccaldi y Yagi, 1990; Jian y Chi, 1991; Jackson, 1994; Vinatea y Andreatta, 1997).

4.5) REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LAS LARVAS

El desarrollo de las dietas para los cultivos larvarios ha requerido un mayor conocimiento sobre las necesidades nutricionales de las larvas. Una forma práctica de conocer el requerimiento de un organismo es estudiar la composición química de los alimentos que obtiene en su medio natural o de los alimentos que permiten adecuados resultados en condiciones de cultivo, de esta forma, se tienen desde hace tiempo estudios sobre la composición química de distintas especies de microalgas, como en el trabajo de Parson *et al.* (1961). Algunos autores (Kurmaly *et al.*, 1989; Amjad y Jones, 1992; Le Vay *et al.*, 1993; Kumlu y Jones, 1995 y Boeing y Martínez, 1997) han reportado que la presencia de una pequeña cantidad de microalgas en combinación con las dietas artificiales, es suficiente para mejorar de forma importante los resultados del cultivo. De modo similar Biedenbach *et al.* (1990), obtienen buenos resultados al alimentar larvas de *Penaeus vannamei* mediante el uso de microalgas *Tetraselmis suecica* secadas por aspersion ("Spray-Dried"); sin embargo, estos autores no logran el reemplazo total de las microalgas vivas, por lo que se tiene que ofrecer una pequeña cantidad de algas para incrementar la sobrevivencia, crecimiento y metamorfosis. Estas últimas observaciones han suscitado líneas de investigación para encontrar los compuestos presentes en el alimento vivo que permiten resultados positivos en la alimentación larvaria, así se ha tratado de encontrar el papel que tienen nutrimentos esenciales que podrían estar aportando las microalgas como

pueden ser vitaminas (Rees, 1994; Dall, 1995), o ácidos grasos poliinsaturados (Levine y Sulkin, 1984; Kanazawa *et al.*, 1985; Sorgeloos, 1992; Mourente *et al.*, 1995).

En reportes recientes Jones (1995), menciona que las nuevas generaciones de alimentos artificiales para larvicultura, están tomando en cuenta la adición de vitaminas, como la vitamina C, así como inmunoestimulantes y enzimas para ayudar en la digestión de las dietas artificiales.

Para tratar de conocer los requerimientos de las larvas también se han realizado estudios del desarrollo del tracto digestivo (Lovett y Felder, 1990a) y de la presencia y actividad de enzimas digestivas en los diferentes subestadios de la larva (Lovett y Felder, 1990b; Fang y Lee, 1992; Le Moullac *et al.* 1992; Le Moullac *et al.* 1994; Le Vay *et al.* 1993; Kumlu y Jones, 1995; Rodríguez *et al.*, 1994), con el fin de relacionar el tipo de alimento que requieren las larvas y que pueden digerir en cada estadio. Hay que destacar la importancia que tiene el determinar los requerimientos nutricionales, lo cual es difícil de realizar en las larvas de camarón, dado su reducido tamaño y hábitos alimenticios, lo cual impide se puedan desarrollar los estudios clásicos establecidos en organismos juveniles y adultos.

4.6) REQUERIMIENTOS DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS

Una opción para establecer el requerimiento del animal es conocer el contenido corporal, suponiendo que esta cantidad se aproxima mucho a lo que necesita en su alimentación. Es así que se propone que el estudiar el contenido de aminoácidos del cuerpo de las larvas puede ser una buena guía para mejorar la formulación actual de las dietas artificiales.

En la búsqueda de los requerimientos nutricionales de las larvas de camarón, hasta la fecha se ha dado poca importancia a la calidad de proteína de las dietas y más específicamente al perfil de aminoácidos.

Shewbart y Ludwing (1972), determinan la composición de los aminoácidos esenciales presentes en la proteína del cuerpo de adultos de camarón café *Penaeus aztecus*. Los autores mencionan que los resultados cuantitativos son similares a los encontrados por otros autores y con otras especies estudiadas, señalan que al parecer la proteína de las distintas especies no varía en forma apreciable, por lo que el requerimiento para una de ellas podría ser adecuado para las demás. Por otro lado Chen y Roelants (1992) evaluaron el requerimiento de arginina para juveniles de *Penaeus monodon*, para lo cual utilizan dietas microencapsuladas, donde después de ver en un primer ensayo que la L-arginina cristalina microencapsulada no fue bien utilizada por los organismos, se elaboraron dietas a base de caseína con niveles crecientes de arginina; así el requerimiento de este aminoácido fue determinado por el método de punto de quiebre de la curva, estableciéndolo en 25.0 g/kg de proteína en la dieta. Por otro lado, Fox *et al.* (1995) determinaron el requerimiento dietario de lisina en juveniles de *Penaeus vannamei*, estableciéndolo en 4.7 g/kg de proteína.

No obstante que la composición cuantitativa de aminoácidos esenciales se ha determinado en juveniles y adultos de camarones peneidos, los estudios sobre estos aminoácidos en larvas son muy escasos y solo se habían reportado para el estadio de zoea en *Penaeus japonicus* y en *Penaeus monodon* (Tacon, 1989; Liao y Sheen, 1993). Actualmente se cuenta con un estudio realizado por Cruz-Reyes (1997), en el que determina el contenido de aminoácidos del cuerpo de larvas de *Penaeus vannamei* en diferentes estadios. Tomando como base los resultados de los cromatogramas obtenidos en este estudio es posible proponer un perfil teórico de aminoácidos para ser usado en la fabricación de una dieta artificial, la cual puede ser evaluada en bioensayos de alimentación con esta especie.

Durante el desarrollo larvario del camarón, se presenta una serie de metamorfosis, donde la larva a partir del estadio de huevo se transforman en nauplio (6 subestadios de nauplio), los cuales se alimentan de las reservas de vitelo. Posteriormente la larva aprovechando las reservas del último estadio de nauplio sufre metamorfosis y se genera la

zoea 1 que ya requiere tomar alimento del medio circundante (alimentación exógena). A partir del subestadio de zoea 1, la larva sufre una serie de cambios metamórficos en cada muda que la hacen atravesar por los subestadios de zoea 2 y 3, y misis 1, 2 y 3, antes de llegar al estadio de postlarva, donde el organismo no presenta cambios morfológicos drásticos ya que la forma de su cuerpo es muy similar a la de un organismo adulto. Estas observaciones sobre los cambios morfológicos importantes, además de cambios en los hábitos alimenticios, ya que las zoeas tienden a filtrar microalgas, mientras que las misis comienzan a capturar organismos del zooplancton, motivaron el estudio realizado por Cruz-Reyes (1997), para tratar de conocer la posible variación en el perfil de aminoácidos en los subestadios larvarios de zoeas y misis, dado que durante el desarrollo larvario se observa una dinámica importante en la formación de tejidos y órganos, así como probablemente puede haber variación en la cantidad y tipo de enzimas que se adapten a los cambios en el tipo de alimento, hormonas y demás compuesto, donde los aminoácidos pueden ser parte constitutiva.

Si se tiene una estimación del perfil de aminoácidos presente en el cuerpo de larvas de camarón, resulta de interés elaborar dietas artificiales microencapsuladas que sigan el perfil de aminoácidos encontrado, para evaluar si con este tipo de dietas se obtienen resultados adecuados al realizar el cultivo larvario.

La referencia más cercana donde se reporta el uso del perfil de aminoácidos del cuerpo de larvas para fabricar dietas, es la reportada por Teshima *et al.* (1992), quienes mencionan la escasa información sobre los requerimientos nutricionales de larvas de camarón y reportan el éxito en el cultivo de larvas de camarón *Penaeus japonicus* desde nauplio hasta postlarva sin usar alimento vivo, con dietas cuyos perfiles de aminoácidos fueron formulados para tratar de igualar al encontrado en el cuerpo mismo de las larvas. Así mismo estos autores mencionan que al parecer los lípidos juegan un papel importante en el éxito de las dietas artificiales.



5) OBJETIVOS

5.1) OBJETIVO GENERAL

Evaluar si con una dieta artificial comercial microencapsulada, elaborada con un perfil de aminoácidos similar al perfil corporal del estadio más exigente encontrado en larvas de *Penaeus vannamei*, se obtienen mejores resultados en los cultivos larvarios que con la misma dieta artificial comercial sin que sea modificado su perfil de aminoácidos original.

5.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer un perfil de aminoácidos teórico, como el requerido por las larvas de *Penaeus vannamei*, en base a estudios previos del perfil de aminoácidos del cuerpo de larvas en diferentes estadios.

Establecer la metodología en los bioensayos de alimentación que permita evaluar el desempeño de las dietas artificiales microencapsuladas.

Evaluar el efecto de microcápsulas comerciales fabricadas de manera experimental, formuladas en base al perfil de aminoácidos de las larvas de camarón, en contraste con microcápsulas de diferente formulación, sin modificar el perfil de aminoácidos original y contra alimento vivo.



6) HIPÓTESIS

El cultivo larvario de *P. vannamei* con dietas microencapsuladas con un perfil de aminoácidos similar al encontrado en su cuerpo, permitirá una respuesta más adecuada de crecimiento, sobrevivencia y salud, que los cultivos en los que se empleen dietas microencapsuladas con un perfil de aminoácidos diferente al encontrado en su cuerpo.

7) METODOLOGÍA

7.1) ESTABLECIMIENTO DE LOS REQUERIMIENTOS DE AMINOÁCIDOS

Con el objeto de establecer el requerimiento de aminoácidos esenciales en la alimentación de larvas de camarón blanco *Penaeus vannamei*, y en base a ellos fabricar dietas para realizar bioensayos de alimentación fueron revisados aminogramas de diferentes subestadios de larvas de esta especie, generados en el trabajo de tesis de Cruz-Reyes (1997). Se procesaron los datos para establecer el perfil de aminoácidos propuesto como el requerimiento de las larvas, como se describe a continuación:

De todos los aminogramas disponibles, no se tomaron en cuenta los realizados en los estadios de huevo y nauplio dado que en estos estadios no existe la alimentación exógena, por lo tanto sus perfiles de aminoácidos no se tomarían en cuenta para fabricar dietas, trabajando entonces con los cromatogramas correspondientes a los estadios de zoea, mysis y postlarva. De estos aminogramas fueron eliminados aquellos que mostraban algún problema de saturación de la señal, se verificó el peso molecular de los aminoácidos y se revisó que la asignación de los picos de acuerdo a su tiempo de retención fuera correcta; así mismo, se revisó que no existieran omisiones o errores en las plantillas de cálculo y/o en los cálculos realizados, obteniéndose así la base de datos.

En el caso de los aminoácidos esenciales en que no fue posible obtener valores analíticos (Arg, Thr y Lys) se procedió a hacer una estimación teórica de sus valores de la forma que se menciona a continuación: para calcular el porcentaje de arginina se multiplicó el dato obtenido como el valor de los aminoácidos arginina y treonina sumado (en los cromatogramas estos dos aminoácidos formaban un solo pico) por el factor 0.6730, y para obtener los valores de treonina por el factor 0.3269. Estos factores se obtuvieron como el promedio de valores publicados por Akiyama (1991) y por Fox (1996) y de la relación en porcentaje que existe entre estos dos aminoácidos. En cuanto a la lisina, su valor se estimó

al establecer la relación entre la sumatoria de los aminoácidos determinados que publica este último autor con la lisina, y la suma de estos mismos aminoácidos encontrados en nuestro análisis en relación a la incógnita que se trataba de la lisina.

Como un paso previo para establecer los valores del requerimiento, fueron transformados los datos anteriores para llevarlos al cien por ciento de aminoácidos esenciales más tirosina, considerando la sumatoria como el cien por ciento y aplicando reglas de tres para determinar qué porcentaje le correspondía a cada aminoácido.

Finalmente para determinar el requerimiento de aminoácidos esenciales, se multiplicaron los datos anteriores por el factor 0.35 ya que en la publicación de Tacon (1989), se establece que del cien por ciento de la proteína contenida en el cuerpo de los camarones el 35% corresponde a los aminoácidos esenciales, más tirosina y cistina.

Una vez obtenido el perfil de requerimiento de aminoácidos esenciales de cada estadio se procedió a seleccionar aquel que mostrara un requerimiento más exigente de aminoácidos, suponiendo que si se cumplían los requerimientos del estadio más exigente, con mayor razón se cumplirían los requerimientos de cualquier otro cuyas necesidades de aminoácidos quedarían ya cubiertas. Se procedió a fabricar las dietas como se menciona a continuación.

7.2) DIETAS EXPERIMENTALES

7.2.1) FABRICACIÓN DE LAS DIETAS

Con el fin de eliminar errores de tipo tecnológico en la fabricación de microcápsulas, se solicitó a una compañía comercial, reconocida a nivel mundial por la calidad de sus alimentos larvarios, su apoyo para la fabricación de las dietas experimentales. Las dietas fueron elaboradas por la compañía a escala experimental, pero

aplicando la misma tecnología de los lotes comerciales. Una de las dietas experimentales se elaboró con la formulación que se sigue en los lotes comerciales (dieta B), mientras que la otra dieta (dieta A) se fabricó modificando el perfil teórico original de aminoácidos mediante la adición de los aminoácidos esenciales en los que se detectaron deficiencias, agregándolos en forma cristalina pura, para tratar de igualar el perfil al del estadio larvario evaluado previamente. Ambas dietas experimentales fueron elaboradas con un tamaño de las microcápsulas de entre 5 a 30 micras, que es el tamaño que maneja la compañía comercial para la alimentación de los subestadios tempranos del desarrollo. Por tratarse de una compañía comercial no es posible detallar nada acerca de los ingredientes, tecnología y equipo utilizados.

Las dietas fueron elaboradas el mes de Agosto de 1997, enviadas y recibidas a principios del mes siguiente. Una vez recibidas las dietas se mantuvieron refrigeradas (4°C) y libres de humedad, colocándolas dentro de bolsas de plástico y botes de sellado hermético.

7.2.2) ANÁLISIS DE LAS DIETAS

Se realizó la determinación del perfil de aminoácidos de las dietas A y B por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), el cual se realizó con el apoyo de un centro de investigación mediante la metodología y equipo establecidos en este lugar (equipo Hewlett Packard 1050, columna C-18 marca Waters de 150 x 4.6 mm, hidrólisis a 112-116 °C de 20 a 24 hrs en Pico-tag al vacío con HCl 6 N + 0.5% de fenol, derivatización precolumna con fenilisotiocianato y detector de UV a 250 nm) así como el análisis químico proximal de las mismas según las técnicas establecidas por la A.O.A.C. (1990).

Se realizó la comparación entre el perfil teórico de requerimiento de aminoácidos esenciales obtenido en la primera etapa de la investigación, contra los perfiles de aminoácidos de las dietas experimentales (dietas A y B) obtenidos analíticamente, para lo

cual los valores a comparar fueron transformados a las mismas unidades, de la forma que se menciona a continuación: el perfil del requerimiento teórico se obtuvo en porcentaje de aminoácidos esenciales del cien por ciento de la proteína; es decir en g/100 g de proteína, por lo tanto para llevar los valores obtenidos del análisis de aminoácidos de las dietas (obtenidos en g/100 g de dieta seca) a estas mismas unidades, se consideró el porcentaje de proteína encontrado en cada dieta (55% en ambas) y mediante reglas de tres se transformaron estos valores a g/ 100 g de proteína.

Fueron obtenidas imágenes al microscopio electrónico de barrido de las dietas microencapsuladas (dietas A y B), colocando pequeñas muestras sobre cilindros de aluminio (1cm de diámetro x 1cm de altura aprox.) a los cuales se les colocó previamente una película adhesiva con el objeto de retener las muestras. Las dietas adheridas en los cilindros fueron recubiertas con una capa de oro mediante un "Ion - sputter" (recubridor ionico) marca Balzers. Se utilizó un microscopio ISI Mini-Sem-5. Las fotografías se tomaron de imágenes aumentadas 700, 1000 y 1400 veces.

7.3) BIOENSAYOS DE ALIMENTACIÓN

Con las dietas obtenidas se realizaron 4 bioensayos de alimentación con larvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) bajo condiciones controladas. La metodología está basada en el uso de matraces redondos (capacidad de 2 lts), donde se colocan 100 larvas por litro y se regulan los parámetros ambientales mediante equipo de laboratorio (lo cual se detalla más adelante).

Se fueron haciendo algunas modificaciones en los tratamientos aplicados en los diferentes experimentos para tratar de evaluar las dietas microencapsuladas experimentales; es decir, que al terminar un bioensayo se analizaron los resultados y en base a esto se realizaron modificaciones a los diseños experimentales aplicados en el siguiente bioensayo;

sin embargo, existieron condiciones generales aplicadas en todos los bioensayos, las cuales se mencionan a continuación:

El origen de los reproductores utilizados para obtener los nauplios de camarón fue de animales reproducidos en granja. Los laboratorios comerciales que donaron los nauplios, se localizan en los estados de Nayarit, Sinaloa y Baja California Sur.

El transporte de los nauplios se realizó en bolsas de plástico (60 x 90 cm aprox.) con un tercio de agua marina y dos tercios de oxígeno. Las bolsas fueron cerradas mediante ligas gruesas y colocadas dentro de cajas de unicel, donde se colocó también una bolsa pequeña (20 x 25 cm aprox.) con hielo para disminuir ligeramente la temperatura (de 28-30° C a 24-26° C aprox.) y reducir el metabolismo de los organismos. Las cajas fueron selladas con cinta adhesiva.

Al llegar al laboratorio se hicieron observaciones de los nauplios al microscopio para determinar su estadio de desarrollo, observar su movilidad, la posible presencia de material extraño (protozoos, restos de alimento, etc.) y posibles deformidades. Se procedió a aclimatar los nauplios hasta la temperatura en que serían mantenidos en los cultivos (28° C).

Cuando los organismos se encontraban ya entre los estadios de nauplio 3 y nauplio 4 se realizó el conteo mediante pipetas y contadores manuales. Se colocaron 150 nauplios de camarón en frascos esféricos de vidrio con capacidad de 2 lts, los cuales contenían 1.5 lts de agua marina con una salinidad de 35 ppt, filtrada a través de un filtro de cartucho de malla de 5 μm .

Se suministró aireación a cada frasco mediante una manguera de plástico con una llave de paso para regular el flujo de aire y un tubo de cristal en la punta (en el extremo que llegaba a los frascos) de 17 cm de largo y 2.5 mm de diámetro interior aprox. Se ajustó el flujo de aire para que promoviera un movimiento adecuado de las partículas dentro del

frasco (de 120 a 180 burbujas por minuto aprox.), pero sin ser excesivo que impidiera la toma del alimento por parte de las larvas.

Los frascos fueron colocados sobre bases individuales de plástico (PVC), sumergiéndolos hasta una tercera parte de su superficie, dentro de una tina a manera de baño maría con agua dulce recirculante y mantenida a una temperatura constante de 28° C, mediante un calentador de titanio y un sistema automatizado de control de temperatura (ver figuras 1 y 2). Se aplicó un fotoperiodo de 12 hrs de luz, de las 8:00 a las 20:00 hrs.

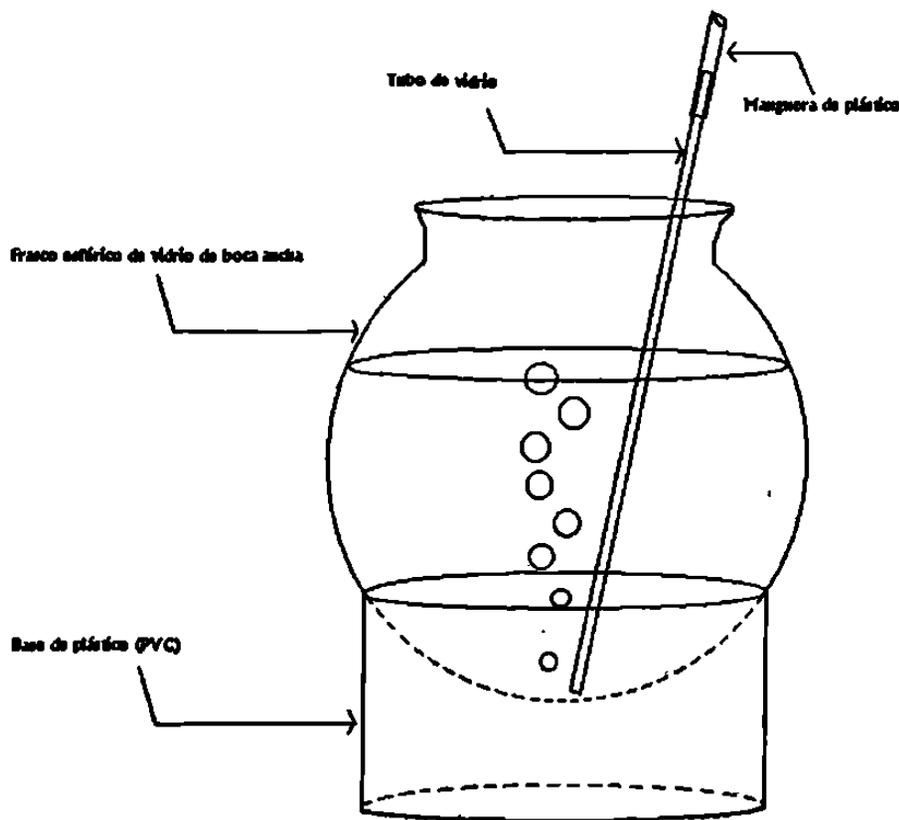


Figura 1.- Frasco de vidrio con capacidad aproximada de dos litros en el cual fueron colocados 150 nauplios de *Penaeus vannamei*. Cada uno de estos recipientes funcionó como unidad experimental.

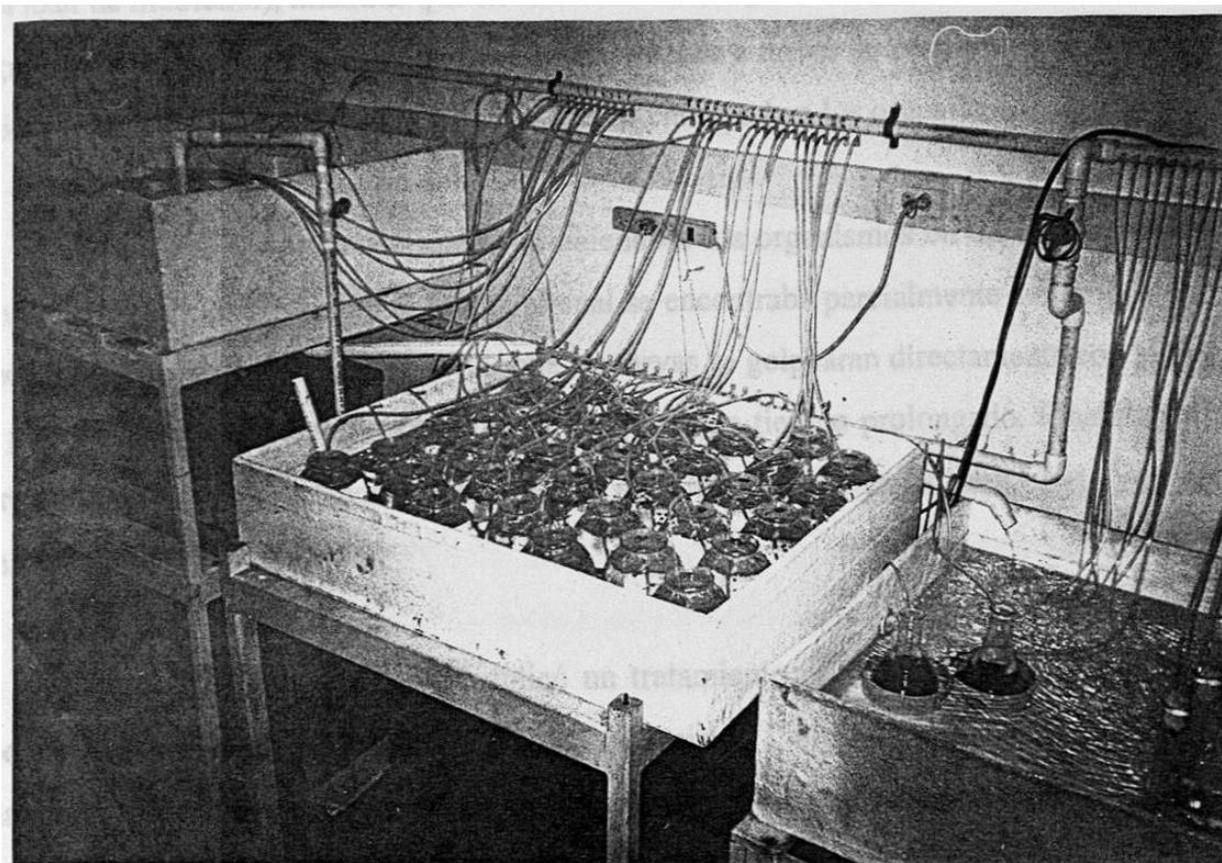


Figura 2.- Sistema utilizado para los bioensayos de alimentación larvaria. La tina que se observa en la parte central, cuenta con un sistema de recirculación de agua dulce, un calentador y un termostato para mantener la temperatura a 28 °C. En el interior de la tina se colocaron frascos esféricos de 2 lts de capacidad. Cada frasco cuenta con una manguera de aireación, una llave para regular el aire y un tubo de cristal en la punta para proporcionar aireación desde el fondo.

Se realizaron 6 replicados de cada tratamiento, los cuales fueron distribuidos al azar dentro de la tina.

En el primer bioensayo se realizó un seguimiento cada dos días de la calidad del agua en cuanto a pH (potenciómetro Orion mod. 720A), nitritos y amonio (determinados por métodos colorimétricos: nitritos por la reacción de Griess y amonio por cuantificación del azul de indofenol), mientras que en los otros bioensayos se implementaron recambios de agua del 100% utilizando agua marina aireada, filtrada a través de un filtro de cartucho de 5 micras a una temperatura igual al agua en que se encontraban los organismos.

El recambio de agua se realizó reteniendo a los organismos en un cilindro plástico con una malla planctónica en el fondo, el cual se encontraba parcialmente sumergido en un recipiente con agua marina para evitar que las larvas se golpearan directamente con la malla y para evitar que quedaran expuestas sin agua por un tiempo prolongado. Finalmente los organismos fueron regresados al frasco con agua limpia, utilizando una piseta con agua marina.

En todos los bioensayos se aplicó un tratamiento de alimento vivo; como testigo positivo, el cual siempre se identificó como tratamiento I, el cual consistió en microalgas y nauplios de *Artemia sp.* Las especies de microalgas utilizadas fueron *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana*, en una proporción de 70:30 respectivamente, manteniendo una cantidad de 100,000 cel/ml. Las microalgas fueron suministradas desde el último estadio naupliar, hasta el final de los bioensayos (de nauplio 6 hasta postlarva 1). La cantidad de microalgas se mantuvo mediante conteos diarios en cámara de Neubauer y reponiendo la cantidad perdida por mililitro una vez al día después de la medición. Los nauplios de *Artemia sp.* se suministraron a partir de M1, ofreciendo una cantidad de entre 0.5 a 3 nauplio de *Artemia sp.*/ml/día, es decir entre 75 a 450 nauplios de *Artemia sp.* diarios según se verificaba que hubieran sido consumidos al hacer observaciones periódicas a lo largo del día. La cantidad de nauplios de *Artemia sp.* suministrada en cada frasco se estableció después de calcular el promedio de nauplios por mililitro en un recipiente con una cantidad concentrada de estos organismos que fueron obtenidos de muestras homogénea, las cuales fueron tomadas con la ayuda de una pipeta. Finalmente se realizó el cálculo de la cantidad en mililitros que era necesario agregar para reponer los nauplios consumidos.

El proceso de alimentación con las dietas artificiales consistió en pesar la cantidad de dieta requerida en una balanza de precisión (marca AND, mod ER-182A, precisión de 0.01mg) justo en el momento antes de alimentar, agitar abundantemente hasta lograr una suspensión de las partículas de alimento en una cantidad previamente determinada de agua destilada (en los primeros dos bioensayos), o en agua marina filtrada a través de malla de 5 μ m (en los dos últimos bioensayos). Con una micropipeta automática se aplicó la cantidad calculada de mililitros de dicha suspensión. Ambas dietas fueron ofrecidas en una cantidad de 4 mg/lt/día, distribuido en cuatro raciones diarias a las 8:00, 12:00, 16:00 y 20:00 hrs.

A partir del experimento 2 se aplicó un tratamiento de dosis única inicial de microalgas (DUIMA), la cual consistió en aplicar en la primera alimentación, una cantidad pequeña de microalgas (25,000 ó 50,000 cel/ml), y posteriormente continuar la alimentación en estos tratamientos exclusivamente con alimento artificial. A partir del experimento 3 se aplicaron tratamientos combinando alimento vivo con las dietas artificiales.

Fueron evaluadas la sobrevivencia, desarrollo (grado de metamorfosis), longitud y peso seco de las larvas sometidas a los diferentes tratamientos, además de observaciones respecto a la apariencia de salud de los animales, presencia de hilos de heces fecales o posibles malformaciones en el desarrollo.

La sobrevivencia se estimó haciendo observaciones periódicas de los frascos, contando el número aproximado de larvas nadando, observadas al levantar y sostener los frascos (esto cuando la cantidad de larvas en los frascos era pequeña). Otra forma de estimar la sobrevivencia fue contar a todos los sobrevivientes al final del experimento, filtrando y concentrando el agua de cada frasco y contando a los organismos mediante pipetas Pasteur y contadores manuales.

El grado de desarrollo o metamorfosis se evaluó haciendo observaciones diarias de los frascos levantándolos para detectar algún cambio aparente en el tamaño de las larvas, en su comportamiento y forma de nadar, para después corroborar tomando muestras y observándolas al microscopio óptico. Las larvas fueron manipuladas mediante pipetas Pasteur, evitando cambios bruscos de salinidad y temperatura, y regresando las larvas a los frascos después de un análisis rápido (de 3 a 6 minutos para toda la muestra aprox.). El cambio de un estadio a otro se consideró cuando más del 80% de las larvas había pasado al siguiente estadio.

La determinación de la longitud se llevó a cabo de la siguiente manera: se utilizó un ocular con reglilla, se estableció la equivalencia en determinado aumento de sus divisiones contra una longitud conocida observada en la reglilla del porta objetos, de esta forma se obtuvo un factor (en este caso fue de 23.5) por el cual había que multiplicar el número de divisiones observadas bajo el mismo aumento para cubrir la distancia a medir en la larva. Los organismos se midieron al final de los bioensayos, después de ser sacrificados (fijados en medio Davidson o por enfriamiento a 4° C de 10 a 20 minutos aprox.), tomando muestras representativas de los frascos con altas sobrevivencias o midiendo todos los organismos cuando se trataba de frascos con bajas sobrevivencias.

El peso seco promedio individual se midió de la forma siguiente: al final de los bioensayos se tomaron con la ayuda de pinzas entomológicas una a una de 5 a 10 larvas, se enjuagaron perfectamente en agua destilada para eliminar las sales y material adherido al cuerpo y se colocaron dentro de pequeñas charolas de aluminio previamente puestas a peso constante (0.5 cm de diámetro X 0.5 cm de alto). Para facilitar la colocación de las larvas, previamente se colocó una pequeña gota de agua destilada en el centro de las charolas. Posteriormente se colocaron en una estufa a 105° C por 24 hrs y después de permitir su enfriamiento hasta temperatura ambiente se tomó el peso. Para conocer el peso seco individual se restó el peso de la charola y el resultado se dividió entre el número de larvas colocadas en cada charola.

A continuación se describen los tratamientos aplicados en cada uno de los cuatro bioensayos realizados:

Bioensayo 1

Tabla 1 .- Diseño experimental aplicado en el primer bioensayo.

Tratamiento	Tipo de alimentación	Descripción.
I	Alimento vivo.	100,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente. 0.5 a 3 nauplios de <i>Artemia sp.</i> /ml/día, a partir de M1.
II	Dieta A	4 mg/lt/día (dividido en 4 raciones).
III	Dieta B	4 mg/ lt/día (dividido en 4 raciones).

Bioensayo 2

Tabla 2 .- Diseño experimental aplicado en el segundo bioensayo.

Tratamiento	Tipo de alimentación	Descripción
I	Alimento vivo	100,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente. 0.5 a 2 nauplios de <i>Artemia sp.</i> /ml/día, a partir de M1.
II	Dieta A	4 mg/lt/día (dividido en 4 raciones).
III	Dieta B	4 mg/t/día (dividido en 4 raciones).
IV	Dieta A + DUIMA	4 mg/lt/día + 25,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente, en una dosis única.
V	Dieta B + DUIMA	4 mg/lt/día + 25,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente, en una dosis única.

DUIMA = Dosis única inicial de microalgas.

Bioensayo 3

Tabla 3 .- Diseño experimental aplicado en el tercer bioensayo.

Tratamiento	Tipo de alimentación	Descripción
I	Alimento vivo	100,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente. 0.5 a 2 nauplios de <i>Artemia sp.</i> /ml/día, a partir de M1.
II	Dieta A + DUIMA	4 mg/lt/día + 25,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente, en una dosis única.
III	Dieta B + DUIMA	4 mg/lt/día + 25,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente, en una dosis única.
IV	Dieta A + Alimento vivo	4 mg/lt/día + 100,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente, durante todo el experimento.
V	Dieta B + Alimento vivo	4 mg/lt/día + 100,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente, durante todo el experimento.

Bioensayo 4

Tabla 4 .- Diseño experimental aplicado en el cuarto bioensayo.

Tratamiento	Tipo de alimentación	Descripción
I	Alimento vivo	100,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente. 0.5 a 2 nauplios de <i>Artemia sp.</i> /ml/día, a partir de M1.
II	Dieta A + DUIMA	4 mg/lt/día + 100,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente, en una dosis única.
III	Dieta B + DUIMA	4 mg/lt/día + 100,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente, en una dosis única.
IV	Dieta A + Alimento vivo	4 mg/lt/día + 50,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente durante todo el experimento.
V	Dieta B + Alimento vivo	4 mg/lt/día + 50,000 cel/ml de <i>Chaetoceros sp.</i> e <i>Isochrysis sp.</i> , en proporción 70 : 30 respectivamente durante todo el experimento.

Se detuvo el experimento cuando los organismos del tratamiento I llegaron a zoea 3. Se realizaron recambios de agua cada dos días del 100%.

7.4) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos obtenidos en cuanto a sobrevivencia, longitud y peso de las larvas en los bioensayos con resultados que así lo permitieron, se realizaron análisis de ANOVAs de una vía, pruebas de "t" y comparación múltiple de medias de Tukey.

8) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1) ESTABLECIMIENTO DE LOS REQUERIMIENTOS DE AMINOÁCIDOS

De los cromatogramas disponibles acerca del perfil de aminoácidos de diferentes estadios de larvas de *Penaeus vannamei* se obtuvo la siguiente base de datos (tabla 5).

Tabla 5.- Análisis del perfil de aminoácidos de subestadios larvarios de camarón *Penaeus vannamei* (en porcentaje de aminoácidos analizados).

Estad.	Asp	Glu	Ser	His	Gly	Arg Thr	Ala	Tyr	Met	Val	Trp	Phe	Ile	Leu
Z	10.2	14.3	8.82	4.41	5.88	10.3	9.69	2.94	4.44	8.79	1.04	4.21	6.05	8.81
Z	9.64	13.9	8.63	4.68	5.97	9.79	9.43	3.00	4.91	8.91	1.60	4.25	6.01	9.32
Z	8.98	15.3	8.00	4.32	5.18	10.7	10.3	2.97	4.52	8.64	1.71	4.54	5.86	9.02
Z	9.68	14.6	8.46	4.45	5.88	10.3	9.62	3.10	4.93	8.07	1.62	4.27	5.42	9.62
med	9.63	14.5	8.48	4.47	5.73	10.3	9.75	3.00	4.70	8.60	1.50	4.32	5.83	9.20
D.E.	0.49	0.59	0.35	0.15	0.37	0.37	0.38	0.07	0.26	0.37	0.30	0.15	0.28	0.35
C.V.	5.19	4.07	4.14	3.43	6.41	3.62	3.86	2.31	5.45	4.32	20.5	3.48	4.95	3.85
M	11.3	16.1	5.97	3.94	5.54	13.6	8.46	2.58	6.22	7.40	1.86	3.73	5.05	8.23
M	9.35	11.8	9.73	4.52	7.05	11.2	8.92	2.84	8.39	7.87	2.29	3.82	4.62	7.48
M	10.4	15.7	6.60	4.13	6.37	13.2	8.53	2.49	6.24	7.13	3.15	3.52	4.60	7.98
M	10.1	14.0	7.51	3.98	9.35	9.93	8.71	2.14	4.02	7.72	3.56	4.10	5.45	9.42
M	11.5	16.1	6.44	4.21	6.17	12.8	7.40	2.59	4.76	6.66	1.33	4.27	5.78	9.96
M	9.41	13.0	8.27	3.84	8.43	13.2	8.59	2.28	9.15	6.91	1.80	3.37	4.45	7.31
M	10.3	13.6	8.27	4.74	6.63	9.45	7.84	2.62	5.17	10.1	2.43	4.23	5.76	8.95
M	9.82	13.2	7.73	4.58	6.82	13.2	8.54	2.57	5.59	7.05	2.39	4.17	5.64	8.65
med	10.3	14.2	7.56	4.24	7.04	12.1	8.37	2.51	6.20	7.60	2.35	3.90	5.17	8.50
D.E.	0.79	1.61	1.22	0.33	1.25	1.64	0.50	0.21	1.76	1.09	0.73	0.34	0.56	0.93
C.V.	7.70	11.3	16.2	7.84	17.7	13.6	5.97	8.60	28.5	14.3	30.9	8.77	10.8	10.9
PL	9.23	13.5	10.0	3.96	8.33	10.9	8.93	2.38	5.13	6.72	2.18	3.76	5.98	9.05
PL	9.26	14.4	6.31	4.72	9.32	10.4	9.61	2.97	5.53	6.50	1.33	3.95	5.19	10.5
PL	9.68	13.5	7.76	4.90	5.48	8.92	8.71	2.90	8.62	7.82	1.48	4.30	6.02	9.87
PL	10.5	15.7	6.87	4.10	6.03	12.8	8.11	2.32	6.11	8.15	1.19	3.59	5.67	8.94
PL	10.8	17.4	5.82	4.13	5.01	14.3	7.99	2.57	4.76	6.95	1.19	3.75	6.03	9.32
PL	9.81	16.0	5.81	4.32	4.63	11.5	8.31	3.01	5.99	7.96	1.43	4.55	6.35	10.3
PL	10.1	14.4	6.62	4.21	5.09	9.88	8.40	2.78	7.41	9.30	1.35	4.47	6.54	9.42
PL	10.4	16.0	6.18	5.60	5.21	10.5	8.32	2.84	6.26	7.82	1.58	4.37	5.56	9.33
med	9.98	15.1	6.92	4.50	6.14	11.1	8.54	2.72	6.22	7.65	1.47	4.10	5.91	9.60
D.E.	0.58	1.38	1.40	0.55	1.73	1.71	0.52	0.26	1.25	0.91	0.32	0.37	0.43	0.57
C.V.	5.79	9.15	20.2	12.3	28.1	15.4	6.15	9.78	20.1	11.9	21.6	9.11	7.33	5.97

Estad. = Estadio larvario. Z = Zoea. M = Misis. PL = Postlarva.

med = Valor promedio. D.E. = Desviación estándar. C.V. = Coeficiente de variación (%).

Como se mencionó en la metodología, no se tomaron en cuenta los aminogramas de los estadios de huevo y nauplio para estudiar su perfil de aminoácidos, sino únicamente los aminogramas obtenidos de los estadios de zoea y misis para proponer un perfil de requerimiento, este hecho requiere ser discutido, puesto que es posible argumentar que el perfil de aminoácidos de los diferentes subestadios (zoea 1, 2 y 3 y misis 1, 2 y 3) presente variaciones según las condiciones y el tipo de alimento que reciban las larvas antes de ser analizadas, lo cual limitaría la posibilidad para poder asegurar que el perfil encontrado dentro de su cuerpo sea el que hay que proporcionar en cultivos larvarios que se realizaran posteriormente; sin embargo, si el muestreo de los diferentes subestadios se desarrolla de forma adecuada, donde se tomen muestras representativas de diferentes cultivos larvarios (de preferencia en diferente lugar y tiempo) y solo de cultivos larvarios con resultados adecuados (sobrevivencia, crecimiento y salud de las larvas adecuados), permitiría obtener valores promedio característicos de la especie con una variación estimada. El muestreo realizado por Cruz-Reyes (1997) cumplió con haberse hecho de diferentes cultivos larvarios de resultados adecuados; sin embargo, este muestreo se realizó en el mismo laboratorio y con poca diferencia de tiempo, por lo tanto es recomendable complementar estos datos con nuevos muestreos. Además cabe señalar que bibliográficamente no está demostrado que la composición aminoacídica del alimento afecte la composición proteínica corporal. Esto contrasta con lo reportado para el caso de los lípidos dietarios, donde se ha observado que el perfil de ácidos grasos del alimento modifica la composición corporal de manera significativa. Por otro lado, hay que mencionar que si bien se puede cuestionar la posibilidad de variación en el perfil de aminoácidos de las larvas de camarón en los diferentes subestadios según las condiciones del cultivo y el alimento que consumen, y por lo tanto se propusiera seguir el perfil del huevo o nauplio, también se debe considerar la posibilidad de variación en el perfil químico de éstos, lo cual estaría dado en este caso por la alimentación que recibieron los reproductores y por el desgaste que tiene la hembra, ya que se ha visto una disminución en la calidad de los huevos en los últimos desoves que tiene la hembra, donde se ha demostrado una disminución en la viabilidad de la progenie (Palacios *et al.*, 1998), por lo tanto para obtener datos confiables nuevamente se deben

hacer correcciones de acuerdo al muestreo. Finalmente hay que mencionar que se recomienda hacer el estudio del perfil de aminoácidos de los huevos y nauplios ya que van a proporcionar información útil al comparar si existe variación entre su perfil de aminoácidos y el perfil de los estadios larvarios de alimentación exógena (zoea y misis).

Después de realizar las consideraciones anteriores se procede a mostrar los resultados obtenidos para establecer el perfil de aminoácidos de las larvas.

Se observa en la tabla 5, que los valores obtenidos para los diferentes aminoácidos encontrados en este análisis presentaron una variación pequeña para la mayoría de los casos, ya que en la mayoría el coeficiente de variación (C.V.), se reporta en valores inferiores o cercanos al 10% lo que habla de una confiabilidad en los datos, ya que las repeticiones se comportan de forma reproducible; sin embargo, existen algunos aminoácidos que presentaron un coeficiente de variación mayor al 20%. Para tratar de corregir este problema se podrían hacer más repeticiones y seleccionar para el análisis solo aquellas que cumplan con tener un coeficiente de variación lo más bajo posible.

Usando el paquete estadístico SPSS se realizaron análisis de ANOVAs de una vía y pruebas de Tukey, para comparar los datos entre los estadios larvarios, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 .- Contenido promedio de aminoácidos en los estadios zoea, misis y postlarva del camarón *Penaeus vannamei* (en porcentaje de aminoácidos analizados). Se indica la probabilidad obtenida mediante ANOVA de una vía y los aminoácidos donde hubo diferencias significativas (Tukey).

AA	Zoea	Misis	Postlarva ^{cc}	P
Asp	9.63	10.27	9.98	0.3109
Glu	14.51	14.20	15.10	0.4328
Ser	8.48	7.56	6.92	0.1336
His	4.47	4.24	4.50	0.4623
Gly	5.73	7.04	6.14	0.2508
Arg Thr	10.28	12.07	11.15	0.1766
Ala	9.75 ^a	8.40 ^b	8.54 ^b	0.0007
Tyr	3.00 ^a	2.51 ^b	2.72 ^{ab}	0.0074
Met	4.70	6.20	6.22	0.1836
Val	8.60	7.60	7.65	0.1928
Trp	1.50 ^a	2.35 ^b	1.47 ^a	0.0073
Phe	4.32	3.90	4.10	0.1399
Ile	5.83 ^{ab}	5.17 ^a	5.91 ^b	0.0129
Leu	9.20	8.50	9.60	0.1226

P = probabilidad.

Literales diferentes indican diferencia estadística a una probabilidad ($P < 0.05$).

En la tabla 6, donde se comparan los valores promedio de los diferentes aminoácidos se pueden detectar los aminoácidos que son diferentes en cada estadio analizado (Ala, Tyr, Trp e Ile), de estos cuatro aminoácidos Ala, Tyr e Ile se requieren en mayor cantidad en el estadio de zoea que en el estadio de misis, es decir que el estadio de zoea parece ser más exigente en los aminoácidos en que se encontraron diferencias, por eso se decidió tomar este perfil como base para elaborar la dieta experimental A.

Mediante la técnica utilizada para obtener los cromatogramas analizados no fue posible separar los picos de la arginina (Arg) y la treonina (Thr), por lo que se reportaron juntos en las anteriores tablas (ArgThr); por otro lado, no fue posible determinar la lisina, por lo que se realizó la estimación de estos tres aminoácidos. Una vez que se tuvieron los valores teóricos de estos tres aminoácidos se obtuvo la tabla siguiente (tabla 7):

Tabla 7 .- Promedio del porcentaje de aminoácidos esenciales más tirosina encontrados en los estadios larvarios de *Penaeus vannamei*, respecto del total de aminoácidos analizados.

AA	Zoea	Misis	Postlarva
His	4.47	4.24	4.50
Arg	6.92	8.12	7.50
Thr	3.36	3.94	3.64
Met	4.70	6.20	6.22
Trp	1.50	2.35	1.47
Val	8.60	7.60	7.65
Phe	4.32	3.90	4.10
Ile	5.83	5.17	5.91
Leu	9.20	8.50	9.60
Lys	7.47	7.57	7.77
Tyr	3.00	2.51	2.72
Σ	59.37	60.1	61.08

Posteriormente se transformaron los datos de la tabla anterior para llevarlos al cien por ciento de aminoácidos esenciales más tirosina, obteniéndose la tabla siguiente (tabla 8).

Tabla 8.- Promedio del porcentaje de aminoácidos esenciales más tirosina de los estadios larvarios de *Penaeus vannamei*, donde el 100% lo forman los aminoácidos esenciales más la tirosina que es un aminoácido no esencial.

AA	Zoea	Misis	Postlarva
His	7.52	7.05	7.37
Arg	11.65	13.51	12.28
Thr	5.66	6.55	5.96
Met	7.91	10.32	10.18
Trp	2.53	3.91	2.41
Val	14.48	12.64	12.52
Phe	7.27	6.49	6.71
Ile	9.82	8.60	9.67
Leu	15.50	14.14	15.72
Lys	12.58	12.59	12.72
Tyr	5.05	4.17	4.45
Total	100	100	100

Finalmente se obtuvo el requerimiento de aminoácidos esenciales, para los diferentes estadios del camarón *Penaeus vannamei*, como se muestra en la tabla siguiente (tabla 9).

Tabla 9 .- Valor promedio estimado del requerimiento de aminoácidos esenciales y tirosina en diferentes estadios del camarón *Penaeus vannamei* (en g/100g de proteína).

AA	Zoea	Misis	Postlarva
His	2.63	2.47	2.58
Arg	4.08	4.73	4.30
Thr	1.98	2.29	2.08
Met	2.77	3.61	3.56
Trp	0.88	1.37	0.84
Val	5.07	4.42	4.38
Phe	2.55	2.27	2.35
Ile	3.44	3.01	3.39
Leu	5.42	4.95	5.50
Lys	4.40	4.41	4.45
Tyr	1.77	1.46	1.56

Se puede decir que fue adecuada la metodología establecida para determinar el contenido de aminoácidos en el cuerpo de larvas de camarón, ya que se obtuvieron valores de casi todos los aminoácidos esenciales, desafortunadamente no fue posible separar la arginina (Arg) de la treonina (Thr) y no se pudo determinar la lisina (Lys). Es necesario corregir esos problemas en la técnica utilizada, para lo cual se podría utilizar una columna cromatográfica de mayor tamaño, con una mayor capacidad de separación (mayor número de platos teóricos). No obstante estos problemas, mediante una serie de cálculos realizados, relacionando los resultados con otras publicaciones, fue posible obtener una aproximación de los tres aminoácidos antes mencionados, y obtener el perfil teórico del requerimiento de aminoácidos de las larvas.

Se tomaron los datos de la columna correspondiente al estadio de zoea como referencia para elaborar la dieta microencapsulada A, ya que en la tabla 6 se observa que entre los estadios de zoea y misis, zoea es más exigente en la cantidad de los aminoácidos esenciales donde se observan diferencias estadísticas. Una vez obtenida la dieta A y la dieta

B (de diferente perfil de aminoácidos), se procedió a su análisis obteniéndose los resultados que se muestran a continuación:

Tabla 10 .- Porcentaje de humedad, proteína, grasa y ceniza de las dietas A y B.

Dieta	Humedad (% ± D.E.)	Proteína (% ± D.E.)	Grasa (% ± D.E.)	Ceniza (% ± D.E.)
A	7.11 ± 0.01	55.45 ± 0.44	17.72 ± 0.96	9.8 ± 0.64
B	6.39 ± 0.11	55.15 ± 1.91	17.85 ± 0.24	9.22 ± 0.29

D.E. = Desviación Estándar.

El análisis químico proximal reveló una gran similitud entre las dietas (Tabla 10), con un contenido promedio de proteína de 55%, lípidos de 17% y cenizas de 9%. Cabe destacar que la cantidad de lípidos en ambas dietas es muy alta en comparación con la cantidad que se suele agregar en dietas para juveniles y adultos de camarón, ya que esta suele ser de entre 6 a 8%.

El análisis de las dietas A y B mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) mostró los siguientes resultados (Tabla 11):

Tabla 11.- Aminoácidos de las dietas experimentales A y B en g/100g de la dieta (materia seca). Las determinaciones se realizaron por triplicado (n = 3).

Aminoácido	Dieta A g/100 ± D.E.	Dieta A C.V. (%)	Dieta B g/100 ± D.E.	Dieta B C.V. (%)
Asp	4.72 ± 0.22	4.76	3.82 ± 0.20	5.21
Glu	7.56 ± 0.36	4.75	6.098 ± 0.32	5.34
Ser	2.21 ± 0.10	4.58	1.80 ± 0.11	6.16
Gly	1.41 ± 0.06	4.09	1.16 ± 0.06	5.44
His	1.42 ± 0.10	6.80	1.21 ± 0.07	6.28
Arg	3.92 ± 0.30	7.45	3.48 ± 0.19	5.62
Thr	2.21 ± 0.10	4.58	1.82 ± 0.13	6.99
Ala	2.11 ± 0.13	6.08	1.69 ± 0.11	6.26
Pro	2.49 ± 0.11	4.62	2.05 ± 0.09	4.61
Tyr	2.45 ± 0.36	14.72	2.02 ± 0.17	8.51
Val	2.30 ± 0.12	5.37	1.89 ± 0.14	7.63
Met	1.38 ± 0.25	18.14	1.23 ± 0.04	3.68
Cys2	0.72 ± 0.13	17.55	0.52 ± 0.05	9.90
Ile	1.95 ± 0.15	7.63	1.68 ± 0.15	8.88
Leu	4.01 ± 0.32	8.09	3.31 ± 0.29	8.77
Phe	2.47 ± 0.25	10.26	2.27 ± 0.20	8.91
Lys	2.16 ± 0.12	5.74	2.34 ± 0.43	18.52
Total	45.51 ± 2.70	5.93	38.41 ± 2.43	6.33

D.E. = Desviación estándar. C.V. = Coeficiente de Variación.

El análisis del perfil de aminoácidos de las dietas, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (Tabla 11) mostró una variación pequeña de valor promedio de las repeticiones, ya que se puede observar que los coeficientes de variación se encontraron entre 5 a 10% en la mayoría de los casos, y en los casos en que el C.V. fue superior al 10%, no llegó a rebasar el 20%, lo cual habla de su confiabilidad. En este análisis realizado en el laboratorio de un centro de investigación que brindó este apoyo, se obtuvieron valores para los aminoácidos arginina, treonina y lisina. Sería conveniente hacer otro muestreo de los diferentes estadios de larvas de camarón y realizar su análisis con el equipo y la metodología usados para el análisis de las dietas, para corroborar los resultados y evaluar la estimación de los aminoácidos cuyos valores fueron calculados teóricamente.

Tomando en cuenta únicamente el perfil de aminoácidos esenciales en g/100 g de proteína (tabla 9) del estadio zoea, que fue determinado como el más exigente en este tipo de aminoácidos, y comparándolo con los perfiles determinados de las dietas experimentales (dietas A y B) previa transformación de sus valores para llevarlos a g/100 g de proteína (para esto se consideraron los datos de la tabla 10 en cuanto a proteína y de la tabla 11), fue posible establecer la tabla 12 donde se puede realizar la comparación entre el perfil que se deseaba obtener, con el perfil encontrado en las dietas microencapsuladas fabricadas por la compañía comercial.

Tabla 12 .- Perfil de aminoácidos propuesto como requerimiento y perfiles de aminoácidos analizados de las dietas A y B (en porcentaje de la proteína).

Aminoácido	Perfil del Requerimiento (% de la proteína)	Dieta A (% de la proteína)	Dieta B (% de la proteína)
His	2.63 ^a	2.56 ^b	2.18 ^b
Arg	4.08 ^a	7.12 ^b	6.30 ^b
Thr	1.98 ^a	4.01 ^b	3.30 ^c
Met	2.77 ^a	2.49 ^a	2.23 ^a
Trp	0.88	N.D.	N.D.
Val	5.07 ^a	4.18 ^b	3.43 ^c
Phe	2.55 ^a	4.49 ^b	4.12 ^b
Ile	3.44 ^a	3.54 ^a	3.03 ^a
Leu	5.42 ^a	7.20 ^b	6.01 ^a
Lys	4.40	3.92 ^a	4.25 ^a
Tir	1.77 ^a	4.43 ^b	3.65 ^b

N.D. = No determinado.

Literales diferentes indican diferencia estadística a una probabilidad ($P < 0.05$).

El perfil de requerimiento se obtuvo en un equipo y con una metodología diferente al perfil de las dietas experimentales (dietas A y B), por lo tanto se puede dudar de la validez en la comparación de sus datos; sin embargo, si previo al contraste se analiza que ambas metodologías cumplan con ciertas exigencias en cuanto a la exactitud y precisión de sus métodos, se podría tener una mayor confianza en que los resultados de esta comparación se aproximen a la realidad, por lo tanto se verificó que ambas metodologías consideraran algunos factores de corrección, como son el factor de respuesta a la detección

de cada aminoácido y la degradación o pérdida característica de cada aminoácido al someterse al proceso de hidrólisis (factor de hidrólisis). En ambas metodologías, este último factor se calculó determinando las pérdidas por descomposición y/o procesamiento de una mezcla de aminoácidos sometida a las mismas condiciones de hidrólisis y análisis cromatográfico que las empleadas para las muestras. Con estas correcciones ambos métodos tienen una exactitud mayor al 90% por lo que los resultados son comparables. Una vez hechas estas consideraciones se procedió a hacer la comparación entre los perfiles.

En la tabla anterior (tabla 12) donde se muestra el perfil teórico de aminoácidos esenciales como requerimiento, junto con los aminoácidos encontrados en las dietas A y B, se observa que ambas dietas quedan ligeramente por debajo del requerimiento para los aminoácidos His, Met, Val y Lys; sin embargo, la dieta A se aproxima más a los valores de requerimiento. En el caso de la Lys que en la misma tabla muestra valores mayores que las dietas, no es posible saber si esta diferencia es significativa, dado que el valor de requerimiento de este aminoácido es único, ya que se obtuvo como una estimación y no tiene un valor de desviación estándar que permita compararlo estadísticamente. Con la idea de presentar de otra forma los resultados de la tabla 12 se realizó la gráfica que se muestra a continuación, donde es posible observar las diferencias entre el perfil del requerimiento contra el perfil de las dietas A y B, (ver figura 3).

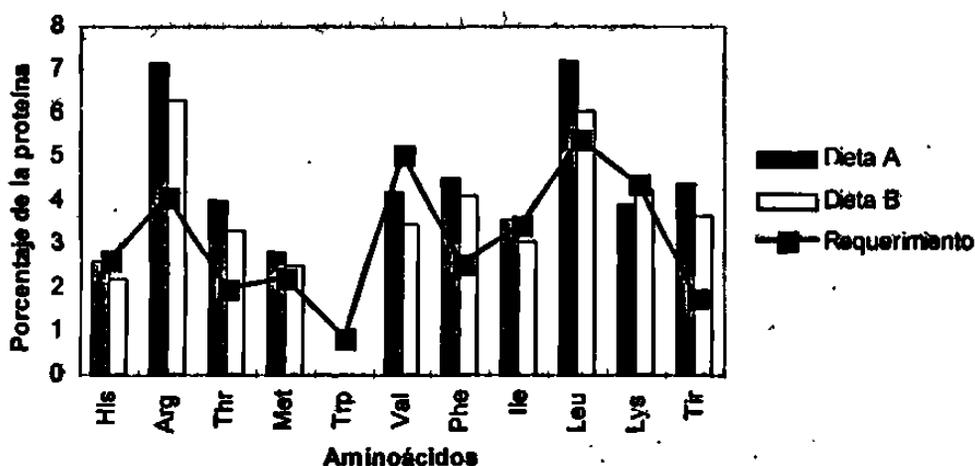


Figura 3.- Perfil de aminoácidos propuesto como requerimiento en contraste con los perfiles de las dietas A y B (en porcentaje de la proteína).

En la tabla 12 y en la figura 3, se observa que la mayoría de los aminoácidos esenciales de las dietas A y B se encuentran sobrepasando el requerimiento (Arg, Thr, Phe, Ile y Leu). De estos aminoácidos se detectaron diferencias estadísticas entre estas dietas en los aminoácidos Thr, Val y Leu. Se observa que los valores más altos se encuentran en la dieta A. Esto quiere decir que esta dieta cubre el requerimiento mínimo y tiene una cantidad mayor de sobra que evita una deficiencia; sin embargo, se ha mencionado que un buen balance de aminoácidos no solo debe cubrir el requerimiento mínimo, sino también debe evitar el exceso ya que se presenta un imbalance que puede llegar a afectar el aprovechamiento de estos, ya sea por no encontrarse en las proporciones adecuadas en el momento justo para la síntesis de proteínas, por la necesidad de consumir energía para eliminar el exceso o por efectos antagónicos entre ciertos aminoácidos.

En términos generales se puede decir que las dietas probadas (dietas A y B), presentaron un perfil de aminoácidos diferente y el perfil de la dieta A se acerca más al perfil del requerimiento ya que las deficiencias que presenta con respecto a este, son pequeñas y menores a las de la dieta B.

El que no se pudiera lograr un perfil de aminoácidos idéntico al requerimiento obedece principalmente a las limitaciones que presenta la tecnología en la elaboración de las microcápsulas, ya que son requeridos algunos ingredientes cuyas cantidades solo pueden variar dentro de ciertos límites; por otro lado, la formulación y preparación misma de las dietas conlleva cierto grado de error.

Con el objeto de fabricar dietas con un perfil de aminoácidos lo más cercano posible al perfil teórico se deben usar ingredientes con un perfil lo más parecido al que se pretende alcanzar, también se pueden usar ingredientes que se complementen muy bien en los aminoácidos en que tengan deficiencias y además se recomienda tratar de usar aglutinantes que no afecten el perfil de aminoácidos (que no sean de naturaleza proteica); por otro lado, la exactitud que se tenga en obtener un perfil dado, dependerá de la exactitud del

conocimiento que se tenga del perfil de aminoácidos de cada uno de los ingredientes utilizados, de la calidad del balanceo y del cuidado que se tenga en el momento de pesar y mezclar al fabricar las dietas.

En el análisis de microscopía electrónica, realizado con el objeto de observar el tamaño y apariencia de las microcápsulas A y B, se obtuvieron las imágenes que se muestran en las siguientes figuras (figuras 4 y 5):

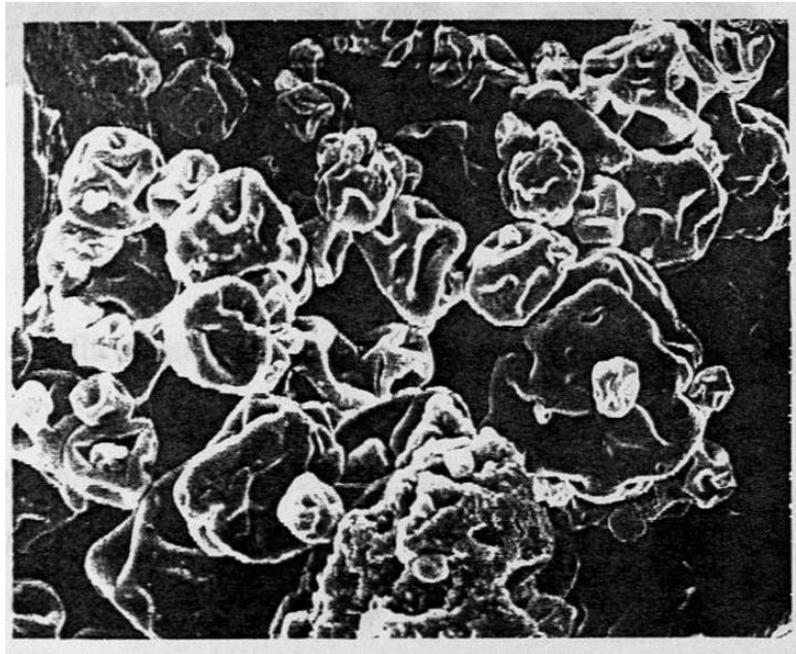


Figura 4.- Fotografía en microscopio electrónico (1000x) de las microcápsulas A.

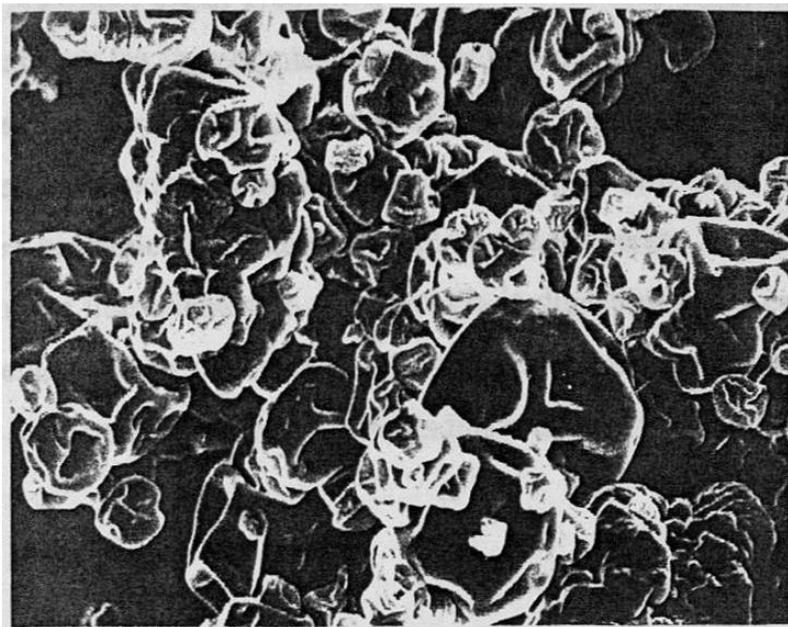


Figura 5.- Fotografía en microscopio electrónico (1000x) de las microcápsulas B.

Analizando las imágenes de microscopía electrónica de las figuras 4 y 5 es posible observar que las partículas de las dietas A y B son similares en cuanto a tamaño y apariencia. Ambas dietas se encuentran en un intervalo de tamaño entre cinco a treinta micras. Ya que las imágenes se encuentran a una escala de mil aumentos, cada milímetro de la imagen corresponde a una micra. Las microcápsulas lucen como pequeñas esferas deshidratadas. Se observa que las depresiones en su superficie no son poros sino únicamente hundimientos de la pared, aparentemente por la pérdida de agua.

Las dietas experimentales presentaron el tamaño establecido por la compañía comercial para larvas de camarón en sus primeros subestadios (zoea 1, 2 y 3). Lograr este tamaño de las partículas de alimento es deseable si se considera que las microalgas de las

cuales se alimentan las larvas se encuentran dentro de este intervalo de tamaño (*Isochrysis sp.* de 3 a 5 μm ; *Chaetoceros sp.* de 4 a 6 μm y *Tetraselmis sp.* de 10 a 15 μm , según Treece y Yates, 1990); sin embargo, cuando se trata de dietas artificiales es probable que partículas demasiado pequeñas presenten algún problema, ya que por un lado difícilmente se puede llegar a pulverizar y tamizar los ingredientes que se utilizan en la elaboración del alimento, por lo que si esto no se logra correctamente se tendría la posibilidad de tener partículas que no contengan una mezcla homogénea de los ingredientes y por otro lado, si las partículas son muy pequeñas es probable que estén constituidas básicamente de la matriz que se utiliza para encapsular los ingredientes, lo que afectaría la digestibilidad y calidad nutritiva de este tipo de alimentos. Es recomendable establecer el tamaño máximo con el que se pueden alimentar las larvas en sus primeros subestadios y en base a esto elaborar las dietas artificiales.

8.2) BIOENSAYOS DE ALIMENTACIÓN

Una vez que se tenían las dietas, se procedió a realizar los bioensayos de alimentación bajo condiciones controladas, hasta establecer la metodología que permitiera evaluar las dietas A y B solas o en combinación con alimento vivo, obteniéndose los resultados que se muestran a continuación:

Bioensayo 1.

En este experimento se planteó comparar la capacidad de las dietas A y B solas (sin aplicar alimento vivo); que diferían entre sí en el perfil de aminoácidos con que fueron elaboradas, en contraste con una alimentación basada en alimento vivo (Tratamiento I), que serviría como testigo positivo.

Siguiendo la metodología general, se hicieron observaciones como se describe a continuación: al día siguiente de la primera alimentación, los organismos de todos los recipientes ya se encontraban en Z1. Todas las larvas lucían bien en general, aunque las

alimentadas con microalgas se veían más activas, mientras que las alimentadas con las dietas A y B nadaban lento y se empezó a notar en algunas de ellas, en ambos tratamientos, material adherido en la parte caudal. Tomando muestras y observándolas al microscopio fue posible apreciar que el material adherido al final del cuerpo eran hilos de heces. Los animales comenzaron a alimentarse bien de las microcápsulas ya que se veían sus tubos digestivos llenos; sin embargo, en el transcurso del día la cantidad de hilos de heces adheridas fue aumentando y comenzó a pegarse en las demás partes del cuerpo; principalmente en las antenas (ver figura 6). Daba la impresión que las larvas alimentadas con las microcápsulas hubieran producido heces con un exceso de mucosidad. En la tarde de ese primer día algunas de las larvas habían dejado de comer, esto era fácil de observar ya que el tracto digestivo se encontraba vacío. La cantidad de heces y de microcápsulas adheridas al cuerpo había aumentado impidiéndoles nadar bien. Se observaron algunos organismos con deformidades consistentes en antenas y apéndices de diferente tamaño. En el caso de las larvas alimentadas con microalgas, se formaban hilos largos de heces pero estos no se adherían a sus cuerpos.

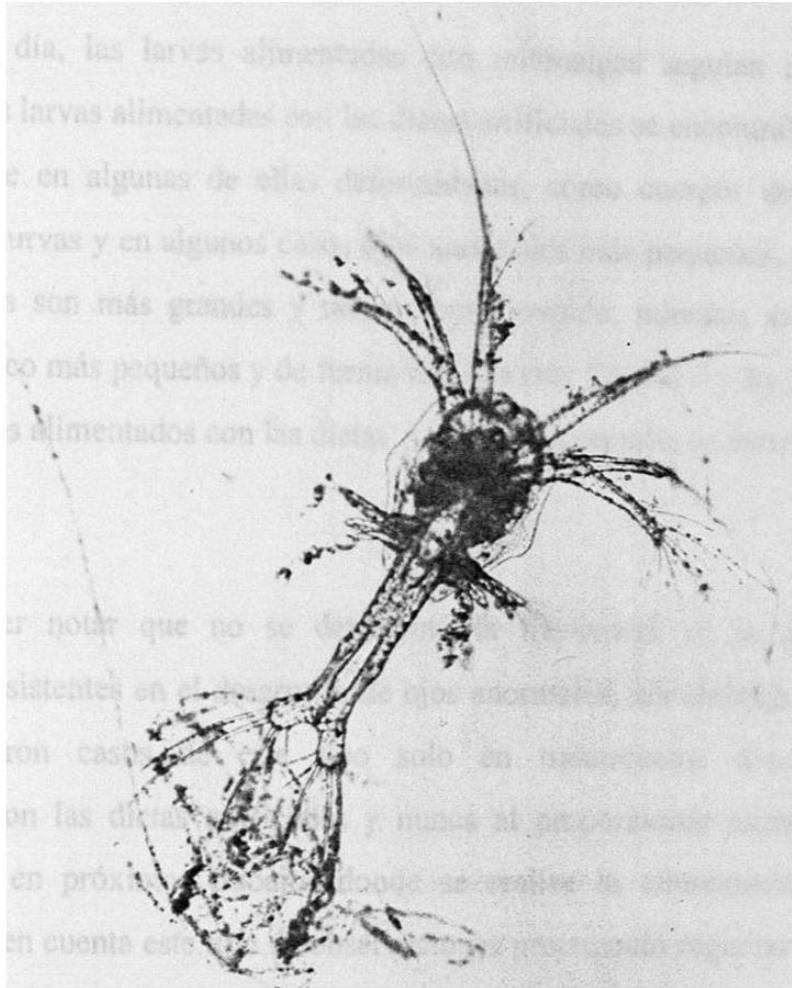


Figura 6.- Zoea de camarón alimentada exclusivamente con dietas microencapsuladas (tanto A como B), donde se nota la formación de hilos largos de heces y partículas que se enredan y adhieren a diferentes partes del cuerpo.

En el segundo día, las larvas alimentadas con microalgas ya se encontraban en Z2, con una apariencia adecuada (muy activas y con el tracto lleno), mientras que las demás larvas continuaban en Z1, con material adherido a sus cuerpos, presentando natación lenta y observándose un tracto digestivo con poco o nulo alimento.

Al tercer día, las larvas alimentadas con microalgas seguían activas y habían mudado a Z3. Las larvas alimentadas con las dietas artificiales se encontraban en estadio de Z2, presentándose en algunas de ellas deformidades, como cuerpos de menor tamaño, espinas cortas y curvas y en algunos casos ojos anormales más pequeños, ya que en las Z2 normales los ojos son más grandes y tienen forma ovoide, mientras en estas larvas se observaban un poco más pequeños y de forma esférica (ver figuras 7 y 8). La sobrevivencia de los tratamientos alimentados con las dietas A y B se encontraba en cero en la mayoría de los frascos.

Cabe hacer notar que no se determinó la frecuencia en la aparición de las deformidades consistentes en el desarrollo de ojos anormales; sin embargo, se puede decir que se presentaron casos de este tipo solo en tratamientos donde se alimentó exclusivamente con las dietas artificiales y nunca al proporcionar alimento vivo. Sería conveniente que en próximos trabajos donde se realice la alimentación de larvas de camarón se tome en cuenta este tipo de observaciones procurando registrar la frecuencia de aparición de este fenómeno.

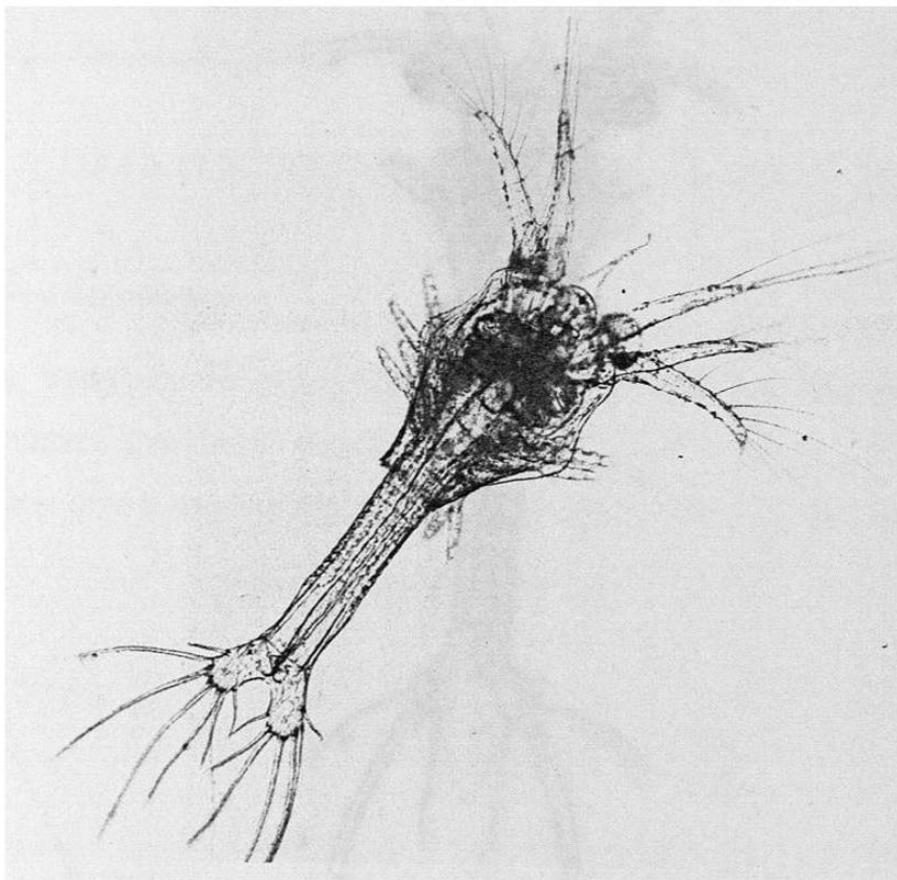


Figura 7.- Fotografía de una zoea 2 alimentada con las dietas artificiales (A y B), donde se observan los ojos anormales por ser más pequeños y de forma esférica cuando se comparan con una larva normal que se muestra en la siguiente figura.

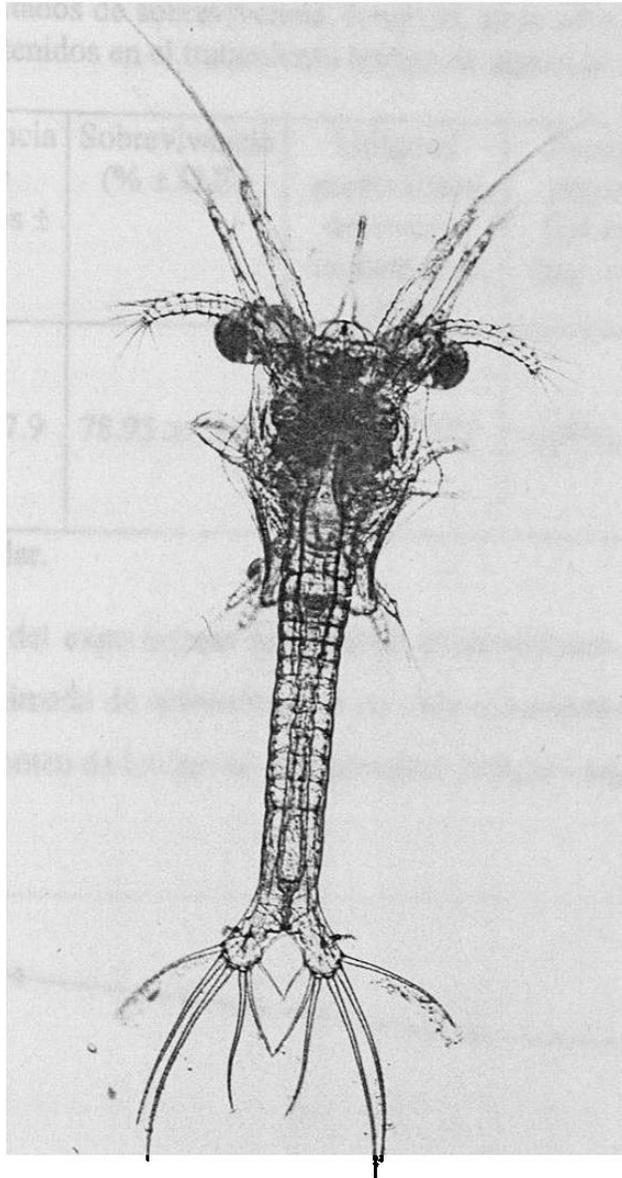


Figura 8.- Fotografía de una zoea 2 normal, alimentada con microalgas, donde se observan los ojos de un tamaño adecuado y de forma ovoide.

Dos días después (día 5), las larvas del tratamiento con microalgas ya se encontraban en M1, mientras que las pocas sobrevivientes de los tratamientos con las dietas artificiales (A y B) seguían en Z2 muy débiles y más translúcidas en comparación con las larvas alimentadas con microalgas.

Transcurridos once días del bioensayo los organismos del tratamiento con microalgas llegaron a PL1 con los datos que se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 13 .- Resultados de sobrevivencia, longitud, peso seco promedio individual y tiempo de desarrollo, obtenidos en el tratamiento testigo de alimento vivo (tratamiento I).

Tratamiento	Sobrevivencia (No. de organismos \pm D.E.).	Sobrevivencia (% \pm D.E.)	Longitud media (base del rostro-caudal) (mm \pm D.E.)	Peso seco promedio individual (mg \pm D.E.)	Tiempo requerido para PL1 (días)
I	118.4 \pm 17.9	78.93 \pm 11.93	4.357 \pm .153	.1055 \pm .0212	11

D.E. = Desviación estándar.

En el transcurso del experimento se hicieron observaciones a diferentes días para calcular el número aproximado de sobrevivientes en cada tratamiento, y a los once días del bioensayo se realizó el conteo de las larvas, obteniéndose la figura siguiente:

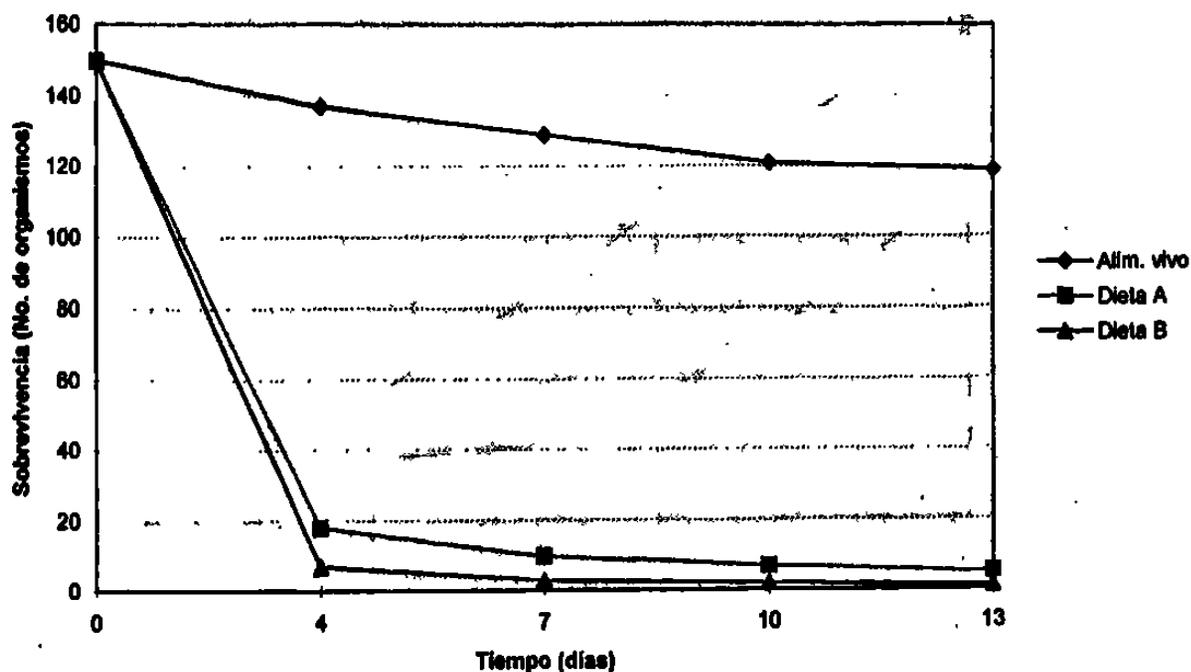


Figura 9 .- Sobrevivencia en los diferentes tratamientos (Tratamiento I = alimento vivo, Tratamiento II = Dieta A y Tratamiento III = Dieta B)

Al aplicar las dietas A y B solas la mortalidad fue muy elevada. Al cabo de los dos a tres primeros días en la mayoría de los frascos la sobrevivencia fue muy baja y los pocos sobrevivientes se encontraban en condiciones inadecuadas de salud. Al transcurrir los once días la mortalidad era cercana a un 100% y no se contaba con postlarvas, por lo que no fue posible obtener datos de longitud y peso de estos tratamientos, únicamente fue posible hacer observaciones de sobrevivencia y grado de desarrollo.

En las determinaciones de la calidad del agua el pH se mantuvo entre 7.8 y 8, sin que existieran diferencias entre los tratamientos. En cuanto a los nitritos y el amonio en el tratamiento I (alimento vivo) la concentración de estas sustancias disueltas en el agua aumentaron en forma menos acelerada que en los tratamientos II y III (dietas A y B solas). Ver figuras 10 y 11.

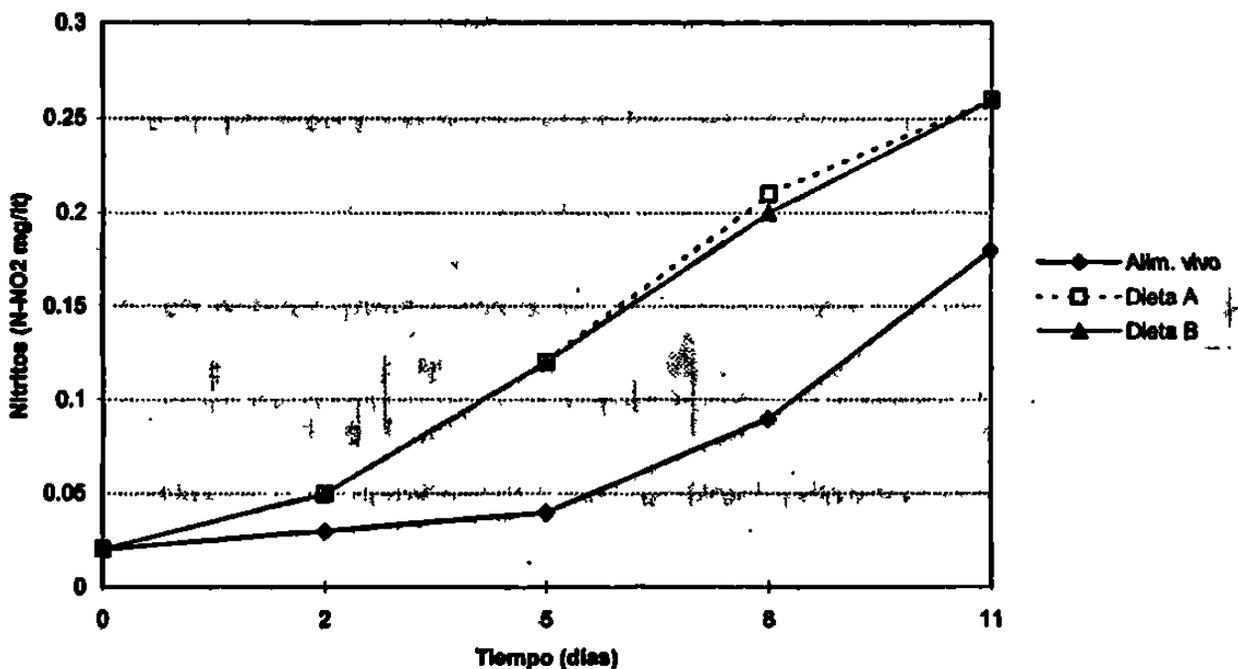


Figura 10.- Aumento de nitritos en los diferentes tratamientos.

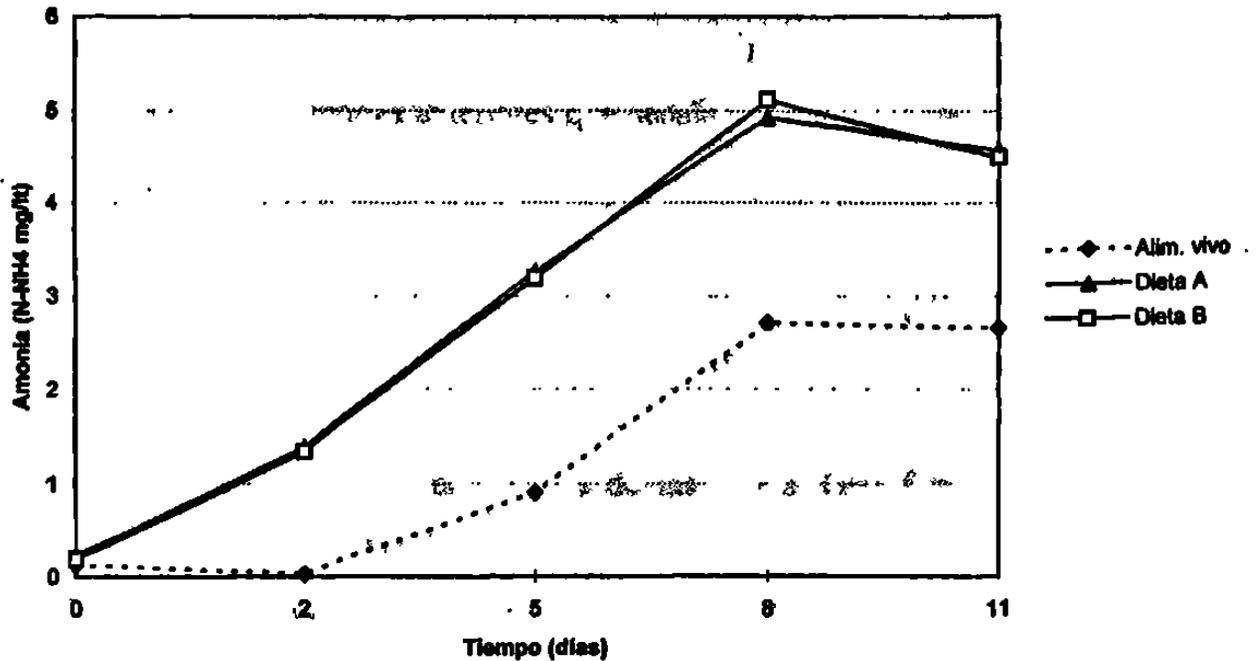


Figura 11.- Aumento de amonio en los diferentes tratamientos.

En este primer bioensayo, se observó que al iniciar la alimentación de las larvas en estadio de zoea 1 éstas fueron capaces de tomar las microcápsulas de alimento de las dietas A y B ya que se detectó alimento en sus tubos digestivos y la formación de hilos de heces; sin embargo, estos hilos comenzaron a adherirse a su cuerpo en forma excesiva. La formación de este tipo de heces podría estar relacionado con la digestibilidad de las microcápsulas o con un daño físico causado por éstas en las paredes del tracto digestivo, ya que Elendt (1990), reporta un trabajo en el que alimentó cladóceros (*Daphnia magna*) con una dieta microencapsulada similar a la utilizada en este trabajo, encontrando daños en las células de la pared del tracto digestivo. En el presente estudio no se realizaron observaciones histológicas, pero sería conveniente evaluar si en este caso las microcápsulas causan algún daño, lo que podría ocasionar la producción de la mucosidad que propicia la excesiva adherencia de partículas al cuerpo de las larvas; por otro lado, es posible que por el tamaño de las partículas, aunado a la naturaleza química de su cubierta, se propiciara la

adhesión entre ellas y al cuerpo de las larvas. Finalmente, como se mencionó con anterioridad, el análisis químico proximal de las dietas experimentales mostró un alto contenido en grasa (17%) en ambas, lo cual puede ser causa que las partículas tiendan a adherirse entre sí (por fuerzas hidrofóbicas) y también puede ocasionar reducción de su digestibilidad. Existen reportes anteriores que señalan el problema de la adherencia de las partículas de alimento al cuerpo de las larvas, como el de García y Báez (1994), en el cual se reporta que no fue posible mantener a los organismos más allá de M2.

Como se muestra en la figura 9 las dietas solas A y B, fueron incapaces de sostener el cultivo de las larvas de camarón. Estas dietas generaron un grave retraso de la metamorfosis, con una mortalidad elevada de las larvas. Otra forma en que se podría explicar el reducido aprovechamiento de las dietas es que la presencia de las microalgas al inicio de la alimentación de las larvas podría aportar enzimas, que participen de forma importante en la digestión del alimento o como activadoras de las enzimas de la larva; por otro lado, se piensa que podrían ser las bacterias presentes en el agua del medio de cultivo y de la pared de las microalgas, una flora bacteriana importante que se establece en el tracto digestivo y permite el mejor aprovechamiento de los alimentos ingeridos.

Se puede pensar que la presencia de microalgas y bacterias benéficas en el agua, establece un equilibrio en el sistema en los tratamientos de alimento vivo, esto se relaciona con la calidad del agua, ya que estos organismos utilizan parte de los desechos nitrogenados presentes en el agua (amonio, nitritos y nitratos). Como se observa en las figuras 10 y 11, en el tratamiento con alimento vivo, el aumento de amonio y nitritos fue menor que en los tratamientos alimentados con las dietas artificiales A y B. Kurmaly *et al.* (1989) mencionan la posibilidad que las microalgas tengan un papel como biofiltros que eliminen las sustancias tóxicas del agua de cultivo.

En los tratamientos con las dietas artificiales A y B se debe ir estableciendo una población bacteriana que comience a utilizar los desechos nitrogenados; sin embargo, se requiere cierto tiempo para llegar a un tamaño poblacional elevado. Si las bacterias no

alcanzan a transformar de forma importante los desechos nitrogenados del agua se contribuye a una forma de estrés para las larvas y se carece de la aportación que podrían estar haciendo las bacterias a la nutrición de las mismas.

Con respecto a la calidad del agua y la flora bacteriana, Vinatea y Andreatta (1997) encontraron mejores resultados en el cultivo larvario de *Penaeus paulensis* al evitar el recambio de agua o que este sea moderado. Mencionan que los nitritos y el amonio no llegaron a niveles peligrosos y las larvas mejoraron en sobrevivencia, crecimiento y desarrollo, concluyendo que las larvas podrían haber complementado su alimentación con la flora bacteriana (*Pseudomonas sp.*).

Los resultados obtenidos con el tratamiento I (alimento vivo), para este primer bioensayo se muestran en la tabla 13. La sobrevivencia de 78.9% fue adecuada y dentro del intervalo encontrado por otros autores (Emmerson, 1980; Alfonso y Leal, 1985; Gallardo *et al.*, 1995; Bautista *et al.*, 1989) al proporcionar diversas especies de microalgas a larvas de camarón. El tiempo de desarrollo fue adecuado, así como la longitud y peso seco de los organismos.

Para comprobar la necesidad de alimentar con una pequeña dosis de alimento vivo que permitiera el establecimiento de una flora bacteriana en el tubo digestivo de las larvas y/o que participara en la capacidad enzimática de las mismas, se decidió aplicar en el siguiente bioensayo, tratamientos con las dietas artificiales A y B junto con una dosis única inicial de microalgas (DUIMA). Por otro lado la presencia de alimento vivo promovía una calidad de agua diferente a la establecida en los tratamientos con dietas artificiales, lo cual estaba siendo una variable más que podría estar impactando los resultados, por lo que en el siguiente bioensayo se estableció el recambio de agua en todos los tratamientos. De esta forma se tendría una calidad de agua similar.

Bioensayo 2

Al observar la elevada mortalidad después de aplicar las dietas microparticuladas A y B solas, se decidió aplicar en el siguiente experimento una dosis única de una cantidad pequeña de microalgas en la primera alimentación, dado que algunos autores (Amjad y Jones, 1992; Kumlu y Jones, 1995; Boeing y Martínez, 1997) han encontrado una mejoría en la sobrevivencia de las larvas al aplicar dicha dosis. Se piensa que la presencia de esta cantidad de microalgas pueda tener un papel como activadora del sistema enzimático de las larvas, que les permita entonces aprovechar mejor las dietas artificiales. La dosis única inicial de microalgas aplicada, consistió en dar 25,000 cel/ml de *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana* en una proporción de 70:30 respectivamente en la primera alimentación, para continuar alimentando únicamente con las dietas artificiales.

Los resultados del tratamiento con alimento vivo fueron muy similares a los del experimento anterior (ver tabla 14), con una sobrevivencia de 79.8%, un tiempo de desarrollo de 10 días y una longitud y peso cercanos a los del bioensayo anterior, con esto es posible observar que este tratamiento fue reproducible y se comportó como un testigo positivo. Se puede observar en los resultados obtenidos en este tratamiento que el haber implementado recambio de agua no los afectó.

Tabla 14.- Resultados de sobrevivencia, longitud, peso seco y tiempo de desarrollo, obtenidos en el tratamiento testigo de alimento vivo (tratamiento I).

Tratamiento	Sobrevivencia (No. de organismos \pm D.E.).	Sobrevivencia (% \pm D.E.)	Longitud media (base del rostro- caudal) (mm \pm D.E.)	Peso seco promedio individual (mg \pm D.E.)	Tiempo requerido para PL1 (días)
I	119.7 \pm 17.0	79.8 \pm 11.3	4.439 \pm .023	.1155 \pm .020	10

D.E. = Desviación estándar.

Los resultados de los tratamientos con las dietas artificiales solas A y B nuevamente mostraron los problemas que en el experimento anterior. Se adhirieron las partículas de alimento, las larvas se veían translúcidas, pequeñas, débiles y algunas con malformaciones (cuerpo o antenas doblados, espinas curvas y ojos pequeños). Existió un gran retraso en el desarrollo y existió una gran mortalidad entre el segundo y tercer día del bioensayo.

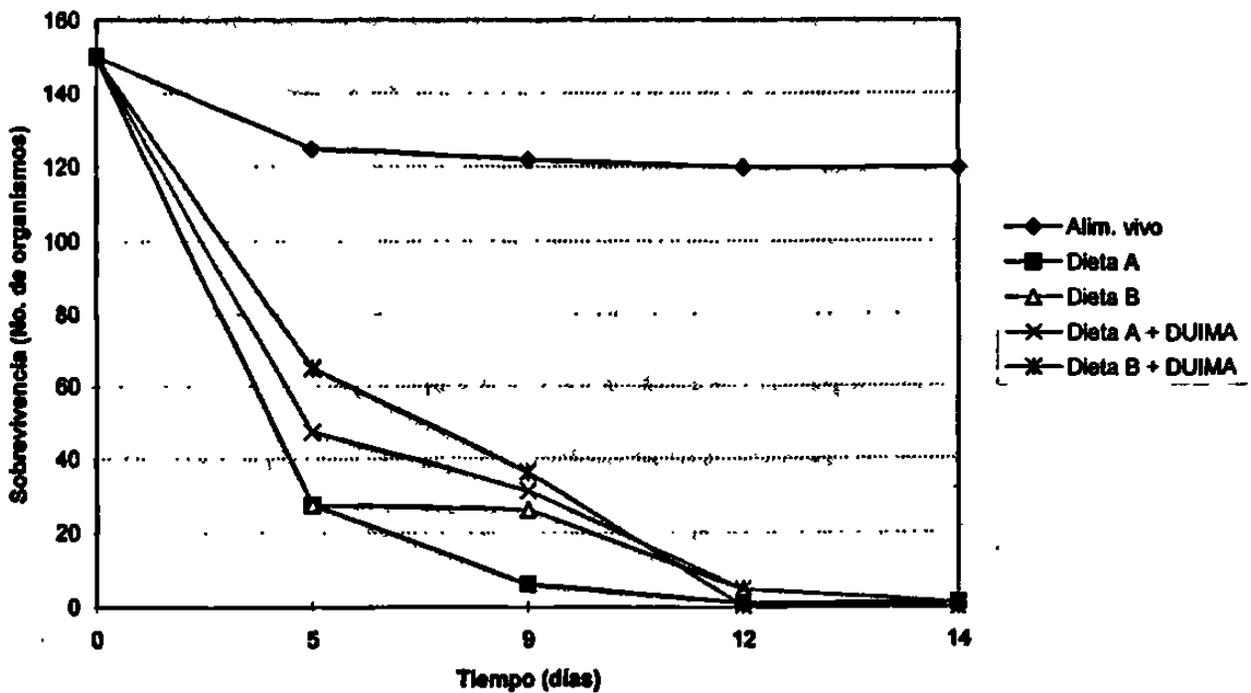


Figura 12.- Supervivencia en los diferentes tratamientos (Tratamiento I = Alimento vivo, Tratamientos II y III = Dietas A y B respectivamente y Tratamientos IV y V = Dietas A y B + DUIMA, respectivamente).

En los tratamientos donde se aplicó la dosis única inicial de microalgas (DUIMA) se mejoró la supervivencia en los primeros días, pero al transcurrir algunos días, nuevamente se presentó una elevada mortalidad, llegando a un nivel similar al de los tratamientos con las dietas artificiales solas (ver figura 12). Esta caída en la supervivencia después de un tiempo indica que mientras las larvas tuvieron disponible cierta cantidad de alimento vivo se mantuvo la supervivencia, y cuando este fue agotado, el alimento artificial solo fue incapaz de sostener el cultivo.

Con los resultados obtenidos hasta este bioensayo no era posible distinguir la calidad de las dietas experimentales (dietas A y B), ya que los organismos presentaron retraso en el desarrollo y no llegaron al estadio de PL1, o si llegaron la cantidad fue pequeña para ser una muestra representativa para medirlos y pesarlos.

Una vez comprobada la incapacidad de las dietas solas para sostener los cultivos larvarios se decidió eliminar estos tratamientos en el siguiente bioensayo y aplicar tratamientos donde se combinara alimento vivo con las dietas artificiales, de esta forma las dietas servirían como un complemento y si alguna de ellas era ventajosa debido a su perfil de aminoácidos esto se reflejaría en los parámetros evaluados. Además se planteó en el siguiente bioensayo hacer muestreos a diferentes tiempos para poder tener datos de los organismos en los diferentes estadios de desarrollo.

Bioensayo 3

Ya que las larvas alimentadas con las dietas artificiales no llegaron al estadio de PL en los anteriores bioensayos, en este se hicieron muestreos a diferentes tiempos y por otro lado, en este bioensayo se decidió eliminar los tratamientos empleando las dietas solas (A y B), y en su lugar se aplicaron tratamientos combinando las dietas artificiales con alimento vivo, con la idea de evaluar si una de las dietas de diferente perfil de aminoácidos complementaba mejor la alimentación con alimento vivo; sin embargo, la respuesta de los tratamientos con las dietas A y B solas y de las dietas A y B más la DUIMA fue muy pobre, pero también en el caso del tratamiento I (alimento vivo) se tuvo una respuesta muy pobre de sobrevivencia y desarrollo, además los replicados de todos los tratamientos mostraron una alta variabilidad.

Es probable que el problema fuera la calidad de las microalgas empleadas, ya que no fueron mantenidas en las condiciones indicadas de luz y temperatura, y no se pudo garantizar que las microalgas proporcionadas se encontraran en la fase exponencial de

crecimiento que es el momento recomendado por su calidad y para evitar la presencia de sustancias producidas en otras fases del crecimiento poblacional.

Los resultados variables del experimento permitieron darle la importancia a la calidad del alimento vivo que se aplica en el tratamiento testigo de alimento natural, por lo que se hicieron los ajustes necesarios y se tuvieron las precauciones propias para el siguiente bioensayo.

Otro factor que pudo ser de importancia en este bioensayo se relaciona a la calidad misma de las larvas. Recientes estudios (Palacios *et al.*, 1998), han encontrado que existe una relación entre el contenido de triacilglicerol y glucosa en los huevos y nauplios de camarón *Penaeus vannamei* con el estado fisiológico de los reproductores, existiendo relación directa con la viabilidad de las larvas. Se menciona por algunos productores de camarón (comentario personal) que pueden existir lotes de larvas de inferior calidad y que es común que los resultados en los cultivos larvarios presenten algún problema principalmente en la temporada invernal que fue la temporada en que se realizó este bioensayo.

Bioensayo 4

Aplicando las correcciones en los tratamientos de los bioensayos anteriores se planteó en este aplicar los mismos tratamientos, aumentando la DUIMA e ir aumentando la cantidad de alimento microencapsulado en forma gradual, para que las larvas se mantuvieran un tiempo mayor en contacto con microalgas y se fortalecieran lo suficiente antes de cambiar de alimento (en el caso de los tratamientos con DUIMA), o de incluir otro tipo de alimento. Este proceso podría servir también para ir acostumbrando a los organismos al nuevo tipo de alimento.

Deteniendo el bioensayo al quinto día, cuando las larvas del tratamiento I se encontraban en Z3 se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 15.- Supervivencia, longitud, tiempo y grado de desarrollo de las larvas de camarón alimentadas con alimento vivo (tratamiento I), con las dietas A y B más alimento vivo (tratamientos II y III, respectivamente) y con las dietas A y B más DUIMA (tratamientos IV y V, respectivamente).

Tratamiento	Supervivencia (No. de org \pm D.E.)	Supervivencia (% \pm D.E.)	Longitud del cefalotorax (mm \pm D.E.)	Grado de desarrollo (subestadio)	Tiempo para llegar al subestadio (días)
I (Alimento vivo)	119.5 \pm 13.3	79.7 \pm 8.8	.837 \pm .024	Z3	5
II (Dieta A + Alim. Vivo)	27.5 ^a \pm 6.6	18.3 ^a \pm 4.4	.640 ^a \pm .020	Z2	5
III (Dieta B + Alim. Vivo)	24.0 ^a \pm 11.7	16.0 ^a \pm 7.8	.641 ^a \pm .022	Z2	5
IV (Dieta A + DUIMA)	0	----	----	----	----
V (Dieta B + DUIMA)	0	----	----	----	----

Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas a una probabilidad ($P < 0.05$). Se aplicó una prueba de "t" entre los tratamientos II y III (no se comparan con el tratamiento I por que las larvas se encuentran en otro estadio de desarrollo).

En este último bioensayo se aplicaron los mismos tratamientos del bioensayo anterior; sin embargo, se planteó detener el experimento transcurridos cinco días de alimentación, ya que se decidió no llevar a los organismos hasta postlarva, sino detener el experimento cuando las larvas del tratamiento de alimento vivo llegaron a zoea 3, de esta forma se tuvieron suficientes organismos para contar sobrevivientes y para medirlos; sin embargo, en los tratamientos de alimento artificial combinado con alimento vivo existió un retraso en el desarrollo y se obtuvieron larvas en zoea 2. Por la pequeña cantidad de sobrevivientes y su reducido tamaño, no fue posible determinar su peso seco; por otro lado, las larvas tanto en Z2 como en Z3 después de ser fijadas para ser medidas, tienden a plegar

su cuerpo, lo cual dificulta la medición de su longitud desde la base del rostro hasta la parte caudal, por lo que únicamente se midió la longitud del cefalotorax.

Al realizar las correcciones que permitieran proporcionar un alimento vivo de buena calidad, los resultados de este tratamiento mostraron valores similares a los obtenidos en los primeros dos experimentos, con una sobrevivencia de 79.7%; sin embargo, hay que tomar en cuenta que la sobrevivencia de los otros bioensayos fue la observada entre el día diez u once, mientras que en el presente experimento fue al quinto día, por lo que podría esperarse que esta sobrevivencia disminuyera ligeramente al llegar al décimo día. No obstante se puede considerar que el tratamiento I de alimento vivo fue similar a los resultados de los primeros bioensayos y por lo tanto se comportó de forma adecuada como un testigo positivo.

Existen numerosos reportes donde se ha logrado el cultivo larvario utilizando únicamente alimento artificial, pero esto solo en condiciones experimentales (Jones *et al.* 1987; Kurmaly *et al.*, 1989; Kumlu y Jones, 1995). Solo existe un reporte donde se menciona el logro exitoso del cultivo larvario con alimento artificial a nivel comercial (Ottogali, 1993). Se observa que en el presente estudio las dietas experimentales A y B, no solo no complementaron la alimentación de las larvas, sino que afectaron el aprovechamiento del alimento vivo que se encontraba disponible en los tratamientos combinados (tabla 15). Esto podría ser explicado por diversas causas; por un lado, si la digestibilidad de las dietas no fue adecuada, al ser consumidas por los organismos se ocupó espacio desplazando a las microalgas y ocasionando una nutrición deficiente; por otro lado, el comportamiento físico de las microcápsulas al adherirse pudo haber ocasionado un estrés tal en las larvas que las debilitó disminuyendo su aprovechamiento del alimento natural. Otra posible explicación pudo ser que la composición química de las dietas contenía alguna sustancia que resultó dañina a las larvas, como pudieran ser residuos tóxicos del proceso de elaboración de las dietas; finalmente, se puede pensar que la falta de algún o algunos nutrimentos importantes aparte de los aminoácidos (ácidos grasos, vitaminas o algún factor de crecimiento desconocido), ocasionaron deficiencia nutricional de las larvas, aunque esto

es menos factible ya que las deficiencias se hubieran cubierto con el alimento vivo complementario.

Al realizar un análisis en conjunto de todos los bioensayos efectuados dentro del presente estudio se puede decir que, tanto la dieta A como la dieta B al ser suministradas solas, con la DUIMA o en combinación con alimento vivo, fueron incapaces de sostener el cultivo larvario de *Penaeus vannamei*, no detectándose diferencias significativas entre los resultados obtenidos al alimentar con cualquiera de ellas, donde al parecer algunos problemas generados por las dietas como fueron su adherencia excesiva, la posible baja digestibilidad o incluso la posible toxicidad de algún compuesto presente en estas dietas o generado por la degradación de las mismas, impidieron hacer una evaluación adecuada que permitiera apoyar en cualquier sentido la hipótesis propuesta, en la que se menciona que el perfil de aminoácidos encontrado en el cuerpo de las larvas, puede ser una referencia útil para elaborar dietas que ofrezcan buenos resultados en los cultivos larvarios de camarón.

Es posible mencionar la deficiencia de nutrimentos esenciales diferentes a los aminoácidos como causa probable de los resultados obtenidos con las dietas experimentales utilizadas, como pueden ser ácidos grasos (principalmente del grupo de los poliinsaturados), vitaminas y minerales, ya que así como hace falta establecer el requerimiento de aminoácidos de las larvas de camarón, también hacen falta estudios que determinen el requerimiento de este tipo de nutrimentos; sin embargo, es factible pensar que aunque se hubiera procurado los nutrimentos antes mencionados en las microcápsulas experimentales, un exceso de lípidos donde quedarían incluidos los ácidos grasos poliinsaturados (los cuales son altamente sensibles a la oxidación), sin una inclusión adecuada de antioxidante se pudiera haber generado un problema de rancidez e indirectamente una deficiencia de vitaminas que participan como antioxidantes (vitaminas C y E), lo que a su vez causa deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados, ya que una vez que sufren oxidación no pueden ser aprovechados por las larvas; sin embargo, otra consideración que debe ser tomada en cuenta es que en los tratamientos donde se aplicó alimento vivo en combinación con las dietas artificiales, estas deficiencias podrían haber

sido cubiertas por las microalgas, lo que lleva a suponer entonces como una explicación más factible la presencia de alguna(s) sustancia(s) tóxica(s), producto de la oxidación de lípidos, como pueden ser peróxidos, hidroperóxidos, aldehidos y cetonas o algún tóxico residual del proceso de fabricación.

El siguiente paso será realizar el análisis de las dietas experimentales utilizadas en el presente estudio para tratar de verificar la posible presencia de niveles importantes de alguna sustancia tóxica. Se recomienda que en trabajos posteriores se tome en cuenta la inclusión de antioxidantes en niveles adecuados, además de realizar el análisis de las dietas para evitar la presencia de sustancias que puedan resultar tóxicas para las larvas.



9) CONCLUSIONES

En base a los aminogramas realizados en un muestreo de diferentes estadios de larvas de camarón blanco *Penaeus vannamei*, fue posible obtener la base de datos que permitió hacer una estimación teórica de los requerimientos de aminoácidos en los estadios larvarios.

Se puede decir que la metodología de experimentación fue adecuada, pues con el alimento vivo se obtuvieron resultados constantes y adecuados.

Los resultados obtenidos fueron efecto exclusivo de las dietas proporcionadas; sin embargo, el efecto del perfil de aminoácidos no tuvo un papel importante en los resultados, ya que al parecer otros factores establecidos por las mismas dietas tuvieron un efecto más importante, como pudo ser el problema por la adherencia excesiva de las partículas, la posible baja digestibilidad de las dietas, presencia de sustancias tóxicas o la carencia de otro tipo de compuestos esenciales para la nutrición de las larvas.

Los alimentos microencapsulados elaborados por la compañía comercial se utilizan con éxito en muchos laboratorios de producción larvaria del mundo, complementando la alimentación de larvas de camarón de diferentes especies, por lo cual se decidió utilizar su tecnología para elaborar las dietas experimentales; sin embargo, es probable que en este caso las dietas obtenidas experimentalmente presentaran algún problema particular, como pudiera ser la presencia de material tóxico o que las dietas hubieran sufrido algún tipo de degradación química como una oxidación haciéndolas tóxicas.

De los alimentos para larvicultura que se elaboran actualmente, se puede observar que suele ponerse gran atención a cubrir un cierto perfil de ácidos grasos; sin embargo, es de interés realizar más trabajos donde se pruebe la importancia en cubrir un cierto perfil de

aminoácidos. Es necesario investigar sobre el uso de nuevos ingredientes y diferentes tecnologías tal vez más sencillas como la elaboración de dietas microagregadas.

Es importante realizar más estudios que permitan determinar el papel que juegan las microalgas en la alimentación de las larvas de camarón. Es necesario conocer si aportan compuestos químicos esenciales para la nutrición de las larvas, complementos enzimáticos o si se trata de una relación ecológica más compleja, donde podrían estar involucradas las bacterias.



10) RECOMENDACIONES

Ya que en el presente trabajo algunos de los aminoácidos esenciales propuestos como el perfil de requerimiento teórico fueron estimados, sería recomendable realizar un nuevo muestreo de los diferentes estadios del camarón blanco *Penaeus vannamei*, y realizar su análisis con un equipo y metodología que permita obtener valores analíticos de todos los aminoácidos esenciales, para por un lado, corroborar que tanto se acercan los valores estimados de la forma en que se hizo en el presente trabajo a los obtenidos analíticamente, y por otro lado, afinar el perfil de aminoácidos teórico que sirva como una propuesta en la formulación de alimentos larvarios de esta especie de camarón.

En diversos trabajos realizados con el objeto de mejorar el desempeño de dietas artificiales para larvas de camarón, se ha tenido gran interés en investigar y cubrir los requerimientos de ácidos grasos esenciales; sin embargo, son pocos los estudios para establecer el requerimiento de proteínas y aminoácidos. Sería de interés utilizar los avances en el establecimiento de los ácidos grasos para emplearlos en nuevos trabajos donde se siga investigando el papel de las proteínas y los aminoácidos, para obtener dietas exitosas en larvicultura.

Es necesario seguir investigando acerca de las propiedades químicas y físicas de las dietas artificiales microparticuladas que se utilicen en la alimentación larvaria, ya que se podrían relacionar con una posible toxicidad de alguna sustancia presente en las partículas, una baja digestibilidad de éstas o con el fenómeno de la adherencia excesiva, por ejemplo, el alto contenido de lípidos de las dietas estudiadas (17%), podrían haber generado el fenómeno de la adherencia entre las partículas, debido a fuerzas hidrofóbicas actuando sobre ellas dentro del sistema acuático.

Como se mencionó dentro de las conclusiones, son necesarios más estudios para establecer el papel del alimento vivo dentro de la alimentación larvaria para tratar de

obtener dietas artificiales que simulen sus características en cuanto a digestibilidad, aporte de nutrimentos, tamaño y comportamiento físico en el sistema.

Se recomienda realizar el análisis químico de las dietas que se utilicen en los cultivos larvarios de camarón, para evitar la presencia de posibles sustancias tóxicas.

Una de las propuestas, para seguir investigando el uso del perfil de aminoácidos en dietas para larvas de camarón, es obtener dietas microparticuladas con una tecnología más sencilla que la necesaria para fabricar dietas microencapsuladas; es decir, tratar de obtener dietas microparticuladas, microligadas o microagregadas, aunque existe el inconveniente que este tipo de alimentos son mucho menos estables en el agua. Para lograr este tipo de dietas es necesario seleccionar ingredientes adecuados, que se complementen bien en su perfil de aminoácidos, o emplear ingredientes que pudieran tener un perfil de aminoácidos similar al del organismo que se desea alimentar. En base a estas últimas ideas se decidió anexar al final del presente trabajo (ver anexo 2) una propuesta de formulación mediante ingredientes a los que se determinó su perfil de aminoácidos esenciales.

Finalmente se decidió incluir al final de este trabajo algunas formas para elaborar alimentos microparticulados con metodologías sencillas (ver anexo 3).



11) LITERATURA CONSULTADA

Amjad, S. and Jones, D.A., 1992a. An evaluation of artificial larval diets used in the culture of penaeid shrimp larvae *Penaeus monodon* (Fabricius). *Pakistan Journal of Zoology*. Vol. 24(2), 135-142.

Amjad, S. and Jones, D.A., 1992b. A review of shrimp nutrition and artificial larval diets. *Marine Research*, 1(1): 97-110.

Akiyama, D. M., Dominy, W. G. and Lawrence, A. L., 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. Revised in: Akiyama, D. and Tan, H. R. Eds. *Proceeding of the aquaculture feed processing nutrition workshop*, Sept. 16-25, Singapore. American Soybean Association. 80-97.

A.O.A.C., 1990. *Official methods of analysis*. 12th Ed. Association of Official Analytical Chemist. Elliam Horritz Ed. Washington, D. C., USA.

Badui, D. S., 1994. *Química de los alimentos- Primera reimpresión*, Editorial Alhambra Mexicana, México, 647 pp.

Bautista, M. N., Millamena, O. M. and Kanazawa, A., 1989. Use of kappa-carrageenan microbound diet (C-MBD) as feed for *Penaeus monodon* larvae. *Marine Biology*, 103 : 169-173.

Bengston, D. A., 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets, *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 24, No. 2.

Biedenbach, J. M., Smith, L. L. and Lawrence, A.L., 1990. Use of a new spray-dried algal product in penaeid larviculture. *Aquaculture*, 86, 249-257.

Boeing, P. and Martínez, P. C. A., 1997. Partial replacement of live algae in the larviculture of *Penaeus vannamei* with microencapsulates and spray-dried algae *Schizochytrium sp.* *Memorias del 1er Simposium Centroamericano de Acuicultura*, Tegucigalpa, Honduras (22-24 de Abril), 135-137.

Castille, F. L. and Lawrence, A. L., 1981. The effect of EDTA (Ethylenedinitrotetraacetic acid) on the survival and development of shrimp nauplii (*Penaeus stylirostris* Stimpson) and the interactions of EDTA with the toxicities of Cadmium, Calcium, and Phenol. *J. World Maricul. Soc.*, 12(2) : 292-304.

Ceccaldi, H. J. and Yagi, H., 1990. Role of temperature and salinity on survival and growth of crustacean larvae. *Société Franco-japonaise d'océanographie. La Mer* 28 : 260-265.

Chang, T. M. S., Macintosh, F. C. and Mason, S. C., 1966. Semipermeable aqueous microcapsules. I. Preparation and properties. *Can. J. Physiol. And Pharm.*, 44, 115-128.

Chen, H. Y., 1991. Larval and postlarval nutrition of penaeid shrimp. Larvi'91 Fish and crustacean larviculture symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jasper, E. and Ollevier, F. (Eds). European Aquaculture Society, Special publication, No.15, Gent Belgium. p 188.

Chen, J. C., Lin, J. N., Kobayashi, T., Lida, Z. and Kumeno, F., 1991. Survival and growth of shrimp larvae fed different amounts of artificial plankton. Larvi'91 Fish and crustacean larviculture symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jasper, E. and Ollevier, F. (Eds). European Aquaculture Society, Special publication, No.15, Gent Belgium. p 189.

Chen, H. Y.; Leu, Y. T. and Roelants, I., 1992. Quantification of arginine requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon*, using microencapsulated arginine. *Marine Biology*, 114, 229-223.

Cruz-Reyes. G., 1997. Cuantificación de aminoácidos de los estadios larvarios del camarón *Penaeus vannamei* y estimación de los requerimientos de aminoácidos esenciales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. México.

Cruz-Suárez, L. E., 1988. Alimentación de larvas de peneidos con micropartículas. Conferencia en el Seminario nacional de cultivo larvario de camarones peneidos. SEPESCA. 3-5 de Agosto. San Blás, Nayarit, México.

Cuzon, G., Dos Santos, R., Hew, M. and Poullaouec, 1981, Use of *Spirulina* in shrimp (*Penaeus japonicus*) diet. *World Mariculture Society*, 12(2) : 282-291.

Cuzon, G., Guillaume, J. and Cahu, Ch., 1994. Composition, preparation and utilisation of feeds for crustacea. *Aquaculture*, 124 : 253-267.

Dabrowski, K., 1991. Dietary requirements for freshwater fish larvae - in search of a common thread. Larvi'91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E. and Ollevier, F. (Eds), European Aquaculture Society, Special publication No.15, Gent Belgium. 9-10.

Elendt, B. P., 1990. Nutritional quality of a microencapsulated diet for *Daphnia magna*. Effects on reproduction, fatty acid composition, and midgut ultrastructure. *Arch. Hydrobiol.* 118 : 4, 461-475.

Emmerson W. D., 1980. Ingestion, growth and development of *Penaeus indicus* larvae as a function of *Thalassiosira weissflogii* cell concentration. *Marine Biology*, 58, 65-73.

Emmerson, W. D. and Andrews, B., 1981. The effect of stocking density on the growth, development and survival of *Penaeus indicus* Milne Edwards larvae. *Aquaculture*, 23 : 45-57.

Emmerson, W. D., 1984. Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda : Penaeidae) larvae feeding on *Brachionus plicatilis* and *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 38 : 201-209.

Fang, L. S. and Lee, B. N., 1992. Ontogenic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 103B, No. 4, 1033-1037.

Fox, J. M., Lawrence, A. L. and Li-Chan, E., 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid source. *Aquaculture*, 131: 279-290.

Fox, J. M., Lawrence, A. L. and Li-Chan, E., 1996. Estimation of requirements for indispensable amino acids by *Penaeus vannamei* (Boone) by age and culture environment. *Aquaculture America*. Arlington. Texas 14-17 Feb. 1996, 20 p.

Fuze, D. M., Wilkenfeld, J. S. and Lawrence A. L., 1985. Studies on the use of boiled chicken egg yolk as a feed for rearing penaeid shrimp larvae. *The Texas Journal of Science*, Vol. XXXVII, No. 4, 371-382.

Galgani, M. L. and AQUACOP, 1988. Essais de substitution des algues vivantes par des microparticules inertes pour l'alimentation des larves zoé de crevettes péneïdes. *Aquaculture*, 69 : 115-127.

Gallardo, P. P., Alfonso, E., Gaxiola, G., Soto, L. A. y Rosas, C., 1995. Feeding Schedule for *Penaeus setiferus* larvae based on diatoms (*Chaetoceros ceratosporum*), flagellates (*Tetraselmis chuii*) and *Artemia* nauplii. *Aquaculture*. 131: 239-252.

García , P. L. y Báez, D. M., 1994. Diseño y evaluación de un alimento artificial para larvas de camarón azul. *Oceanología*. 2: 25-41.

Gatlin, D. M., 1987. Whole body amino acid composition and comparative aspects of amino acid nutrition of the Gold fish, Golden shiner and Fathead minnow. *Aquaculture*, 60, 223-229.

Glaude, R. M. and Maxey, J. E., 1994. Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 6 : 131-141.

Grobois, F. A. and Caballero, M. E., 1991. A comparison of the use of decapsulated *Artemia* cysts and nauplii as food for *Penaeus vannamei* larvae. Larvi'91 Fish and crustacean larviculture symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jasper, E. and Ollevier, F. (Eds). European Aquaculture Society, Special publication No. 15, Gent, Belgium. 128-131.

Hamid, S. N., Fortes, R. D. and Estepa, F., 1994. Effect of pH and ammonia on survival and growth of the early larval stages of *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 125 : 67-72.

Jackson, C. J., 1994. Effect of intramolt growth and salinity on the larval morphology of *Penaeus semisulcatus* De Haan (decapoda : penaeidea). *Journal of Crustacean Biology*, 14(3) : 463-472.

Javellana, G. N. L., 1989. Ingestion saturation and growth responses of *Penaeus monodon* larvae to food density. *Aquaculture*, 81 : 329-336.

Jian, C. C. and Chi, C. T., 1991. Influence of ammonia on growth of *Penaeus monodon* Fabricius post-larvae. *Aquaculture*, 22 : 457-462.

Jones, D. A., Kanazawa, A. and Rahaman, S. A., 1979. Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 17 : 33-43.

Jones, D. A., 1979. Studies on the nutritional requirements of the larval stages of *Penaeus japonicus* using microencapsulated diets. *Marine Biology*, 54: 261-267.

Jones, D.A., Kurmaly, K. and Arshard, A., 1987. Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture*, 64: 133-146.

Jones, D. A., Kamarudin, M. S. and Le Vay, L., 1991. The potential for replacement of live feeds in larval culture. Larvi'91 Fish and crustacean larviculture symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jasper, E. and Ollevier, F. (Eds). European Aquaculture Society, Special publication, No.15, Gent, Belgium. p 141.

Jones, D. A., Le Vay, L. and Kamarudin, M. S., 1992. Feeding and nutritional requirements of penaeid shrimp larvae. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, Escuela Superior Politécnica del Litoral*. 45-52.

Jones, D. A., Kamarudin, M. S. and Le Vay, L., 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 24, No. 2, 199-209.

Jones, D. A., 1995. Feeding strategies in penaeid and caridean shrimp larvae and development of appropriate artificial feeds. In press. 46 Pacific Fish Tech Ann. Meeting. 1-18.

Jones, D. A., Bridson, P., Freeman, M., Latchford, J., Martínez-Palacios, C. A., Misciattelli, N., Ribeiro, F. A. L. T., Sirvas-Rowlands, S. and Simoes, F., 1996. Progress in the use of artificial feeds in penaeid larval culture. *Journal Marine Biotechnology* (In press).

Kanazawa, A., Teshima, S. and Sasada, H., 1982. Culture of the prawn larvae with micro-particulate diets. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48(2) : 195-199.

Kanazawa, A., Teshima, S. and Sakamoto, M., 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture*, 50 : 39-49.

Kanazawa, A., 1989. Protein requirements of Penaeid shrimp. *Advances in tropical aquaculture. Aquacop Ifremer. Actes de Colloque 9*. 261-270.

Kanazawa, A., 1992. New directions in microdiet research in Japan. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, 44(4), 123.

Kitani, H., 1986. Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(7), 1131-1139.

Kitani, H., 1992. Relative growth of penaeid postlarvae as a useful tool for identification. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(12), 2211-2217.

Kitani, H., 1993. Morphology of Postlarvae of the Whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59(2), 223-227.

Kitani, H., 1994. Identification of wild postlarvae of the penaeid shrimps, genus *Penaeus*, in the pacific coast of Central America. *Fisheries Science*, 60(3), 243-247.

Koshio, S., Kanazawa, A., Teshima, S. and Castell, J. D., 1989. Nutritional evaluation of crab protein for larval *Penaeus japonicus* fed microparticulate diets. *Aquaculture*, 81 : 145-154.

Kuban, F. D., Wilkenfeld, J. S. and Lawrence, A. L., 1983. Survival and growth of *Penaeus setiferus* L. and *Penaeus aztecus* Ives larvae, fed *Artemia* beginning at the protozoa-two substage versus the mysis-one substage. *J. World Maricul. Soc.*, 14 : 38-48.

Kuban, F.D., Lawrence, A. L. and Wilkenfeld, J., 1985. Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. *Aquaculture*, 47, 151-162.

Kumlu, M. and Jones, D.A., 1995. The effect of live and artificial diets on growth, survival, and trypsin activity in larvae of *Penaeus indicus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 26: 4, 406-415.

Kurmaly, K., Jones, D.A., Yule, A. B. and East, J., 1989. Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa I to

postlarva 1 on live feeds, artificial diets and on combination of both. *Aquaculture*, 81, 27-45.

Le Moullac, G., Aquacop, Roy, P. and Van Wormhoudt, A., 1992. Effects of trophic and prophylactic factors on some digestive enzymatic activities of *Penaeus vannamei* larvae. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, Escuela Superior Politécnica del Litoral*. 81-85.

Le Moullac, G., Van Wormhoudt and Aquacop, 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour*, 7: 203-210.

Lester, L. J., 1988. Difference in larval growth among families of *Penaeus stylirostris* Stimpson and *P. vannamei* Boone. *Aquaculture and Fisheries Management*, 19: 243-251.

Le Vay, Rodríguez, Kamarudin and Jones., 1993. Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture*, 289-297

Liao, I. C. and Sheen, S. S., 1993. Prawn nutrition studies in Taiwan. In: T. P. Mc Vey Eds. *CRC Handbook of mariculture. 2nd Edition, Crustacean Aquaculture*. CRC Press. USA, Florida, vol. 1, pp 95-103.

Lin, H. P., Thuet, P., Trilles, J. P., Guillaume, R. and Charmantier, G., 1993. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, 117 : 591-598.

López-Alvarado, J., Langdon, C. J., Teshima, S. H. and Kanazawa, A., 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. *Aquaculture*, 122: 335-346.

Lovett, D. L. and Felder, D. L., 1990a. Ontogeny of kinematics in the gut of the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda : Penaeidae). *Journal of Crustacean Biology*, 10(1) 53-68.

Lovett, D. L. and Felder, D. L., 1990b. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.*, 178: 144-159.

Magán, V. M. and Cañavate, J. P., 1995. Fluorometric determination of selectivity between live and inert food by *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture*, 134 : 307-311.

Mourente, G., Medina, A., González, S. and Rodríguez, A., 1995. Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus keraturus*. *Aquaculture*, 130 : 187-199.

Muir, P. R. and Sutton, D. C., 1994. Bacterial degradation of microencapsulated foods used in larval culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 25, No. 3, 371-378.

Ottogalli, L., 1993. Nueva gestión del agua en las crías de peneidos en Nueva Caledonia. En Calderón, J. And Sandoval. Eds. *Memorias. I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, 18-23 de oct. de 1992, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 87-92.

Palacios, E., Ibarra, A. M., Ramírez J. L., Portillo, G. y Racotta, I. S., 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in white pacific shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a comercial hatchery. *Aquaculture Research*, 29 :101-107.

Parsons, T. R., Stephens, K. and Strickland, J. D., 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. BD. Canada*. 18(6) 101-115.

Preston, N. P., Burford, M. A., Coman, F. E. and Rothlisberg, P. C., 1992. Natural diet of larval *Penaeus merguensis* (Decapoda : Penaeidae) and its effect on survival. *Marine Biology*, 113 : 181-191.

Rahman, S. H. A., 1996. Evaluation of various diets for the optimum growth and survival of larvae of the penaeid prawn *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture Nutrition*, 151-155.

Rees, J. F., Curé, K., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P. and Menasveta, P., 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*, 122 : 193-207.

Rodríguez, A., Le Vay, L., Mourente, G. and Jones, D. A., 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology*, 118 : 45-51.

Samocha, T. M., Uziel, N. and Brodwy, C. L., 1989. The effect of feeding two prey organisms, nauplii of *Artemia* and rotifers, *Brachionus plicatilis* (Muller), upon survival and growth of larval marine shrimp, *Penaeus semisulcatus* (De Haan). *Aquaculture*, 77 11-19.

Sánchez, M. R., 1986. Rearing of mysid stages of *Penaeus vannamei* fed cultured algae of three species. *Aquaculture*, 58, 139-144.

SEPESCA, 1994. Situación de la acuicultura en México. En: Mendoza, R., Cruz-Suárez, L. E. y Ricque, D., Eds. Memorias del II Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. 7-9 de Noviembre, pp 1-15.

Shewbart, K. L., Mier, W. L. and Ludwing, P. O., 1972. Identification and quantitative analysis of amino acids present in the protein of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. Marine Biology, vol. 16. 64-67.

Simoës, N., Jones, D. A. and Martínez-Palacios, C., 1998. Artificial diets: effects in survival, growth and water quality in the larval culture of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris*. World Aquaculture Society (In press).

Simon, C. M., 1978. The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for *Penaeis* protozoal larvae. Aquaculture, 14 : 105-113.

Smith, L. L., Fox, J. M., Treece, G. D. and McVey J. P., 1996. Intensive Larviculture Techniques. CRC Handbook of Mariculture, 2nd Edition, Edited by James P. McVey. Crustacean Aquaculture, volume I, 153-172.

Sorgeloos, P., 1992. Live feeds and their substitution products for larval nutrition of fish, shrimp and prawn. Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 25-36.

Tacon, A. G. J., 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación, GCP/RLA/102/ITA, Proyecto Aquila II, Documento de campo No. 4, FAO, Brasilia, Brasil, 572 pp.

Tandler, A. and Kolkovski, S., 1992. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the successful application of microdiets in Gilt-head seabream *Sparus aurata* larvae. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 44(4), 128.

Teshima, S. and Kanazawa, A., 1983. Effects of several factors on growth and survival of the prawn larvae reared with microparticulate diets. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 49(12), 1893-1896.

Teshima, S., Kanazawa, A. and Yamashita, M., 1986. Dietary value of several proteins and supplemental amino acids for larvae of the prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 54, 225-235.

Teshima, S., Kanazawa, A. and Koshio, S., 1992. Recent developments in nutrition and microparticulate diets of larval prawns. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 44(4), 127-128.

Thies, C., 1996. A survey of microencapsulation processes. Microencapsulation : Methods and industrial applications. Edit. Simon Benita, by Marcel Dekker, Inc. 1-19.

Treece, G. D. and Yates, M. E., 1990. Laboratory Manual for the culture of penaeid shrimp larvae. Marine Advisory Service Sea Grant College Program, Texas A & M University, pp 75.

Uchida, M., Nakata, K. and Maeda, M., 1997. Introduction of detrital food webs into an aquaculture system by supplying single cell algal detritus produced from *Laminaria japonica* as a hatchery diet for *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 154: 125-137.

Villamar, D. E. and Langdon, C. J., 1993. Delivery of dietary components to larval shrimp (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. *Marine Biology*, 115 : 635-642.

Vinatea, L. Olivera, A. and Andreatta, E., 1991. Culture of *Penaeus paulensis* with five different sources of *Artemia* cysts. Larvi'91 Fish and crustacean larviculture symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jasper, E. and Ollevier, F. (Eds). European Aquaculture Society, Special publication, No.15, Gent Belgium. 136-137.

Vinatea, L and Andreatta, E. R., 1997. Comparative study of continuous and static water renewal strategies in the larviculture of *Penaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) associated with high stocking densities and different water renewal rates. *Aquaculture*, 154: 247-259.

Wilkenfeld, J. S., Fox J. M. and Lawrence, A. L., 1981. Consumption of frozen and live *Artemia* by protozoa of *Penaeus setiferus*. *J. World Maricul. Soc.*, 12 (2): 250-259.

Yúfera, M., Rodríguez, A. and Lubián, L. M., 1984. Zooplankton ingestion and feeding behavior of *Penaeus keraturus* larvae reared in the laboratory. *Aquaculture*, 42, 217-224.

12) ANEXOS

12.1) ANEXO 1

12.1.1) ESQUEMAS DE LOS NAUPLIOS, ZOEAS Y MISIS DEL CAMARÓN BLANCO *PENAEUS VANNAMEI*.

A continuación se muestran algunos esquemas realizados por Kitani (1986), donde se pueden observar características de los diferentes subestadios del desarrollo larvario de *Penaeus vannamei*.

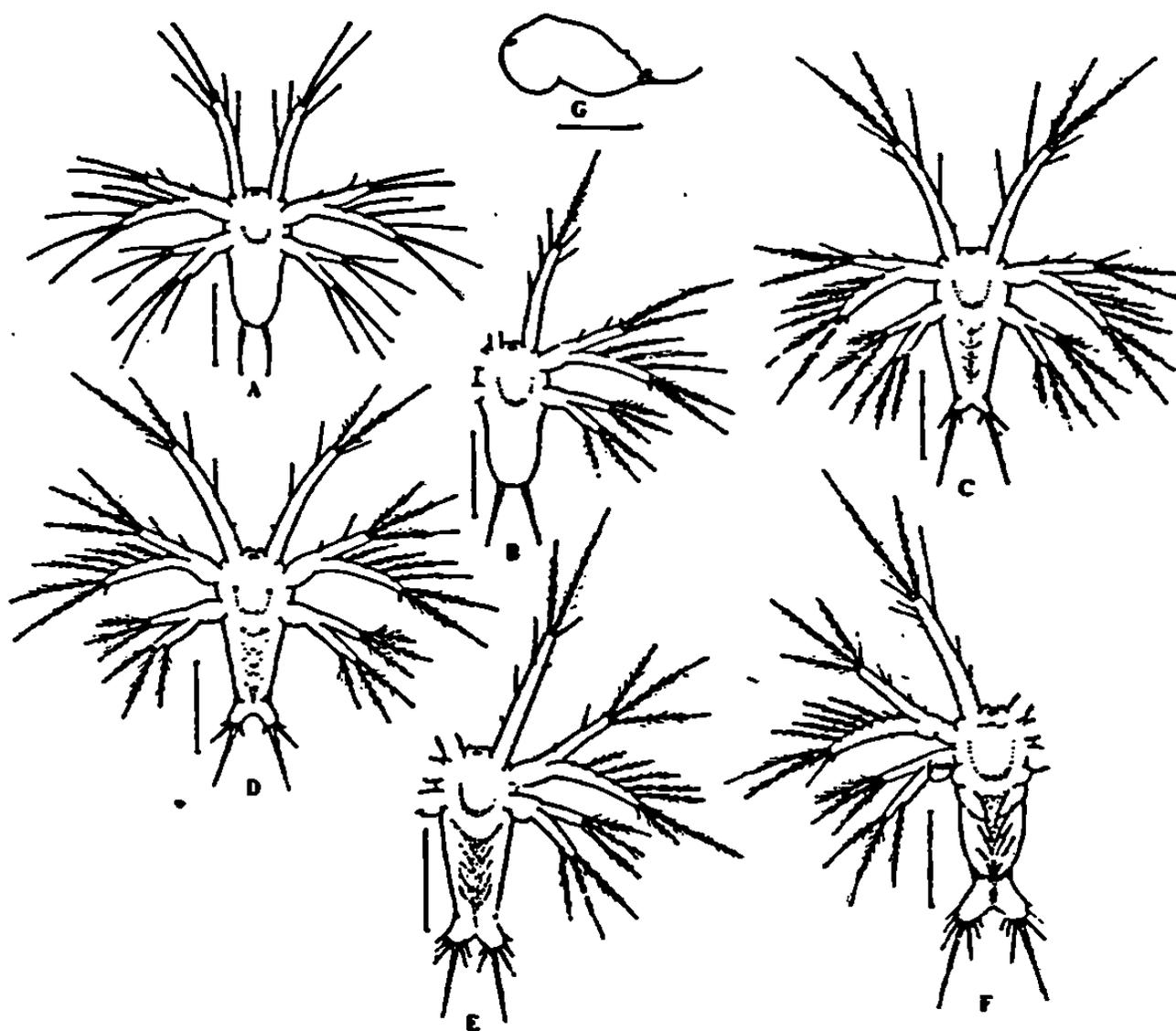


Figura 13.- Nauplios de *P. vannamei*. A-F: vista ventral. G: vista lateral. A-F: nauplios del 1 al 6. G: primer nauplio. La escala equivale a 0.2 mm. (Tomado de Kitani, 1986).

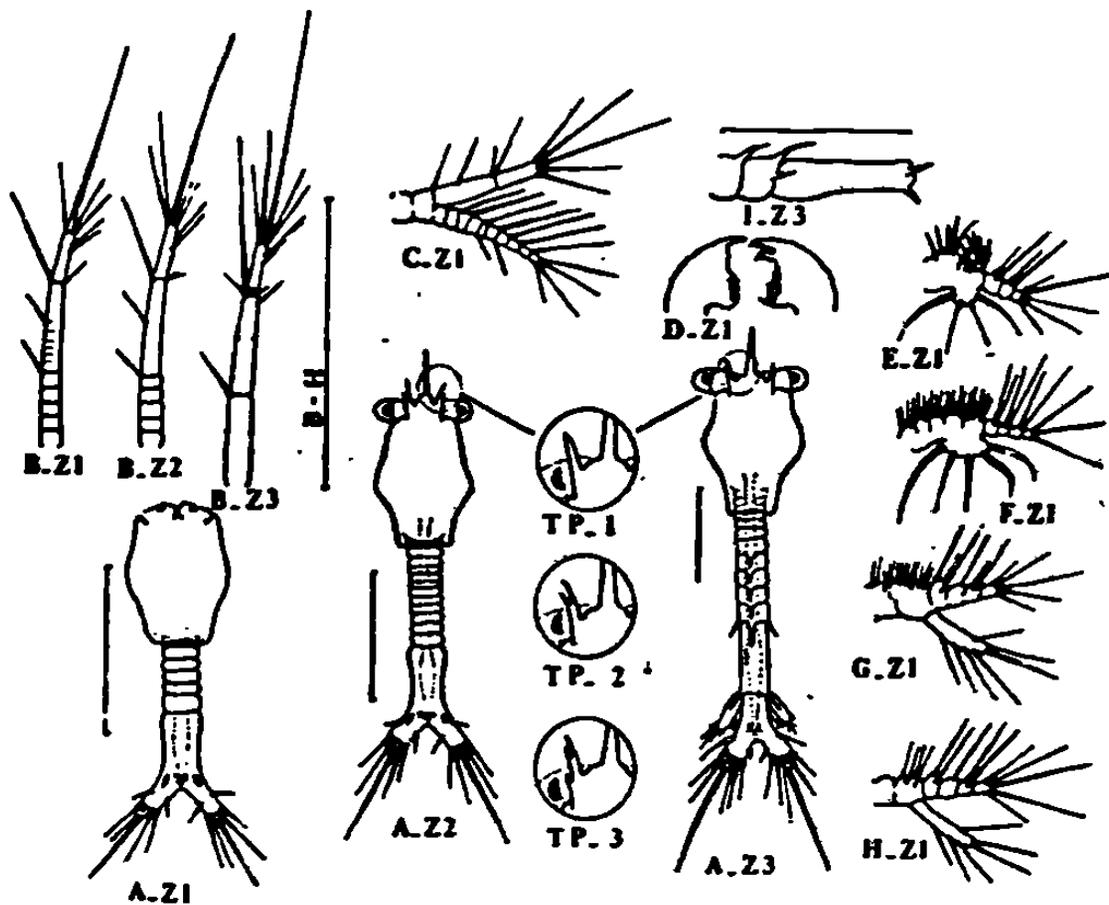


Figura 14.- Zoeas de *P. vannamei*. A: zoea 1 a la 3 en vista dorsal. B: primera antena. C: segunda antena. D: mandíbula. E: primer maxila. F: segunda maxila. G: primer maxilipedo. H: segundo maxilipedo. I: vista lateral de zoea 3. Z: zoea. La escala equivale a 0.5 mm. (Tomado de Kitani, 1986).

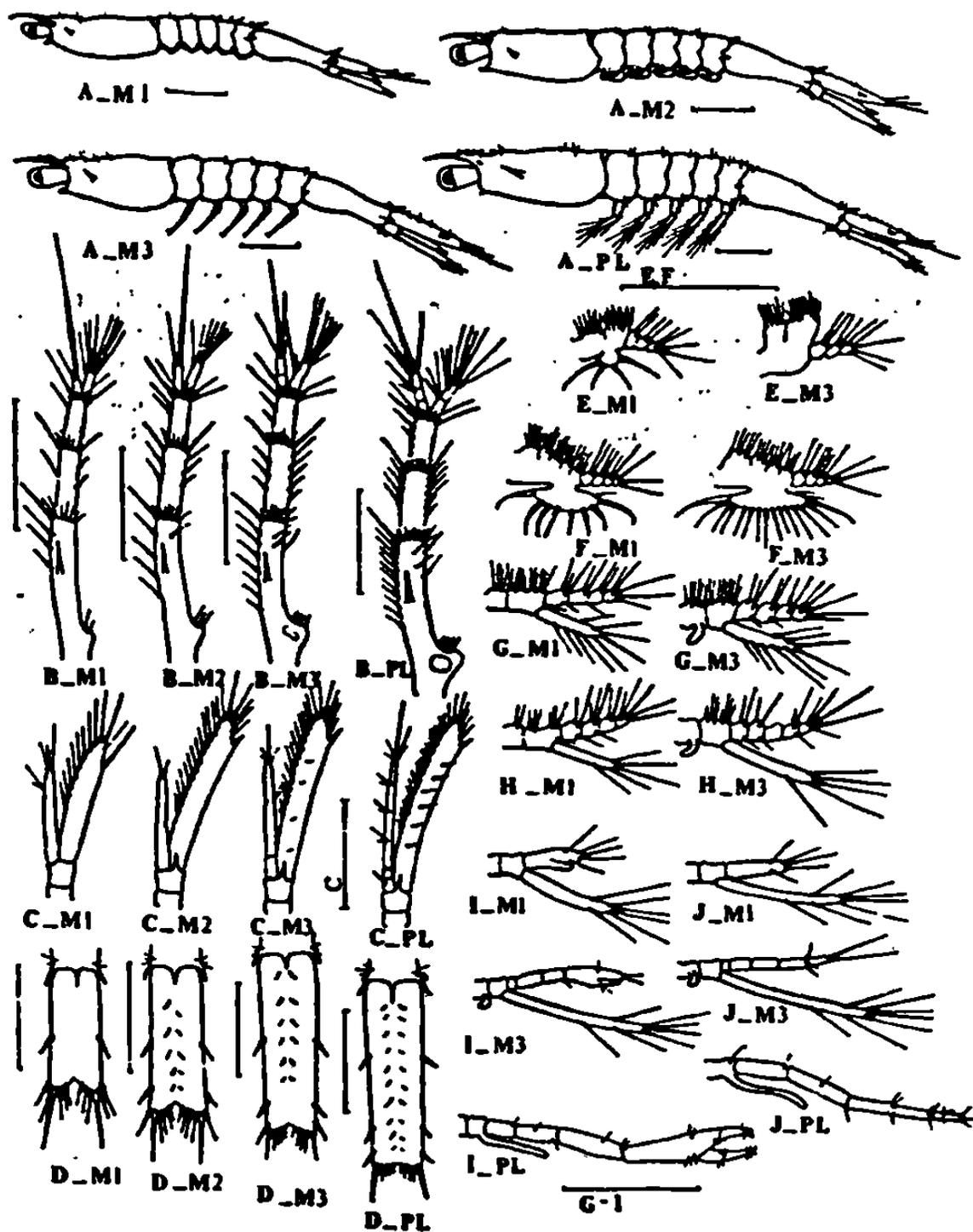


Figura 15.- Los tres estadios de misis y el primero de postlarva de *P. vannamei*. A: vista lateral. B: primer antena. C: segunda antena. D: telson. E: primer maxila. F: segunda maxila. G: primer maxilipedo. H: segundo maxilipedo. I: primer pereopodo. J: cuarto pereopodo. M1-M3: misis 1 a 3. PL: postlarva. La escala equivale a 0.5 mm. (Tomado de Kitani 1986).

12.2) ANEXO 2

12.2.1) FORMULACIÓN DE UNA DIETA SIGUIENDO EL PERFIL DE AMINOÁCIDOS ENCONTRADO EN LARVAS DE *PENAEUS VANNAMEI*

Para la formulación de la dieta propuesta se utilizó el programa computacional Mixit-2, versión 3.2, donde se generó una base de datos como se muestra en la tabla siguiente.

12.2.1.1) BASE DE DATOS

Tabla 16.- Ingredientes y nutrimentos considerados en la elaboración de una dieta microparticulada para larvas de camarón blanco *Penaeus vannamei*.

		cala- mar	ca- ma- rón	pes- cado	trigo	glu- ten de trigo	ac. de pes- cado	co- les- terol	leci- tina de soya	algi- nato de sodio	mine- rales	vita- mi- nas	anti- oxi- dante	pig- men- to
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	base	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	humed	7	1	9	10	8	0	4	1	0	0	0	0	0
3	prot	80	90	65	12	78	0	0	0	0	0	0	0	0
4	grasa	7	4	8	1.8	1.71	100	96	99	0	0	0	0	0
5	ceniza	6	5	14	2.04	.693	0	0	0	0	100	0	0	0
6	fibra	0	0	0.24	3.5	.115	0	0	0	0	0	0	0	0
7	ELN	0	0	2.81	69.5	13	0	0	0	0	0	0	0	0
8	energ	5.14	5.42	4.51	3.69	4.92	9.50	9.12	9.40	0	0	0	0	0
9	His	1.17	1.43	2.81	.291	2.00	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Arg	3.08	6.42	3.81	.628	4.93	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Thr	2.00	2.70	2.51	.360	2.36	0	0	0	0	0	0	0	0
12	Met	1.62	2.16	1.95	.205	.975	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Val	2.41	3.03	3.26	.574	3.54	0	0	0	0	0	0	0	0
14	Phe	2.12	3.09	2.44	.616	2.82	0	0	0	0	0	0	0	0
15	Ile	2.70	3.10	2.92	.497	2.62	0	0	0	0	0	0	0	0
16	Leu	3.89	5.02	4.77	.856	4.72	0	0	0	0	0	0	0	0
17	Lys	3.55	5.04	4.56	.350	2.98	0	0	0	0	0	0	0	0
18	Tyr	1.67	2.44	2.01	.420	2.15	0	0	0	0	0	0	0	0
19	colest	0	0	.27	0	0	.88	96	0	0	0	0	0	0
20	fosfoli	0	0	3.25	.403	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Los datos del calamar, fueron obtenidos al procesar una muestra de todo el cuerpo de 20 calamares de California (longitud corporal media de 15 cm) adquiridos en un centro comercial de la localidad. Los calamares fueron cortados en trozos pequeños que fueron liofilizados, molidos y mezclados perfectamente para tener una muestra lo más homogénea posible. Los datos del camarón se obtuvieron de la región caudal (músculo sin exoesqueleto) de una muestra de 100 camarones (*P. vannamei*) colectados en una granja del estado de Sinaloa, los cuales fueron cortados en trozos pequeños, liofilizados, molidos y mezclados de la misma forma en que se realizó para el calamar. El pescado utilizado consistió en una muestra de harina de pescado chilena (de la compañía Tepual. Clave en la bolsa B-9274. Llegada al laboratorio el 24 del 6 de 1997), la cual fue mezclada para garantizar una muestra homogénea.

Muestras homogéneas de los ingredientes arriba mencionados (calamar, camarón y pescado) fueron analizadas mediante un análisis químico proximal y una porción fue desgrasada y sometida a su análisis de aminoácidos mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), en el CIAD-Hermosillo.

Los datos de los restantes ingredientes considerados en la tabla se obtuvieron de datos bibliográficos y de ingredientes con que se cuenta en el laboratorio y que han sido previamente analizados.

Una vez que se tenía la base de datos de ingredientes y nutrimentos se procedió a establecer sus restricciones.

12.2.1.2) RESTRICCIONES DE INGREDIENTES Y NUTRIMENTOS.

Se establecieron las restricciones de ingredientes y nutrimentos que se muestran a continuación (tablas 17 y 18).

Tabla 17.- Restricciones de ingredientes.

	Ingrediente	Restricción	
		Inclusión mínima (%)	Inclusión máxima (%)
1	Calamar	0	100
2	Camarón	0	100
3	Pescado	0	100
4	Trigo	0	100
5	Gluten de trigo	6	9
6	Aceite de pescado	0	100
7	Colesterol	.25	1
8	Lecitina de soya	3	10
9	Alginato de Na + Hexametáfosfato de Na (3 :1)	4	4.01
10	Minerales	.25	.2501
11	Vitaminas	2.5	2.501
12	Antioxidante	.02	.0201
13	Pigmento	.25	.2501

Tabla 18.- Restricción de nutrimentos.

Nutrimento		Restricción	
		Inclusión mínima (%)	Inclusión máxima (%)
1	Humedad	0	12
2	Proteína	55	55.01
3	Grasa	4	12
4	Ceniza	1	14
5	Fibra	0	4.5
6	Carbohidratos (ELN)	0	100
7	His	1.45	100
8	Arg	2.24	100
9	Thr	1.09	100
10	Met	1.52	100
11	Val	2.79	100
12	Phe	1.40	100
13	Ile	1.89	100
14	Leu	2.98	100
15	Lys	2.42	100
16	Tyr	0.97	100
17	Colesterol	0.25	1
18	Fosfolípidos	0.25	4

El valor considerado como el requerimiento mínimo de aminoácidos es el requerimiento establecido en este trabajo, ajustado a 55% de proteína que es la que en este caso se desea obtener en la dieta.

Las restricciones de ingredientes y nutrimentos que se consideraron dentro de las tablas anteriores se encuentran dentro del intervalo reportado en otros trabajos en que se han elaborado dietas para larvas de camarón (Teshima *et al.*, 1986; Bautista *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1995 y Rahaman, 1996).

En base a los ingredientes, nutrimentos, restricciones de ingredientes y restricciones de nutrimentos, se obtuvo la propuesta de formulación que se presenta a continuación en la tabla 19.

12.2.1.3) FORMULACIÓN OBTENIDA

Tabla 19.- Cantidad necesaria de cada ingrediente en la formulación.

	Ingrediente	Inclusión (%)
1	Calamar	0.00
2	Camarón	0.00
3	Pescado	76.338
4	Trigo	4.781
5	Gluten de Trigo	6.00
6	Aceite de pescado	0.00
7	Colesterol	0.824
8	Lecitina de soya	5.025
9	Alginato de Sodio + Hexam. De Na	4.010
10	Minerales	0.250
11	Vitaminas	2.501
12	Antioxidante	0.020
13	Pigmento	0.250

12.2.1.4) PERFIL OBTENIDO DE LOS NUTRIMENTOS

El perfil teórico esperado de los nutrimentos al mezclar los ingredientes en las proporciones señaladas en la tabla 19, es el que se muestra a continuación (tabla 20).

Tabla 20.- Perfil de nutrimentos de la dieta formulada.

	Nutrimento	Perfil obtenido (%)
1	Humedad	7.93
2	Proteína	55.01
3	Grasa	12.00
4	Ceniza	11.10
5	Fibra	0.36
6	Carbohidratos (ELN)	6.26
7	His	2.28
8	Arg	3.24
9	Thr	2.08
10	Met	1.56
11	Val	2.74
12	Phe	2.07
13	Ile	2.42
14	Leu	3.98
15	Lys	3.69
16	Tyr	1.69
17	Colesterol	1.00
18	Fosfolípidos	2.51

A continuación se muestra en forma gráfica (figura 16) el perfil de aminoácidos que se desea obtener ya que fue establecido como el requerimiento, en comparación con el perfil de aminoácidos encontrado en los ingredientes que son fuente importante de proteína de los considerados en la presente formulación (calamar, camarón y pescado)

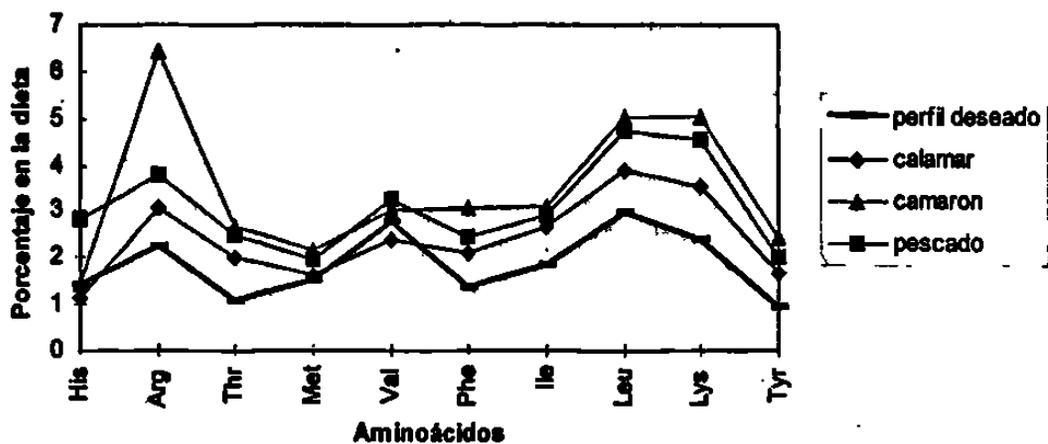


Figura 16.- Perfil de aminoácidos del requerimiento, en comparación con el perfil de aminoácidos de los ingredientes que sirven como fuente de proteína.

Al graficar los valores del perfil de aminoácidos deseado (requerimiento) contra el perfil de aminoácidos obtenido por el balanceo se obtiene la figura que se muestra a continuación (figura 17).

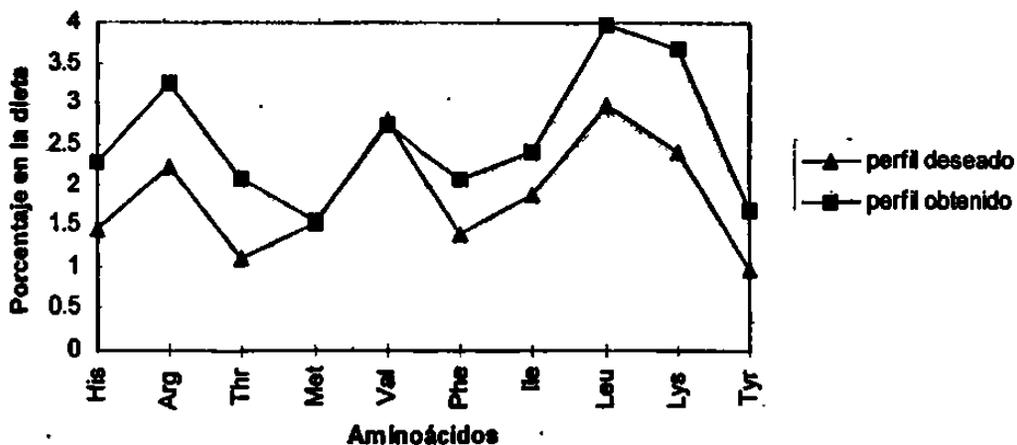


Figura 17.- Perfil de aminoácidos obtenido, en comparación con el perfil de aminoácidos deseado.

Como se observa en la figura anterior (figura 17), los aminoácidos Met y Val son los más limitantes en esta formulación. Una solución a este problema puede ser agregarlos en forma pura o buscar otro grupo de ingredientes cuyo perfil se acerque más al esperado.

Para realizar esta formulación se estableció en el programa computacional que de ser necesario algunos ingredientes no fueran incluidos, de esta forma, se puede observar que no fueron incluidos tanto el camarón, como el calamar ni el aceite de pescado.

Finalmente cabe señalar que este es un ejemplo teórico que probablemente requiera ajusten en la formulación según las características físicas obtenidas de la dieta, principalmente su estabilidad en el agua, ya que si ésta es pobre se tiene que forzar la inclusión de más ingrediente(s) que participen en la aglutinación.

12.3) ANEXO 3

12.3.1) EJEMPLOS DE METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA FABRICAR MICRODIETAS

A continuación se mencionan algunas formas sencillas encontradas en algunos trabajos, para elaborar alimentos microparticulados:

1) Dieta en la que se emplea Kappa-carragenina:

Se mezclan los ingredientes. Se agrega Kappa-carragenina (Rhôe-Poulec) al 5%. Se agita vigorosamente y se agregan lípidos y agua. Se calienta a 80°C en baño maría. Cuando la mezcla está semilíquida se pone en una charola y se refrigera a 4°C y adquiere consistencia gelatinosa. Se corta en pequeños cubos y se liofiliza. Posteriormente se muele y se tamiza. Se almacena en congelación (según Teshima *et al.*, 1982)

2) Dieta pulverizada microligada con zeina

Los ingredientes secos son fraccionados, pulverizados y tamizados. 8g de esta muestra se disuelven con 5g de zeina disuelta en 25ml de etanol. Se mezclan (agitan) vigorosamente. Se calienta en un horno a 40 °C de 24 a 48 hrs. La dieta seca es pulverizada y tamizada a 10-50µm. (Tomado de Kanazawa *et al.*, 1982).

3) Dieta microcubierta con membrana de zeina (en la que se utiliza etanol)

6g de muestra pulverizada se mezclan con 1.2g de zeina disuelta en 74ml de etanol al 76%, se mezclan perfectamente, se añade gota a gota 150ml de agua destilada. Se forman las microcápsulas y son colectadas por centrifugación (1500 rpm, 15 minutos a 0°C). (Tomado de Kanazawa *et al.*, 1982).

4) Dietas microcubiertas con membrana de zeina (en la que se utiliza Na OH)

7g de muestra pulverizada se suspenden en 70 ml de una solución de Na OH, pH 12 que contiene 1.4g de zeina. Se agita en agitador magnético. La suspensión se diluye con 120 ml de agua destilada y se acidifica con ácido acético hasta pH 4.5. Se forman las micropartículas y son colectadas por centrifugación (1500 rpm, 15 minutos a 0°C). (Tomado de Kanazawa *et al.*, 1982).

Nota : La zeina es una proteína del grupo de las prolaminas, características por su baja solubilidad en agua (la zeina es soluble en solución de alcohol al 70%). Esta proteína se encuentra en una proporción elevada dentro de las proteínas presentes en el grano de maíz (Badui, 1994).

