



**Universidad Nacional Autónoma de México**

*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*

03098



**ALIMENTOS ARTIFICIALES CON HIDROLIZADOS  
PROTÉICOS DE ORIGEN MARINO EN LA NUTRICIÓN  
DE LARVAS DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*  
(BONNE, 1931)**

**TESIS**

que para obtener el grado académico de

**Doctor en Ciencias  
(Biología Marina)**

presenta:

**PEDRO PABLO GALLARDO ESPINOSA**

Director de Tesis: Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés

Comite Tutorial:  
M. en C. Angela Sotelo López  
Dra. Ruth Pedroza Islas

Sisal, Yucatán

Junio 2005

m344715



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Marina Experimental en Cd. del Carmen, Campeche de la Facultad de Ciencias de la UNAM y terminado en la Unidad de Docencia e Investigación de la misma dependencia y con sede en Sisal, Yucatán, México, bajo la dirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, en el marco de los proyectos UNAM IN-234596, UNAM IN – 220505 y SEP CONACyT 38193 Y 41513-A1. También con el apoyo de la beca para estudios de doctorado otorgada por el CONACYT (agosto de 2000 a febrero de 2005) y complemento de beca por la DGEP (agosto de 2000 a julio de 2003).

## AGRADECIMIENTOS

Esta parte se puede tornar difícil y caer en la clásica omisión. Por ello, aquellas personas que no estén, vaya mi más sincero agradecimiento.

El sustentante de esta tesis agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Dirección de Estudios de Posgrado de la UNAM, el apoyo otorgado a través de su programa de becas. Agradezco a la Coordinación del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Dr. Martín Merino Ibarra, Gabriela Almaraz, Norma Suazo, Guadalupe Godoy, Diana y Chantal y demás integrantes por todos los apoyos otorgados para la realización y culminación de mis estudios de grado.

Este trabajo fue posible gracias a la participación de numerosas personas e instituciones públicas, así como empresas privadas. Agradezco especialmente a la Dra. Ruth Pedroza y su equipo de trabajo de la Universidad Iberoamericana, la enorme colaboración para la fabricación y caracterización de las dietas microencapsuladas utilizadas en este trabajo. Al Dr. Jaime Vernon de la Universidad Autónoma Metropolitana por su ayuda para la evaluación fisicoquímica de las dietas. A la granja camaronícola de Industrias Pecis S.A. de C.V. de Sisal, Yucatán por la donación de las larvas empleadas en este trabajo. A la empresa Specialty Marine Products LTD de Vancouver, Canadá, por la donación del hidrolizado de krill utilizado en este trabajo. Al Dr. Gerard Cuzon de IFREMER, Tahiti por la donación de ingredientes utilizados en la formulación de las dietas, pero principalmente por su colaboración desinteresada en el seguimiento y discusión de los diferentes experimentos. Un especial agradecimiento al Dr. Roberto Civera Cerecedo y al M. en C. Alfonso Galicia del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por la donación del hidrolizado de langostilla y la información relacionada, Gracias Mil.

Agradezco a la M. en C. Gabriela Palomino (Paloma), gran amiga, por su participación directa en la realización de los experimentos y la calidad de los alimentos vivos que se

emplearon en este trabajo. Así también, a mis amigos, Adriana Paredes, Gemma Martínez, Lalo Brito, por su colaboración y participación en todos los experimentos. A los estudiantes de licenciatura que colaboraron en la medición de algunos indicadores. A la M. en C. Ariadna Sánchez y amiga que colaboró en la medición de enzimas digestivas. A los técnicos académicos de la Unidad, compañeros y amigos.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Carlos Rosas Vázquez, coordinador de la Unidad de Docencia e investigación por su apoyo para la realización de este trabajo, pero principalmente por ser el iniciador de mis andanzas en la investigación y promotor del trabajo en equipo como filosofía de trabajo. Así también, a la Dra. Maite Mascaró, Dr. Xavier Chiapa y demás investigadores de la Unidad por su disposición sincera y franca. Al M. en C. Gabriel Taboada, por ser un gran amigo y compartir mis tristezas y alegrías desde hace muchos años.

Al comité tutorial, M. en C. Angela Sotelo y Dra. Ruth Pedroza que participaron activamente en el seguimiento de los resultados obtenidos durante el transcurso del trabajo de investigación.

A mis revisores de tesis, algunos de ellos amigos de antaño, Dra. Cecilia Vanegas, Dra. Ruth Pedroza, Dr. Nuno Simoes, M. en C. Angela Sotelo y otros que espero fortalecer la amistad, Dr. Ilie Racotta y Dr. Carlos Martínez, por sus sugerencias y comentarios para el mejoramiento de este trabajo, especialmente por su invitación a aprender con las correcciones.

A mi amiga y tutora Gabriela Gaxiola por la confianza y estímulo depositados en mi persona, por creer en mí y por estar abierta al diálogo cuando las cosas se ponían difíciles. Por los consejos brindados durante los momentos más difíciles, pero sobretodo por su enorme lado humano. Gracias Gaby.

Y finalmente a mi pareja de profesión y principalmente de vida, Cristina, por aguantarme y darme el reposo necesario para continuar y sobretodo por darme esa lucecita de vida que es nuestra hija Sofía.

## Lista de abreviaturas.

AG	Acilglicéridos.
AV	Alimento vivo.
CPSP 90%	Concentrado proteico soluble de pescado con 90 % de proteína.
DCPSP	Dieta con hidrolizado de pescado (concentrado proteico soluble de pescado 90 % de proteína).
DCPSPCA	Dieta con hidrolizado de pescado de 3 micrometros de tamaño de partícula (concentrado proteico soluble de pescado 90 % de proteína) más microalgas.
DCPSP3	Dieta con hidrolizado de pescado (concentrado proteico soluble de pescado 90 % de proteína) de 3 micrometros de tamaño de partícula.
DCPSP26	Dieta con hidrolizado de pescado (concentrado proteico soluble de pescado 90 % de proteína) de 26 micrometros de tamaño de partícula.
DHL	Dieta con hidrolizado de langostilla.
DHK	Dieta con hidrolizado de krill.
DME	Dieta microencapsulada sin hidrolizado.
Ef. As.	Eficiencia de Asimilación.
Ef. R.	Eficiencia de respiración.
E <sub>v</sub>	Exuvia
ID	Indice de desarrollo
I	Ingestión
K2	Eficiencia neta de crecimiento
MI	Mysis I
MII	Mysis II
MIII	Mysis III
NV	Nauplio V
P	Producción
PL1	Postlarva 1

PZI	Protozoa I
PZII	Protozoa II
PZIII	Protozoa III
R	Respiración
TEC	Tasa específica de crecimiento
TI	Tasa de ingestión
VO <sub>2</sub>	Consumo de oxígeno

# INDICE GENERAL

<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>13</b>
<b>ANTECEDENTES. ....</b>	<b>19</b>
GENERALIDADES DEL DESARROLLO LARVARIO DE CAMARONES PENEIDOS.....	19
CAMBIOS ONTOGENÉTICOS DE LARVAS DE CAMARONES PENEIDOS.....	21
ONTOGENIA DEL APARATO DIGESTIVO.....	23
CAMBIOS METABÓLICOS DE LARVAS DE CAMARONES PENEIDOS.....	24
ALIMENTOS ARTIFICIALES PARA LARVAS DE CAMARONES PENEIDOS.....	25
<b>OBJETIVO GENERAL. ....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>29</b>
<b>HIPOTESIS. ....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>31</b>
ORIGEN DE LAS LARVAS Y CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO.....	31
DISPOSITIVO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
ELABORACIÓN DE LAS DIETAS.....	34
<i>Proceso de elaboración de las microcapsulas.....</i>	<i>34</i>
<i>Evaluación fisicoquímica.....</i>	<i>35</i>
<i>Evaluación química.....</i>	<i>37</i>
INDICADORES ZOOTÉCNICOS.....	39
<i>Crecimiento.....</i>	<i>39</i>
<i>Índice de desarrollo (I.D.).....</i>	<i>40</i>
<i>Sobrevivencia (%).....</i>	<i>40</i>
INDICADORES DE LA FISIOLÓGÍA DIGESTIVA.....	41
<i>Obtención de muestras.....</i>	<i>41</i>
<i>Obtención del homogenizado.....</i>	<i>41</i>
<i>Enzimas digestivas de las larvas de camarón.....</i>	<i>41</i>
<i>Composición bioquímica.....</i>	<i>43</i>
INDICADORES DE LA FISIOLÓGÍA ENERGÉTICA.....	44
<i>Tasa de ingestión.....</i>	<i>44</i>
<i>Consumo de oxígeno.....</i>	<i>45</i>
<i>Método de evaluación de los parámetros del balance energético.....</i>	<i>46</i>
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	47
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>49</b>
EXPERIMENTO 1: SUSTITUCIÓN PARCIAL DE ALIMENTO VIVO EN MYTIS DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO DE KRILL.....	50
<i>Crecimiento.....</i>	<i>50</i>
<i>Sobrevivencia (%) e Índice de desarrollo (I.D.).....</i>	<i>51</i>
<i>Actividad específica de enzimas digestivas.....</i>	<i>51</i>
<i>Contenido de proteína soluble, colesterol y acilglicéridos.....</i>	<i>54</i>

EXPERIMENTO 2: SUSTITUCIÓN PARCIAL DE ALIMENTO VIVO EN MYSIS DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO DE KRILL E HIDROLIZADO DE LANGOSTILLA.....	56
<i>Crecimiento</i> .....	56
<i>Sobrevivencia e índice de desarrollo</i> .....	57
<i>Actividad específica de enzimas digestivas</i> .....	57
<i>Contenido de proteína soluble total, acilglicéridos y colesterol</i> .....	60
EXPERIMENTO 3: SUSTITUCIÓN TOTAL DE ALIMENTO VIVO EN PROTOZOEAS DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO CPSP 90%.....	62
<i>Crecimiento</i> .....	62
<i>Actividad específica de enzimas digestivas</i> .....	63
EXPERIMENTO 4: SUSTITUCIÓN PARCIAL DE ALIMENTO VIVO EN MYSIS DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO CPSP 90%.....	68
<i>Crecimiento</i> .....	68
<i>Sobrevivencia (%) e índice de desarrollo (ID)</i> .....	69
<i>Actividad específica de enzimas digestivas</i> .....	69
<i>Contenido de proteína soluble, colesterol y acilglicéridos</i> .....	73
EXPERIMENTO 5: SUSTITUCIÓN PARCIAL Y TOTAL DE ALIMENTO VIVO EN MYSIS DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO CPSP 90%.....	76
<i>Crecimiento</i> .....	76
<i>Sobrevivencia (%) e Índice de desarrollo (ID)</i> .....	77
<i>Actividad específica de enzimas digestivas</i> .....	78
<i>Contenido de proteína soluble total, acilglicéridos y colesterol</i> .....	82
<b>DISCUSION</b> .....	<b>85</b>
EFECTO DE LAS DIETAS MICROENCAPSULADAS CON HIDROLIZADOS PROTEICOS SOBRE EL CRECIMIENTO, SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO LARVARIO DE LITOPENAEUS VANNAMEI.....	87
EFECTO DE DIETAS MICROENCAPSULADAS CON HIDROLIZADOS PROTEICOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS LARVAS DE LITOPENAEUS VANNAMEI.....	89
<b>CAPITULO II</b> .....	<b>97</b>
CONTENIDO DE ENERGÍA DE LAS LARVAS.....	98
EXPERIMENTO 1: SUSTITUCIÓN PARCIAL DE ALIMENTO VIVO EN MYSIS DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO DE KRILL.....	98
<i>Crecimiento</i> .....	98
<i>Tasa de ingestión (TI) de microalgas y Artemia sp</i> .....	99
<i>Consumo de oxígeno</i> .....	102
<i>Balance energético</i> .....	102
EXPERIMENTO 2: SUSTITUCIÓN PARCIAL DE ALIMENTO VIVO EN MYSIS DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO DE KRILL E HIDROLIZADO DE LANGOSTILLA.....	104
<i>Crecimiento</i> .....	104
<i>Tasa de ingestión de microalgas y Artemia sp</i> .....	105
<i>Consumo de oxígeno</i> .....	107
<i>Balance energético</i> .....	108
EXPERIMENTO 3: SUSTITUCIÓN TOTAL DE ALIMENTO VIVO EN PROTOZOEAS DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO CPSP 90%.....	110
<i>Crecimiento</i> .....	110
<i>Tasas de ingestión</i> .....	111
<i>Consumo de oxígeno</i> .....	113
<i>Balance energético</i> .....	113
EXPERIMENTO 4: SUSTITUCIÓN PARCIAL DE ALIMENTO VIVO EN MYSIS DE Litopenaeus	
vannamei: EFECTO DEL HIDROLIZADO CPSP 90%.....	115

<i>Crecimiento</i> .....	115
<i>Tasas de ingestión (TI) de microalgas y Artemia sp</i> .....	116
<i>Consumo de oxígeno</i> .....	118
<i>Balance energético</i> .....	119
EXPERIMENTO 5: SUSTITUCIÓN PARCIAL Y TOTAL DE ALIMENTO VIVO EN MYDIA DE LITOPENAEUS	
VANNAMEI: EFECTO DEL HIDROLIZADO CPSP 90%.....	121
<i>Crecimiento</i> .....	121
<i>Tasa de ingestión (TI) de microalgas y Artemia sp</i> .....	122
<i>Consumo de oxígeno</i> .....	125
<i>Balance energético</i> .....	126
<b>DISCUSION</b> .....	<b>128</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>135</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>136</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>137</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>144</b>

## RESUMEN.

El presente trabajo fue diseñado para evaluar el efecto de hidrolizados proteicos de origen marino a través de dietas microencapsuladas para reemplazar al alimento vivo en larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Hidrolizados de Krill (*Euphausia superba*), de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y de pescado CPSP 90% (Concentrado Proteico soluble de pescado, 90% de proteína) fueron incorporados en diferentes alimentos microencapsulados, sustituyendo a la harina de calamar en la formulación de un alimento microparticulado probado en un trabajo previo y fueron comparadas tanto con alimento microencapsulado sin hidrolizado como con un régimen de alimento vivo que funcionaron como tratamientos controles (microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii* y nauplios de *Artemia* sp). La valoración fisicoquímica y las condiciones de producción de los alimentos microencapsulados fueron registradas antes de su evaluación en bioensayos. Su efecto sobre respuestas zootécnicas (crecimiento, sobrevivencia y desarrollo), de la fisiología (actividad específica de enzimas digestivas: proteasas totales, tripsina, quimotripsina,  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa), así como indicadores bioquímicos (contenido de proteína total, acilglicéridos y colesterol) y de la fisiología energética (consumo de oxígeno, tasas de ingestión y balance energético) fue evaluado. Los resultados obtenidos señalan que las dietas conteniendo los hidrolizados fueron capaces de generar crecimientos, desarrollos y sobrevivencias similares a los obtenidos con el régimen de alimentos vivos en el estadio de mysis, cuando las dietas artificiales fueron acompañadas de microalgas en experimentos de sustitución de los nauplios de *Artemia* sp, aunque entre las dietas artificiales probadas los mejores resultados fueron mostrados por las larvas mantenidas con las dietas conteniendo CPSP 90% de proteína tanto en la sustitución de los nauplios de *Artemia* sp (DCPSP) como de todo el alimento vivo (DCPSP3 y DCPSP26). En la evaluación de las enzimas digestivas, mejores resultados fueron observados con las dietas conteniendo los hidrolizados, observándose un incremento significativo en la actividad enzimática con relación a las dietas sin hidrolizado y similares a las obtenidas con la dieta de régimen de alimentos vivos. Estos resultados de actividad enzimática asociados a los crecimientos obtenidos y traducidos en las altas sobrevivencias observadas pueden ser considerados como parte de un efecto secretagogo generado por los hidrolizados presentes en las dietas. Mientras que con las dietas conteniendo el hidrolizado de krill (DHK), los contenidos de

proteína soluble fueron significativamente más bajos con relación al mostrado por las larvas del régimen de alimento vivo (AV), las larvas mantenidas con las dietas con hidrolizado de langostilla y las mantenidas con la dieta con CPSP 90% no mostraron diferencias con respecto al AV. Con relación a los indicadores de la fisiología energética evaluados, tasas de ingestión de microalgas significativamente mayores fueron observadas con la presencia de los nauplios de *Artemia sp.* (AV), mientras que los consumos de oxígeno fueron disminuyendo de manera gradual hacia el final de las fases larvales estudiadas, conforme los organismos avanzaban en su desarrollo en todos los tratamientos evaluados, destacándose picos de consumo entre PZIII y MI y entre MIII y PL1, subestadios reconocidos como críticos en el desarrollo larval. Los modelos de balance energético permitieron visualizar las estrategias adoptadas por los organismos en la repartición de energía, observándose eficiencias netas de asimilación de energía por las larvas mantenidas con las dietas artificiales, comparables a las mostradas con el régimen de AV. En el experimento de sustitución total de alimento vivo para toda la fase larval, microcápsulas de 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula con CPSP 90% (DCPSP3), fueron capaces de generar crecimientos y porcentajes de sobrevivencia, así como indicadores de la fisiología digestiva y energética comparables al régimen de alimentos vivos, mostrando una mayor eficiencia neta de asimilación, considerando que en términos energéticos, la energía ingerida estimada fue 4.6 veces inferior a la ofrecida con el AV. Sin embargo, aunque un retraso de 24 horas fue observado hacia el final del experimento para arribar a PL1 en las larvas alimentadas únicamente con la dieta artificial (DCPSP), la sobrevivencia y el crecimiento obtenido con este tratamiento fue similar al observado con el régimen de AV, así como las repuestas fisiológicas y bioquímicas analizadas. La conclusión general es que las dietas conteniendo los hidrolizados proteicos pueden reemplazar satisfactoriamente al alimento vivo comúnmente utilizado en la cría larvaria de *Litopenaesus vannamei*, actuando como alimentos funcionales que promueven un equilibrio entre el estado de salud de los organismos y un buen funcionamiento de los procesos fisiológicos importantes para su óptimo crecimiento.

# ABSTRACT

The present work was designed to evaluation of effect of marine protein hydrolysates through microencapsulated diets to replacement live food to fed *Litopenaeus vannamei* larvae. Krill hydrolysate (*Euphausia superba*), red crab (*Langostilla*) hydrolysate (*Pleuroncodes planipes*) and fish hydrolysate CPSP 90% (concentrate of soluble protein of fish with 90 % protein) were incorporate to microencapsulated diets, replacing to meal squid in microparticulated diet previus test in *L. setiferus* larvae, and comparated with controls treatments (microencapsulated diet without hydrolysate and live food regimen: *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii* and *Artemia sp* nauplii). The physicochemical and production conditions of microencapsulateds foods were register previous experiments. The zootechnical responses (growth, survival and development), digestive physiology (specific activity of digestive enzymes: total proteases, trypsin, chymotrypsin, amylase and glucosidase), biochemical indicators (soluble protein, acylglycerides and cholesterol contents) and energetic physiology (oxygen consumption, ingestion rate and energetic budget) was evaluated. The results show that the artificial diets with protein hydrolysates produced growth, developments and survivals similar to mysis larvae fed with live food, when are use in combination with microalgae (experiments to replacement *Artemia sp* nauplii), and the better results were show with microencapsulated diet containing CPSP 90%, in partially (DCPSP) and total (DCPSP3 and DCPSP26) replacement live food. A increment in specific activity of digestive enzymes was observed with diets containing protein hydrolysates, to regard live food regimen. These results, associated to growth and survival obtained, can be considerate a segregatogue effect produced by presence of protein hydrolysates in artificial diets. Low value of soluble protein content was showed for larvae fed with artificial diet with krill hydrolysate, but larvae fed with artificial diets containing red crab hydrolysate and fed with diet with CPSP 90% was similar to showed for larvae fed with live food regimen. A decreased in acilglycerides and cholesterol was similar both larvae fed with artificial diets and live food regimen. To respect a energetic physiology, a significantly major microalgae ingestion rates was observed in larvae fed only live food, and oxygen consumption was decrease during substages of larval development in all treatments, with consumptions peaks between PZIII and MI, critical substages during larval

development. The models of energetic budget showed the strategy in energy partitioning by larvae fed artificial diets, similar to live food regimen. In the total replacement live food during all larval development, larvae fed microcapsulated diet with CPSP 90% of 3  $\mu\text{m}$  particle size (DCPSP3), showed growth and survival, and physiology energetic indicators similar to larvae fed with live food regimen, with major net assimilation efficiency, but, the energy provided was 4.6 minor to offer with live food regimen. However, a delayed in 24 hours in development time was observed to PL1 for larvae fed only with artificial diet (DCPSP), the survival and growth obtained with this treatment was similar to observed in larvae fed live food regimen, as was as physiological and biochemical responses. The general conclusion is that artificial diets containing protein hydrolysates can replace the satisfactory to live food use in the *L. vannamei* larval culture, how functional foods that promotion equilibrium in health state of organism and adequate function of physiology process important for optimal growth.

## INTRODUCCION.

El uso de alimentos artificiales en las larvas de camarón ha sido una de las constantes en la industria de la fabricación de alimentos en la acuicultura debido principalmente a la enorme necesidad de la eliminación de cultivos paralelos como son los cultivos de microalgas y los nauplios de *Artemia sp*, necesarios para la alimentación durante esta fase del ciclo de vida de estos organismos (Jones, 1998).

La producción de alimentos vivos paralelos al cultivo larvario incrementa los costos en las granjas de producción de camarón. Estos cultivos requieren un manejo delicado en el sentido de estar sujetos a la contaminación por bacterias o protozoarios que pueden resultar patógenos para las algas y para las larvas en el tanque de cultivo, sobretodo cuando no son suministrados adecuadamente al tanque de cría larvaria o las condiciones del laboratorio no cumplen los requisitos de calidad para la producción de estos alimento vivos. Estos factores por sí solos o en su conjunto provocan un déficit de alimento en los laboratorios de crianza en las granjas de camarón. Asimismo, una concentración, calidad y especie no adecuada del alimento vivo en la cría larvaria conlleva a una mala nutrición para las larvas provocando una deficiencia nutrimental en los organismos, un debilitamiento y una disminución del éxito en el posterior ciclo de cultivo del camarón (precría y engorda) en las granjas de cultivo.

La utilización de alimentos artificiales en el cultivo de las fases larvarias de organismos acuáticos y de manera particular los camarones peneidos, ha sido justificada por los altos costos y riesgos en la producción de alimentos vivos (Jones, *et al.* , 1993, Kanazawa *et al.*, 1982,1989; Kurmaly *et al.*, 1989; Vergara, 1990, Chu, 1991; Chitradivelu, 1992).

La importancia del uso de fuentes nutritivas adecuadas en la formulación de dietas artificiales redundan en el éxito que se tenga en el cultivo de las larvas. Paralelamente, es necesario considerar los cambios fisiológicos, bioquímicos y comportamentales que ocurren a lo largo del desarrollo larvario de camarones peneidos. Además de cubrir los requerimientos nutrimentales de las especies potenciales y actualmente cultivadas, las dietas artificiales deben presentar características fisicoquímicas tales como tamaño de

partícula adecuado, tiempo de disolución, flotabilidad, etc., fundamentales para el éxito en el cultivo larvario. Aunado a ello, es necesario seguir investigando en términos del proceso de digestibilidad, absorción y asimilación de las dietas. Para ello se han realizado algunos estudios del uso de hidrolizados de origen proteico sustituyendo parcial o totalmente el tradicional uso de harina de pescado en la formulación de alimentos artificiales (Ravallec Ple, 2000).

Los hidrolizados proteicos son productos obtenidos por hidrólisis limitada de proteínas, ya sea por proteinasas endógenas o intencionalmente adicionadas. La hidrólisis limitada produce péptidos solubles que son fácilmente separados de otros materiales tisulares, tales como lípidos, huesos y tejido conectivo por medios físicos tales como la filtración o la centrifugación. El desarrollo del concepto de grado de hidrólisis hecho por el Dr. Jens Adler-Nissen (Novo Industry AS Dinamarca) en 1986 dio sostén para la producción de hidrolizados con propiedades funcionales deseables en el laboratorio y la industria.

Algunos experimentos han demostrado las ventajas de la sustitución de harinas de pescado por hidrolizados proteicos. En peces ha sido probada con éxito la sustitución parcial de harina de pescado por hidrolizado proteico en alimento artificial para larvas de peces (Cahu, *et al.*, 1999). Las larvas de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) exhiben una alta actividad de peptidasas (Cahu y Zambonino-Infante, 1997) y se asume que los hidrolizados proteicos pueden ser usados de manera eficiente en la nutrición de las larvas (Cahu *et al.*, 1999). El efecto benéfico de los hidrolizados proteicos también ha sido reportado para carpa dorada (Szlaminska *et al.*, 1991) y la carpa común (Carvalho, *et al.*, 1998). Un mejoramiento de la sobrevivencia fue observado cuando se agregó un hidrolizado proveniente de la caseína (Cahu y Zambonino-Infante, 1995).

Para larvas de peces ha sido demostrado el efecto benéfico de los hidrolizados a través de concentrados proteicos solubles de pescado con diferentes concentraciones de proteína (CPSP 70, 80 y 90%), específicamente en relación con la promoción de la secreción de las enzimas producidas en el páncreas y esta secreción se produce cronológicamente después de los mecanismos de síntesis, como en todos los vertebrados. Cahu y Zambonino-Infante

(1994) observaron que este mecanismo se vio afectado por el cambio de alimento vivo a alimento peletizado en la lubina

En la presente investigación se pretende utilizar hidrolizados y comparar su eficiencia a la obtenida por alimento vivo en la alimentación de la fase larvaria en el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. En general para alimentar a estos organismos existe, además de diversas combinaciones de alimentos vivos (microalgas, rotíferos y *Artemia*), dos formas de presentación de los alimentos artificiales: micropartículas y microcápsulas.

La forma de presentación de los hidrolizados, ya sea en micropartículas y/o microcápsulas podría ser una alternativa para mejorar la asimilación de estos alimentos por parte de las larvas. Chitradivelu (1992) señala que existe un amplio rango de dietas para larvas de camarón que incluyen la sustitución parcial del alimento vivo por alimento microparticulado o microencapsulado. Amjad *et al* (1992), han demostrado una fuerte correlación entre el crecimiento y la sobrevivencia de las larvas y la estabilidad de los alimentos artificiales en el agua, más que con el contenido nutrimental y el tamaño de partícula de los alimentos. Las dietas encapsuladas han alcanzado una menor lixiviación y un tamaño de partícula más aceptable con altos contenidos orgánicos. Con la microencapsulación se pretende atender las necesidades de desarrollo de tecnologías que eliminen o disminuyan las dificultades que representa la alimentación de la fase larvaria, considerando que las funciones de la microencapsulación son: .protección de deterioros por efecto del oxígeno y otros gases, control de la transmisión de humedad, manejo de materiales líquidos y sólidos, control sobre la liberación del material microencapsulado y protección contra la contaminación microbiana. El tipo de microcápsulas que se requiere depende del método de alimentación. Tanto para larvas como para adultos, las cápsulas deben ser rotas mecánicamente para permitir que el contenido sea ingerido o bien ser susceptibles de hidrólisis enzimática.

Se ha señalado que sin importar cual sea el proceso de fabricación, las dietas deben de cubrir los siguientes criterios: 1) Aceptabilidad, es decir, las partículas deben tener el tamaño adecuado, disponibilidad en el agua a una densidad similar a la de los alimentos

vivos e ingeridas a una tasa similar; 2) estabilidad, las dietas formuladas deben permanecer estables con la mínima pérdida por lavado y ser rotas hasta que se ingieran; 3) digestibilidad, las dietas deben ser digeribles y asimilables; 4) contenido nutrimental similar al alimento vivo y 5) almacenamiento con cualidades adecuadas (12 meses).

Hay varios métodos para microencapsular y el secado por aspersión es uno de los más utilizados actualmente. Su principio es la producción de polvo seco por medio de la atomización de una emulsión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la emulsión, quede atrapado en una película de material encapsulante (Masters, 1985).

Este sistema se ha utilizado en la deshidratación de cultivos del alga *Tetraselmis suecica* para alimentar a larvas de *L. vannamei*, encontrando que el alga seca podía utilizarse sustituyendo hasta en un 75% al alimento vivo y también se ha utilizado como alimento de bivalvos (Lang y Gil, 1991).

Uno de los factores de mayor relevancia en la encapsulación utilizando este sistema es el material que constituye la pared de la microcápsula. Para ello se han utilizado diferentes polímeros de grado alimenticio como son la goma acacia, almidones, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz, etc. Sin embargo, ningún material por si solo muestra un comportamiento ideal. Recientemente se ha empleado la goma de mezquite para resolver este problema, ya que ha sido capaz de estabilizar eficientemente las emulsiones acuosas (Vernon *et al*, 1999).

Además de lo anterior debe contarse con una metodología para la evaluación de las microcápsulas obtenidas, para determinar su potencial de éxito antes de ser ofrecidas como alimento para las larvas. Es decir, evaluar sus características o factores como su disolución en agua, lavado de nutrimentos, tasa de sedimentación, morfología y propiedades de conservación (Pedroza, 2000).

Subsecuentemente, se deben realizar bioensayos con organismos que validen el uso de los alimentos artificiales. Esto se puede lograr a través de ensayos con larvas de camarón, de tal manera que la sobrevivencia, desarrollo y crecimiento indiquen los mejores alimentos. Asimismo, Cahu *et al* (1999), mencionan que los hidrolizados son promotores de la actividad de las enzimas digestivas, especialmente las proteinasas, por lo tanto se evaluarán las actividades de estas durante el desarrollo larvario para constatar el efecto inductor de estas fuentes de proteína. A través del crecimiento y la sobrevivencia se podrá determinar si son factores de crecimiento para las larvas de camarón, como lo han sido para las larvas de peces.

Así también, se evaluarán los contenidos de proteína soluble, colesterol y acilglicéridos (AG) en los diferentes subestadios como indicadores de la calidad larvaria ante los diferentes tratamientos de alimentación (Palacios, 1999; Fraser, 1989). Se sabe que en las larvas de los camarones peneidos y de peces, las primeras fases del ciclo de vida dependen en gran medida de las reservas energéticas endógenas. La mayor parte de esta energía endógena está en la forma de triacilglicerol. Esta energía es aportada subsecuentemente por fuentes exógenas. Cuando esta energía excede las demandas metabólicas de las larvas es almacenada en forma de TAG. Se ha observado que las reservas de TAG, son utilizadas cuando el aporte de energía exógena vía el alimento es insuficiente en larvas de peces y crustáceos (Fraser, 1989).

El consumo de oxígeno y las tasa de ingestión han sido considerados indicadores importantes para la evaluación de diferentes dietas en larvas de *L. setiferus* y *Penaeus monodon* (Rosas *et al*, 1995; Loya y Javellana, 1989) y su efecto sobre el balance energético (Kurmalay *et al*, 1989). La estimación de un balance energético en larvas de *F. paulensis* por Lemos y Phan (2001), permite entender como la energía proveniente del alimento es canalizada a la respiración, crecimiento, exuvia, etc. La estimación de las eficiencias metabólicas como la eficiencia bruta y eficiencia neta, permiten dilucidar cuanta energía aporta cada tipo de alimento suministrado a los diferentes subestadios larvales y puede ser utilizado como una herramienta para establecer los requerimientos energéticos durante la alimentación de las larvas de peneidos (Rosas, 1995). Una estimación de los

componentes del balance energético fue realizada con cada uno de los alimentos utilizados en esta investigación y con base en la cantidad de energía aportada por cada entidad alimenticia fue diseñado el experimento de sustitución total del alimento vivo por alimento artificial.

## ANTECEDENTES.

### ***Generalidades del desarrollo larvario de camarones peneidos.***

En el cultivo de larvas de peneidos ha sido una práctica generalizada el uso de microalgas como alimento en los estadios de protozoa, y el suministro de alimento de origen animal, generalmente nauplios de *Artemia spp*, o rotíferos durante los estadios de mysis y postlarvas, sugiriendo esta práctica un cambio en los hábitos alimenticios de herbívoro a carnívoro u omnívoro durante el desarrollo larval (Alfonso *et al*, 1988; Amjad y Jones, 1992; Gallardo *et al*, 1995; Jones, 1997; Gallardo, 2000; Gallardo *et al*, 2002).

Las larvas de *Litopenaeus vannamei* presentan 3 estadios larvarios con diferentes subestadios después de la eclosión: estadio naupliar (NI a NV), estadio de protozoa (PZI a PZIII) y estadio de mysis (MI a MIII). Los 5 subestadios naupliares no presentan una alimentación exógena, y su nutrición depende de las reservas vitelogenicas provenientes del huevo, constituido principalmente de lipoproteínas. A partir de PZI, las larvas comienzan a alimentarse de microalgas de tamaños menores a 6 micrómetros y es una práctica común el uso de diatomeas como alimento de inicio en los cultivos larvarios (Mc Vey, 1996; Alfonso *et al*, 1988). Las principales especies utilizadas tanto a escala experimental como comercial son del genero *Chaetoceros spp*, aunque otras especies han sido empleadas como las del genero *Skeletonema spp* (Kuban, 1984). Así también, se ha señalado que la combinación de diatomeas con flagelados dan mejores resultados, destacando las especies del genero *Tetraselmis spp* con tamaños que varían de acuerdo a la especie y van desde 14 a 26 micrometros. El uso de flagelados ha sido planteado a partir de PZII en larvas de *L. schmitti* (Alfonso *et al*, 1988) y de *L. setiferus* (Gallardo *et al*, 1995). En cambio en *L. vannamei* ha sido indicado desde PZI por Trecece y Yates (1990).

La incorporación de elementos zooplanctonicos ha sido sustentando por las demandas de proteina de origen animal hacia el final del estadio de protozoa, siendo los nauplios de *Artemia spp*, los mas utilizados. Los requerimientos varían de acuerdo a las diferentes especies de camarones cultivados. Así, en el caso de *L. vannamei*, *L setiferus* y *L schmitti*, concentraciones no mayores a 2 nauplios por ml son recomendadas (Alfonso *et al*, 1988;

Gallardo *et al*, 1995 y Trecce and Yates, 1990). Sin embargo, en trabajos experimentales, concentraciones de 4 a 6 nauplios por ml han sido utilizadas en *P. monodon* (Kurmaly *et al*, 1989) y *F. brasiliensis* (Palma, 2002), sugiriendo un hábito más carnívoro de estas especies.

El cambio de herbivoría a omnivoría está acompañado de modificaciones tanto morfológicas como fisiológicas, así como de comportamiento (Lovett y Felder, 1989; Gallardo *et al*, 1995; Rosas *et al*, 1995). La aparición de un molino gástrico para el fraccionamiento de las partículas alimenticias en MI, así como el inicio de la formación de la glándula digestiva, acompañada de una alta actividad proteolítica entre PZIII y MI en larvas de *L. setiferus* (Lovett y Felder, 1989, 1990) y en *L. vannamei* (Pedroza, 2004), son acompañadas de un incremento en la tasa respiratoria (Rosas *et al*, 1995) y tasa de ingestión de las larvas de estas especies (Gallardo *et al*, 1995, Rosas *et al*, 1995; Gallardo *et al*, 2002). Al mismo tiempo, al arribar al estadio de mysis, las larvas comienzan a nadar por contracciones, cambiando el desplazamiento hacia delante durante la fase de protozoa. Estos cambios implican un paso crítico de un estadio a otro y reflejan una serie de procesos adaptativos de la vida planctónica de los camarones peneidos para incrementar su espectro alimentario (Anger, 2001). Otro aspecto importante es la evolución de las enzimas digestivas durante el desarrollo larval. Así mientras que la actividad proteolítica tiene picos de actividad entre PZIII y MII en larvas de *L. setiferus* (Lovett y Felder, 1990) y *L. vannamei* (Pedroza *et al*, 2004) y disminuye hacia PL1, incrementándose después de PL2 (Lovett y Felder, 1990), la actividad de esterasas va disminuyendo conforme avanzan los subestadios larvales (Lovett y Felder, 1990). En el caso de la amilasa, picos de actividad han sido encontrados en el subestadio de MII de larvas de *L. setiferus* (Lovett y Felder, 1990).

En general, la depresión de la actividad enzimática y de la tasa metabólica en larvas de *L. setiferus* (Rosas *et al*, 1995; Lovett y Felder, 1990) han sido relacionados como una estrategia adaptativa hacia la vida bentónica en la fase de postlarva, implicando el resguardo de energía para afrontar la última muda metamórfica. Así, puede señalarse que las larvas de camarones peneidos de tétlico abierto como lo son *L. vannamei* y *L. setiferus*,

presentan dos pasos críticos durante su desarrollo (de PZIII a MI y de MIII a PL1) y deben ser considerados para la optimización de su cultivo, adquiriendo especial relevancia el régimen de alimentación, tanto en su calidad como cantidad a suministrar.

### ***Cambios ontogenéticos de larvas de camarones peneidos.***

La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre la actividad de las enzimas digestivas de los camarones peneidos se han enfocado a los estadios larvales o adultos, con pocas referencias a los primeros estadios de desarrollo postlarval (Lovett y Felder, 1990; González *et al.*, 1994; Lemos y Rodríguez, 1998).

Considerando la fase larval, Kumlu y Jones (1995a) han demostrado que la actividad enzimática, el crecimiento y la sobrevivencia a postlarva de *Fenneropenaeus indicus* se incrementa en presencia del alimento vivo, en comparación con el uso de dietas artificiales solas. Estos autores mencionan que los nauplios de *Artemia spp*, pueden presentar enzimas autolíticas que pudieran facilitar el proceso digestivo.

Varios autores han encontrado un pico de actividad de diferentes enzimas digestivas en los estadios de protozoa a mysis, disminuyendo la actividad en los primeros estadios postlarvales con una tendencia a aumentar la actividad de las enzimas a partir de PL5 (Lovett y Felder, 1990; Kumlu y Jones, 1995; Lemos y Phan, 2001; Pedroza *et al*, 2004). Este patrón general de variaciones en la actividad de las enzimas digestivas ha sido relacionado con el desarrollo ontogenético y es independiente del tipo de alimento suministrado.

Se ha encontrado en diversos peneidos una relación entre el tipo de alimento y la actividad de las enzimas digestivas en los diferentes estadios de desarrollo larval y postlarval. Se ha observado que las larvas secretan mayores niveles de enzima cuando los nutrientes de la dieta, tales como las proteínas, son escasos o poco digeribles (Le Moullac *et al.*, 1994; Kumlu y Jones, 1995).

Por otro lado, estudios llevados a cabo con larva de *L. vannamei* (Le Moullac *et al.*, 1996), han demostrado que la actividad específica de la tripsina aumenta según los niveles de caseína en la dieta sin cambios aparentes en los patrones isoenzimáticos. Así mismo, estos autores observaron que la actividad de la amilasa es inversamente proporcional al aumento de la caseína en la dieta con variaciones importantes de los patrones de expresión genética de las enzimas. Aunque los mecanismos de regulación de la caseína sobre la expresión genética se encuentran aún en discusión es evidente que para esta especie una concentración elevada de caseína afecta la capacidad bioquímica de los camarones para aprovechar el alimento ingerido de manera adecuada (Le Moullac *et al.*, 1996).

En los últimos años, la fabricación de dietas para larvas de camarón ha sido ligada a los trabajos relacionados con la fisiología de las principales especies de interés comercial (Jones *et al.*, 1995, Jones, 1998). Así, se ha logrado establecer los principales cambios que ocurren sobre el desarrollo ontogenético del aparato digestivo en las larvas de camarones peneidos, el cual va presentando modificaciones fisiológicas y bioquímicas importantes con respecto a la selección y procesamiento del alimento (Rosas *et al.*, 1995; Rosas *et al.*, 1997; Lovett y Felder, 1989, 1990). En los primeros subestadios larvales, las larvas presentan un tubo digestivo indiferenciado, en el cual se lleva a cabo el proceso de digestión y absorción de los nutrientes. En este tubo indiferenciado, se ha logrado establecer una región en la que se da el mayor proceso de digestión y absorción de los nutrientes el cual ha sido denominado intestino medio, que da lugar posteriormente a la glándula digestiva (Lovett y Felder, 1989). El principal alimento ingerido durante esta fase del ciclo de vida es de origen fitoplanctónico. Sin embargo, a medida que las larvas se van desarrollando van conformando un tubo digestivo más diferenciado, con una mayor actividad de las principales enzimas digestivas, de las cuales las proteolíticas juegan un papel fundamental cuando las larvas comienzan a ingerir elementos zooplanctónicos (normalmente entre protozoa III y mysis I). De estas enzimas proteolíticas la más importante (representando casi el 80 %) es la tripsina (Jones, 1998).

En diversos peneidos se ha encontrado una relación entre el tipo de alimento y la actividad de las enzimas digestivas en los diferentes estadios de desarrollo larval y postlarval. Se ha

observado que las larvas secretan mayores niveles de enzima cuando los nutrientes de la dieta tales como las proteínas son escasos o poco digeribles (Kumlu y Jones, 1995; Le Moullac y Van Wormhoudt, 1994; Le Vay *et al.*, 1993a y 1993b; Kumlu *et al.*, 1992).

Las variaciones que ocurren en la actividad de las enzimas digestivas de los peneidos han sido relacionados con los cambios ontogenéticos del tracto digestivo (Lovett y Felder, 1990) así como con la cantidad o calidad de algún componente de la dieta (Le Vay *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1994; Le Moullac *et al.*, 1996; Lemos y Rodríguez, 1998).

### ***Ontogenia del aparato digestivo.***

Las larvas al eclosionar no presentan una boca funcional ya que carecen de ano, el cual aparece después de 2 o 3 mudas. Durante la fase naupliar su alimentación esta restringida al usos de sus reservas energéticas provistas del vitelo del huevo (lipoproteínas). Presentan una mandíbula para triturar el alimento, y un tracto digestivo dividido en 3 regiones: el estomoideo, el mesenterón y el proctoideo. El mesenterón o intestino medio es un sitio de producción y excreción enzimática, absorción y almacenamiento, que abarca un tronco medio y varios plegamientos (ciegos y ventrículos) que llegan a formar la glándula digestiva o hepatopancreas (a partir de protozoa III – mysis I). Durante el desarrollo ontogenético del sistema digestivo, las larvas experimentan varias transformaciones como la aparición de un par de ciegos anteriores que se ubican en la unión del estomoideo con el tubo del intestino medio y un par de ciegos laterales (Lovett y Felder, 1990).

Hacia el final del estadio de protozoa los dos ciegos anteriores decrecen su tamaño, se fusionan y dan origen al divertículo anterior del intestino medio. Así, se da el inicio de la formación de la glándula digestiva, misma que después de una serie de ramificaciones y hasta la 3ª semana (después de postlarva 35, PL35) termina de adquirir la forma y función presente en los adultos (Lovett y Felder, 1990).

Las principales funciones del intestino medio, además de la absorción de nutrientes de los alimentos ya digeridos, son el intercambio de iones y el control de flujo de agua entre el

lumen del intestino medio y la hemolinfa, así como la formación de la membrana peritrófica (Dall y Moriarty, 1983).

Durante el estadio de mysis se forma un molino gástrico con unos dientes bien desarrollados, coincidiendo con un cambio de hábitos alimenticios, incorporando a su alimentación proteína de origen animal a través del zooplancton, asociado a sus demandas nutrimentales (Lovett y Felder, 1989, 1990; Kumlu y Jones, 1995, Jones, 1998).

Palacios *et al*, 1998, menciona la importancia que adquiere la condición de los nauplios producidos de progenitores de diferentes condiciones de cultivo. Estos autores proponen un índice de condición de los nauplios en relación al contenido de acilglicéridos, mismo que disminuye conforme los días posteriores a la ablación de las hembras. La calidad del alimento, así como las condiciones de manejo de la cría larvaria y el origen de los nauplios están estrechamente relacionadas para el éxito en la sobrevivencia y desarrollo hacia la fase de postlarva. En larvas de *L. schmitti* (De la Cruz, 1988) y *L. setiferus*, (Gallardo *et al*, 1995) han propuesto índices de calidad con base en pruebas de estrés salino, encontrando estos autores una mayor sobrevivencia en larvas sometidas a condiciones óptimas de alimentación.

### ***Cambios metabólicos de larvas de camarones peneidos.***

En muchas postlarvas de peneidos se ha relacionado el estado fisiológico (consumo de oxígeno) con factores ambientales tales como la temperatura, la salinidad y la concentración de oxígeno disuelto en el medio (Licop, 1984; Chu y Ovsianico-Koulikovsky, 1994; Villarreal *et al.*, 1994; Rosas *et al.*, 1997a). Sin embargo, pocos estudios han estado enfocados a analizar la relación entre el consumo de oxígeno y la dieta o el estado nutrimental de los primeros estadios postlarvales de los peneidos aun cuando esta etapa resulta crítica tanto para comprender los mecanismos involucrados en el reclutamiento a los sistemas estuarinos como para asegurar una buena sobrevivencia durante el cultivo (Kurmaly *et al.*, 1989; Chu y Ovsianico-Koulikowsky, 1994; Rosas *et al.*, 1995; Gallardo, 2000, Gallardo *et al*, 2003). Mas aun, ha habido pocos estudios de los cambios metabólicos que ocurren durante el desarrollo larval asociados a diferentes

regímenes de alimentación o tipos de alimentos (Rosas *et al*, 1995, Lemos y Phan, 2001, Gallardo *et al*, 2003).

El consumo de oxígeno en larvas de *L. setiferus* ha sido estrechamente relacionado con la concentración y el tipo de alimento vivo o artificial (Rosas *et al*, 1995, Gallardo, 2000, Gallardo *et al*, 2003). Se ha observado que a medida que las larvas avanzan en su desarrollo, las demandas de oxígeno se incrementan como reflejo de la energía canalizada en gran medida en las modificaciones en su sistema digestivo y de comportamiento alimentario al pasar de un hábito herbívoro a omnívoro entre el estadio de protozoa a mysis (Gallardo, 2000, Rosas, *et al*, 1995, Palomino, 1997).

Los cambios ontogenéticos en el metabolismo respiratorio de larvas de *L. setiferus* y *L. schmitti* mantenidas en condiciones óptimas de alimentación han sido descritos por Rosas *et al*. (1997). En estos peneidos se ha encontrado una relación estrecha entre el consumo de oxígeno de las larvas y el tipo de alimento. Se observó que las larvas de ambas especies pueden mantener constante la tasa metabólica en protozoa II y III como una estrategia para la acumulación de energía que será utilizada durante el paso a mysis I, estadio en el cual se producen fuertes cambios morfológicos y de comportamiento. Los resultados indican que, dependiendo del estadio de desarrollo, las larvas son capaces de aumentar o disminuir la tasa metabólica con el fin de aprovechar al máximo el alimento.

### ***Alimentos artificiales para larvas de camarones peneidos.***

En los últimos años, varias dietas han sido desarrolladas para la sustitución del alimento vivo en larvas de peneidos (Jones *et al.*, 1993; Shin-ichi *et al.*, 1982, 1993; Bautista *et al.*, 1991), peces (Jones *et al.*, 1993); moluscos (Vergara, 1990) y jaibas (Maeda *et al.*, 1992). El concepto del reemplazo del alimento vivo en el cultivo larvario ha sido sostenido en las últimas dos décadas y ha sido dirigido en el sentido de simplificar los regímenes de alimentación en los laboratorios de crianza, así como investigar la nutrición y el proceso de alimentación en las especies de mayor importancia comercial (Jones *et al*, 1998). El desarrollo de alimentos artificiales en crustáceos, peces y algunos bivalvos, no solo ha

facilitado la investigación de la ingestión, digestión y requerimientos energéticos, sino en el conocimiento de los principales requerimientos nutricionales (Jones, 1998).

Aunque los nauplios de *Artemia* han sido ampliamente utilizados para el cultivo de larvas de peneidos (Sorgeloos *et al.*, 1998), desde principios de la década del 70 se han realizado numerosos intentos para sustituirlos por alimento artificial. A pesar de que la sustitución parcial del alimento vivo por alimento artificial constituye una práctica rutinaria, cuando se reemplaza totalmente el alimento vivo se obtienen generalmente menores crecimientos, lo que significa que hasta el momento ningún tipo de alimento artificial cubre totalmente los requerimientos nutrimentales de las fases larvarias de camarón (Jones, 1998).

En este sentido se ha observado que la inclusión de alimento vivo en las dietas e incluso la adición de pequeñas proporciones de algas a los alimentos artificiales promueve la actividad de las enzimas digestivas, la asimilación de la dieta, el crecimiento y la supervivencia, sugiriéndose la presencia en las algas de alguna sustancia estimulante de la actividad enzimática (Kumlu *et al.*, 1992; Le Vay *et al.*, 1993a y 1993b; Le Moullac *et al.*, 1994; Kumlu y Jones, 1995a).

Con base en la necesidad de atender el problema de la aceptación de alimentos formulados en cuanto a la digestibilidad y asimilación de los nutrientes, así como la resistencia a enfermedades y organismos patógenos en el tanque de cultivo, se han realizado una serie de investigaciones enfocadas a la creación de dietas que en su composición involucren elementos antiestresantes y promotores del sistema inmune de las larvas de camarón, así como de la actividad enzimática para facilitar la digestión de la dieta en general. Entre ellas se han formulado microcápsulas que en su contenido presentan microalgas deshidratadas, que actúan como estimulantes de la actividad enzimática (de la tripsina y quimotripsina principalmente) y coadyuvan a la digestión de la dieta artificial en larvas de *Palaemon elegans* y *Machobrachium rosenbergii* (Kumlu y Jones, 1995).

El empleo de microencapsulados y microparticulados ha tenido un considerable éxito en la sustitución parcial y total de los alimentos vivos. Recientemente, se ha logrado la reducción

del uso de los nauplios de *Artemia franciscana* como alimento en las larvas de *L. setiferus* con alimento microparticulado, entre 40 y 60 % (Gallardo, 2000). Asimismo, se han realizado trabajos preliminares de la sustitución total de microalgas y *Artemia sp* en mysis de *L. vannamei* con alimentos microencapsulados experimentales (Pedroza *et al*, 2004). La sustitución parcial y total del alimento vivo para el cultivo de larvas de esta especie, reduciría considerablemente - en términos productivos - los costos en las granjas comerciales. En el ámbito experimental, en otras especies de peneidos ha sido reportada la sustitución total del alimento vivo, tal es el caso de *Marsopenaeus japonicus* y *P. monodon* (Kanazawa, 1985; Jones, 1998).

La combinación de un alimento vivo, aún congelado, en pequeñas concentraciones en combinación con el alimento artificial reportó resultados similares a los obtenidos en animales alimentados únicamente con alimento vivo. Estos resultados ponen en evidencia que existen "factores" controladores de la actividad enzimática los cuales podrían a su vez controlar la expresión genética de las enzimas digestivas, tal y como ha sido reportado por Le Moullac *et al.*, (1996) para *L. vannamei*.

Esto ha conllevado a la presentación de alimentos comerciales, tanto microparticulados como microencapsulados, microagregados, microligados, y el empleo de un sinnúmero de alternativas como son yema de huevo hervida, hidrolizados de algas (*Spirulina sp* ó *Tetraselmis spp.*), así como alimentos que en su contenido presentan inmunoestimulantes o en forma de biocapsulas (nauplios de *Artemia sp* o rotíferos enriquecidos). De estos alimentos los más utilizados hasta ahora han sido los microencapsulados, los cuales al ser digeridos en el intestino de las larvas liberan su contenido y permite con ello asimilar la dieta sin pérdida de nutrientes. Además estos alimentos mantienen la calidad del agua del cultivo (Jones *et al*, 1998).

Actualmente en el uso de dietas para el cultivo de organismos acuáticos, el concepto de funcionalidad del alimento esta relacionado con la capacidad de proveer un equilibrio en los principales procesos fisiológicos que conllevan a un estado optimo de crecimiento asi como en el estado de salud de los organismos. Los alimentos funcionales solo pueden serlo

cubriendo estas premisas (Vega – Villasante *et al*, 2004). La presencia de los hidrolizados en las microcapsulas pudieran otorgarle esta característica de alimento funcional para las larvas de *L. vannamei*.

## OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de hidrolizados proteicos de origen marino (hidrolizado de krill, hidrolizado de langostilla e hidrolizado de pescado, concentrado proteico soluble de pescado 90 % de proteína), a través de alimentos artificiales microencapsulados, en la nutrición de larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar el efecto de la inclusión de hidrolizados proteicos de origen marino en dietas microencapsuladas como sustitutas del alimento vivo sobre el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de larvas y primera postlarva de *Litopenaeus vannamei*.

Evaluar el efecto de la inclusión de hidrolizados proteicos de origen marino en dietas microencapsuladas como sustitutas del alimento vivo sobre la actividad enzimática (proteasas totales, tripsina, quimotripsina,  $\alpha$  – amilasa y  $\alpha$  – glucosidasa) de larvas y primera postlarva de *Litopenaeus vannamei*.

Evaluar el efecto de la inclusión de hidrolizados proteicos de origen marino en dietas microencapsuladas como sustitutas del alimento vivo sobre el contenido de proteína soluble, acilglicéridos y colesterol de larvas y primera postlarva de *Litopenaeus vannamei*.

Determinar a través de un balance energético las estrategias de canalización de energía durante el desarrollo larvario de *Litopenaeus vannamei*, comparando las diferentes dietas microencapsuladas con hidrolizados proteicos de origen marino contra alimento vivo.

## HIPOTESIS.

La presencia de hidrolizados proteicos de origen marino en alimentos microencapsulados estimulará la secreción y actividad de las enzimas digestivas igual o mayor a cuando se utiliza alimento vivo, mejorando la fisiología digestiva global que se vera reflejada en la sobrevivencia, crecimiento, desarrollo y balance energético de las larvas del camarón blanco *L. vannamei*.

## MATERIALES Y METODOS

Se realizaron 5 bioensayos enfocados al reemplazo parcial y total del alimento vivo, utilizando para ello alimentos microencapsulados con diferentes hidrolizados proteicos de origen marino. Los 3 hidrolizados fueron: hidrolizado de krill, hidrolizado de langostilla e hidrolizado de pescado (concentrado proteico de solubles de pescado 95 % de proteína). En una primera etapa, 3 experimentos fueron conducidos para la sustitución parcial del régimen de alimento vivo (reemplazo total de los nauplios de *Artemia sp.*). 2 experimentos fueron enfocados a la sustitución total del alimento vivo (microalgas y nauplios de *Artemia sp.*).

### ***Origen de las larvas y condiciones generales de cultivo.***

Las larvas de la especie *Litopenaeus vannamei* fueron obtenidas en la granja camaronera de Industrias Pecis, S.A. de C.V., ubicada en Sisal, Yucatán, México. Los animales fueron trasladados al laboratorio del Grupo de Biología Marina Experimental de la Facultad de Ciencias con sede en Cd. del Carmen, Campeche en el subestadio de nauplio II-III, en donde fueron aclimatados a la temperatura del agua de mar utilizada en el laboratorio ( $28 \pm 1$  °C).

Las condiciones fisicoquímicas en los diferentes experimentos se presentan en la Tabla 1. La temperatura y la salinidad fueron mantenidas estables durante el curso de los experimentos utilizando un calentador ambiental y preparando la concentración deseada de agua de mar con agua dulce purificada respectivamente. El agua de mar natural utilizada fue tratada con luz ultravioleta y filtrada por filtros de arena, filtros de cartucho de 20, 5 y 1 micra para la eliminación de bacterias y/o protozoarios y por último recirculada por 3 horas en un filtro biológico rápido (marca FLUVAL mod.403) para eliminar la materia orgánica en suspensión.

Tabla 1. Condiciones fisicoquímicas registradas en los diferentes experimentos con las larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Parámetro	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5
Temperatura (°C)	28.5 ± 1	28.3 ± 0.8	28 ± 0.5	28.5 ± 1	28.3 ± 0.8
Salinidad (g.l <sup>-1</sup> )	35 ± 1	34 ± 1	35 ± 1	35 ± 1	35 ± 1
Oxígeno disuelto	5.7 ± 0.7	5.8 ± 0.5	5.5 ± 0.6	5.7 ± 0.7	6.0 ± 0.6
PH	8.1 ± 0.2	8.3 ± 0.3	8.0 ± 0.3	8.1 ± 0.2	8.3 ± 0.2

Las concentraciones de alimento vivo utilizadas durante los experimentos se muestran en la Tabla 2 y son con base en el esquema de alimentación propuesto por Treece and Yates (1990). La combinación de las microalgas y los nauplios de *Artemia sp* en tales concentraciones funcionaron como el tratamiento control de alimento vivo (AV).

Tabla 2- Concentraciones de alimentos vivos utilizados en los experimentos con larvas de *L. vannamei*.

Estadio	Subestadio	<i>Chaetoceros gracilis</i> (Cel.ml <sup>-1</sup> )	<i>Tetraselmis chuii</i> (Cel.ml <sup>-1</sup> )	<i>Artemia sp</i> (Nauplios.ml <sup>-1</sup> )
Protozoa	I	40 000	10 000	
	II	75 000	10 000	
	III	85 000	25 000	0.2
Mysis	I	60 000	25 000	1.0
	II	50 000	20 000	1.5
	III	50 000	20 000	2.0
Postlarva	1	50 000	15 000	3.0

### ***Dispositivo y diseño experimental.***

El dispositivo experimental consistió de una batería de tanques blancos de fondo cónico de fibra de vidrio de 10 L de capacidad (3 replicas por tratamiento en el experimento 1 y 5 replicas por tratamiento en los experimentos 2, 3, 4 y 5), con aireación constante, en donde se colocaron 400 larvas en estadio de nauplio V para la valoración del desarrollo, crecimiento y consumo de oxígeno. Se utilizaron también matraces de vidrio redondos de 1 l de capacidad (5 replicas por tratamiento en los experimentos 1, 2 y 4 y 10 replicas por tratamiento en los experimentos 3 y 5), en donde se colocaron 50 organismos exclusivamente para la valoración de la sobrevivencia. Por último, en tanques de 100 l de capacidad se colocaron 4000 larvas, las cuales fueron muestreadas por grupos de 100 larvas

en protozoa y 50 larvas en mysis (5 grupos por cada subestadio en cada tratamiento) para la valoración de la actividad de las enzimas digestivas.

Diseños experimentales completamente aleatorizados fueron utilizados para la valoración de los alimentos microencapsulados conteniendo los diferentes hidrolizados proteicos. La descripción de los diferentes diseños de los experimentos realizados se presentan en la Tabla 3 y la formulación de cada alimento microencapsulado se presenta en la Tabla 4.

Tabla 3.- Descripción de los diseños experimentales utilizados para la valoración de los hidrolizados proteicos a través de dietas microencapsuladas en larvas de *Litopenaeus vannamei*.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5
Fases del desarrollo evaluadas	PZIII – PL2	PZIII – PL2	PZI – PZIII	PZIU – PL2	PZI – PL2
Tratamientos experimentales	3 dietas (DME, DHK Y AV)	3 dietas (DHK, DHL Y AV)	3 dietas (CPSP3*, CPSP26* Y AV)	3 dietas (DME, DCPSP Y AV)	3 dietas (DCPSP*, DCPSPCA Y AV)
Repeticiones por tratamiento	3	5	5	3	5

Subestadios larvales: PZI = protozoa I, PII = protozoa II, PZIII = protozoa III, MI = mysis I, MII = mysis II, MIII = mysis III y PL1 = postlarva 1.

Descripción de los tratamientos dietéticos señalados en la Tabla 3:

DME = Alimento microencapsulado sin hidrolizado más microalgas.

DHK = Alimento microencapsulado con hidrolizado de krill más microalgas.

DHL = Alimento microencapsulado con hidrolizado de langostilla más microalgas.

DCPSP = Alimento microencapsulado con hidrolizado de pescado (concentrado proteico soluble de pescado con 90% de proteína, CPSP 90%) más microalgas.

DCPSP3 Y DCPSP26 = Alimentos microencapsulados con hidrolizado de pescado (concentrado proteico soluble de pescado con 90% de proteína, CPSP 90%) de 3 y 26 µm de tamaño promedio de diámetro.

AV = alimento vivo (*Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii* y nauplios de *Artemia sp.*)

\* Tratamientos sin la presencia de microalgas, únicamente es la dieta artificial.

Los reemplazos de alimento vivo por las microcápsulas fueron de la siguiente manera:

Los experimentos 1, 2 y 4 se refieren al reemplazo parcial del alimento vivo (es la sustitución únicamente de los nauplios de *Artemia sp.* por el alimento microencapsulado señalado en la Tabla 3).

El experimento 3 se refiere al reemplazo total de alimento vivo (es la sustitución de las microalgas, las cuales son el único alimento en el estadio de protozoa por los alimentos microencapsulados señalados en la Tabla 3).

El experimento 5 se refiere al reemplazo parcial y total del alimento vivo (es la sustitución tanto de las microalgas como de los nauplios de *Artemia sp.* durante toda la fase larval por los alimentos microencapsulados señalados en la Tabla 3). Para este experimento, el alimento DCPSP correspondió a las dietas DCPSP3 (de PZI a PZIII) y DCPSP 25 (de MI a PL1). La DCPSPCA se refiere al alimento microencapsulado de 26 micrómetros (DCPSP-26), en combinación de microalgas y sustituyendo únicamente a los nauplios de *Artemia sp.*, de acuerdo al esquema propuesto por Treece and Yates (1990).

Las concentraciones de microalgas y nauplios de *Artemia sp.* que conformaron el tratamiento de alimento vivo (AV) se presenta en la Tabla 2 de acuerdo al esquema de alimentación propuesto por Treece and Yates (1990). La frecuencia de alimentación de las dietas formuladas fue cada 4 horas (2:00, 6:00, 10:00, 14:00, 18:00 y 22:00 horas) para los experimentos 1 2 y 4 y de cada 2 horas para los experimentos 3 y 5. Las raciones de alimento microencapsulado utilizadas fueron de  $0.8 \text{ mg.larva}^{-1}.\text{día}^{-1}$  de PZI a PZIII y de  $0.32 \text{ mg.larva}^{-1}.\text{día}^{-1}$  de MI a PL1.

### ***Elaboración de las dietas.***

#### **Proceso de elaboración de las microcapsulas.**

Tabla 4. Formulación basal de las dietas (%) para la elaboración de las microcapsulas utilizadas en los experimentos.

Ingredientes	DME	DHK	DHL	DCPSP	DCPSP3 y 26
H. de pescado ( <i>Scomberomorus sierra</i> )	27	27	27	27	
Harina de calamar	17	0	0	0	0
Hidrolizado de krill ( <i>Euphausia superba</i> ) <sup>1</sup>	0	12	0	0	
Hidrolizado de langostilla <sup>2</sup> ( <i>Pleuroncodes planipes</i> )	0	0	12	0	
Hidrolizado de pescado (CPSP 90 %) <sup>3</sup>	0	0	0	15	46.6
Harina de camarón ( <i>Litopenaeus setiferus</i> )	17	17	17	17	
Levadura de cerveza	15	15	15	15	3.77
Harina de soya	14	14	14	14	3.89
Almidón de trigo	1.5	1.5	1.5	1.5	0.93
Ac hig. de bacalao	4	4	4	4	7.11
Colesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.54
Vit. <sup>4</sup>	1	1	1	1	2.23
Min.	1.5	1.5	1.5	1.5	
Rovimix c	0.5	0.5	0.5	0.5	0.19
Lecitina de soya	1	1	1	1	2.12
Relleno (Talco de zeolita)	0	5	5	2	

Descripción de los alimentos:

DME = Alimento microencapsulado sin hidrolizado

DHK = Alimento microencapsulado con hidrolizado de krill

DHL = Alimento microencapsulado con hidrolizado de langostilla

DCPSP = Alimento microencapsulado con hidrolizado de pescado con 90 % de proteína, CPSP 90%).

DCPSP3 Y DCPSP26 = Alimentos microencapsuladas con hidrolizado de pescado con 90 % de proteína, CPSP 90%) de 3 y 26  $\mu\text{m}$  de tamaño promedio de diámetro.

1 Hidrolizado líquido de krill (Specialty Marine Products, LTD, Vancouver, Canadá).

2 Hidrolizado líquido de langostilla (*Pleuroncodes planipes*, elaborado por el CIBNOR, México).

3 Concentrado proteico soluble de pescado CPSP 90% (Sapopreche, Francia).

4 Premezcla de vitaminas.

\*\* Agribrands Purina de México.

\*\*\* Roche.

Los hidrolizados sustituyeron en cada dieta microencapsulada utilizada en los experimentos a la harina de calamar presente en la formulación original propuesta por Gallardo *et al*, 2002.

## Evaluación fisicoquímica.

### Tiempo de sedimentación.

Los tiempos de sedimentación de las microcápsulas fueron evaluados de acuerdo a Pedroza (2000) registrando la cinética de flotabilidad (Tabla 5). Así, 2 gramos de cada microcápsula

fueron colocadas en la superficie de 10 mL de agua de mar contenida en un tubo de ensayo. Posteriormente el tubo fue colocado en un espectrofotómetro Bausch and Lomb Spectronic 20 y se tomaron lecturas del porcentaje de transmitancia, a una longitud de onda de 395 nm, cada minuto hasta tener una transmitancia menor a 10 %. Según Pedroza (Com. Personal), la constante de tiempo de flotación no debe ser menor a 5 minutos considerando que para su determinación se empleo una columna de agua estática, mientras que en la practica, la aireación permite una mayor disponibilidad de las microcápsulas favoreciendo la captura por las larvas de camarón. Las figuras correspondientes a la cinética de flotabilidad de las dietas microencapsuladas puede observarse en el anexo 1.

Tabla 5.- Tiempos de flotación (min.) de las diferentes dietas microencapsuladas utilizadas en el presente trabajo para la alimentación de larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Dieta	Constante de tiempo de flotación
DME	14.92 min
DHK	9.06 min
DCPSP	9.45 min

### Tamaño de partícula.

Las medias volumétricas de los tamaños de partículas (Pedroza-Islas *et al.*, 1999) de las dietas microencapsuladas fueron determinadas con un analizador de tamaños de partícula serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Worcs, UK). Los valores promedio de cada dieta microencapsulada utilizada en este trabajo se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6.- Tamaños promedio de partículas de las diferentes dietas microencapsuladas utilizadas en el presente trabajo para la alimentación de larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Dieta	Tamaño promedio	Intervalo
DME	11.99	1.22 – 42.1
DHK	8.40	1.41 – 27.1
DHL	3.22	3.17 – 3.70
DCPSP	5.59	1.41 – 15.0
DCPSP3	4.35	3.69 – 6.09
DCPSP26	17.33	14.56 – 24.87

## Evaluación química.

### Análisis proximal.

Los análisis proximales de las dietas microencapsuladas (Tabla 7) fueron realizados por el Centro Total de Calidades S.A. de C.V. utilizando los siguientes métodos: Humedad, por el método gravimétrico (NOM-116-SSA-1994); cenizas, método gravimétrico (NMX-F-607-NORMEX-2002); lípidos , método gravimétrico (NOM-86-SSA-1994, Ap. C.1.1.3.1); proteínas, método Kjeldahl (NMX-F-608-NORMEX-2002); y fibra cruda, método gravimétrico (NMX-F-90-S-1978).

Tabla 7.- Análisis proximal de las diferentes dietas microencapsuladas para el reemplazo del alimento vivo en larvas y primera postlarva de *Litopenaeus vannamei*.

	DME	DHK	DHL	DCPSP	DCPSP3 y 26
Humedad	4.63	5.29		4.22	3.8
Proteína Cruda (N * 6.25)	17.7	14.12	14.41	17.77	42.91
Extracto etéreo	3.33	3.09		3.54	18.81
Cenizas	6.07	6.72		4.44	4.91
Fibra cruda	0.11	0.10		0.05	0.34
ELN (cbh)	68.16	67.65		69.98	29.57
ED				17.33kJ/g	457.85 (Kcal/100g)

### Aminogramas.

El perfil aminoacídico de la proteína contenida en las dietas fue realizado por el Centro de Control Agroindustrial S.A. de C.V. de acuerdo con los siguientes métodos: proteína (Metodo Kjeldhal, NMX – Y – A- 1982), triptofano (método espectrofotométrico, técnica interna del laboratorio) y aminoácidos totales (hidrólisis ácida AOAC 17th Ed. 2000, 988.15. Método interno). Los valores del contenido aminoacídico de la proteína contenida en cada dieta y de las microalgas y nauplios de *Artemia sp* utilizados en este trabajo se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8.- Aminogramas de la proteína contenida en las diferentes dietas microencapsuladas con diferentes hidrolizados proteicos para la alimentación de larvas de *L. vannamei*.

Aminoácidos	DME	DHK	DHL	DCPSP	DCPSP3 y 26	<i>T. chuii</i> *	<i>C. gracilis</i> *	<i>Artemia</i> **
Aspargina	9.59	11.29	10.86	9.59	10.03	9.4	8	8.18
Glutamina	14.14	16.0	15.72	15.14	15.9	12.4	9.4	8.84
Serina	4.8	5.37	5.22	5.33	5.24	4.3	6.6	6.88
Histidina	1.9	2.72	2.68	2.12	1.8	1.8	2.4	1.29
Glicina	2.9	5.25	5.06	4.02	8.47	5.9	5.1	6.7
Alanina	5.12	5.77	5.80	5.61	6.87	6.8	6.9	7.73
Tyrosina	2.3	2.45	2.49	1.97	2.57	3.7	5.4	4.23
Metionina	1.25	0.64	0.71	0.75	1.98	1.9	2.4	1.57
Valina	3.55	4.50	4.34	4.07	4.52	5.8	6.2	4.41
Triptofano		1.57	1.36		0.72			
Phenilalanina	3.2	4.16	4.09	3.54	3.8	5.4	7.1	3.36
Isoleucina	3.28	3.85	3.91	3.66	3.86	3.5	5.8	3.12
Leucina	7.65	8.26	7.98	7.92	7.76	7.5	7.2	5.11
lisina	6.46	7.4	7.10	7.12	7.5	5.7	5.1	5.51
Treonina	4.57	5.24	5.27	4.95	4.84	4.2	5.9	4.03
cisteina	0.33	0.33	0.06	0.43	0.4	0.57	0.52	1.05
Arginina	3.43	4.6	4.7	3.66	6.04	13.5	6.6	3.58

\*Tomado de Brown, M. (1991)

\*\* Tomado de Lan y Phan (1993)

### Computo químico

El cómputo químico de las dietas microencapsuladas experimentales se baso en el concepto de que la utilización de la proteína depende en primera instancia del nivel de aminoácidos esenciales que se encuentre en mayor déficit en esta (Mitchell y Block, 1946). El computo químico obtenido para cada dieta se establecio por el valor del aminoácido esencial que estuvo en menor porcentaje con la proteína patrón del músculo de juveniles de acuerdo con lo determinado por Lim (1993). Este aminoácido fue considerado el primer aminoácido limitante. Los valores del computo químico se muestran en la Tabla 9.

Determinación:

$$CQ = \frac{\text{mg aa en la proteína analizada}}{\text{mg de aa en la proteína patrón}} \times 100$$

Tabla 9.- Computo químico de las diferentes dietas microencapsuladas con diferentes hidrolizados proteicos para la alimentación de larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Aminoácidos	DME	DHK	DHL	DCPSP	DCPSP3 y 26
Aspargina					
Glutamina					
Serina					
Histidina	100	143.1	141.1	111.5	94.5
Glicina					
Alanina	79.2	98.2	98.4	85.2	126.7
Tyrosina					
Metionina	48.1	24.6	27.4	28.8	76.4
Valina	93.4	118.6	114.2	107.1	118.9
Triptofano		143.3	124.1		66
Phenilalanina	88.9	115.7	113.8	98.3	105.8
Isoleucina	91.1	107.1	108.7	101.6	107.4
Leucina	117.7	127.1	122.8	121.8	119.3
Lisina	100.9	115.6	110.9	111.2	118.1
Treonina	134.4	154.2	155.1	145.5	142.4
Cisteina	47.1	47.1	8.7	61.4	61.7
Arginina	45.7	61.3	62.6	48.8	80.6

En negritas y cursivas: Primer a.a. limitante.

En cursivas: segundo a.a. limitante.

### ***Indicadores zootécnicos***

#### **Crecimiento.**

El crecimiento (peso y longitud) y el ID fue evaluado en 15 larvas por tratamiento (5 larvas por réplica). Para la longitud, las larvas fueron medidas desde la escotadura post-orbital hasta el final del telson sin incluir las espinas a través de una regleta adaptada al ocular en un microscopio. Para el peso, los organismos fueron colocados individualmente en una microbalanza CAHN con 0.0001 mg de precisión. A partir de los datos de longitud y de

peso se calcularon tasas específicas de crecimiento considerando la longitud y/o el peso. Las tasas fueron calculadas de PZI a PZIII, de PZIII a PL1 y de PZI a PL1 en los respectivos experimentos de sustitución de acuerdo con la siguiente fórmula propuesta por Bureau (2000):

$$\text{TEC (\% día)} = (\ln \text{PF} - \ln \text{PI}/t) * 100$$

Donde TEC = Tasa específica de crecimiento; PF = Peso final; PI = Peso inicial y t = tiempo en horas. La misma fórmula fue aplicada para la obtención de la TEC en longitud.

### **Índice de desarrollo (I.D.)**

El ID fue evaluado cada 24 horas con los mismos organismos utilizados para el crecimiento a través de la identificación de los subestadios larvales. Estos fueron definidos de acuerdo con las descripciones de García (1972). Para la determinación del índice se utilizó la propuesta de Villegas y Kanazawa (1979):

$$I.D. = \frac{\sum A}{N}$$

donde A es el número de organismos de cada subestadio multiplicado por el número asignado a cada subestadio y N es el número total de larvas muestreadas. El valor del número absoluto asignado a cada subestadio larval fue: PZI=1, PZII=2, PZIII=3, MI=4, MII=5, MIII=6 y PL1=7.

### **Sobrevivencia (%)**

La sobrevivencia (%) fue obtenida al final de los experimentos contando las PL2 producidas para cada tratamiento en relación al número de nauplios en subestadio V (experimentos de sustitución total del AV) o PZIII (experimentos de sustitución de nauplios de *Artemia sp*) colocados al inicio de los experimentos.

## ***Indicadores de la fisiología digestiva***

### **Obtención de muestras.**

Se colectaron 500 larvas por tratamiento en los subestadios de PZI y PZII y se dividieron en 5 muestras de 100 larvas. Desde PZIII hasta PL1 se colectaron 250 larvas de cada tratamiento y se dividieron en 5 muestras de 50 larvas cada una, de tal manera que se tuvieron 5 repeticiones por tratamiento para la determinaciones de la actividad de cada una de las enzimas digestivas y de la composición bioquímica. Las muestras fueron colectadas una hora después de haber alimentado y se lavaron con agua destilada, colocándose en una malla de 50  $\mu\text{m}$ , la cual se colocó encima de papel secante, con la finalidad de retirar el agua y los restos de alimentos y desechos. Las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su análisis.

### **Obtención del homogenizado.**

A cada muestra de 50 o 100 larvas (según el experimento) se le adicionó 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril y se homogeneizaron a velocidad máxima con un homogenizador de tejidos a 4°C. Posteriormente se centrifugaron en esta misma temperatura durante 6 minutos a 14 000 r.p.m. en una centrífuga marca Eppendorf Mod. 5415 C (Alemania).

Del homogenizado fue separado el sobrenadante, el cual fue utilizado para las mediciones de enzimas digestivas y metabolitos de acuerdo al método descrito por Ravallec – Ple (2000).

## **Enzimas digestivas de las larvas de camarón**

### **Proteasas totales.**

La actividad de las proteasas totales fue medida por la hidrólisis de la caseína amarilla (1% en un amortiguador fosfato 10 mM, pH 7) a 37°C durante una hora. La reacción es bloqueada por ácido tricloroacético (TCA) 5% para precipitar las proteínas solubles. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue recuperado y mezclado a partes iguales

con una solución de NaOH 0.5M, se lee a 420 nm en un espectrofotómetro (SPECTRONIC modelo 21D).

### **Tripsina**

La actividad de la tripsina fue medida por la hidrólisis del sustrato L-benzoil-Arginina-p-nitroAnilide (BAPNA) (Sigma, Cat. B – 4875) 1 mM en un amortiguador TRIS 0.1 M pH 8 a 405 nm (Geiger y Fritz, 1988). Una unidad de actividad específica de la tripsina corresponde a un  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilide liberado por minuto.

### **Quimotripsina.**

La actividad de la quimotripsina es estimada por la hidrólisis del Succinil-Alanina-2-Prolina-Phenilalanina p-nitro Anilide (SAPPNA) 1 mM en un amortiguador TRIS = .1 M pH 8 a 405 nm (Geiger, 1988). Una unidad de actividad quimotripsica corresponde a un  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilide liberado por minuto.

### **$\alpha$ - Amilasa**

La actividad de la  $\alpha$ -amilasa fue calculada por el método de Bernfeld (1955), utilizando el glicógeno (Merck, cat. V – 502102) como sustrato en un amortiguador fosfatos 10 mM a pH 7.0 y se lee a 540 nm. Una unidad de actividad amilásica es definida como los mg de maltosa liberados por mín. a 37°C por mg de proteína.

### **$\alpha$ - Glucosidasa**

La actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa fue medida utilizando el paranitrofenil  $\alpha$ -D glucopyranoside (Sigma, Cat. N – 1377) en un amortiguador fosfato 50 mM a pH 6.0 y medido a 410 nm. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que hidroliza un  $\mu\text{M}$  de sustrato en un minuto.

Para todas las enzimas evaluadas se calculó la actividad específica (en miliunidades de actividad por mg de proteína) por microgramo de peso seco, para lo cual se emplearon los valores promedios de los pesos secos obtenidos en cada subestadio larval de cada tratamiento con el objeto de hacer comparables las actividades entre los diferentes subestadios larvarios analizados en los experimentos (Anger, 2001).

## **Composición bioquímica**

### **Proteína soluble.**

La proteína soluble fue medida por el método de Bradford (1976), usando un kit BioRad (USA). Los valores de proteína soluble fueron expresados como  $\mu\text{g } \mu\text{g de ps}^{-1}$ .

### **Acilglicéridos.**

Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de extracto en una microplaca y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución reactiva del kit comercial Sera-Pak, Cat. 6684 (Tampón 50 mmol  $\text{l}^{-1}$  pH 7; lipoproteinlipasa  $\geq 50 \text{ U ml}^{-1}$ ; gliceroquinasa  $\geq 0.055 \text{ U ml}^{-1}$ ; glicérol-fosfato-oxidasa  $\geq 2.0 \text{ U ml}^{-1}$ ; peroxidasa  $\geq 3.0 \text{ U ml}^{-1}$ ; adenosina 5'-trifosfato (ATP) 0.7 mmol  $\text{l}^{-1}$ ; 4-aminofenazona 1.0 mmol  $\text{l}^{-1}$ ; ferrosianuro potásico 7.0  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ; sales magnésicas 0.6 mmol  $\text{l}^{-1}$ ; *N*-etil-*N*-(3-sulfopropil)-*m*-anisina 1.2 mmol  $\text{l}^{-1}$ ; surfactante 2.0 g  $\text{l}^{-1}$ ). El análisis colorimétrico – enzimático fue hecho sobre la muestra con una adaptación para pequeñas muestras de acuerdo a Palacios, 1999. Se incubó la reacción a temperatura ambiente por 10 min y se registra la absorbancia a 540 nm. La concentración de acilglicéridos (mg/ml) es calculada con una curva patrón utilizando el estándar comercial obtenido con el kit.

### **Colesterol.**

Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de extracto en una microplaca y se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de solución reactiva del kit comercial Sera-Pak, Cat. 6670 (Tampón fosfatos (PBS) pH 7.2; colesterol oxidasa  $\geq 170 \text{ U l}^{-1}$ ; colesterol éster hidrolasa  $\geq 400 \text{ U l}^{-1}$ ; peroxidasa  $> 400 \text{ U l}^{-1}$ ; ácido 2-hidroxifenilacético 9 mmol  $\text{l}^{-1}$ ; 4-aminio-fenazona 0.5 mmol  $\text{l}^{-1}$ ; ferrocianuro potásico 7  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ; tensoactivos 6 g  $\text{l}^{-1}$ ). El análisis calorimétrico – enzimático fue hecho sobre la muestra con una adaptación para pequeñas muestras de acuerdo a Palacios, 1999. Se incubó

la reacción a temperatura ambiente por 10 min y se registra la absorbancia a 540 nm. La concentración de colesterol (mg/ml) es calculada utilizando la constante de conversión del kit.

### ***Indicadores de la fisiología energética.***

#### **Tasa de ingestión.**

La tasa de ingestión (no. de células de las microalgas o nauplios de *Artemia sp.* h<sup>-1</sup> larva<sup>-1</sup>) fue determinada de acuerdo con Rosas *et al* (1995) y fue valorada a partir de los ajustes de alimento vivo realizados del dispositivo experimental utilizado para la valoración de la sobrevivencia. Este consistió de 5 matraces de 1 L con fondo redondo por tratamiento con 50 larvas por frasco. Los matraces fueron mantenidos en agua dulce termostáticamente controlada a 28°C. La concentración residual de microalgas de cada matraz experimental fue contada utilizando un hematocitómetro de Neubauer (Fox, 1983) en 2 ml de muestra. La tasa de ingestión fue calculada de la diferencia entre las concentraciones de algas colocadas en la noche y las encontradas por la mañana, ajustadas de acuerdo al esquema presentado en la Tabla 2. La tasa de ingestión (TI) fue calculada con la ecuación (Paffenhoffer, 1971):

$$TI = \frac{V(Co - Ct)}{T \times N}$$

donde : TI es la tasa de ingestión; V es el volumen de agua de cada réplica experimental, Co y Ct son las concentraciones de algas a las 20:00 y 8:00 horas respectivamente. T es el periodo experimental (horas) transcurrido y N es el número de larvas en cada frasco.

Con respecto a la *Artemia sp.*, el número de nauplios ingeridos por las larvas de camarón fue calculada midiendo la disminución de nauplios en los frascos experimentales. Para ello 10 muestras de 10 ml fueron colectadas para determinar la concentración de nauplios cada 12 horas. La tasa de ingestión fue calculada utilizando la misma ecuación utilizada para calcular los valores de ingestión de microalgas, pero sustituyendo por la concentración de nauplios.ml<sup>-1</sup> (Rosas *et al*, 1995).

La ingestión de las dietas microencapsuladas fue considerada constante en los experimentos 1, 2, 3 y 4 y fueron de  $0.08 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  de PZI a PZIII y de  $0.13 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  para MI y MII y de  $0.16 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  para MIII y PL1. En el experimento 5, las cantidades suministradas por subestadio fueron establecidas por la traducción a valores de energía de acuerdo al consumo de los diferentes alimentos vivos ofrecida por individuo reportadas por Gallardo *et al.*(2002) y Pedroza-Islas *et al.* (2004). Los valores de alimento microencapsulado suministrado en el experimento 5 se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones de cada alimento utilizado durante el experimento 5 de sustitución parcial y total del alimento vivo para las larvas de *L. vannamei*. Las diferentes dietas fueron: microcapsulas con CPSP 90% proteína ( $\text{mg}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ), microalga ( $\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y *Artemia sp* ( $\text{Nauplios} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

Estadio	Ración de dieta (mg/larva/día)	Tamaño de partícula	<i>Chaetoceros gracilis</i> (cel.ml <sup>-1</sup> )	<i>Tetraselmis chui</i> (cel.ml <sup>-1</sup> )	<i>Artemia sp</i> (nauplios.ml <sup>-1</sup> )	
Protozoa	I	0.08	3 $\mu\text{m}$	40 000	10 000	
	II	0.09	3 $\mu\text{m}$	75 000	10 000	
	III	0.5	17 $\mu\text{m}$	85 000	25 000	0.2
Mysis	I	0.1* y 0.38**	17 $\mu\text{m}$	60 000	25 000	1.0
	II	0.14* y 0.52**	17 $\mu\text{m}$	50 000	20 000	1.5
	III	0.2* y 0.65**	17 $\mu\text{m}$	50 000	20 000	2.0
Postlarva	1	0.29* y 0.65**	17 $\mu\text{m}$	50 000	15 000	3.0

### Consumo de oxígeno

Las determinaciones del consumo de oxígeno ( $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g de larva}^{-1}$ ) fueron realizadas en un sistema cerrado de consumo de oxígeno de acuerdo al procedimiento planteado por Rosas *et al* (1995) y Gallardo *et al* (2003). Dos organismos de cada subestadio fueron colocados en cámaras respirométricas RC-300 de un microrespirómetro (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK), con 0.5 ml de agua de mar del tanque experimental. Doce cámaras respirométricas fueron conectadas a un recirculador de agua a 28°C (Fisher Scientific Isotherm Refrigerated Circulator, Modelo 900). Las lecturas fueron tomadas después de 30 minutos de aclimatación de las larvas a las cámaras. Las lecturas de 10 cámaras con organismos fueron registradas para cada subestadio larval y tratamiento. Las lecturas de dos cámaras sin larvas fueron utilizadas para corregir los valores de variación de

O<sub>2</sub> disuelto sin consumo por parte de las larvas. Después de la mediciones del consumo de oxígeno, las larvas fueron lavadas con agua destilada y secadas a 60°C por 24 horas hasta obtener un peso constante. Después los organismos fueron colocados en una campana de secado y pesados individualmente utilizando una microbalanza (0.1 µg, CAHN-33).

### **Método de evaluación de los parámetros del balance energético.**

#### **Ingestión (I).**

Las tasas de ingestión de microalgas y nauplios de *Artemia* fueron convertidos en Joules de acuerdo a Lemos y Phan (2001), utilizando los siguientes valores: *Chaetoceros gracilis*, 30 X 10<sup>-6</sup> µg ps cel<sup>-1</sup> y 9.66 J mg ps<sup>-1</sup>; *Tetraselmis chunii*, 269 pg ps •cel<sup>-1</sup> y 47.88 J mg ps<sup>-1</sup>; *Artemia sp*, 2.42 J µg ps•nauplio<sup>-1</sup> y 24.21 J • mg ps<sup>-1</sup>.. Los valores energéticos de las microcápsulas (13.94 J• mg<sup>-1</sup>) fueron estimados utilizando los coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) reportados por Cuzon y Guillaume (1997).

#### **Crecimiento (P).**

El peso seco individual de las larvas provenientes de las mediciones del consumo de oxígeno fue convertido a Joules utilizando el modelo reportado para larvas de *Farfantepenaeus paulensis* por Lemos y Phan (2001). La ecuación es:

$$\text{Log}C = a + b * \log dw$$

donde: C es expresada en Joules y el peso seco (dw) en miligramos y las constantes son: a = 37.15 J• mg dw<sup>-1</sup> y b = 0.145 (r= 0.9), obtenidas de las mediciones calorimétricas de las larvas de *Litopenaeus vannamei*.

#### **Exuvia (Ex).**

El contenido energético de la exuvia fue calculado de acuerdo a Lemos y Phan (2001), quienes la reportan como el 5% del contenido de energía total del cuerpo en larvas de *Farfantepenaeus paulensis*.

### **Otros parámetros energéticos.**

Con la conversión en Joules de los parámetros mencionados previamente, se estimó un modelo de balance energético, incluyendo los siguientes parámetros de acuerdo a Lucas (1993) y Lemos y Phan (2001):

$$\text{Asimilación (As)} = \text{Producción (P)} + \text{Respiración (R)} + \text{Exuvia (E}_v\text{)}$$

$$\text{Eficiencia de asimilación (Ef As)} = (\text{Asimilación/Ingestión}) \times 100$$

$$\text{Eficiencia de respiración (Ef R)} = (\text{Respiración/asimilación}) \times 100$$

$$\text{Eficiencia neta de crecimiento (K}_2\text{)} = [(P + E_v) / (P + R + E_v)] \times 100$$

La producción (P) fue estimada de los valores de peso seco obtenidos para cada subestadio larval en todos los experimentos a partir del valor calórico obtenido de 5000 organismos de cada subestadio donados por Industrias Pecis S.A. de C.V. a través de una bomba calorimétrica. Los valores del consumo de oxígeno en cada subestadio larval fue convertido a energía utilizando  $14.06 \text{ J} \cdot \text{mg O}_2^{-1}$  como factor de conversión (Gnaiger, 1983).

### ***Análisis estadístico de los resultados.***

La determinación de las diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos dietéticos fue realizada utilizando un análisis de varianza (ANDEVA) de una sola vía de clasificación para las respuestas zootécnicas. En el caso de la evaluación estadística de las enzimas digestivas, contenidos de proteína soluble, colesterol y acilglicéridos, así como los consumos de oxígeno y tasas de ingestión, un ANDEVA de 2 vías de clasificación fue aplicado. Una prueba pos hoc de Tuckey fue realizada, previo análisis de la normalidad y homogeneidad de varianzas (de acuerdo a Zar, 1996 y Underwood, 1997). Los indicadores expresados en porcentaje o proporciones fueron previamente transformados a su arc seno. En todos los casos se utilizó un nivel de probabilidad de 0.05.

## RESULTADOS

## CAPITULO I

Efecto de alimentos microencapsulados con hidrolizados proteicos de origen marino sobre el crecimiento, desarrollo, sobrevivencia y fisiología digestiva de larvas de *Litopenaeus vannamei* en la sustitución de alimento vivo.



## Experimento 1: Sustitución parcial de alimento vivo en mysis de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado de krill.

### Crecimiento.

Las TEC en longitud no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las dietas artificiales empleadas en este experimento con relación al tratamiento con alimento vivo (valor promedio de  $8.2 \mu\text{m día}^{-1}$ ) (Fig. 1a).

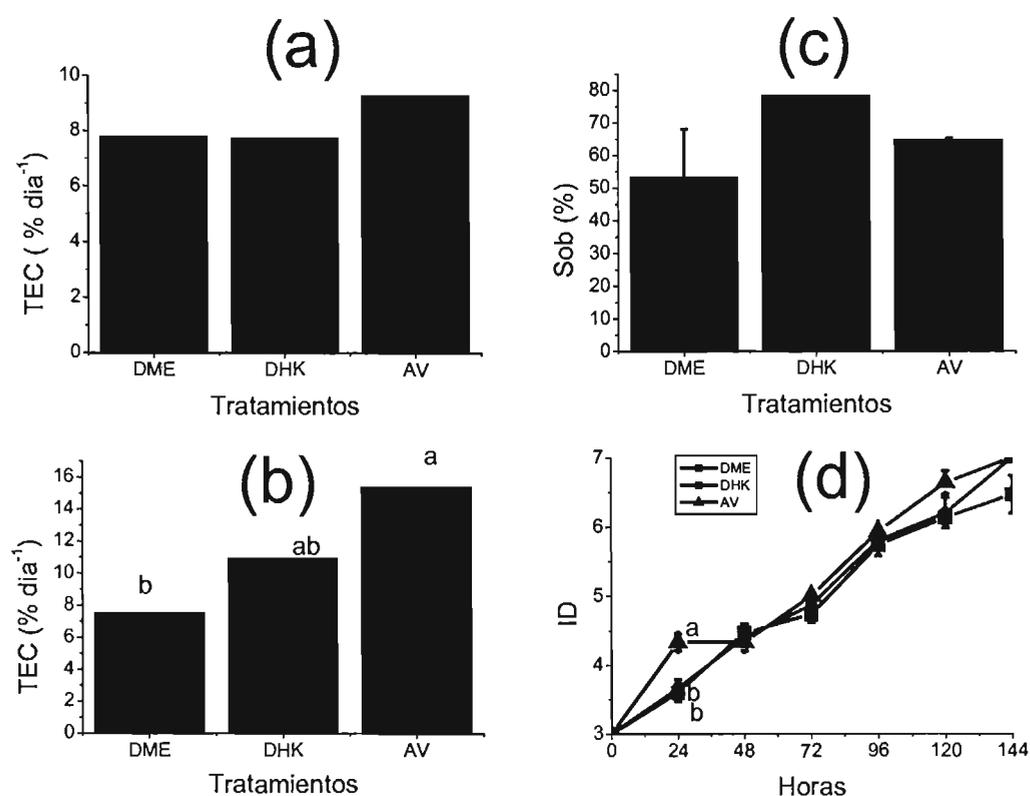


Fig. 1.- (a) Tasa Especifica de Crecimiento en Peso y (b) longitud, (c) Sobrevivencia (%) y (d) Índice de Desarrollo de las larvas de *L. vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas, dieta microencapsulada con hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 3 réplicas por tratamiento.

Sin embargo, la TEC obtenida por las larvas del tratamiento DME ( $7.49 \pm 0.01 \mu\text{m. día}^{-1}$ ) fue significativamente menor a la mostrada por las larvas mantenidas con el AV ( $15.3 \pm$

0.039  $\mu\text{m. dia}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1b). Un valor de  $10.8 \pm 0.02 \mu\text{m. dia}^{-1}$  de TEC mostrado por las larvas mantenidas con la dieta microencapsulada conteniendo el hidrolizado de krill (DHK) no fue diferente estadísticamente al obtenido por el AV (Fig. 1b) ( $P > 0.05$ ).

### **Sobrevivencia (%) e Índice de desarrollo (I.D.).**

En relación a la sobrevivencia, no se encontraron diferencias entre las larvas mantenidas con la dietas artificiales ( $53 \pm 15\%$  para DME y  $78.02 \pm 0.02$  para DHK) cuando fueron comparadas con las alimentadas con el AV ( $64.3 \pm 0.75\%$ ). (Fig. 1c).

El índice de desarrollo (ID) no mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos evaluados, entre las 72 y las 144 h (Fig. 1c). Solo al inicio (24 – 48 h) un retraso significativo fue observado en las larvas alimentadas con DME y DHK comparadas a las mantenidas con AV ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1d).

### **Actividad específica de enzimas digestivas.**

La actividad específica de las proteasas totales mostró un pico en el subestadio de MII con el tratamiento DME, el cual sin embargo no resultó significativo en relación al resto de los tratamientos, de acuerdo al análisis bifactorial aplicado ( $P > 0.05$ ). Una disminución significativa en la actividad de las proteasas totales es mostrada a partir de MII hacia PL1 en los tratamientos DHK y AV. Las variaciones en los resultados observados en la actividad de esta enzima fueron dadas por el desarrollo de acuerdo al análisis estadístico aplicado, donde únicamente reveló diferencias entre subestadios ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

La actividad específica de la quimotripsina mostró un comportamiento similar a las proteasas totales, donde la mayor actividad fue presentada por las larvas mantenidas por la dieta sin hidrolizado DME ( $0.66 \pm 0.1 \text{ mU mg de proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ), aunque sin diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2). El análisis estadístico solo reveló diferencias estadísticas entre subestadios, donde las PL1 fueron las que presentaron la menor actividad ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

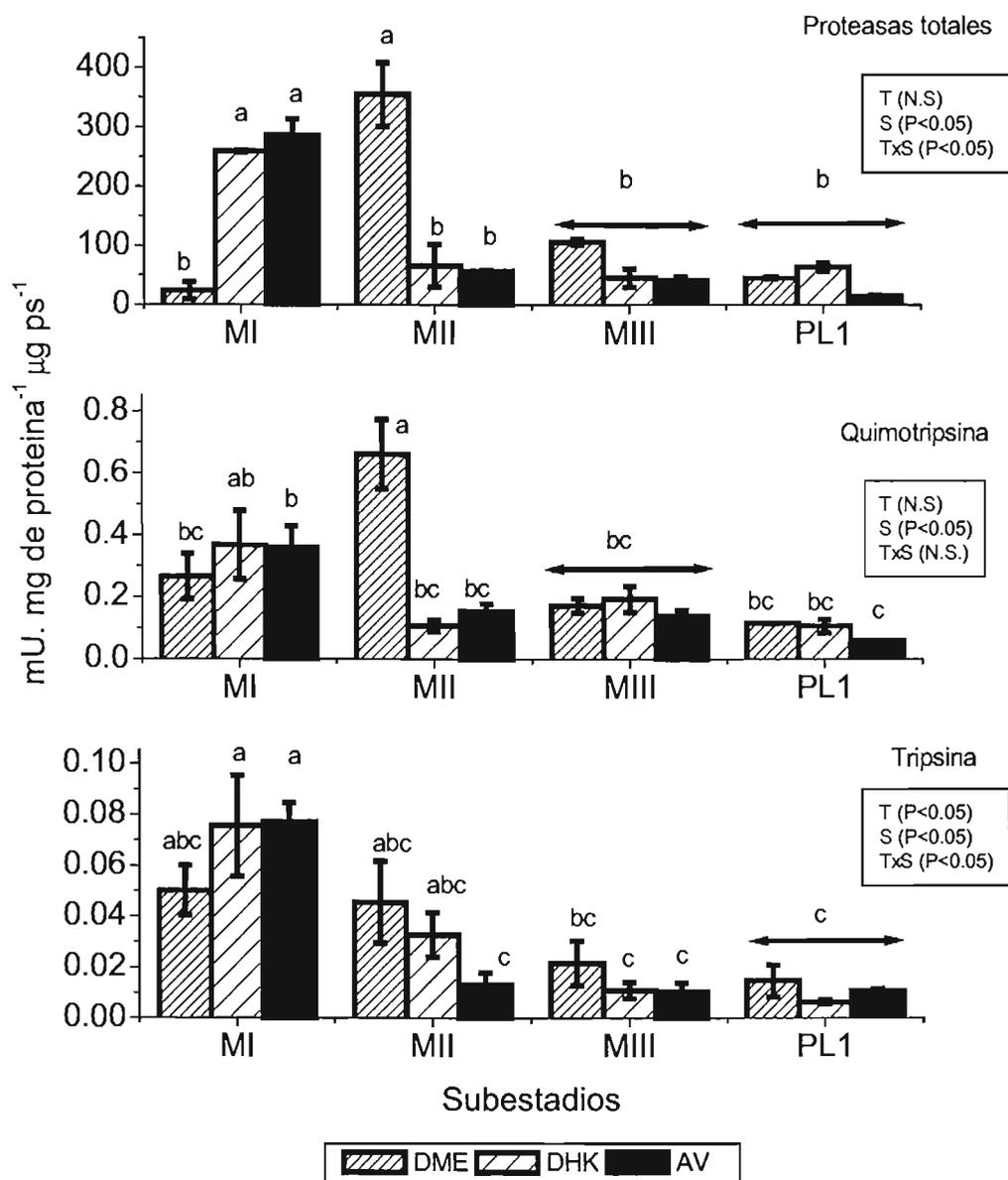


Fig. 2.- Actividad específica de proteasas totales, quimotripsina y tripsina de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas, dieta microencapsulada con hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S.  $N = 3$  repeticiones por tratamiento.

Con respecto al análisis estadístico de la actividad específica de la tripsina, se encontraron diferencias tanto entre tratamientos como entre subestadios, así como una interacción entre

ambos factores ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2). Las mayores actividades fueron presentadas por las larvas mantenidas con la dieta con hidrolizado (DHK) y las del alimento vivo (AV) en MI (promedio de  $0.07 \text{ mU mg de proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ), cuyos valores fueron significativamente mas altos que los mostrados en los subestadios de MIII y PL1 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

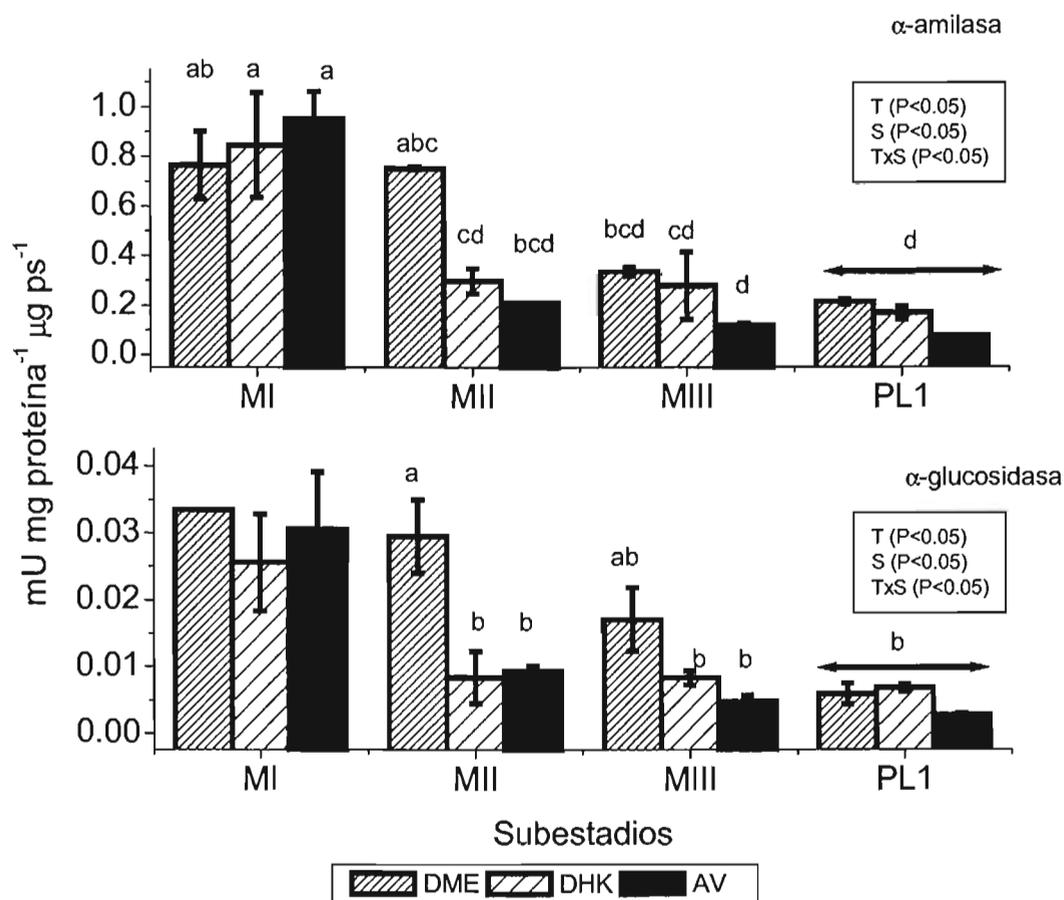


Fig. 3.- Actividad específica de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas, dieta microencapsulada con hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 3 repeticiones por tratamiento.

La actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa de MI a PL1 resultó afectada tanto por las dietas aplicadas como por el desarrollo de acuerdo al analisis estadístico ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3). También una interacción significativa entre los tratamientos dietéticos y los subestadios fue

encontrada ( $P < 0.05$ ). Así, una disminución significativa después del subestadio de MI fue observada en las larvas mantenidas con las diferentes dietas, excepto en MII con la dieta sin hidrolizado (DME) (Fig. 3) ( $P < 0.05$ ).

Un comportamiento muy similar fue manifestado con la evaluación de la  $\alpha$ -glucosidasa, donde las mayores actividades fueron observadas en el subestadio de MI. El tratamiento estadístico reveló que las diferentes dietas aplicadas así como los diferentes subestadios analizados tuvieron un efecto significativo en la actividad de esta enzima. Una interacción significativa entre ambos factores también fue encontrada ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3). También, una actividad significativamente más alta fue observada en las MIII alimentadas con la dieta artificial sin hidrolizado en relación al resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3).

### **Contenido de proteína soluble, colesterol y acilglicéridos.**

Los valores más altos de contenido de proteína soluble fueron mostrados por las larvas del tratamiento de AV, con diferencias significativas observadas en MII ( $0.15 \pm 0.003 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) y PL1 ( $0.32 \pm 0.004 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) comparados a los obtenidos con las dietas artificiales ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4). También, cambios en la concentración de proteína soluble conforme el desarrollo fueron observados, donde las PL1 de los diferentes tratamientos dietéticos mostraron los mayores contenidos de proteína soluble ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4). Una interacción significativa entre las diferentes dietas suministradas y los subestadios fue observada después del análisis bifactorial ( $P < 0.05$ ).

En cuanto al contenido de acilglicéridos, no se observaron diferencias estadísticas entre las diferentes dietas, pero sí entre los subestadios del desarrollo ( $P < 0.05$ ). Así, las larvas mantenidas con alimento vivo incrementaron el contenido de AG de MI a MIII ( $0.009 \pm 0.0003 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$  y  $0.02 \pm 0.001 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$  respectivamente) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4).

El contenido de colesterol no mostró variaciones significativas entre los tratamientos de alimentación, ni entre los diferentes subestadios analizados ( $P > 0.05$ ) (Fig. 4).

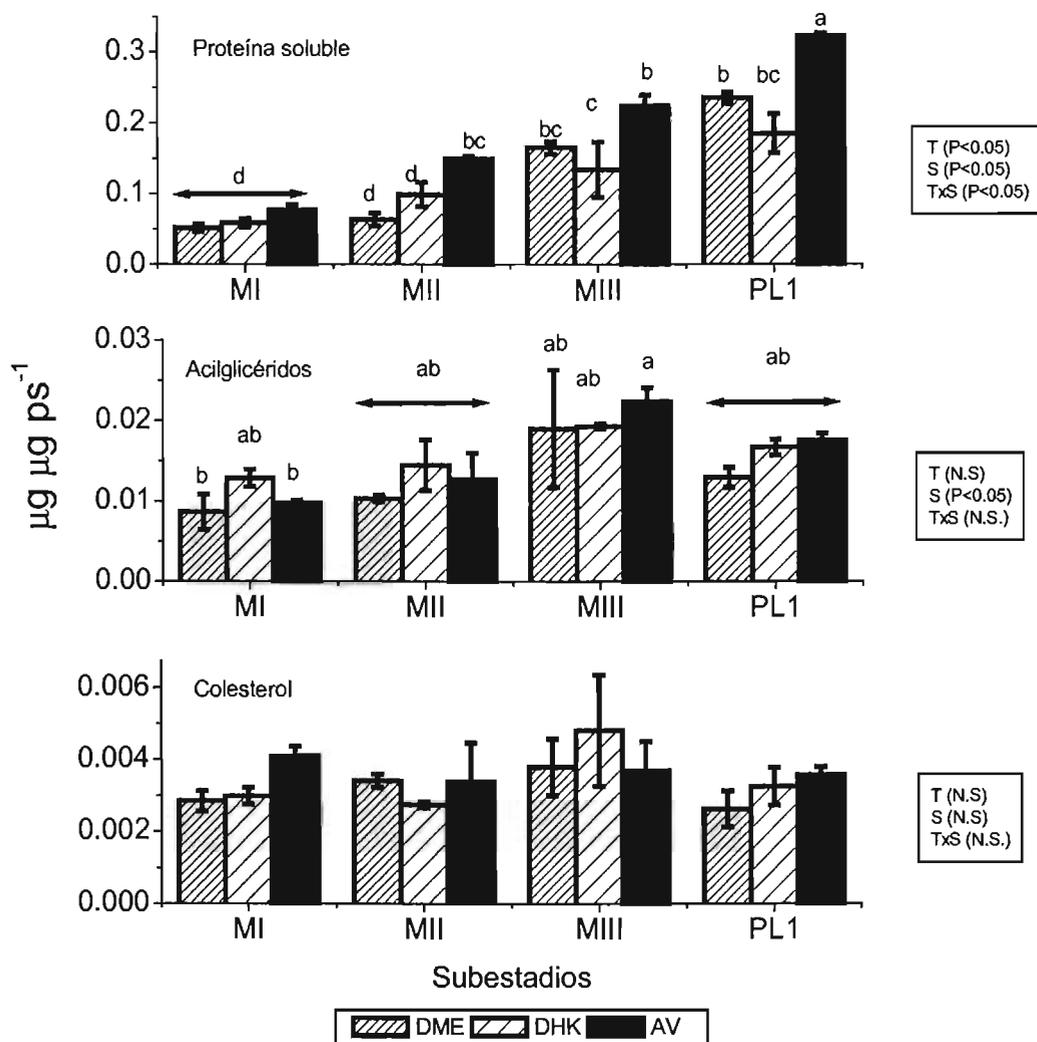


Fig. 4.- Contenido de proteína soluble, acilglicéridos y colesterol ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas, dieta microencapsulada con hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 3 repeticiones por tratamiento.

## Experimento 2: Sustitución parcial de alimento vivo en mysis de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado de krill e hidrolizado de langostilla.

### Crecimiento.

Las TEC estimadas tanto en longitud como en peso observadas en la Fig. 5a y 5b respectivamente con ambas dietas microencapsuladas (DHL y DHK) no fueron diferentes entre si ni con respecto al AV, pudiéndose establecer un valor promedio de  $14.6 \mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$  con estas dietas por los  $15.9 \mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$  obtenido por las larvas del AV.

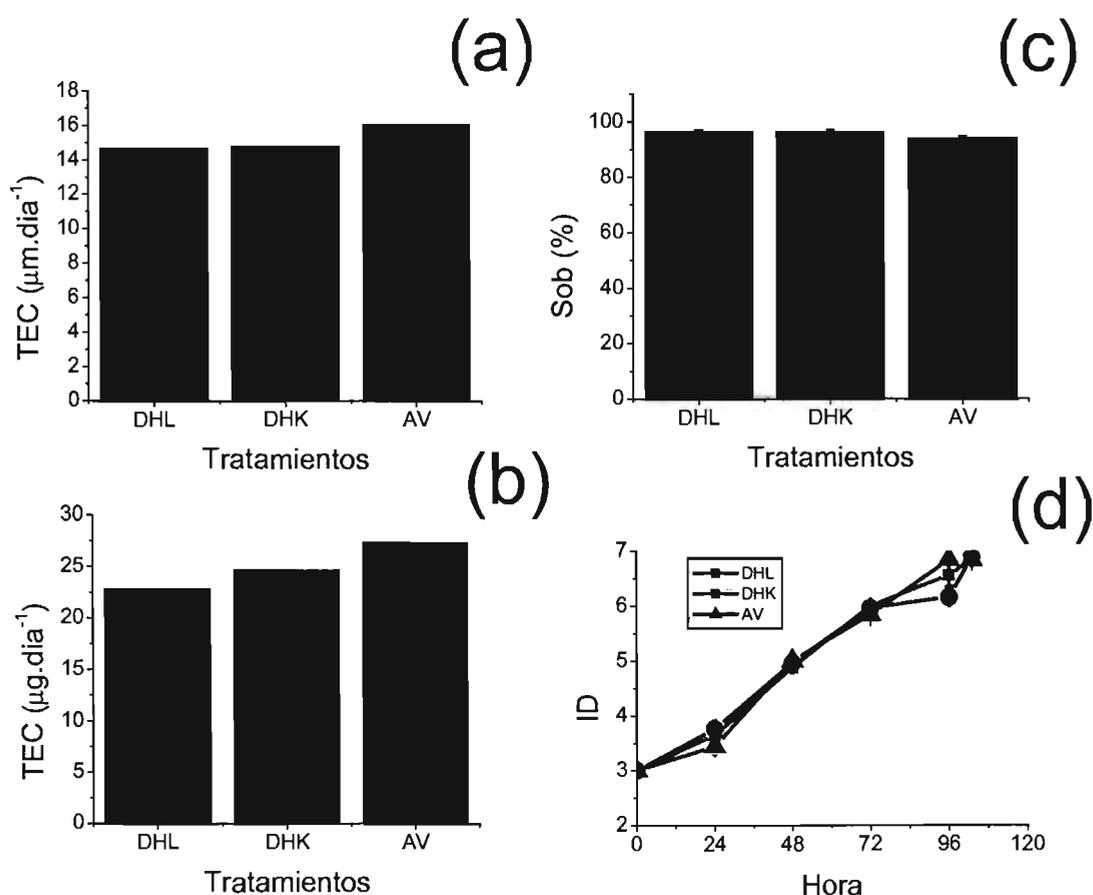


Fig. 5.- (a) Tasa Especifica de Crecimiento en Peso y (b) longitud, (c) Sobrevivencia (%) y (d) Índice de Desarrollo de las larvas de *L. vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta microencapsulada con hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 3 réplicas por tratamiento.

Una situación similar ocurrió con las TEC en peso, así, un valor promedio de  $23.6 \mu\text{m. día}^{-1}$  con las dietas artificiales por  $27.2 \mu\text{m. día}^{-1}$  con el AV fueron obtenidos, no habiendo diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P>0.05$ ).

### **Sobrevivencia e índice de desarrollo.**

Altos porcentajes de sobrevivencias fueron registrados al final del periodo experimental para los organismos mantenidos con todas las dietas (valor promedio de 94.8%), sin observarse diferencias estadísticas entre tratamientos (Fig. 5c).

Las larvas de *L. vannamei* necesitaron de 108 h para llegar a PL1 con todas las dietas, mostrándose un desarrollo sincronico hasta MIII en las primeras 72 h (Fig 3d). Sin embargo, a las 96 h, un retraso significativo fue observado en las larvas alimentadas con la dieta DHK ( $P<0.05$ ), sin afectar los resultados del desarrollo final (Fig. 5d).

### **Actividad específica de enzimas digestivas.**

Una disminución significativa de la actividad específica de las proteasas totales fue observada de MI a PL1 en todos los tratamientos ( $P<0.05$ ) (Fig. 6). Así también, una mayor actividad de las larvas mantenidas con la dieta artificial conteniendo hidrolizado de langostilla (DHL) y las del alimento vivo (AV) ( $240 \pm 33 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$  y  $460 \pm 10 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) en relación a las alimentadas con la dieta DHK en MI fue observada ( $P<0.05$ ) (Fig. 6). Un efecto combinado entre los tratamientos dietéticos y los subestadios del desarrollo fue encontrado al presentarse una interacción significativa entre ambos factores analizados ( $P<0.05$ ).

La actividad de la tripsina en el subestadio de MI de las larvas mantenidas con el alimento vivo ( $0.6 \pm 0.1 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) resulto significativamente mas alta en relación a las mostradas por las larvas alimentadas con las dietas artificiales ( $P<0.05$ ) (Fig. 6). El análisis bifactorial reveló diferencias estadísticas tanto con los tratamientos de alimentación, como entre los subestadios del desarrollo, presentando una interacción significativa entre ambos factores ( $P<0.05$ ).

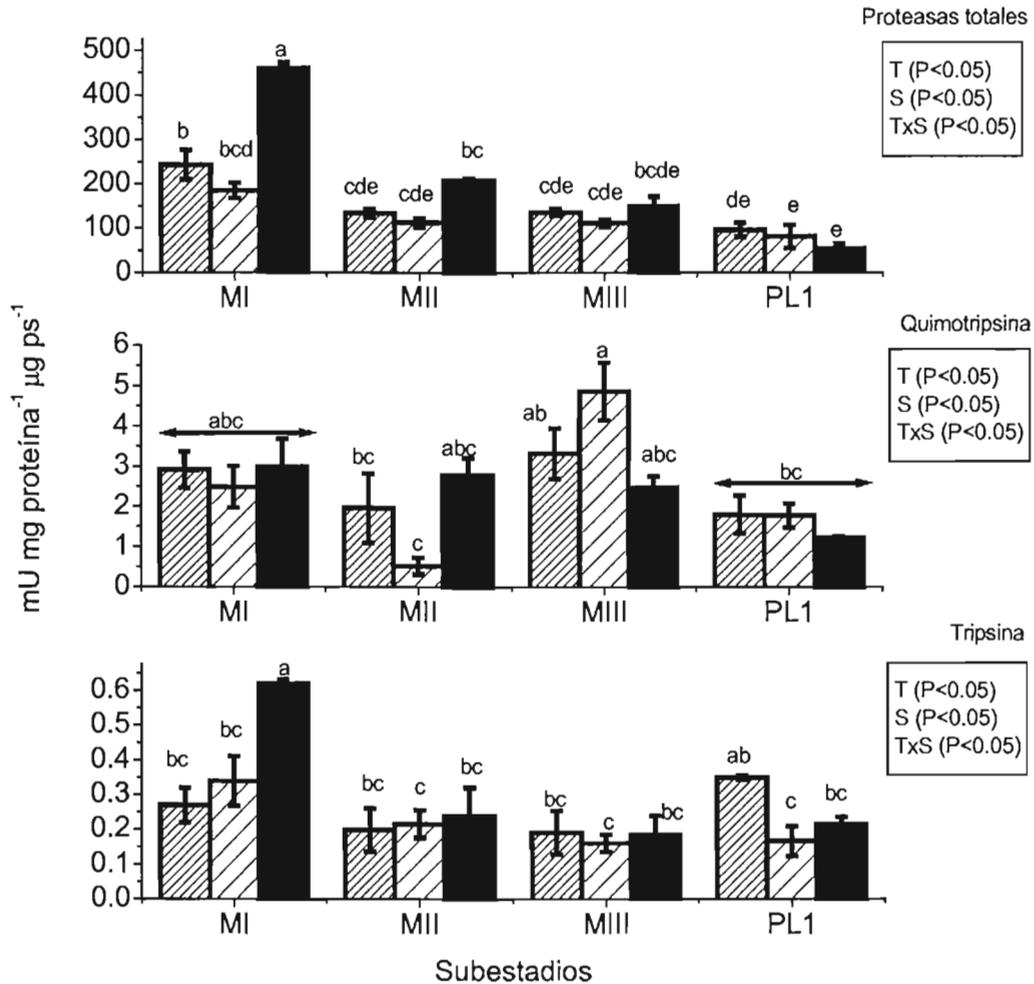


Fig. 6.- Actividad específica de proteasas totales, quimotripsina y tripsina de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta microencapsulada con hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

En cuanto a la actividad de la quimotripsina, una disminución significativa fue observada en MII y PL1 con el tratamiento DHK en relación a los subestadios precedentes, aunque sus valores promedios no resultaron estadísticamente distintos a los exhibidos por las larvas mantenidas con el resto de los tratamientos de alimentación en estos mismos subestadios ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6). La actividad de esta enzima mostrada por las larvas mantenidas con el alimento vivo resultó significativamente más alta en MII en relación a la mostrada por las larvas alimentadas con la dieta conteniendo HK, pero no con respecto a la exhibida por las

del tratamiento de la dieta artificial donde el hidrolizado de langostilla estuvo presente (Fig. 6).

Con respecto a la actividad de las carbohidrasas, mayores actividades amilasidicas fueron observadas en MIII y PL1 por las larvas alimentadas con las dietas artificiales conteniendo los hidrolizados en relación a la actividad mostrada por las larvas mantenidas con el alimento vivo ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7). Una disminución constante en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa fue observada por las larvas mantenidas con el alimento vivo desde MI a PL1 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7). Diferencias estadísticas entre tratamientos y entre subestadios fueron encontradas con el análisis estadístico bifactorial aplicado a los valores de actividad de esta enzima ( $P < 0.05$ ).

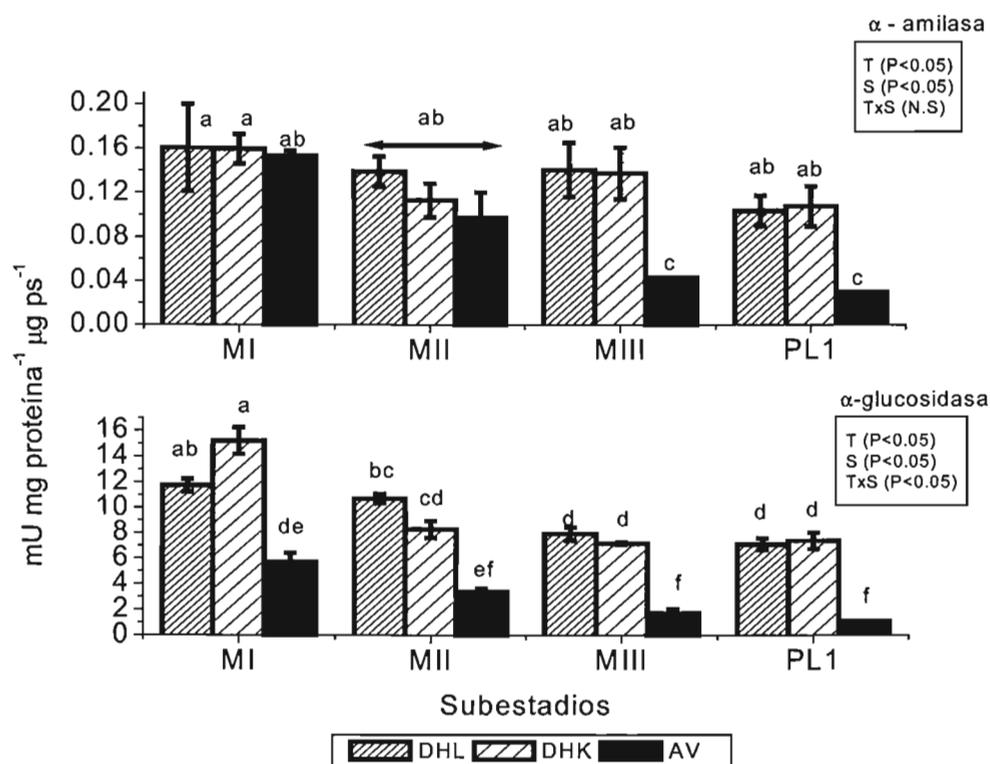


Fig. 7.- Actividad específica de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa ( $\text{mU mg proteína}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta microencapsulada con hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

En cuanto a la  $\alpha$ - glucosidasa, el análisis estadístico reveló diferencias estadísticas tanto entre los diferentes tratamientos dietéticos como entre los subestadios del desarrollo analizados. También, una interacción significativa entre ambos factores fue encontrada ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7). Las mayores actividades fueron presentadas por las larvas mantenidas con las dietas artificiales conteniendo los hidrolizados proteicos en todos los subestadios en relación a las larvas mantenidas con el alimento vivo ( $P < 0.05$ ), aunque una disminución gradual en la actividad se presentó en todos los tratamientos a partir de MII en adelante (Fig. 7) ( $P < 0.05$ ).

### **Contenido de proteína soluble total, acilglicéridos y colesterol.**

Los contenidos de proteína soluble de las larvas alimentadas con los diferentes tratamientos de alimentación no mostraron diferencias significativas al final del periodo experimental ( $P > 0.05$ ) (Fig. 8). Solo en MI la mayor concentración de proteína soluble en las larvas alimentadas con la dieta conteniendo hidrolizado de krill ( $0.33 \pm 0.03 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) mostró un valor promedio más alto que el mostrado por las larvas mantenidas con el alimento vivo ( $0.18 \pm 0.003 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8). También entre los diferentes subestadios y una interacción significativa fue encontrada después del análisis bifactorial ( $P > 0.05$ ). Así, mayores contenidos de proteína soluble de las larvas mantenidas con las dietas artificiales en los subestadios de MI y MII son observados en relación a las MIII mantenidas con estas dietas ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8).

El contenido de AG mostró solo diferencias estadísticas entre subestadios, así como una interacción significativa entre tratamientos y subestadios ( $P > 0.05$ ) (Fig. 8). El mayor contenido de AG de las larvas mantenidas con la dieta conteniendo hidrolizado de krill en MI, resultó significativamente más alto que el mostrado en los subestadios subsecuentes con este tratamiento ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8).

En cuanto al colesterol, diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos dietéticos, así como entre subestadios fue revelada después de la prueba estadística ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8). La mayor concentración de colesterol fue observada en el subestadio de MI por las larvas mantenidas con la dieta de alimento vivo, y fue significativamente más alta que la mostrada por las larvas mantenidas con la dieta conteniendo hidrolizado de langostilla ( $P < 0.05$ ) (Fig.

8). Este contenido en MI de las larvas mantenidas con el tratamiento de alimento vivo fue superior a la vez de las PL1 producidas con este mismo tratamiento ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8).

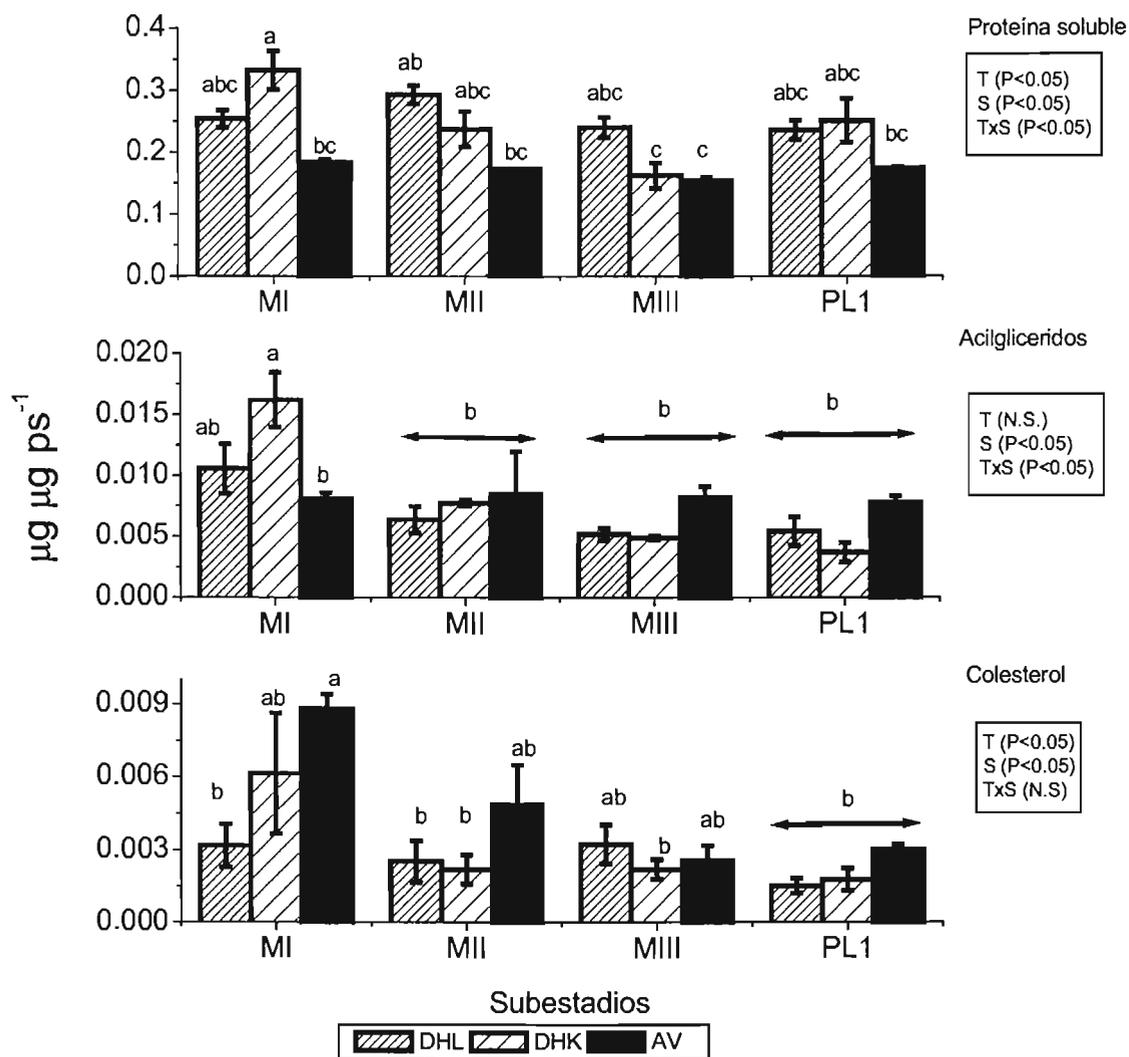


Fig. 8.- Contenido de proteína soluble, acilglicéridos y colesterol ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta microencapsulada con hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

### Experimento 3: Sustitución total de alimento vivo en protozoas de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado CPSP 90%.

#### Crecimiento.

Las mayores TEC en longitud (Fig. 9a) fueron observadas en el tratamiento con microalgas (AV) y con la dieta microencapsulada de 3  $\mu\text{m}$  (DCPSP3), cuyos promedios resultaron diferentes estadísticamente a la observada en el tratamiento con la dieta microencapsulada de 26  $\mu\text{m}$  (DCPSP26) ( $P < 0.05$ ).

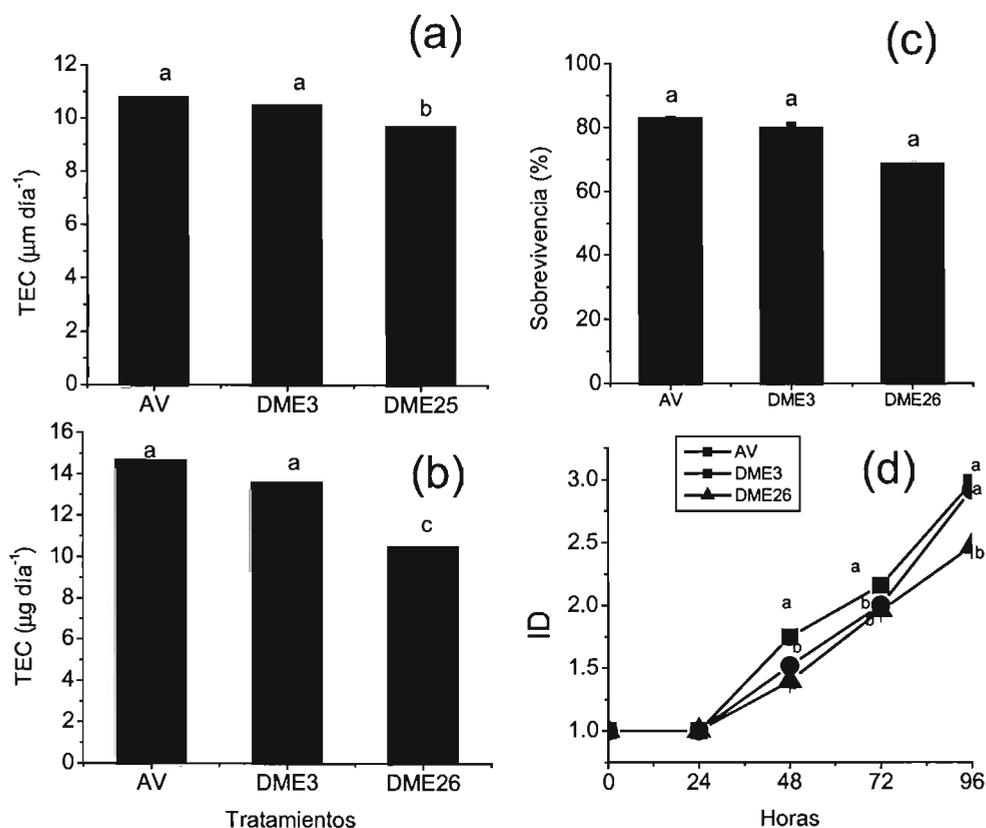


Fig. 9.- (a) Tasa Especifica de Crecimiento en Peso y (b) longitud, (c) Sobrevivencia (%) y (d) Índice de Desarrollo de las larvas protozoas de *L. vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado de 3  $\mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado de 26  $\mu\text{m}$  (DCPSP26) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 réplicas por tratamiento.

Un valor promedio mayor en cuanto a la tasa específica de crecimiento en peso (TEC) (Fig. 9b) fue observada con la dieta de AV seguida de la observada con la DCPSP3, no habiendo

diferencias estadísticas entre ambos tratamientos ( $P < 0.05$ ) y si con respecto al valor alcanzado por las larvas mantenidas con la dieta DCPSP26 ( $p < 0.05$ ).

No se observaron diferencias estadísticas en relación a la sobrevivencia (Fig.9c), sin embargo, los mayores porcentajes (cercaos a 80%) fueron alcanzados por las larvas alimentadas con las dietas con AV y DCPSP3 en comparación al 70 % en promedio presentados por las larvas del tratamiento con la DCPSP26 ( $P > 0.05$ ).

En cuanto al desarrollo (Fig. 9d), un valor promedio de ID de 2.7 fue estimado para las larvas alimentadas con la dieta con el mayor tamaño de partícula (DCPSP26) reflejando un retraso significativo para arribar al subestadio de PZIII en relación a las larvas alimentadas con las dietas con AV y DCPSP3 (ID de 3) en un tiempo de 96 horas de iniciado el experimento ( $P < 0.05$ ).

### **Actividad específica de enzimas digestivas**

En la Fig. 10 se muestran las actividades específicas de las enzimas proteolíticas evaluadas en PZI y PZIII de las larvas mantenidas con diferentes dietas. Diferencias solo entre los dos subestadios analizados fueron encontradas ( $P < 0.05$ ). Así, las mayores actividades fueron presentadas en PZI, donde una actividad promedio de  $51.5 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$  resultó significativamente mas alta que las observadas en PZIII en todos los tratamientos dietéticos (promedio de  $13.7 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) (Fig. 10).

En el caso de la actividad específica de la quimotripsina, una alta actividad de las larvas mantenidas con la dieta de  $3 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula fue observada en relación a las mostradas por las larvas alimentadas con las otras dietas ( $P < 0.05$ ). Esta alta actividad, fue significativamente mas alta que la observada en PZIII por las larvas de este mismo tratamiento dietético ( $P < 0.05$ ). No se observaron variaciones en la actividad de la quimotripsina de las larvas mantenidas con la dieta de  $26 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula ni las alimentadas con el alimento vivo durante la fase del desarrollo evaluada ( $P > 0.05$ ). Una interacción significativa entre los tratamientos de alimentación con los subestadios del desarrollo fue encontrada después del análisis estadístico ( $P > 0.05$ ).

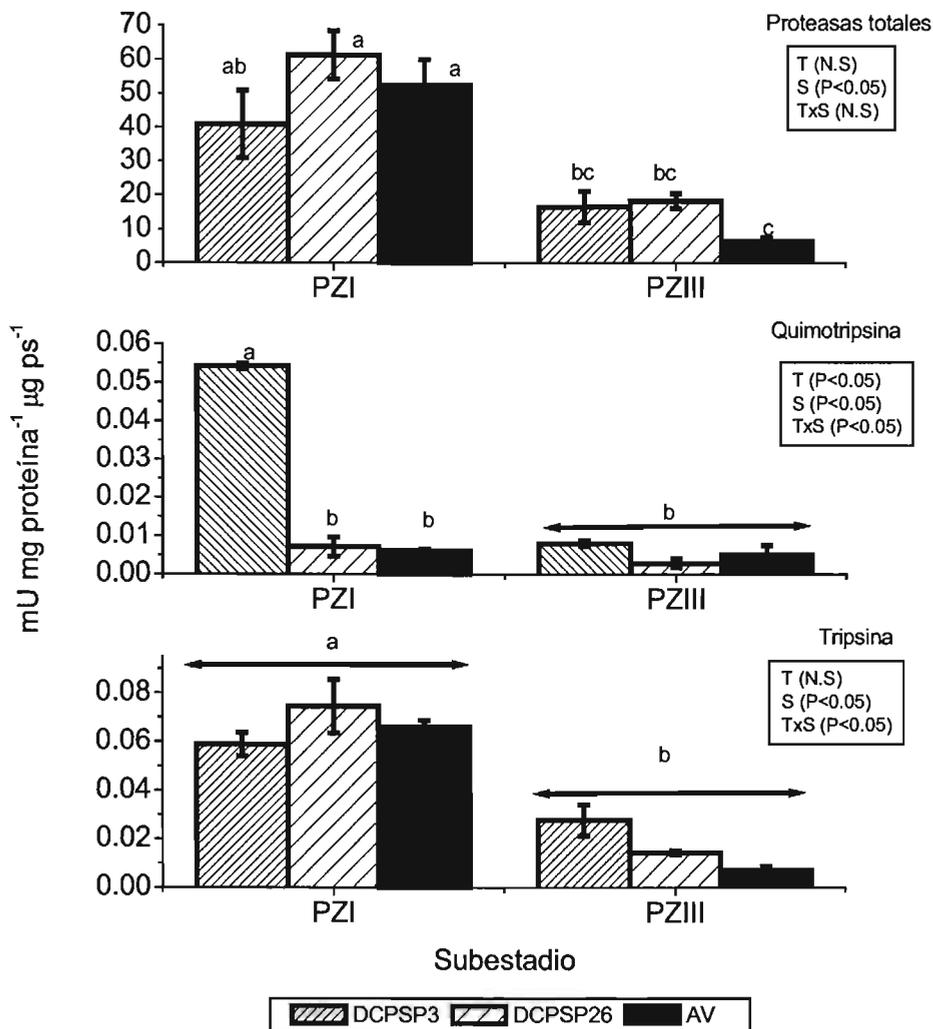


Fig. 10.- Actividad específica de proteasas totales, quimotripsina y tripsina ( $\text{mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado de  $3 \mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado de  $26 \mu\text{m}$  (DCPSP26) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S.  $N = 5$  repeticiones por tratamiento.

En el caso de la tripsina, un comportamiento similar a las proteasas totales fue encontrado. Solo diferencias entre subestadios fueron reveladas con la prueba estadística ( $P < 0.05$ ). Las mayores actividades fueron observadas en el subestadio de PZI en relación a las PZIII, pudiéndose calcular valores promedios de  $0.06 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$  y  $0.01 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$  respectivamente ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10).

La actividad de las carbohidrasas se observa en la Fig. 11. La actividad de la  $\alpha$  – amilasa mostró solo diferencias estadísticas entre los subestadios larvales, con una mayor actividad en PZI con los diferentes tratamientos dietéticos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11). Así, un valor promedio de  $1.54 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$  de las PZI resultó mas alto que el promedio de  $0.35 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$  estimado para las PZIII de todos los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11).

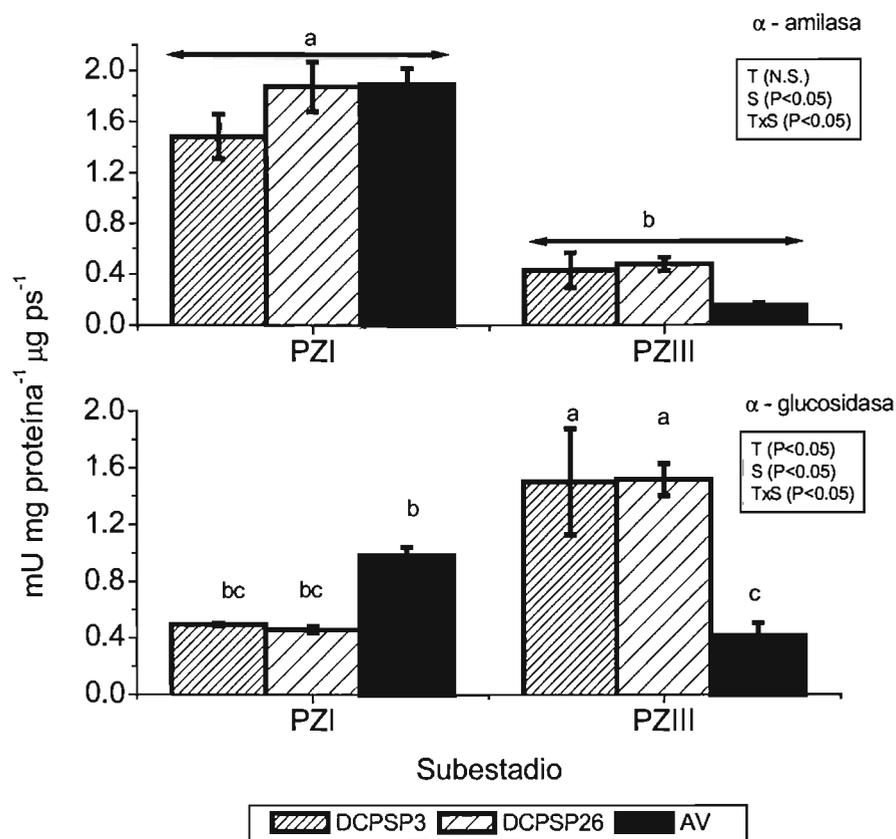


Fig. 11.- Actividad específica de  $\alpha$  – amilasa y  $\alpha$  – glucosidasa ( $\text{mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado de  $3 \mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado de  $26 \mu\text{m}$  (DCPSP26) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

En cuanto a la actividad específica de la  $\alpha$  – glucosidasa , el análisis bifactorial aplicado reveló diferencias estadísticas tanto entre los diferentes tratamientos de alimentación , como entre los subestadios analizados ( $P < 0.05$ ). Así también, una interacción significativa entre

ambos factores para la respuesta de esta enzima fue encontrada ( $P < 0.05$ ). A diferencia de la  $\alpha$  – amilasa, las mayores actividades fueron encontradas en PZIII, donde los valores promedios registrados por las larvas alimentadas con las dietas artificiales ( $1.5 \pm 0.3$  mU mg proteína<sup>-1</sup>  $\mu$ g ps<sup>-1</sup> con la DCPSP3 y  $1.5 \pm 0.1$  mU mg proteína<sup>-1</sup>  $\mu$ g ps<sup>-1</sup> con la dieta DCPSP26) resultaron superiores al mostrado por las larvas mantenidas con el alimento vivo ( $0.4 \pm 0.08$  mU mg proteína<sup>-1</sup>  $\mu$ g ps<sup>-1</sup>) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11).

En relación a la concentración de metabolitos, estos se presentan en la Fig. 12. el análisis bifactorial del contenido de proteína soluble reveló diferencias tanto entre tratamientos dietéticos, como entre los subestadios del desarrollo, así como una interacción significativa entre ambos factores ( $P < 0.05$ ) (Fig. 12). Mientras que las larvas mantenidas con el alimento vivo mantuvieron una concentración estable de proteína soluble entre PZI y PZIII, las larvas alimentadas con la dieta de 3 mm disminuyeron significativamente hacia este último subestadio ( $P < 0.05$ ) (Fig. 12) y resultó el promedio más bajo de todos los tratamientos dietéticos ( $P < 0.05$ ). En cuanto al contenido de acilglicéridos, una concentración significativamente mayor de las larvas mantenidas con la dieta de 3 mm fue observada en PZI en relación al resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 12). Así también, los mayores valores presentados en las PZI en relación a las PZIII de las diferentes dietas, fueron significativamente más altos de acuerdo a la prueba estadística ( $P < 0.05$ ). Una interacción significativa entre los tratamientos de alimentación y los subestadios del desarrollo analizados fue encontrada de acuerdo al análisis bifactorial ( $P < 0.05$ ).

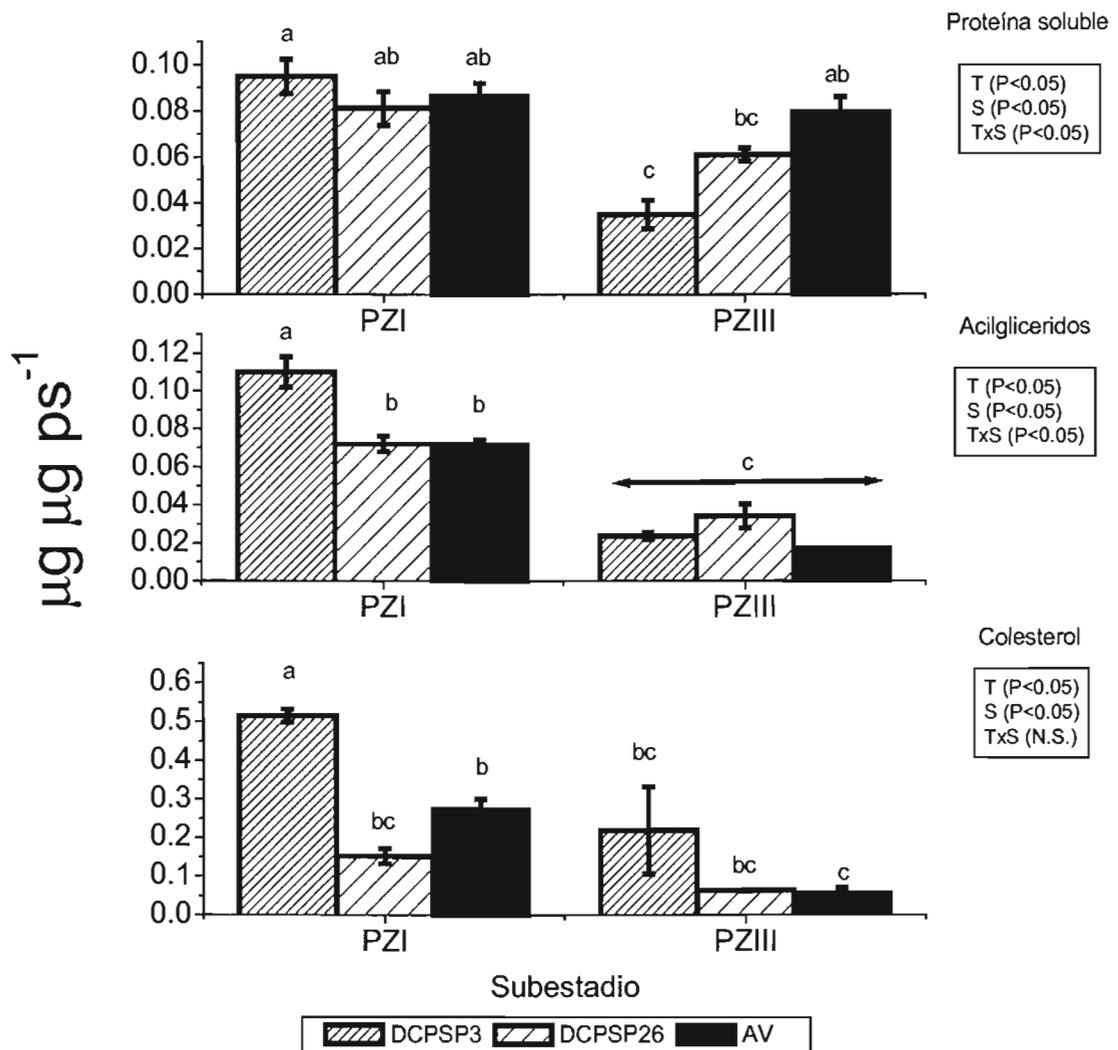


Fig. 12.- Contenido de proteína soluble, acilglicéridos y colesterol ( $\mu\text{g } \mu\text{g } \text{ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado de 3  $\mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado de 26  $\mu\text{m}$  (DCPSP26) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

## Experimento 4: Sustitución parcial de alimento vivo en mysis de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado CPSP 90%.

### Crecimiento.

Una mayor TEC en longitud fue obtenida por las larvas alimentadas con alimento vivo ( $3.2 \pm 0.0008 \mu\text{m} \text{ día}^{-1}$ ) con relación a las alimentadas con las dietas artificiales (promedio de  $2.75 \%$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 13a). En cuanto a la TEC en peso, un promedio mas alto de  $3.56 \pm 0.13 \mu\text{m} \text{ día}^{-1}$  fue obtenido por las larvas alimentadas con la dieta DCPSP, aunque este valor no mostró diferencias significativas con relación a los obtenidos en los tratamientos restantes ( $P > 0.05$ ) (Fig. 13b).

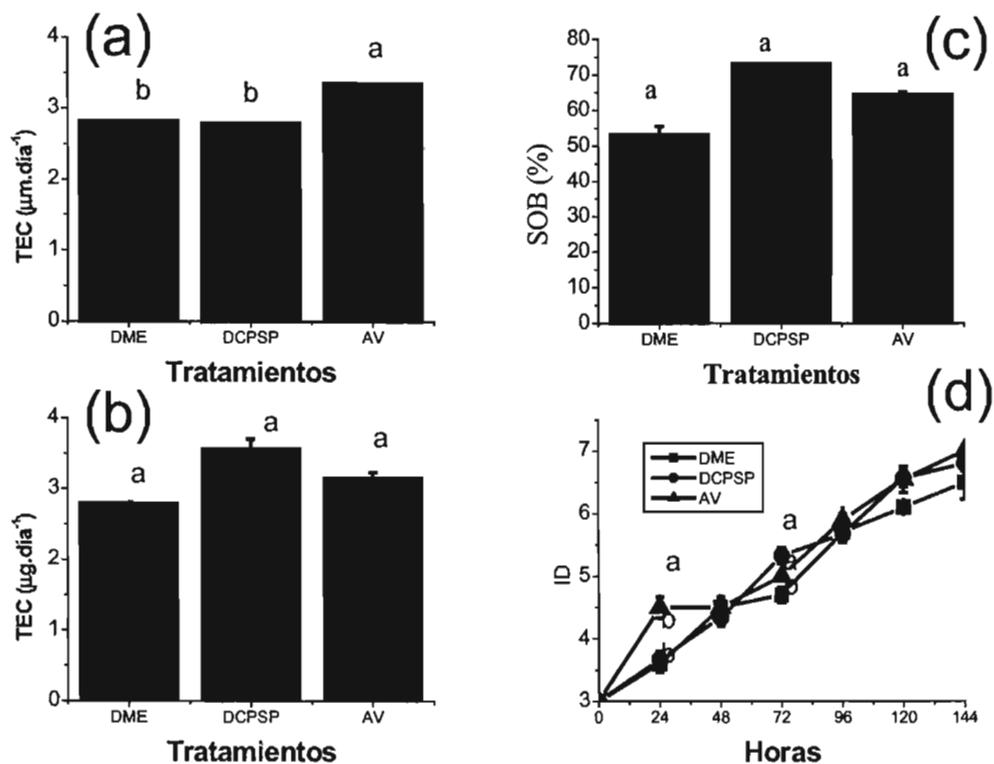


Fig. 13.- (a) Tasa específica de crecimiento en longitud ( $\mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$ ) y (b) peso (%), (c) sobrevivencia y (d) índice de desarrollo desde PZIII a PL1 de larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas; dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSP) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 réplicas por tratamiento.

### **Sobrevivencia (%) e índice de desarrollo (ID)**

El valor promedio mas alto de sobrevivencia ( $73 + 0.11\%$ ) a PL1 fue obtenido con la dieta conteniendo el CPSP aunque no fue estadísticamente diferente con relación a los demás tratamientos, aunque un valor mas bajo de  $53 \pm 2.35\%$  fue observado con las larvas mantenidas con la dieta DME ( $P > 0.05$ ) (Fig. 13c).

Con relación al ID un retraso significativo a las 24 h de iniciado el experimento en las larvas alimentadas con las dietas artificiales fue observado con relación a las mantenidas con alimento vivo ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, este retraso no afectó al desarrollo general, ya que a las 144 h de iniciado el experimento, los ID alcanzados por las tres dietas no mostraron diferencias ( $P > 0.05$ ) (Fig. 13d).

### **Actividad especifica de enzimas digestivas.**

Una mayor actividad de proteasas totales fue observada en el subestadio de MI por las larvas mantenidas con la dieta conteniendo el hidrolizado CPSP ( $505.9 + 49 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) en relación al resto de los tratamientos de alimentación ( $P < 0.05$ ) (Fig. 14). Una disminución significativa fue observada en las larvas alimentadas con la dieta artificial con CPSP, así como las mantenidas con el alimento vivo a partir de MII y MIII respectivamente fue observada, y una interacción significativa entre estos tratamientos de alimentación con el desarrollo larvario fue encontrada (Fig. 14). En PL1, la menor actividad fue registrada por las larvas mantenidas con el alimento vivo ( $13.4 + 2.8 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) en relación con las larvas alimentadas con las dietas artificiales. Un efecto de los diferentes regímenes de alimentación , así como diferencias entre los subestadios fue observada de acuerdo al resultado del análisis bifactorial.

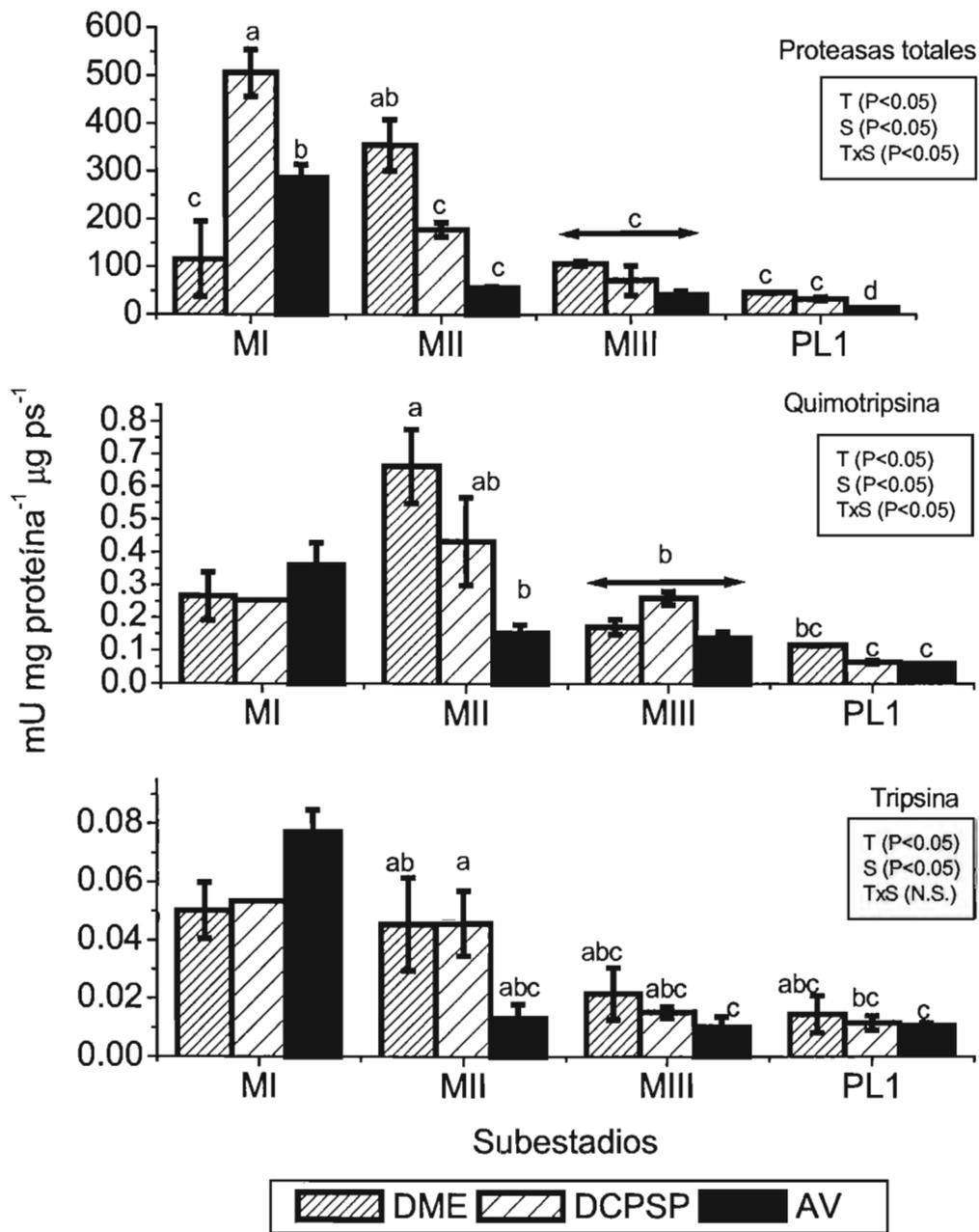


Fig. 14.- Actividad específica de proteasas totales, quimotripsina y tripsina de larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas; dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSP) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

Con respecto a la actividad de la quimotripsina, un pico de actividad fue observado en MII por las larvas mantenidas con la dieta sin hidrolizado (DME) ( $0.66 \pm 0.1 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ), el cual fue significativamente mas alto que el promedio mostrado por las larvas mantenidas con el alimento vivo ( $P < 0.05$ ) (Fig. 14). El análisis estadístico no incluyo los valores de MI, ya que solo se contó con un valor de la dieta con hidrolizado (DCPSP). Sin embargo a partir de MII, el análisis revelo diferencias entre los valores de actividad de las larvas sometidas ante las distintas dietas, así como entre subestadios del desarrollo, observándose mayores actividades en las MII alimentadas con las dietas artificiales en relación a los valores presentados en PL1 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 14).

Con respecto a la actividad especifica de la tripsina, el análisis bifactorial solo fue realizado a partir de MIII por la misma razón que para la quimotripsina, encontrándose diferencia estadísticas tanto entre los diferentes regímenes de alimentación, como entre los subestadios del desarrollo ( $P < 0.05$ ) (Fig. 14). Una disminución hacia PL1 fue observada en las larvas, aunque solo fue significativa en los organismos mantenidos con la dieta artificial con hidrolizado ( $P < 0.05$ ) ( Fig. 14). El valor promedio mas alto fue mostrado en MI por las larvas mantenidas con alimento vivo, y aunque no fueron evaluadas estadísticamente, su promedio fue muy similar al mostrado por las larvas mantenidas con las dietas artificiales (Fig. 14).

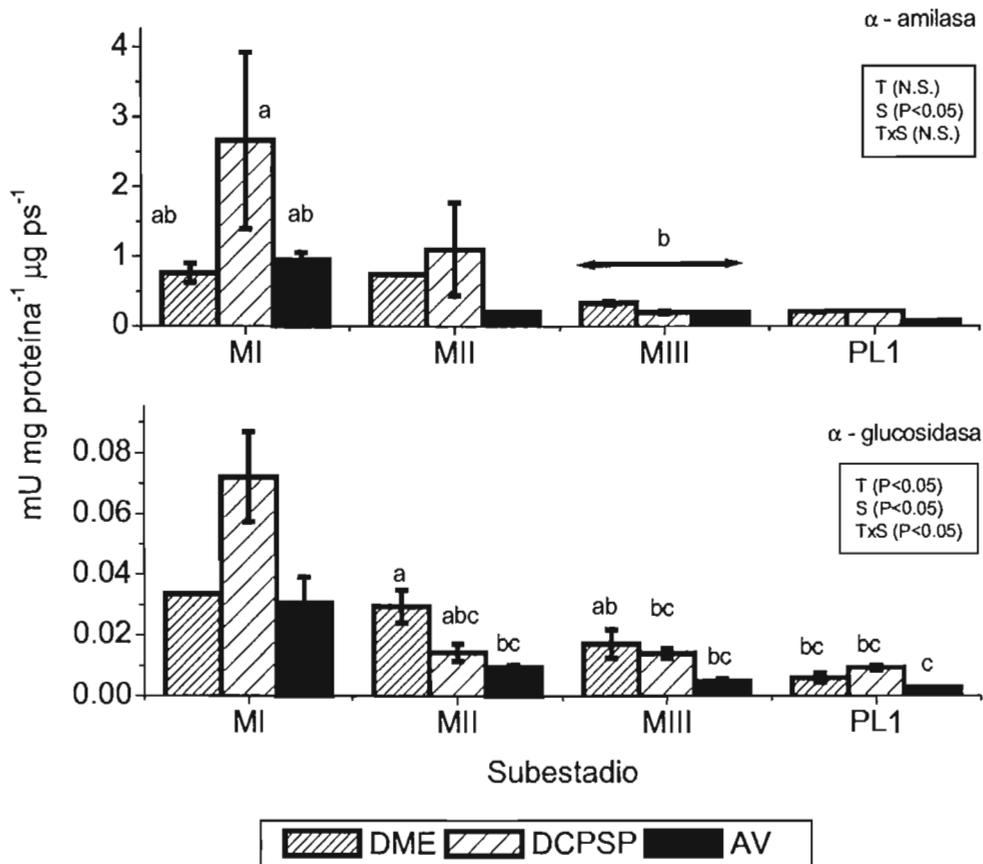


Fig. 15.- Actividad específica de  $\alpha$ -amilasa de larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas; dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSP) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S.  $N = 5$  repeticiones por tratamiento.

En el caso de la actividad de la amilasa, solo los subestadios de MI y MIII fueron incluidos en el analisis bifactorial, porque en MII y PL1 solo se conto con un dato para las alrvas mantenidas con el alimento vivo. Sin embargo, son presentados en la Fig. 15. El analisis bifactorial solo reveló diferencias estadísticas entre los dos subestadios analizados, unicamente con el tratamiento con la dieta artificial con CPSP ( $p < 0.05$ ), presentando un valor mas alto en MI de  $2.6 \pm 1.2$  mU mg proteína<sup>-1</sup>  $\mu$ g ps<sup>-1</sup> (Fig. 15). Actividades sin variaciones entre los distintos subesatdios fueron mostradas por las larvas mantenidas con la dieta DME y AV ( $P > 0.05$ ) (Fig. 15).

Para la actividad específica de la glucosidasa, un efecto tanto de los diferentes tratamientos dietéticos, como de los subestadios analizados, así como una interacción significativa entre ambos factores fue encontrada después del análisis bifactorial ( $P < 0.05$ ) (Fig. 15). El análisis solo fue realizado desde MII, aunque los datos para MI son presentados en la Fig. 15, donde se observa que hay mayor actividad de esta enzima, principalmente en las larvas mantenidas con la dieta conteniendo el hidrolizado. Sin embargo, para los subestadios analizados, una mayor actividad significativa fue observada en las larvas mantenidas con la dieta sin hidrolizado (DME) ( $0.02 \pm 0.005$  mU mg proteína<sup>-1</sup>  $\mu$ g ps<sup>-1</sup>). Este valor fue significativamente más alto en relación al resto de los tratamientos y a las actividades mostradas en PL1 (promedio de  $0.005 + 0.001$  mU mg proteína<sup>-1</sup>  $\mu$ g ps<sup>-1</sup> con la dieta DME) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 15).

### **Contenido de proteína soluble, colesterol y acilglicéridos.**

Un efecto de los diferentes regímenes de alimentación sobre el contenido de proteína soluble fue observado en los diferentes subestadios del desarrollo analizados ( $P < 0.05$ ), con una tendencia a incrementarse conforme el desarrollo (Fig. 16). Este incremento fue significativo a partir de MII para las larvas mantenidas con el alimento vivo, cuyo valor promedio de las MII y MIII ( $0.18 \mu$ g. $\mu$ g de ps<sup>-1</sup>) resultó significativamente más alto que el contenido mostrado en MI ( $0.07 + 0.006 \mu$ g. $\mu$ g de ps<sup>-1</sup>) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 16). En PL1, el mayor contenido de proteína soluble fue mostrado por las larvas del tratamiento AV ( $0.32 \pm 0.003 \mu$ g. $\mu$ g de ps<sup>-1</sup>), cuyo valor resultó significativamente más alto que el mostrado por las larvas alimentadas con las dietas artificiales ( $0.21 \mu$ g. $\mu$ g de ps<sup>-1</sup>). El análisis bifactorial también mostró una interacción significativa entre los diferentes tratamientos dietéticos con los subestadios, dado el incremento significativo entre MIII y PL1 observado en las larvas mantenidas con el alimento vivo (Fig. 16).

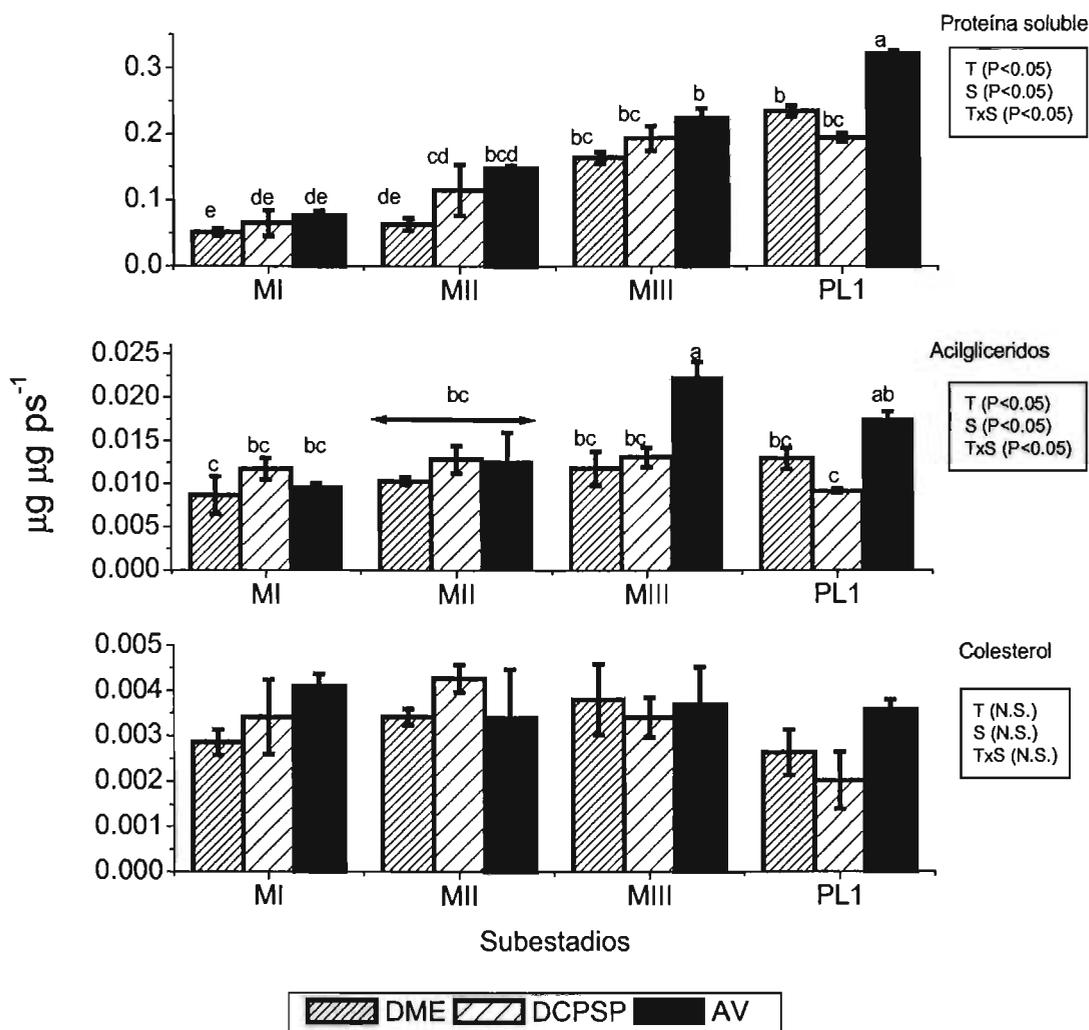


Fig. 16.- Contenido de proteína soluble, colesterol y acilglicéridos ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}$  de  $\text{ps}^{-1}$ ) de larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas; dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSP) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

En el caso del contenido de AG, la mayor concentración fue encontrada en las larvas mantenidas con la dieta de alimento vivo en el subestadio de MIII, cuyo valor fue significativamente más alto que el mostrado por las larvas mantenidas con las dietas artificiales y también con respecto a los demás subestadios analizados ( $P < 0.05$ ) (Fig. 16). No se observaron variaciones en el contenido de AG en las larvas mantenidas con las dietas artificiales de acuerdo al análisis estadístico aplicado ( $P > 0.05$ ). La concentración de AG

cambio significativamente a partir de MIII en las larvas mantenidas con el tratamiento AV y esta variación puede ser mostrada por la interacción significativa entre el factor tratamiento (AV) y los subestadios larvales.

El contenido de colesterol no mostró variaciones entre los diferentes regímenes de alimentación, ni entre los subestadios analizados, así como ante la combinación de ambos factores ( $P > 0.05$ ) (Fig. 16). De tal forma, un valor promedio de contenido de colesterol de  $0.003 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g de ps}^{-1}$  puede ser estimado combinando los valores producidos por las dietas artificiales y el alimento vivo (Fig. 16).

## Experimento 5: Sustitución parcial y total de alimento vivo en mysis de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado CPSP 90%.

### Crecimiento.

Las TEC en longitud obtenidas en el estadio de protozoa (PI a PZIII) fueron similares entre el tratamiento con la dieta artificial (DCPSP) y el de alimento vivo (AV) ( $13.9 \pm 0.36 \mu\text{m día}^{-1}$  y  $13.53 \pm 0.4 \mu\text{m día}^{-1}$  para AV y DCPSP respectivamente) ( $P > 0.05$ ) (Fig. 17a).

Sin embargo, las TEC en longitud calculadas desde PI a PL1 mostraron los mayores valores con las dietas AV ( $10.5 \pm 0.05 \mu\text{m día}^{-1}$ ) y DCPSPCA ( $10.31 \pm 0.05 \mu\text{m día}^{-1}$ ), los cuales resultaron estadísticamente diferentes al obtenido por las larvas alimentadas únicamente con la dieta artificial (DCPSP) ( $8.12 \pm 0.13 \mu\text{m día}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 17a).

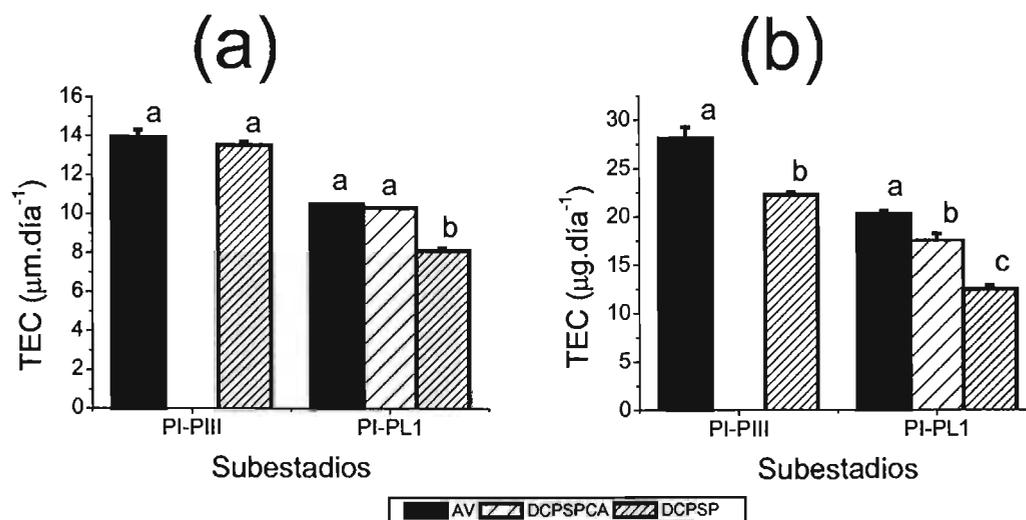


Fig. 17.- Tasa específica de crecimiento en longitud (a) y peso (b) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSP); dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSPCA) más microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 réplicas por tratamiento.

En cuanto al peso, las mayores tasas específicas de crecimiento fueron mostradas por las larvas mantenidas con alimento vivo tanto las calculadas de PZI a PZIII, como de PZI a PL1 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 17b). Entre PZI y PZIII, un valor de TEC de  $28.07 \pm 1.15 \mu\text{g día}^{-1}$  para las larvas del AV resultó superior al obtenido por las larvas de la dieta artificial ( $22.25 \pm 0.3 \%$ ) ( $P < 0.05$ ). Así también, la TEC obtenida para toda la fase larvaria mostró el mayor

porcentaje en las larvas alimentadas con la dieta de alimento vivo (AV) con un valor promedio de  $20.23 \pm 0.36 \mu\text{m día}^{-1}$ , el cual fue 13.5 y 31 % mas alto que las obtenidas por las larvas alimentadas con la dieta artificial (TEC de  $17.5 \pm 0.5 \mu\text{m día}^{-1}$  y  $12.48 \pm 0.4 \mu\text{m día}^{-1}$  para DCPSPCA y DCPSP respectivamente) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 17b).

**Sobrevivencia (%) e Índice de desarrollo (ID).**

Un mayor porcentaje de sobrevivencia fue obtenido por las larvas mantenidas con la dieta artificial con algas ( $83.7 \pm 4.4$ ), aunque este promedio no resultó diferente estadísticamente a la mostrada por las larvas del resto de los tratamientos ( $74.8 \pm 4.4 \%$  y  $74.5 \pm 4.2 \%$  para el AV y la DCPSP respectivamente) ( $P > 0.05$ ) (Fig. 18a).

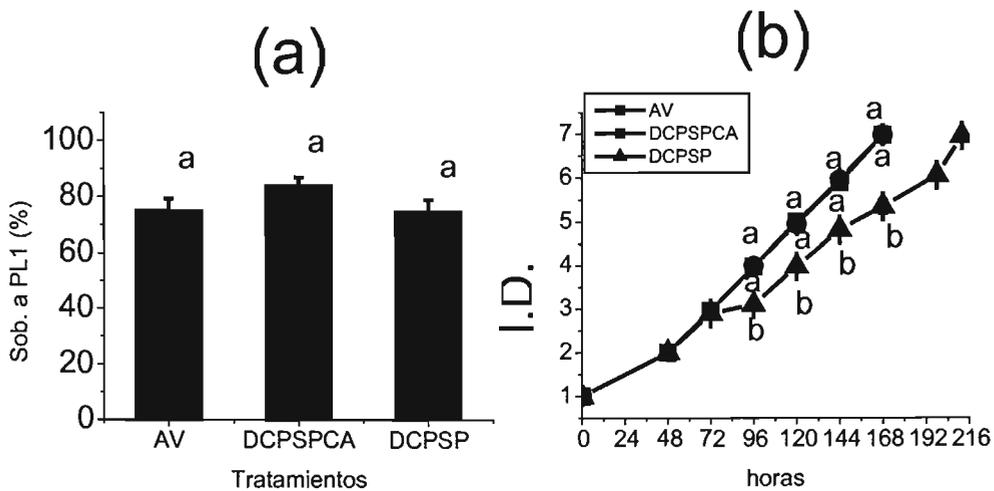


Fig. 18.- (a) Sobrevivencia (%) y (b) Índice de Desarrollo (I.D.) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado(DCPSP); dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSPCA) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 réplicas por tratamiento.

En cuanto al desarrollo, un retraso significativo fue observado en las larvas alimentadas únicamente con la dieta artificial (DCPSP) a partir de las 96 horas (ID de 3.0) cuando los organismos de los tratamientos con alimento vivo y dieta artificial con algas arribaron al subestadio de MI (ID de 4.0 en ambos) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 18b). Este retraso en el desarrollo de las larvas alimentadas únicamente con la dieta artificial fue mantenido hasta el final del

experimento, manifestándose diferencias significativas cada 24 horas en que fue analizado el desarrollo en los diferentes tratamientos. Así, un tiempo de 168 horas fue necesario para que las larvas mantenidas con el alimento vivo (AV) y con la DCPSPCA arribaran a PL1 (ID), mientras que las larvas alimentadas únicamente con la DCPSP se encontraban en el subestadio de MII y contrastando fuertemente con las 216 horas que emplearon para arribar a PL 1 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 18b).

### **Actividad específica de enzimas digestivas.**

La actividad específica de las enzimas proteolíticas se observan en la Fig. 19. El análisis estadístico de los diferentes subestadios larvales fue realizado para cada estadio larval.

En el caso de las proteasas totales y para el estadio de protozoa, solo se presentaron diferencias entre los diferentes subestadios, no habiendo un efecto significativo de los tratamientos de alimentación (Fig. 19). Así, una mayor actividad de las PZI (promedio de  $410 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) tanto con la dieta conteniendo el hidrolizado de pescado, como de las larvas mantenidas con el alimento vivo, resultó significativamente mas alta que las mostradas por las PZII y PZIII (promedio de  $46.5 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 19). Estos dos últimos subestadios no presentaron variación significativa en la actividad específica de las proteasas totales ( $P > 0.05$ ) (Fig. 19). En cuanto al estadio de mysis, no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos, pero si entre subestadios, donde una mayor actividad fue obtenida por las larvas mantenidas con las dieta artificial sola (DCPSP) o acompañada de microalgas (DCPSPCA) en los subestadios de MI y MII respectivamente en relación a la baja actividad mostrada en MIII con estos mismos tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 19). También para este estadio, una interacción significativa de los tratamientos dietéticos y los subestadios fue encontrada después del análisis estadístico ( $P < 0.05$ ).

En el caso de la actividad específica de la quimotripsina y para el estadio de protozoa, diferencias tanto entre las diferentes dietas suministradas, como entre subestadios, así como una interacción significativa entre ambos factores fue encontrada de acuerdo al análisis estadístico bifactorial. Así, una mayor actividad por parte de las PZIII mantenidas con

alimento vivo ( $0.25 \pm 0.03 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) fue significativamente mas alta que la mostrada por las larvas alimentadas con la dieta artificial en este mismo subestadio y también con respecto a las MI alimentadas con ambas dietas ( $P < 0.05$ ) (Fig. 19).

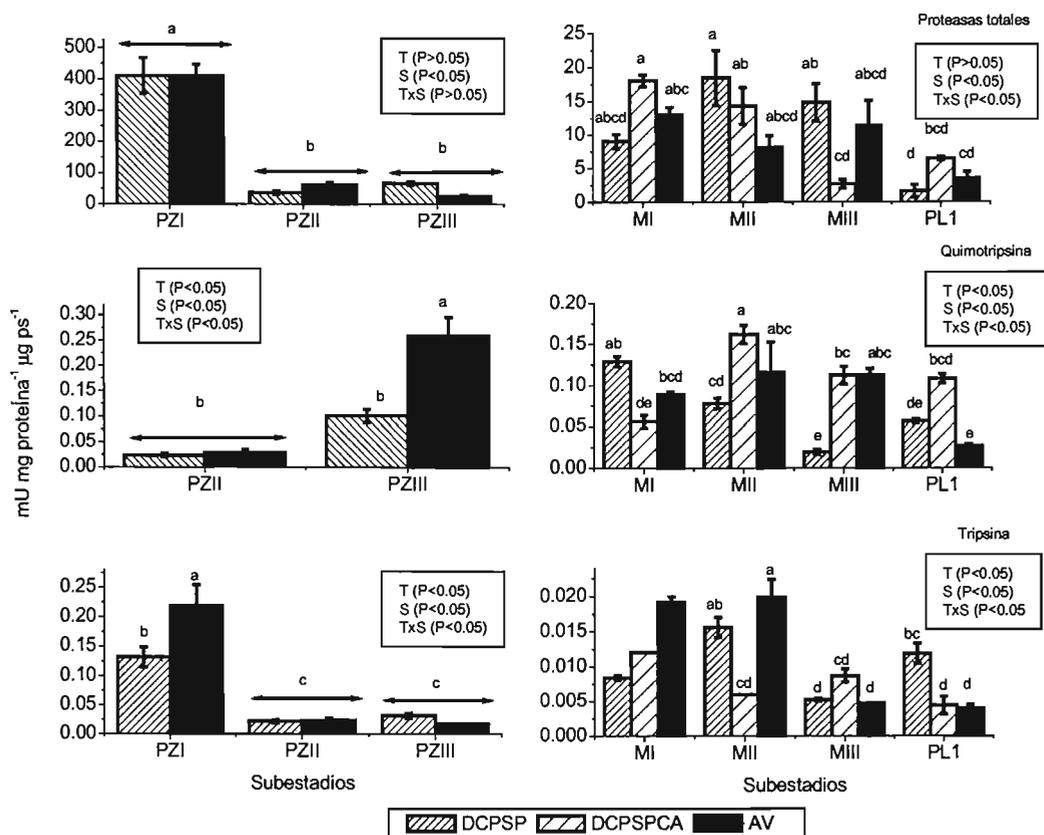


Fig. 19.- Actividad específica de proteasas totales, quimotripsina y tripsina de larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado(DCPSP); dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSPCA) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

Para el estadio de mysis, diferencias tanto entre tratamientos como entre subestadios, así como un interacción significativa entre ambos factores fueron encontradas después de la prueba estadística ( $P < 0.05$ ). La mayor actividad fue observada en el subestadio de MII ( $0.16 \pm 0.01 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) por las larvas alimentadas con la dieta artificial acompañada de microalgas como sustituta parcial del alimento vivo (reemplazo de los nauplios de *Artemia sp.*) y fue significativamente mas alta que la mostradas por las larvas

mantenidas con la dieta artificial sola como sustituta total del alimento vivo ( $P < 0.05$ ) (Fig. 19).

Una disminución hacia PL1 a partir de MII en la actividad de la quimotripsina de las larvas provenientes del tratamiento DCPSPCA y las del AV resulto significativa de acuerdo a la prueba estadística ( $P < 0.05$ ) (Fig. 19).

Con respecto a la actividad específica de la tripsina en el estadio de protozoa, diferencias estadísticas fueron encontradas después del análisis bifactorial tanto con los tratamientos de alimentación, como entre subestadios, donde una mayor actividad triptica en PZI de las larvas sometidas al régimen de alimento vivo, resulto significativa en relación a las mantenidas con la dieta artificial, así como con respecto a los subestadios subsecuentes ( $P < 0.05$ ) (Fig. 19). Una interacción significativa entre los tratamientos de alimentación utilizados y los subestadios de protozoas analizados fue encontrada ( $P < 0.05$ ). Así como en las protozoas, las variaciones en la respuesta de la actividad de la tripsina fue dada tanto por los diferentes regímenes de alimentación aplicados, como por los diferentes subestadios del desarrollo de las larvas ( $P < 0.05$ ). el análisis estadístico solo fue realizado a partir de MII hasta PL1, dado que solo se contó con un valor para las MI alimentadas con la dieta DCPSPCA. Sin embargo, y junto con ese dato, se presentan los valores promedio de los tratamientos DCPSP y AV para este subestadio. La mayor actividad de la tripsina fue mostrada en MII por las larvas mantenidas con el alimento vivo ( $0.019 \pm 0.002$  mU mg proteína<sup>-1</sup>  $\mu$ g ps<sup>-1</sup>), aunque su promedio no fue diferente estadísticamente al observado en las larvas alimentadas únicamente con la dieta artificial (DCPSP) ( $0.015 \pm 0.001$  mU mg proteína<sup>-1</sup>  $\mu$ g ps<sup>-1</sup>) ( $P > 0.05$ ) (Fig. 19). Una actividad significativamente menor en PL1 fue mostradas por las larvas sometidas c los tratamientos DCPSPCA y AV en relación a la observada en las larvas sometidas únicamente a la dieta artificial (DCPS) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 19). Una interacción significativa entre los diferentes tratamientos con los subestadios analizados fue encontrada ( $P < 0.05$ ).

La actividad específica de la amilasa se observa en la Fig. 20. en el caso de las protozoas, solo diferencias entre subestadios fueron reveladas después del análisis estadístico ( $P < 0.05$ ). Así, las actividades mostradas de las PZI de ambos tratamientos de alimentación (promedio de  $7.45 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ) resultaron significativamente mas altas que las observadas en los subestadios subsecuentes ( $P < 0.05$ ) (Fig. 20). Para el estadio de mysis, un pico de actividad en MI fue mostrado por las larvas mantenidas con la dieta artificial sola, cuyo valor ( $0.66 \pm 0.04 \text{ mU mg proteína}^{-1} \mu\text{g ps}^{-1}$ ), resultó significativamente mas alto a los obtenidos por el resto de los tratamientos. ( $P < 0.05$ ) (Fig. 20). En general una disminución significativa de la actividad hacia PL1 de las larvas mantenidas con la dieta artificial sola o en compañía de microalgas fue observada ( $P < 0.05$ ).

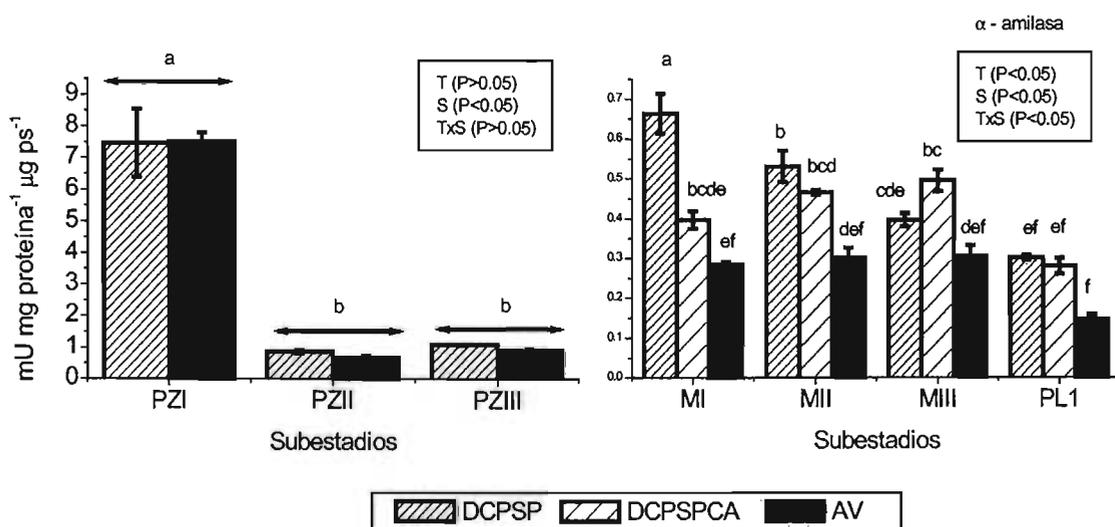


Fig. 20.- Actividad específica de  $\alpha$ -amilasa de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado(DCPSP); dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSPCA) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

## Contenido de proteína soluble total, acilglicéridos y colesterol.

El efecto de los tratamientos sobre la concentración de proteína soluble reflejó un valor significativamente más alto para las larvas mantenidas con la dieta artificial en PZIII ( $0.09 \pm 0.004 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g} \text{ps}^{-1}$ ) en relación a las mantenidas con alimento vivo ( $P < 0.05$ ) (Fig. 21).

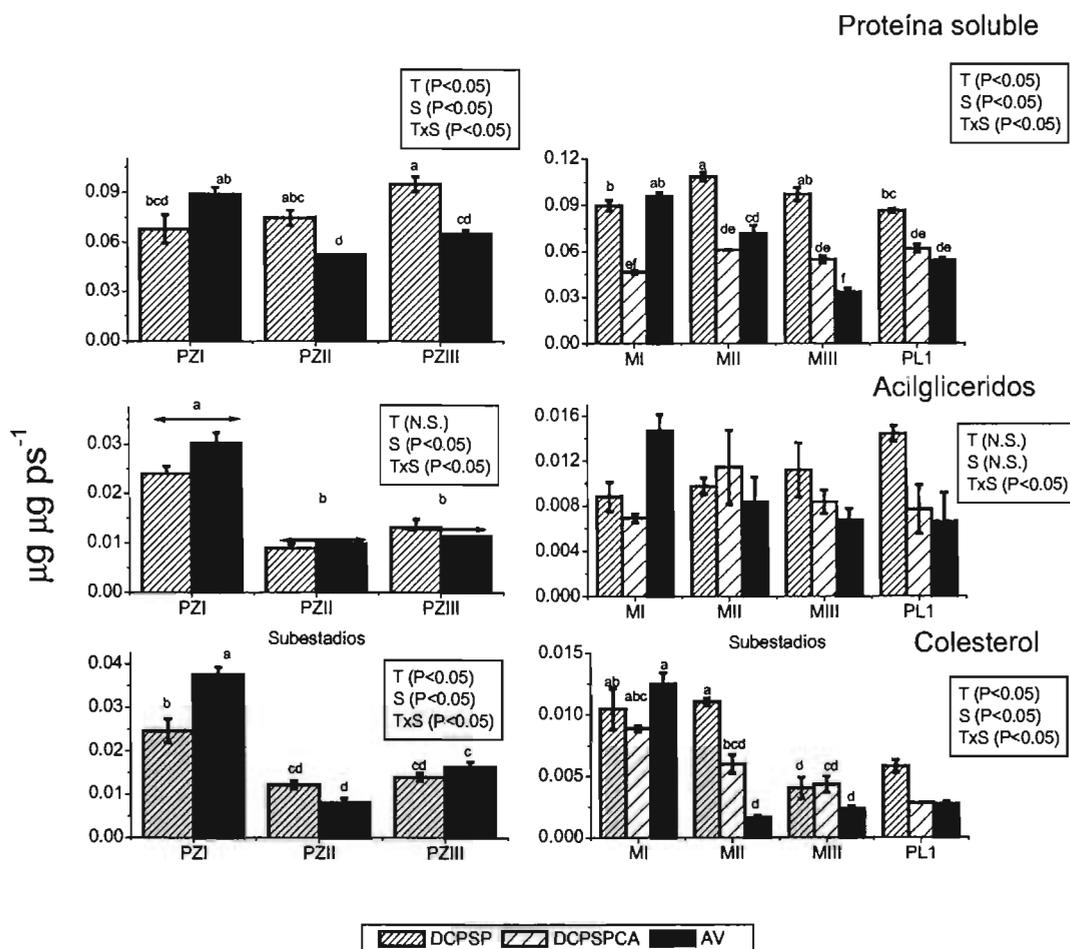


Fig. 21.- Contenido de (a) proteína soluble, (b) acilglicéridos y (c) colesterol de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSP); dieta microencapsulada con hidrolizado de pescado (DCPSPCA) más microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N = 5 repeticiones por tratamiento.

Así también, una disminución significativa a partir de PZII en la concentración de proteína soluble de las larvas mantenidas con el alimento vivo fue observado ( $P < 0.05$ ). Una interacción significativa es observada entre los diferentes tratamientos con respecto a los

subestadios evaluados ( $P < 0.05$ ) (Fig. 21). Para el estadio de mysis, el efecto de los tratamientos mostró mayores concentraciones para las larvas mantenidas con la dieta artificial sola conteniendo CPSP, con el valor mas alto en MII ( $0.1 \pm 0.002 \mu\text{g. } \mu\text{g ps}^{-1}$ ) (Fig. 21). Este valor fue significativamente mas alto que el mostrado por las larvas mantenidas por el resto de los tratamientos en este mismo subestadio ( $P < 0.05$ ); así como en relación a las PL1 mantenidas con esta mismas dieta ( $P < 0.05$ ) (Fig. 21). La disminución en la concentración de proteína hacia PL1 de las larvas alimentadas con la dieta artificial sola y de MI a MIII por las mantenidas con el alimento vivo, es un efecto de la combinación de ambos factores analizados, como lo demuestra la interacción significativa entre ellos ( $P < 0.05$ ).

En relación a los acilglicéridos, una fuerte disminución del contenido tanto en las larvas mantenidas con la dieta artificial, como las del alimento vivo hacia PZII y PZIII fue observada ( $P < 0.05$ ) (con un valor promedio de  $0.025 \mu\text{g. } \mu\text{g ps}^{-1}$  para MI con ambas dietas y de  $0.012 \mu\text{g. } \mu\text{g ps}^{-1}$  entre PZII y PZIII) (Fig. 21). El análisis estadístico no mostró diferencias estadísticas entre ambas dietas, pero una interacción significativa de los tratamientos dietéticos y los subestadios fue encontrada ( $P < 0.05$ ). Con respecto al estadio de mysis, no se observo un efecto significativo de los tratamientos dietéticos sobre los valores de contenido de AG ( $P > 0.05$ ), así como entre los diferentes subestadios. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron a partir de un efecto combinado entre tratamientos y subestadios como los demuestra la interacción significativa entre ambos factores ( $P < 0.05$ ). Mientras que para las larvas alimentadas con la dieta artificial sola (DCPSP), un incremento no significativo hacia PL1 fue observado, el contenido de AG de las larvas mantenidas con el alimento vivo disminuyo durante este estadio (Fig. 21).

Un efecto significativo de los tratamientos dietéticos sobre el contenido de colesterol fue observado desde PZI, donde las larvas mantenidas con el alimento vivo, presentaron el valor mas alto ( $0.03 \pm 0.001 \mu\text{g. } \mu\text{g ps}^{-1}$ ), tanto con respecto a las PZII y PZIII de este mismo tratamiento como con las larvas mantenidas con la dieta artificial en este subestadio ( $P < 0.05$ ) (Fig., 21). Así también, un incremento significativo en el contenido de colesterol de PZII a PZIII en las larvas mantenidas con el alimento vivo fue observado ( $P < 0.05$ ). las

variaciones en el contenido de colesterol por las larvas del tratamiento AV muestra la interacción significativa entre ambos factores. En el estadio de mysis, nuevamente la disminución significativa hacia PLI en el contenido de colesterol fue observada en las larvas mantenidas con las diferentes dietas. Así, valores significativamente mas altos fueron observados en MI en relación a las MIII y PL1 de todas las dietas, aunque esta disminución fue diferente para las larvas del AV, ya que en estas, la disminución fue notoria desde MII, como lo muestra la interacción significativa observada en este tratamiento (Fig. 21).



## DISCUSION.

El principal reto que enfrentan los acuacultores de larvas de camarón es la producción continua de “semilla” (postlarvas). A partir de los primeros estudios científicos realizados por Hudinaga (1942) para la tecnificación del cultivo de camarón ha existido una incesante búsqueda en alternativas alimenticias en las diferentes fases del ciclo de vida de numerosas especies que en la actualidad se ha traducido en su cultivo. Además de la investigación realizada en cuestiones propias del cultivo como son densidad, condiciones fisicoquímicas, uso de alimentos vivos y artificiales, especies adecuadas para el cultivo, etc., se ha profundizado intensamente en aspectos de la nutrición, fisiología, bioquímica, genética, y ecología de especies potenciales y actualmente cultivadas. Estos estudios han permitido un incremento acelerado de la producción d camarón cultivado en las ultimas tres décadas, adquiriendo un mayor porcentaje en la producción acuícola mundial.

Como parte medular del cultivo de camarón, la cría larvaria ha recibido el interés por numerosos investigadores. La búsqueda de alternativas nutrimentales, al tradicional uso de alimento vivo, ha coincidido con el creciente volumen de producción global de este crustáceo. Para ello, una gran variedad de alimentos han sido probados, destacándose el uso de dietas microparticuladas. Dentro de ellas destaca el uso de microencapsulados y microagregados. Sin embargo, la mayoría de ellas no han logrado sustituir completamente al alimento vivo, lográndose avances en la sustitución parcial aunque, con crecimientos y sobrevivencias menores (Jones, 1997). Destaca el uso de dietas microencapsuladas, las cuales permiten trasladar mas íntegramente los elementos contenidos en la dieta al sistema digestivo de las larvas y permitir con ello el aprovechamiento de las entidades alimenticias que conforman las dietas. Las primeras microcapsulas fueron formadas por una pared de Nylon (Jones, 1974), lo cual dificultaba el ataque enzimático a la dieta y en consecuencia la liberación de los nutrientes. Sin embargo, el avance tecnológico en la elaboración de alimentos ha permitido la incorporación de nuevos ingredientes y materias primas para la conformación de la pared. Estas nuevas formulaciones y nuevas técnicas de elaboración de microdietas han permitido lograr alimentos que permiten profundizar en los requerimientos

nutrimentales de las especies. El uso de gomas y proteínas como agentes ligantes para la conformación de la pared de las microcápsulas han resultado benéficas para la aceptabilidad de las microdietas (Pedroza *et al*, 1999; Pedroza *et al*, 2004).

Así también, los avances en las características fisicoquímicas de las dietas artificiales han sido conjuntados con la utilización de nuevos ingredientes que permiten una mayor aceptabilidad y aprovechamiento de las dietas. El uso de compuestos atrayentes y de estimuladores de la actividad enzimática ha sido constante en la formulación de nuevos alimentos en los últimos años (Le Moullac *et al*, 1994; Le Vay, 1993, Kumlu y Jones, 1995, Pedroza, 1999, 2000; Cahu y Zambonino - Infante, 1999. Gallardo *et al.*, 2002). Entre ellos, los hidrolizados proteicos han resultado benéficos a través de dietas formuladas en larvas de peces, donde se ha observado un incremento en el tiempo de desarrollo y sobrevivencias similares a cuando se utiliza alimento vivo. Los hidrolizados proteicos han sido considerados como estimuladores de la actividad enzimática en larvas de peces y crustáceos (Cahu y Zambonino - Infante, 1994, 1997, 1999 y Ravallec - Plé, 2000), en particular para el camarón (Ravallec – Ple, 2000).

También para las larvas de camarón se ha identificado un efecto secretagogo de las enzimas digestivas, debido a la presencia de hidrolizados proteicos en las dietas (Ravallec-Plé, 2000).

Por otro lado, los péptidos secretagogos endógenos, tales como las gastrina/colesistoquinina han sido identificados en el tracto digestivo de muchas especies, entre las que se encuentran los crustáceos (Reifel *et al*, 1983; Aldman *et al*, 1989; Reinecke *et al*, 1992, Van Wormhoudt, 1990). La gastrina/coleistoquinina poseen un gran espectro de actividades, incluyendo la estimulación de la síntesis de proteínas (Johnson *et al*, 1978), el control del peristaltismo intestinal y la segregación de enzimas digestivas (Ravallec-Plé, 2000).

Aunque una gran variedad de trabajos con larvas de camarón han sido diseñados para evaluar el efecto de un determinado alimento o factor ambiental sobre uno o algunos indicadores (crecimiento, sobrevivencia, desarrollo, actividad enzimática, consumo de

oxígeno, etc.), pocos integran los resultados de crecimiento, sobrevivencia y desarrollo con la actividad bioquímica y fisiológica como explicaciones causales. El estudio de todos estos indicadores de manera conjunta se dificulta por la necesidad de dispositivos experimentales idóneos y la rápida evolución durante la fase larvaria. Para lograr esto, se requiere la participación de mayor personal que permita llevar a cabo el seguimiento experimental, además del requerido para las evaluaciones *a posteriori*. Este trabajo destaca por la valoración de los siguientes hidrolizados proteicos: hidrolizado de Krill (*Euphausia superba*), hidrolizado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y concentrado proteico de solubles de pescado (CPSP 90%). Los tres hidrolizados fueron incorporados en una formulación previamente probada en larvas de *L. setiferus* por Gallardo et al (2002) a través de dietas microencapsuladas como alimentos para la fase larvaria de *L. vannamei* utilizando indicadores clásicos de la nutrición como el crecimiento, desarrollo y sobrevivencias, así como indicadores bioquímicos a través de la valoración de las enzimas digestivas y reservas nutritivas como la proteína soluble, el colesterol y los AG.

### ***Efecto de las dietas microencapsuladas con hidrolizados proteicos sobre el crecimiento, sobrevivencia y desarrollo larvario de Litopenaeus vannamei.***

Las dietas microencapsuladas incluyendo a los diferentes hidrolizados proteicos fueron capaces de sustituir parcial y totalmente a los alimentos vivos considerando los crecimientos y sobrevivencias obtenidos. Solo con la dieta DCPSP de PZIII a PL1 (Experimento 4) y la dieta DCPSP de PZI a PL1 (experimento 5) resultaron inferiores en longitud y peso respectivamente en relación con las tasas obtenidas con el alimento vivo

El análisis bromatológico de las dietas microencapsuladas (DME, DHK, DHL y DCPSP) utilizadas para los experimentos de reemplazo parcial del alimento vivo (nauplios de *Artemia sp*) durante el estadio de mysis, arrojaron porcentajes bajos de proteína (Tabla 7), lo cual resulta insuficiente según los requerimientos en larvas de camarón (Durruty, 2000), y considerando que el aporte de proteína por los nauplios de *Artemia sp* sustituidos es de aproximadamente del 50%. Este bajo porcentaje de proteína en las dietas fue causado por la inclusión de las gomas como agentes encapsulantes que conformaron la microcápsula,

mismas que no conforman una pared estrictamente hablando, sino que el método de secado por aspersión utilizado (Pedroza, 2000), establece una matriz en donde ligan a los nutrientes de la dieta. La proporción de agente encapsulante: dieta en los alimentos utilizados para la sustitución parcial del alimento vivo fue de 3:1 (Pedroza *com. Per.*), lo cual contribuyó a una baja concentración de proteína en las dietas. Aunado a lo anterior, los bajos contenidos de metionina, triptofano y cisteína (Tabla 8 ), donde los dos primeros son aminoácidos esenciales para la síntesis de proteína, pudieron haber afectado para los bajos crecimientos observados con la utilización de estos alimentos en los tratamientos dietéticos.

Los bajos contenidos de proteína y su calidad aminoacídica en los alimentos microencapsulados utilizados para la sustitución parcial del alimento vivo durante el estadio de mysis pudo haber contribuido a los bajos crecimiento observados. Sin embargo, los desarrollos y sobrevivencias obtenidas señalan que estos alimentos en combinación de microalgas fueron capaces de mantener vivos a los organismos y proveerlos de la energía necesaria para la metamorfosis y continuar su desarrollo. Sin embargo, esta estrategia de canalizar energía para el mantenimiento de los principales procesos metabólicos conlleva el costo a la vez de una menor fabricación de biomasa y puede ser relacionada al bajo contenido y calidad proteica de los distintos alimentos artificiales utilizados, de acuerdo con los crecimientos en peso en algunos casos y de longitud en otros en relación con las larvas mantenidas con el alimento vivo.

Por la misma razón, cuando se realizó el experimento de la sustitución total del alimento vivo (microalgas y nauplios de *Artemia sp*), el alimento microencapsulado conteniendo CPSP 90% fue capaz de mantener sobrevivientes al 65% de los organismos desde nauplio V (NV) iniciales (NV) a PL1, aunque 48 h después de iniciado el experimento comparado al tiempo registrado por las larvas mantenidas con alimento vivo. Además de este retraso en el desarrollo, este mismo alimento (análisis bromatológico arrojó 48 % de proteína), no generó un resultado similar al obtenido con el alimento vivo en cuanto al crecimiento, demostrando que no solamente la concentración de la proteína en la dieta es fundamental para la ganancia de biomasa, sino la calidad y cantidad relativa de las fuentes de proteína. Esta última dieta (DCPSP tanto de 3 como 26) fue diseñada y elaborada para aumentar el

contenido proteico con relación a las dietas evaluadas anteriormente, incluyendo al CPSP90% de manera importante (48.03 %) como parte del agente encapsulante. Sin embargo, y a pesar de que se logro un alto contenido proteico, las propiedades del CPSP 90% como hidrolizado proteico de contener una gran cantidad de aa libre y péptidos de bajo peso molecular, pudieron afectar al crecimiento saturando los sitios de absorción en el intestino de las larvas. Como se señalo anteriormente, los hidrolizados proteicos contienen una gran cantidad de péptidos de bajo peso molecular y aa libres, los cuales según Córdova y García (2002), pueden saturar los sitios de absorción y evitar el aprovechamiento de las demás fuentes proteicas .

### ***Efecto de dietas microencapsuladas con hidrolizados proteicos sobre la actividad enzimática de las larvas de Litopenaeus vannamei.***

Numerosos trabajos resaltan el efecto de las dietas sobre la actividad de las enzimas digestivas en larvas de camarón (Le Moullac *et al*, 1994; Kumlu y Jones, 1995; Jones 1997; Anger 2001). Los cambios en los hábitos alimenticios de las larvas de camarones peneidos implican la utilización de diversas estrategias de adaptación al alimento que incluyen tanto aspectos morfológicos de las presas como de estructuras especializadas para la captura y procesamiento del alimento. Asimismo, los camarones peneidos como *L. vannamei*, presentan una maquinaria enzimática dispuesta a contribuir en el aprovechamiento de las diferentes entidades alimenticias que componen su dieta, considerando los cambios de herbivoría característica durante la fase de protozoa y de omnivoría durante el estadio de mysis. El amplio espectro alimenticio al que se enfrentan las larvas de camarón no necesariamente implica que puedan estar fisiológicamente adaptadas para utilizar todos los tipos de alimento de manera igualitaria (Anger, 2001). La eficiencia de obtención de energía de los alimentos depende principalmente de los mecanismos disponibles para al maceración física y química del alimento (apéndices de alimentación, molino gástrico, aparato del filtro y enzimas digestivas), y sobre el tiempo de gastroevacuación (Kumlu y Jones 1995; Anger 2001).

La actividad de las enzimas digestivas ha sido evaluada en diversas especies de larvas de camarones peneidos, destacándose la actividad relacionada con las enzimas proteolíticas,

principalmente tripsina y quimotripsina (Lovett y Felder, 1990; Le Moullac, 1994; Kumlu y Jones, 1995). De estas enzimas la tripsina tiene un 60% aproximadamente de participación de toda la actividad proteolítica (Galgani et al, 1984, Kumlu y Jones, 1995). Los picos de actividad proteolítica durante PZIII y MI en larvas de *L. setiferus*, han sido relacionados principalmente con los cambios en el comportamiento alimenticio, además de las modificaciones del tubo digestivo con la aparición de los primeros lóbulos de la glándula digestiva a partir del divertículo anterior del intestino medio en estos subestadios (Lovett y Felder, 1989, 1990). En nuestros resultados con las larvas de *L. vannamei*, este comportamiento fue manifestado por los picos de actividad proteolítica mostrados en PZIII, actividad que fue disminuyendo durante el estadio de mysis hacia PL1, no habiendo diferencias entre los tratamientos de alimentación.

Lemos *et al*, 1999, señala que la alta actividad enzimática en PZII, PZIII y MI en larvas de *Farfantepenaeus paulensis* podría reflejar un incremento en el uso de la energía asociada a cambios de comportamiento como un nado intenso y a la ingestión del alimento. Así también, señala que las variaciones en la actividad enzimática pueden ser asociadas con cambios morfológicos y de comportamiento durante el desarrollo ontogenético de los camarones peneidos. En otros trabajos, se ha mencionado que la actividad de las enzimas proteolíticas está estrechamente relacionada tanto con la calidad de las proteínas contenidas en las dietas como el tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo de las larvas (Le Moullac, 1994; Kumlu y Jones, 1995). A una mayor calidad nutricional de las dietas artificiales, un menor esfuerzo en los procesos digestivos podría estar dado por una mayor síntesis de enzimas digestivas y en consecuencia una mayor actividad. Sin embargo, Kumlu y Jones (1995) también señalan que una dieta de mala calidad pudiera generar una alta actividad de la batería enzimática presente en los organismos, como un esfuerzo para aprovechar al máximo las entidades alimenticias que conforman el alimento..

En este trabajo la evaluación de la actividad de las principales enzimas digestivas de las larvas de *L. vannamei* fue relacionada con los resultados de crecimiento, desarrollo y sobrevivencia a postlarva. A partir de los resultados del crecimiento en talla y peso, los cuales fueron menores significativamente en los experimentos de sustitución parcial de

nauplios de *Artemia sp* y de sustitución total del alimento vivo respectivamente y que la actividad de proteasas totales fue mayor en MI y MII en los experimentos mencionados respectivamente con los alimentos conteniendo CPSP 90%, posiblemente las larvas alimentadas con las dietas artificiales retuvieron mayor tiempo el alimento como una estrategia para digerir y aprovechar al máximo los elementos contenidos en las mismas y poder desarrollarse y sobrevivir como las larvas mantenidas con el alimento vivo (aunque en este trabajo el tiempo de gastroevacuación, GET, no fue registrado). Sin embargo, la actividad de las enzimas evaluadas de las larvas alimentadas con la dieta conteniendo el hidrolizado de krill en el experimento 1 (DHK), no mostró diferencias con respecto a las observadas en las larvas sometidas al régimen de alimento vivo (Fig. 2 y 3).

Con relación a la actividad digestiva de las larvas sometidas a la dieta conteniendo el hidrolizado de langostilla, una menor actividad de proteasas totales y quimotripsina en MI y MII y de tripsina en MI fue observada con relación a la mostrada por las larvas mantenidas con los alimentos vivos (Fig. 6). El efecto inductor de la actividad enzimática con este hidrolizado fue observado en MIII y PL1 en  $\alpha$ -amilasa y en todos los subestadios de la  $\alpha$ -glucosidasa, las cuales fueron mayormente significativas en relación a la observada por las larvas mantenidas con el AV (Fig. 7). Esta mayor actividad pudo haber generado la alta sobrevivencia observada en este experimento con las dietas artificiales (arriba del 90%) y del crecimiento y desarrollo estimados en este experimento (Fig. 5c y Fig. 5d)).

Con respecto al experimento 4 de sustitución parcial del alimento vivo con alimento microencapsulado conteniendo CPSP, un efecto inductor de mayor actividad de proteasas totales y tripsina en el subestadio de MI (Fig. 14), puede relacionarse con la mayor sobrevivencia y tasa de crecimiento solo en peso similares a los resultados de estos indicadores obtenidos por las larvas mantenidas únicamente con alimento vivo (Fig. 13 b y Fig. 13c).

Las altas actividades de las enzimas proteolíticas (proteasas totales y tripsina principalmente), así como de la  $\alpha$ -amilasa exhibidas por las larvas mantenidas únicamente

con alimento microencapsulado conteniendo CPSP 90%, puede ser relacionadas a la presencia del hidrolizado y puede a la vez ser considerado como una evidencia de efecto secretagogo. Esta alta actividad pudo haber incrementado la eficiencia digestiva de las larvas de *L. vannamei* sobre los nutrientes contenidos en las dietas y en consecuencia permitir el desarrollo larvario hasta PL1 con una buena sobrevivencia al final de la fase experimental (Fig. 18<sup>a</sup>) Fig. 18b). Los picos de actividad en el subestadio de PZIII coinciden con lo reportado por otros autores en otras especies de camarones peneidos durante la fase larvaria (Le Vay, 2001; Lovett y Felder, 1990, Le Vay *et al.*, 1993 y Jones *et al.*, 1993). La presencia de peptidos segregatogicos en los hidrolizados proteicos pudieron haber permitido un incremento en la produccion de enzimas proteoliticas como lo señala Ravallec (2000). El retraso en el desarrollo larvario a partir de las 72 horas mostrado por las larvas alimentadas únicamente con la dieta de alimento microencapsulado (DCPSP 3 y DCPSP26) en el experimento 5 con relación al tratamiento con alimento vivo, pudo estar asociado a los cambios ontogeneticos que originan transformaciones a nivel digestivo y que ocurren durante la transición del estadio de protozoa a mysis con la adaptación a la dieta. Estos cambios están acompañados por modificaciones en los hábitos alimenticios de herbivoría a omnivoría (Gallardo *et al.*, 1995) y con la especialización del tubo digestivo para la formación de la glándula digestiva asociada con la desaparición del divertículo anterior del intestino medio en las protozoas de camarones peneidos (Abubakr y Jones, 1992; Lovett y Felder, 1989,1990).

Aunque un incremento en la cantidad de dieta fue realizado en PZIII de acuerdo a las necesidades energéticas de las larvas (calculadas con base en la tasa de ingestión para cada subestadio larval y a través del aporte de energía dado por las microalgas calculado con base a Lemos y Phan (2001) y los nauplios de *Artemia sp* y que la frecuencia de alimentación fue reducida a cada 2 horas en el experimento 5, posiblemente una deficiencia en la cantidad de dieta y la deficiencia en metionina, triptofano y cisteína, pudieron causar el retraso en el desarrollo y los bajos crecimientos observados durante el experimento, a pesar de la alta supervivencia obtenida hacia PLI.

Bajo condiciones de limitación de alimento, Anger (2001) menciona que el tiempo de gastroevacuación (GET) podría incrementarse y por lo tanto las partículas de alimento ser recicladas desde el intestino hacia la glándula digestiva o bien hacia el divertículo del intestino medio anterior. Según Lovett y Felder (1989) el tiempo promedio del tránsito de alimento es de 15 minutos en las larvas de *L. setiferus*, el cual bajo condiciones de subalimentación podría incrementarse de acuerdo con Anger (2001). Así también, según este último autor, las condiciones de “alimento insuficiente” o “alimento limitante” generan pobres crecimientos y una baja sobrevivencia o bien no permiten la sobrevivencia larval, estableciéndose una nula correlación entre la concentración de alimento y la actividad de las enzimas digestivas. En este último experimento, sí se presentó un incremento en la actividad enzimática y se podría suponer una correlación positiva entre esta, la cantidad de alimento ofrecido y la sobrevivencia de las larvas de *L. vannamei* de acuerdo a lo planteado por Anger (2001). Solamente el bajo crecimiento en peso y el retraso en el desarrollo observado en el experimento de sustitución total (experimento 5) cuando el alimento microencapsulado fue ofrecido como única dieta puede ser más asociado a la cantidad y calidad suministrada.

La calidad de la dieta y las estrategias de alimentación, además de la maquinaria enzimática y su actividad en los organismos pueden ser reflejadas en la obtención de biomasa a través del crecimiento. Así, en el presente trabajo, los pesos y longitudes a partir del subestadio de MI en adelante obtenidos por las larvas alimentadas únicamente con el alimento microencapsulado conteniendo CPSP produjeron TECs en peso menores a las obtenidas con el alimento vivo (Fig. 17b). Este comportamiento pone en evidencia que no necesariamente una alta actividad de enzimas digestivas conlleva a un crecimiento óptimo como cuando son alimentadas con alimento vivo.

En el experimento 5, aunque se observó un retraso en el desarrollo y bajos crecimientos, es importante destacar la alta sobrevivencia alcanzada por las larvas mantenidas exclusivamente con la dieta microencapsulada desde NV a PL1 (74%) (Fig. 18a). Este porcentaje de sobrevivencia supera a lo reportado por otros autores cuando comparan

dietas artificiales contra alimento vivo en otras especies de camarones tanto palaemonidos (Kumlu y Jones, 1995; Bautista *et al*, 1989) como peneidos (Jones *et al*, 1979).

El requerimiento de proteína en larvas de crustáceos es mas alta que en las subsecuentes fases de su ciclo de vida debido al rápido crecimiento que manifiestan en el estadio larvario, mencionándose un requerimiento que va desde 30 a 56% de contenido en la dieta, (según Jones *et al*, 1997). La dieta DCPSP mostro un contenido alrededor del 42.91 % de proteína, utilizando una gran cantidad de hidrolizado (CPSP 90% de proteína) (Ver Tabla 7) aunque con baja presencia de cisteina y triptofano (primer y segundo aminnoácidos limitantes de acuerdo al computo químico, Tabla 9).

El alto contenido de proteína soluble mostrado por las larvas alimentadas exclusivamente con la dieta artificial (DCPSP) contrasta con el bajos crecimientos en peso y longitud obtenidos con este régimen alimenticio (Fig. 17a y 17b). Este contraste se acentúa considerando que los aminoácidos contenidos en las dietas tienen la función de la síntesis de proteína y como tales, su disponibilidad es crucial para la fabricación de músculo, pigmentos de la hemolinfa respiratoria, enzimas y hormonas (Anger, 2001). Así también, ellos sirven como fuente nitrogenada para la síntesis de compuestos nitrogenados no proteicos, incluyendo coenzimas, ácidos nucleicos, y nucleótidos y a su vez pueden ser utilizados como sustrato metabólico para la obtención de energía (Anger, 2001). Este autor menciona que los crustáceos no pueden tomar directamente los aminoácidos libres presentes en el agua circundante o bien es insignificante a diferencia de las larvas de equinodermos, moluscos, briozoarios y otros invertebrados marinos, los cuales tienen acceso a materia orgánica disuelta. Sin embargo, la alta disponibilidad de aminoácidos libres en el tracto digestivo de las larvas de *L. vannamei* a través de la dieta microencapsulada con el nivel de inclusión de hidrolizado en la dieta posiblemente facilitó su absorción a través de la membrana del intestino influyendo en la absorción de otros péptidos o aminoácidos esenciales. Posiblemente la alta concentración de CPSP 90% en la dieta permitió por tanto una alta presencia de aminoácidos libres. Esta alta concentración de aminoácidos libres pudo haber permitido su paso por difusión directa en el intestino de la larva y almacenarse, pero no necesariamente pudieron ser utilizados para la síntesis de

proteínas necesarias para la conformación de músculo o biomasa, de ahí que pudiera ser la explicación de los bajos crecimientos observados al sustituir en algún grado a los aminoácidos esenciales necesarios para la síntesis de proteína y en consecuencia la construcción de tejido.

En huevos y larvas de crustáceos decápodos los triacilglicéridos, los fosfolípidos y los esteroides libres constituyen las fracciones lipídicas predominantes (Mourente et al, 1995; Anger, 2001, Palacios et al, 2001). De entre estos, los triacilglicéridos constituyen la mayor fuente de reserva energética (Dall *et al*, 1992, Mourente *et al.*, 1995).

Después de la eclosión, las larvas de peneidos dependen de sus reservas vitelogenéticas, de ahí la importancia de la calidad de las reservas lipídicas que la hembra transfiere a los huevos del desove. Palacios (1999) menciona que el éxito en el desarrollo larvario después del cambio de alimentación endógena a exógena está estrechamente relacionada con el contenido de triacilglicéridos en el vitelo del huevo. Estas reservas son utilizadas en los primeros estadios larvarios hasta que la alimentación exógena cubre las demandas energéticas para el crecimiento y metabolismo en general y cuando la alimentación exógena provee un exceso de energía para cubrir las demandas metabólicas de las larvas, ésta se puede almacenar en forma de triacilglicéridos (Fraser, 1989, Palacios., 1999). Anger (1989) menciona el concepto de “lecitotrofia secundaria” que habla del caso del desarrollo endotrofico, es decir, a partir de sus reservas y que le permite al organismo desarrollarse sin alimento durante la metamorfosis, volviendo a alimentarse posteriormente a este evento.

Las larvas de crustáceos peneidos son organismos con bajos niveles de reservas nutritivas, con cortos tiempos de residencia de alimento en el tracto digestivo (Kumlu y Jones, 1995), por lo cual necesitan un constante aporte de alimento que además cubra sus requerimientos nutritivos. Además, el decremento en el contenido de colesterol y acilglicéridos de PZI a PZII (Fig. 21) pudiera ser consecuencia del proceso de adaptación a la alimentación exógena, durante el cual las larvas pudieran haber seguido utilizando las reservas lipídicas provenientes del huevo. Sin embargo, los contenidos de acilglicéridos y colesterol después

del subestadio de PZII se mantuvieron relativamente constantes con una tendencia a disminuir gradualmente hacia PL1 (Fig. 21). Este comportamiento concuerda con lo señalado por Anger (1989) de la lecitotrofia secundaria, donde las larvas independientemente de ser sometidas a diferentes alimentos utilizan sus reservas nutritivas acumuladas en las primeras fases larvales de la materia orgánica derivada de los alimentos suministrados. Además, esta tendencia a disminuir los niveles de colesterol y acilglicéridos en los organismos, similar entre la dieta artificial sola y en combinación con microalgas, así como en el caso de las larvas mantenidas con alimento vivo, indica que tanto la microcápsula como los alimentos vivos presentaron una calidad lipídica comparable, que pudo ser comprobada a través de la falta de existencia de diferencias significativas en el desarrollo larval excepto en MII, en donde las larvas alimentadas con la dieta artificial sola mostraron un mayor contenido de colesterol en relación al observado en las larvas mantenidas con el alimento vivo (Fig. 21). Se ha señalado que el éxito del desarrollo eficiente en las larvas de crustáceos depende de la utilización eficiente de las reservas de energía, especialmente los lípidos (Mourente *et al.*, 1995).

## CAPITULO II

Efecto de alimentos microencapsulados con hidrolizados proteicos de origen marino sobre la fisiología energética de larvas de *Litopenaeus vannamei* en la sustitución de alimento vivo.



## Contenido de energía de las larvas

El contenido de energía obtenido por combustión para cada subestadio larval de *L. vannamei* alimentadas con alimento vivo en una granja de producción comercial, no mostró diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico realizado ( $P>0.05$ ), aunque las PZI tuvieron un valor de energía 34 % menos que las PL1 (Fig. 22).

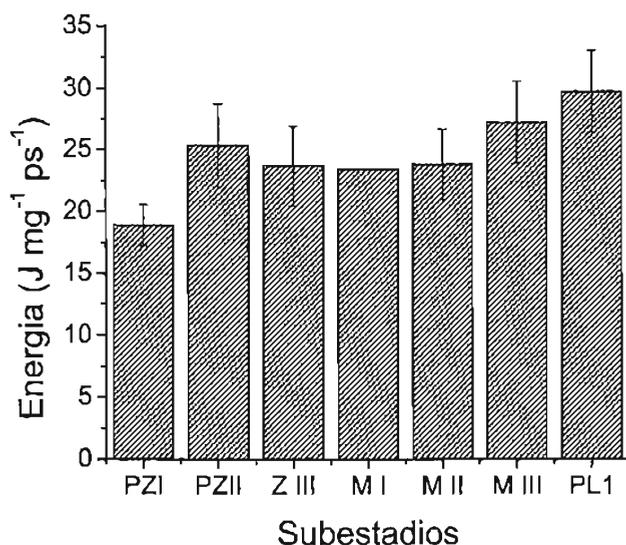


Fig. 22.- Contenido de energía medida por combustión de los diferentes subestadios larvales de *Litopenaeus vannamei* de PZI a PL1 mantenidas con alimento vivo. No se observaron diferencias estadísticas ( $P>0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S.

## Experimento 1: Sustitución parcial de alimento vivo en mysis de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado de krill.

### Crecimiento.

Los pesos secos individuales de las larvas mantenidas con los diferentes regímenes de alimentación resultaron del efecto combinado del tratamiento con el desarrollo evaluado en este experimento de acuerdo al análisis estadístico aplicado y la interacción significativa entre los tratamiento y subestadios (Fig. 23) ( $P<0.05$ ). Así también, el análisis mostró diferencias estadísticas entre tratamientos donde los valores promedios mas altos fueron obtenidos por los organismos mantenidos con la dieta conteniendo hidrolizado de krill

(DHK) y los de alimento vivo (AV) en relación a las larvas sometidas únicamente a la dieta microencapsulada (DME) sin hidrolizado a partir de MII hasta PL1 (Fig. 23) ( $P < 0.05$ ).

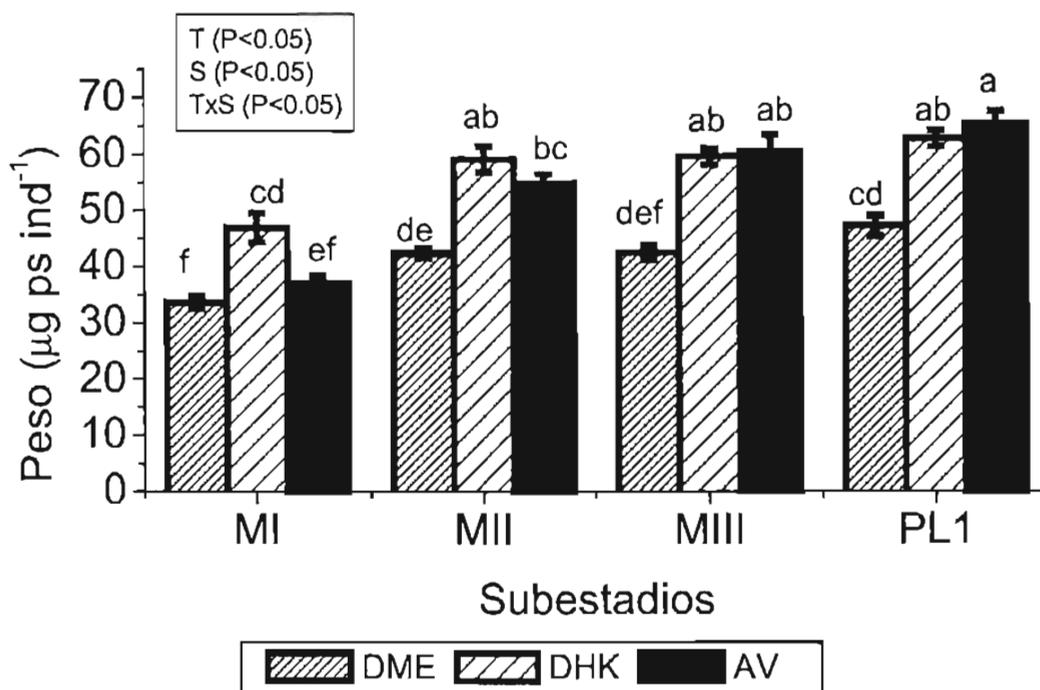


Fig. 23. Peso seco individual ( $\mu\text{g}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* para cada subestadio alimentadas con diferentes dietas: dieta sin hidrolizado (DME), dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas. (Promedio  $\pm$  E.S.).  $N = 10$  repeticiones por tratamiento.

#### Tasa de ingestión (TI) de microalgas y *Artemia* sp.

Una disminución significativa de la TI en MI ( $112500 \pm 2405 \text{ cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) hacia PL1 ( $27777 \pm \text{----} \text{ cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) por las larvas mantenidas con la dieta sin hidrolizado (DME) fue observada, mientras que el consumo de algas por las larvas mantenidas tanto con la dieta conteniendo hidrolizado (DHK) presento un TI máxima en MII, las mantenidas solo con alimento vivo (AV) mostraron su mayor ingestión en MIII (Fig. 24). El análisis bifactorial no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos pero si entre subestadios en la TI de *Chaetoceros gracilis*, además de una interacción significativa entre ambos factores ( $P < 0.05$ ) (Fig. 24).

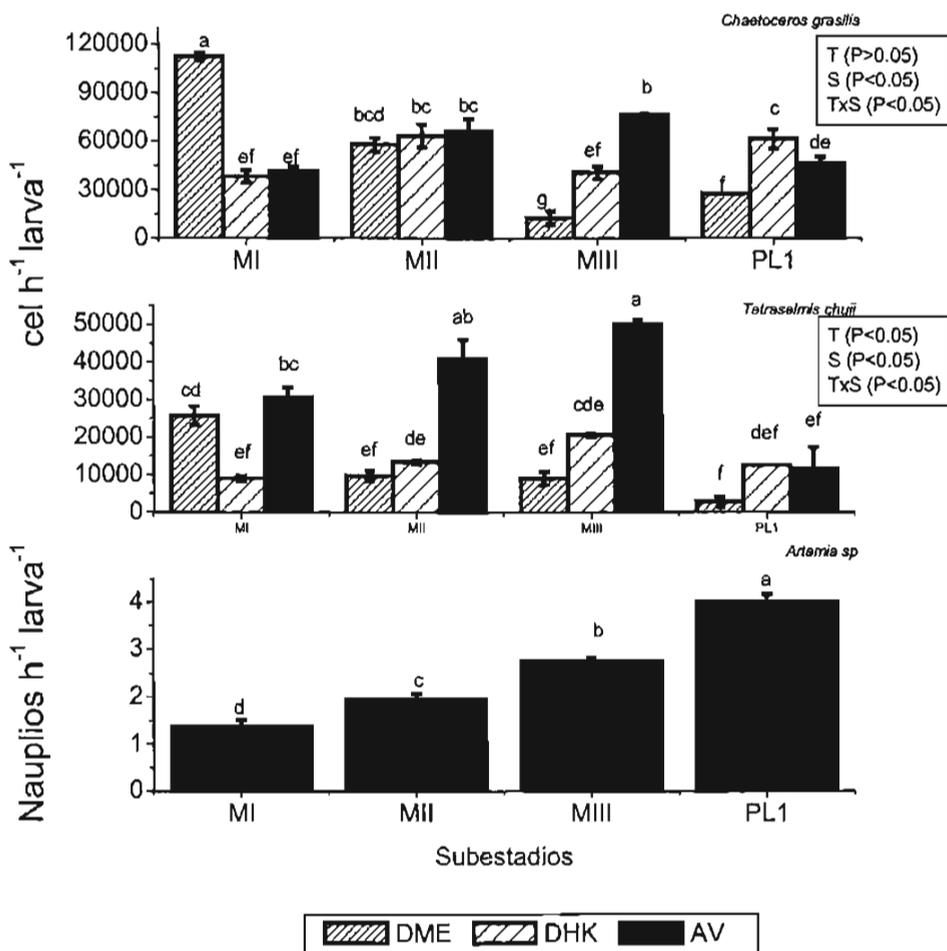


Fig. 24.- Tasa de ingestión (TI) ( $\text{cel} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$  y  $\text{nauplios h}^{-1} \text{larva}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta sin hidrolizado (DME), dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas. (Promedio  $\pm$  E.S.). N = 3 replicas por tratamiento. Un análisis bifactorial fue empleado para la TI de las microalgas y un ANDEVA de una vía de clasificación fue empleado para la TI de nauplios de *Artemia sp.*

Con relación a la TI de *T. chuii*, un máximo consumo de la microalga fue presentado por las larvas alimentadas con el AV en todos los subestadios, resultando diferente estadísticamente a las tasas estimadas en las larvas mantenidas con las dietas artificiales (DME y DHK) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 24). Los mayores consumos de esta microalga fueron observados con el tratamiento de AV en MII y MIII (Fig. 24).

La TI de los nauplios de *Artemia* fue afectada durante los subestadios de mysis de acuerdo al ANDEVA de una vía aplicado ( $P < 0.05$ ). Los valores obtenidos mostraron un incremento significativo conforme el desarrollo larvario, llegando a un pico de ingestión en PL1 ( $4 \pm 0.1$  nauplios larva<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (Fig. 24).

La estimación de la TI en Joules larva<sup>-1</sup>•día<sup>-1</sup>, para cada alimento en los diferentes tratamientos de alimentación, es presentada en la Tabla 15.

Tabla 15. Energía ingerida (J•larva<sup>-1</sup>•día<sup>-1</sup>) de las mysis de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta sin hidrolizado (DME), dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV). La cantidad de energía suministrada por las microcápsulas fue mantenida constante.

Tratamiento		<i>C gracilis</i>	<i>T chuii</i>	<i>Artemia sp</i>	Microcápsula	Entrada de energía total
DME	MI	1.9 + 0.04	7.8 + 0.77		4.46	14.29
	MII	1.0 + 0.07	2.9 + 0.43		4.46	8.44
	MIII	0.2 + 0.07	2.7 + 0.56		4.46	7.44
	PL1	0.5 + 0.0	0.8 + 0.43		4.46	5.79
Suma					35.96	
DHK	M I	0.66 ± 0.06	1.38 ± 0.1		4.46	6.51
	M II	1.1 ± 0.12	2.04 ± 0.09		4.46	7.6
	M III	0.7 ± 0.06	3.15 ± 0.07		4.46	8.31
	PL1	1.06 ± 0.1	0.64 ± 0.00		4.46	6.16
Suma					28.58	
AV	M I	0.7 ± 0.04	4.7 ± 0.4	1.96±0.2		7.36
	M II	1.15 ± 0.13	6.2 ± 0.8	2.8±0.2		10.15
	M III	1.32 ± 0.01	7.6 ± 0.22	3.9±0.14		12.82
	PL1	0.8 ± 0.07	1.8 ± 0.9	5.7±0.23		8.3
Suma					38.6	

Las larvas alimentadas con el AV aumentaron la ingestión total por subestadio, al incrementar la ingestión de nauplios de *Artemia sp* (1.96 a 5.7 J•larva<sup>-1</sup>•día<sup>-1</sup>), y por tanto la entrada de energía total desde MI a PL1 (38.63 Joules). Por otro lado, las larvas alimentadas con las dietas microencapsuladas, en donde los Joules por día de la microcápsula se mantuvieron constantes (4.46 J•larva<sup>-1</sup>• día<sup>-1</sup>), la entrada de energía total (35.9 Joules para DME y 28.58 Joules para DHK) fue 7% y 26% mas baja que la observada en las larvas alimentadas con el AV (Tabla 15).

## Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno disminuyó gradualmente durante los subestadios de mysis (Fig. 25). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al análisis estadístico. Sin embargo, fue observado un consumo significativamente menor de las PL1 alimentadas con la dieta sin hidrolizado en relación a las MI ( $0.006 + 0.01 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$  y  $0.018 + 0.01 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$  respectivamente) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 25). También, una interacción significativa fue observada entre tratamientos y subestadios en el consumo de oxígeno de acuerdo al análisis bifactorial ( $P < 0.05$ ).

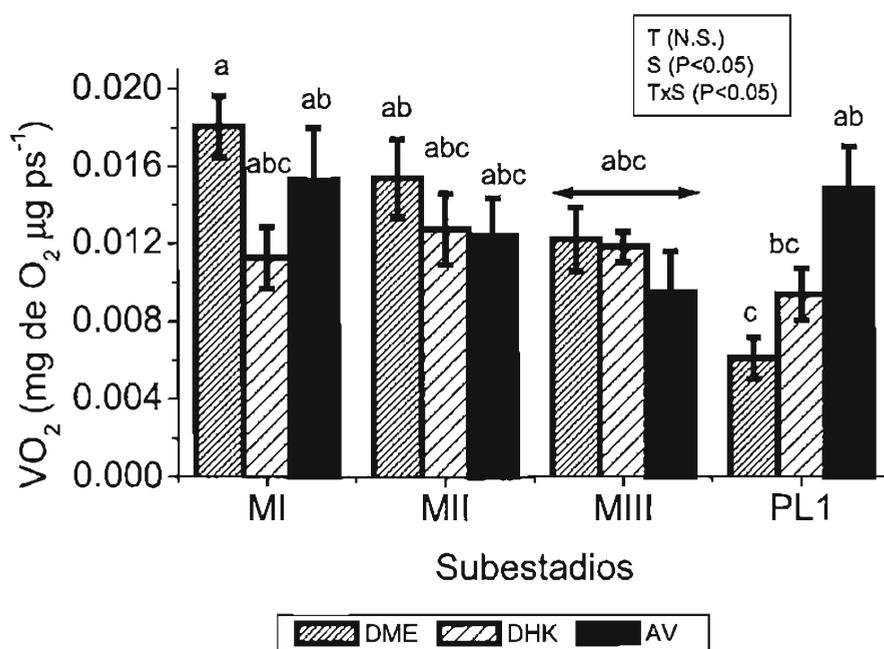


Fig. 25.- Metabolismo de rutina ( $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta sin hidrolizado (DME), dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). (Promedio  $\pm$  E.S.). N = 10 repeticiones por tratamiento.

## Balance energético

La estimación de un modelo de balance energético en Joules por larva por día, mostró que la entrada de energía bruta (IGE), fue mas alta para las larvas alimentada con el AV ( $38.63 \text{ J} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) y las mantenidas con la dieta sin hidrolizado (DME) ( $35.96 \text{ J} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) desde MI

a PL1 que la estimada para las larvas del tratamiento DHK (promedio de 28.58 J•larva<sup>-1</sup>) (Tabla 16). Una diferencia de 0.1 J invertido en la respiración fue obtenido entre las larvas alimentadas con la DHK (0.82 J•larva<sup>-1</sup>) y aquellas alimentadas con el AV (0.92 J•larva<sup>-1</sup>) (Tabla 13). Esta diferencia favoreció la asimilación de las larvas alimentadas con el AV (1.26 J•larva<sup>-1</sup>), comparada a la observada en las larvas alimentadas con la DHK (1.12 J•larva<sup>-1</sup>, Tabla 16). Mientras que las larvas mantenidas con la dieta sin hidrolizado mostraron un valor de asimilación total de 1.21 J•larva<sup>-1</sup> (Tabla 16).

Tabla 16. Energía (joules• larva<sup>-1</sup> • día<sup>-1</sup>) canalizada al crecimiento: producción (P), metabolismo de rutina (R), exuvia (E<sub>v</sub>) durante los subestadios larvales de *L. vannamei* alimentados con diferentes dietas: dieta sin hidrolizado (DME), dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV).

Tratamiento		Ingestión	Respiración	E <sub>v</sub>	Producción	Asimilación
DME	MI	14.29	0.21	0.0	Neg.	0.21
	MII	8.44	0.26	0.005	0.11	0.38
	MIII	7.44	0.21	0.005	0.11	0.33
	PL1	5.79	0.11	0.008	0.16	0.29
Total		35.9	0.79	0.018	0.38	1.21
DHK	M I	6.5	0.18	0.009	0.17	0.36
	M II	7.6	0.25	0.005	0.11	0.37
	M III	8.3	0.22	0.00003	Neg	0.22
	PL1	6.2	0.17	0.00002	0.0004	0.17
Total		28.6	0.82	0.014	0.29	1.12
AV	M I	7.36	0.19	0,002	0.042	0.23
	M II	10.15	0.23	0.01	0.20	0.44
	MIII	12.82	0.19	0.001	0.03	0.22
	PL1	8.24	0.31	0.002	0.05	0.36
Total		38.61	0.92	0.016	0.32	1.26

$$A = P + R + E_v.$$

La estrategia de repartición de energía es mostrada en la Tabla 17. La eficiencia respiratoria (R/As), la cual es la cantidad de energía asimilada invertida en la respiración, fue mas baja para las larvas alimentadas con la dieta sin hidrolizado (DME) (promedio de 68.4 %) que para las larvas mantenidas con las dietas conteniendo el hidrolizado (DHK) (promedio de 79.7 %) y las larvas sometidas al régimen de alimento vivo (promedio de 79.7%) (Tabla 17).

Tabla 17. Eficiencias energéticas estimadas para las mysis de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta sin hidrolizado (DME), dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV).

Tratamiento		Eficiencia de respiración	Eficiencia de asimilación	K <sub>2</sub>
		%	%	%
DME	MI	100	1.48	0.0
	MII	69.6	4.54	30.4
	MIII	64.2	4.44	35.7
	PL1	39.9	4.97	60.1
Promedio		68.4	3.8	31.55
DHK	MI	49.8	5.5	50.2
	MII	69.5	4.8	30.5
	MIII	100	2.6	0
	PL1	99.7	2.8	0.3
Promedio		79.7	3.5	20.3
AV	MI	81.01	3.2	19
	MII	52.2	4.3	48
	MIII	86.7	1.7	13
	PL1	85.3	4.4	14.7
Promedio		76.3	3	23.7

K<sub>2</sub> = Eficiencia Neta de producción.

La eficiencia de asimilación (As Ef) mostró un comportamiento contrario, donde la mayor eficiencia fue estimada en la larvas alimentadas con la dieta DME (3.8 %) mientras que la eficiencia de asimilación de las larvas de los tratamientos DHK y AV fue de 3.5 % y 3 % respectivamente. La eficiencia neta de producción (K<sub>2</sub>), mostró un valor promedio mas alto con la dieta artificial sin hidrolizado (31.5 %), seguida del las larvas mantenidas con el alimento vivo (23.7%) y la dieta artificial con hidrolizado de krill (20.3 %) (Tabla 17).

## **Experimento 2: Sustitución parcial de alimento vivo en mysis de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado de krill e hidrolizado de langostilla.**

### **Crecimiento.**

El análisis bifactorial del peso seco individual de las larvas mantenidas con las diferentes dietas mostró diferencias significativas tanto entre tratamientos como entre subestadios ( $P < 0.05$ ). Así también, el mismo análisis reveló interacción significativa entre ambos factores ( $P < 0.05$ ) (Fig. 26). A partir de MIII los organismos mantenidos con el alimento vivo (AV) mostraron los mayores valores de peso seco, significativamente distintos a los obtenidos por las larvas mantenidas con las dietas artificiales (Fig. 26).

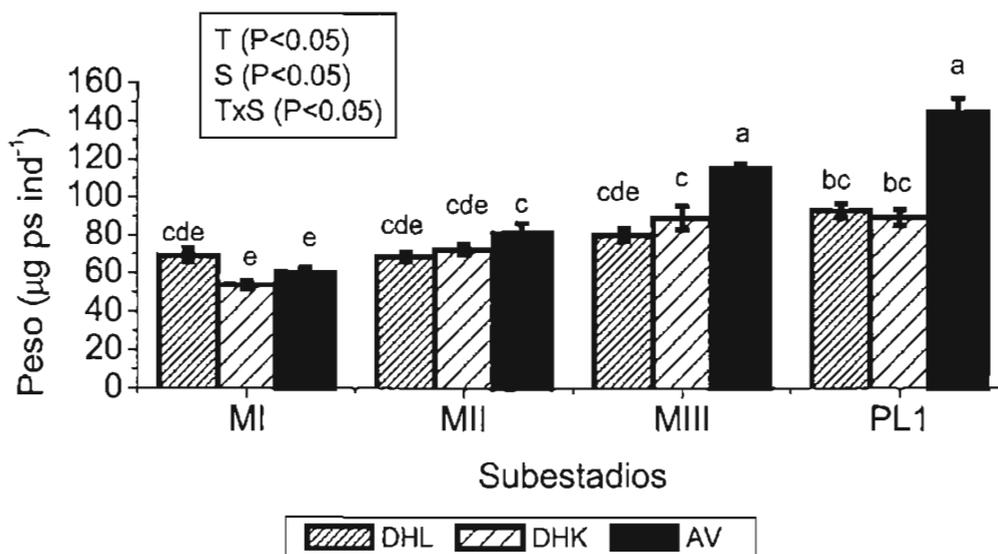


Fig. 26. Peso seco individual ( $\mu\text{g}$ ) de las larvas mysis de *Litopenaeus vannamei* para cada subestadio alimentadas con diferentes dietas: dieta con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas. (Promedio  $\pm$  E.S.).  $N = 10$  repeticiones por tratamiento.

### Tasa de ingestión de microalgas y *Artemia* sp.

Las tasas de ingestión (TI) de las microalgas *C. gracilis* y *T. chuii* no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ). Con el análisis estadístico, sólo se observaron diferencias entre subestadios en el consumo de ambas microalgas ( $P < 0.05$ ) (Fig. 27).

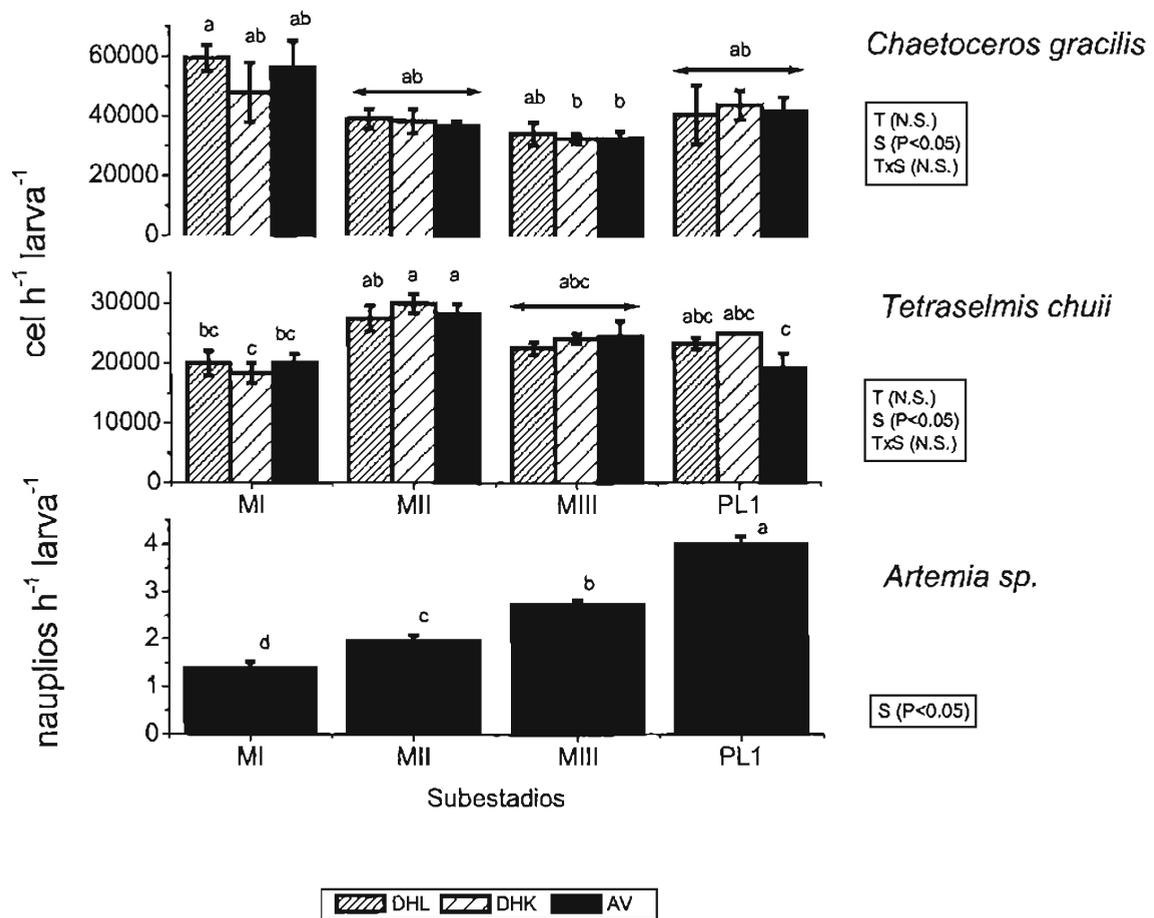


Fig. 27.- Tasa de ingestión (TI) ( $\text{cel} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$  y  $\text{nauplios h}^{-1} \text{larva}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas. (Promedio  $\pm$  E.S.). N = 3 réplicas por tratamiento. Un análisis bifactorial fue empleado para la TI de las microalgas y un ANDEVA de una vía de clasificación fue empleado para la TI de nauplios de *Artemia sp.*

En relación al consumo de nauplios de *Artemia sp*, una mayor TI en PL1 (promedio de  $2.7 \text{ nauplios} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) resulto estadísticamente diferente a los subestadios anteriores (Fig. 27).

La estimación de las TI en  $\text{Joules larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ , para cada alimento en los tres tratamientos de alimentación, es presentada en la Tabla 18. Aunque la entrada de energía vía las microcápsulas fue constante, las larvas alimentadas con la DHL y DHK tuvieron las

mayores entrada de energía (45.73 y 50.54 Joules, respectivamente) dado la menor entrada de energía vía el consumo de los nauplios de *Artemia sp* en el tratamiento con AV (45.26 Joules).

Tabla 18. Energía ingerida ( $J \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) de las mysis de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV). La racion de las microcapsulas se mantuvo constante.

Tratamiento		<i>C. gracilis</i>	<i>T. chuii</i>	<i>Artemia sp</i>	Microcápsula	Energía total ingerida
DHL	M I	0.88 ± 0.16	6.13 ± 6.17		4.46	8.97
	M II	0.68 ± 0.06	8.43 ± 0.65		4.46	11.88
	M III	0.59 ± 0.7	6.9 ± 0.31		4.46	11.36
	PL1	0.7 ± 0.17	7.15 ± 0.31		4.46	13.52
Suma						45.73
DHK	MI	0.83 ± 0.17	5.62 ± 0.51		4.46	10.91
	MII	0.66 ± 0.07	9.2 ± 0.48		4.46	14.32
	MIII	0.56 ± 0.03	7.41 ± 0.26		4.46	12.43
	PL1	0.76 ± 0.09	7.66 ± 0.00		4.46	12.88
Suma						50.54
AV	M I	0.81 ± 0.21	6.13 ± 0.48	1.96 ± 0.18		8.9
	M II	0.64 ± 0.03	8.69 ± 0.48	2.77 ± 0.18		12.1
	M III	0.56 ± 0.04	7.56 ± 0.73	3.87 ± 0.14		11.99
	PL1	0.72 ± 0.08	5.88 ± 0.77	5.67 ± 0.23		12.27
Suma						45.26

### Consumo de oxígeno

Se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos en cuanto al consumo de oxígeno de las larvas, resultando un pico significativo en MIII ( $0.04 + 0.001 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) por los organismos mantenidos con la dieta con hidrolizado de langostilla en relación al resto de los tratamientos de alimentación ( $P < 0.05$ ) (Fig. 28). Así también, una interacción significativa entre tratamientos y subestadios fue obtenida después del análisis estadístico aplicado ( $P < 0.05$ ). No se mostraron diferencias entre subestadios ( $P < 0.05$ ) (Fig. 28).

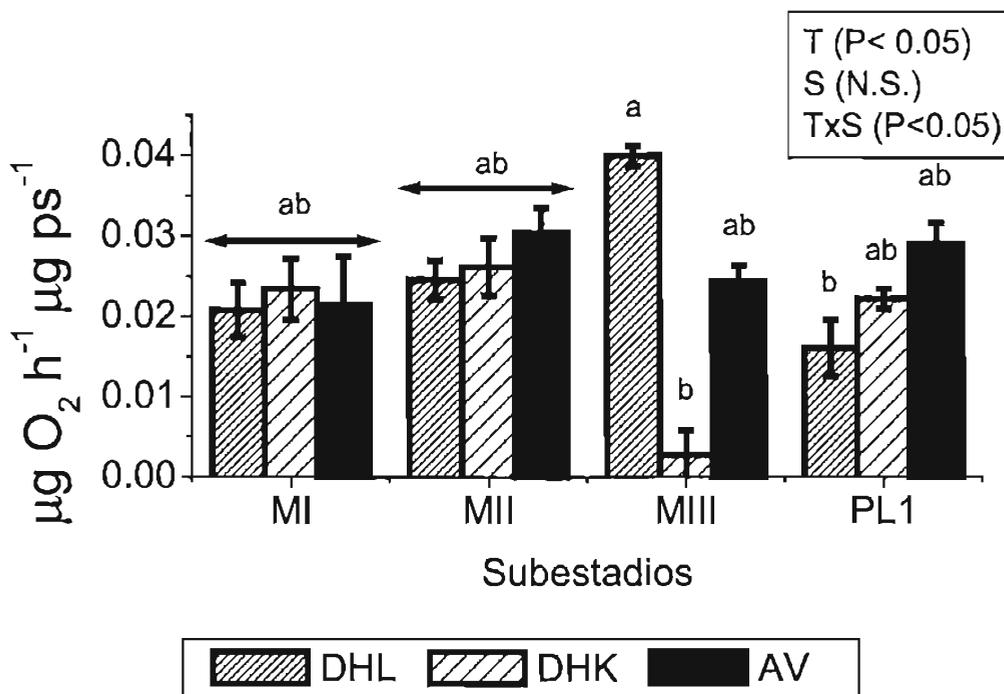


Fig. 28 .- Metabolismo de rutina ( $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas. (Promedio  $\pm$  E.S.). N = 10 repeticiones por tratamiento.

### Balance energético

La energía bruta ingerida fue mas alta para las larvas alimentadas con las dietas artificiales (45.73 Joules para DHL y 50.54 Joules para DHK) que aquellas mantenidas con el alimento vivo AV (45.26 Joules).

Diferencias de 0.96 J y de 1.43 J fueron estimadas entre las larvas mantenidas con las microcápsulas (DHL y DHK respectivamente) en relación al AV con respecto a la respiración (promedio de  $3.68 \text{ J} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) (Tabla 19). Estas diferencias favorecieron una mayor asimilación de energía por las larvas alimentadas con el AV ( $3.86 \text{ J} \cdot \text{larva}^{-1}$ ), comparada a la observada en las larvas alimentadas con las dietas artificiales DHL y DHK ( $3.15$  y  $2.45 \text{ J} \cdot \text{larva}^{-1}$  respectivamente) (Tabla 19).

Tabla 19. Energía (joules  $\cdot$  larva<sup>-1</sup>  $\cdot$  día<sup>-1</sup>) canalizada al crecimiento: Producción (P), metabolismo de rutina (R), exuvia (E<sub>v</sub>) durante los Subestadios larvales de *L. vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV).

		Ingestión	Respiración	E <sub>v</sub>	Producción	Asimilación
DHL	M I	8.97	0.45	Neg	Neg.	0.42
	M II	11.88	0.57	0.007	0.15	0.73
	M III	11.36	0.96	0.008	0.17	1.14
	PL1	13.52	0.74	0.005	0.11	0.86
Total		45.73	2.72	0.02	0.43	3.15
DHK	MI	10.91	0.47	0.002	0.5	0.52
	MII	14.32	0.81	Neg.	Neg	0.80
	MIII	12.43	0.09	0.003	0.08	0.17
	PL1	12.88	0.88	0.003	0.07	0.96
Total		50.54	2.25	0.008	0.65	2.45
AV	M I	8.9	0.42	Neg.	Neg.	0.34
	M II	12.1	0.95	0.007	0.15	1.10
	M III	11.99	1.11	0.02	0.10	1.22
	PL1	12.27	1.20	0.02	0.0004	1.20
Total		45.26	3.68	0.047	0.25	3.86

$$A = P + R + E_v$$

La repartición de energía es mostrada en la Tabla 20. La eficiencia respiratoria (R/As), fue mas baja para las larvas alimentadas con la dieta con hidrolizado de krill (DHK) (promedio de 73.3%) que para las larvas alimentadas tanto con la dieta con hidrolizado de langostilla (DHL) como las mantenidas con alimento vivo (AV) (promedios de 89.6% y 84.7 %).

La eficiencia de asimilación (Ef As) resultó mas elevada para el tratamiento AV (9.6%) (Tabla 20). La eficiencia neta de producción (K2), mostró un valor promedio mas alto con la DHK (26.7%) que el calculado para las larvas alimentadas con la DHL y AV (10.38% y 15.32% respectivamente).

Tabla 20. Eficiencias energéticas (%) estimadas para las larvas mysis de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con las dietas: dieta con hidrolizado de langostilla (DHL) mas microalgas, dieta conteniendo hidrolizado de krill (DHK) mas microalgas y dieta de alimento vivo (AV).

Tratamiento		Respiración	Asimilación	K <sub>2</sub>
		%	%	%
DHL	M I	98.7	4.7	1.28
	M II	92.8	5.4	7.14
	M III	86.4	11.4	13.61
	PL1	80.5	9.12	19.5
Promedio		89.6	7.65	10.38
DHK	MI	100	4.42	0
	MII	83.2	8.03	16.8
	MIII	28.8	3.1	71.2
	PL1	81.2	10.2	18.8
Promedio		73.3	6.43	26.7
AV	M I	100	4.28	0
	M II	86.1	9.1	13.9
	M III	77	12.1	23.0
	PL1	76	12.9	24.4
Promedio		84.7	9.59	15.32

### **Experimento 3: Sustitución total de alimento vivo en protozoas de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado CPSP 90%.**

#### **Crecimiento.**

Solo se analizaron estadísticamente los pesos secos individuales correspondientes a los Subestadios de PZII y PZIII, resultando este último subestadio los de los mayores valores. El análisis estadístico mostró diferencias únicamente entre los dos subestadios analizados, mientras que no hubo diferencias por los tratamientos de alimentación ( $P < 0.05$ ) (Fig. 29).

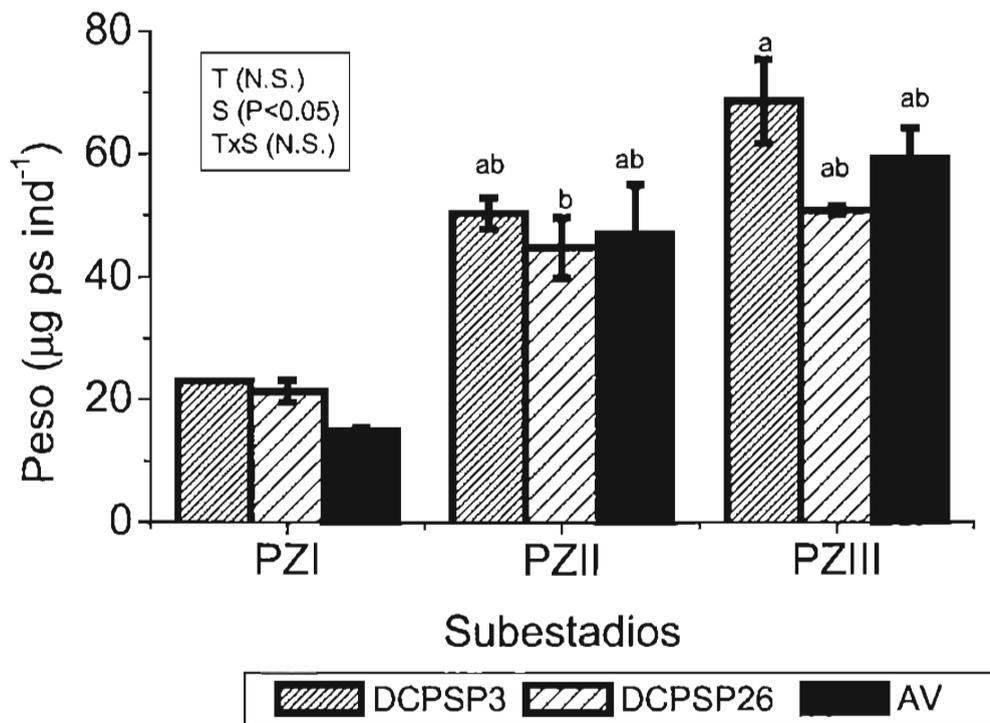


Fig. 29. Peso seco individual ( $\mu\text{g}$ ) de las larvas protozoicas de *Litopenaeus vannamei* para cada subestadio alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de  $3 \mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de  $26 \mu\text{m}$  (DCPSP26) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (Promedio  $\pm$  ES).  $N = 10$  repeticiones por tratamiento.

### Tasas de ingestión

Las tasas de ingestión de las microalgas en el tratamiento AV se muestran en la Fig. 30. Las tasas de ingestión (TI) en PZIII de las microalgas *C. gracilis* y *T. chuii* ( $61979 \pm 2461 \text{ cel} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$  y  $34583 \pm 1412 \text{ cel} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$  respectivamente) (Fig. 30) representaron los valores promedio mas altos, significativamente diferentes a las TI mostradas en PZI y PZII ( $P < 0.05$ ).

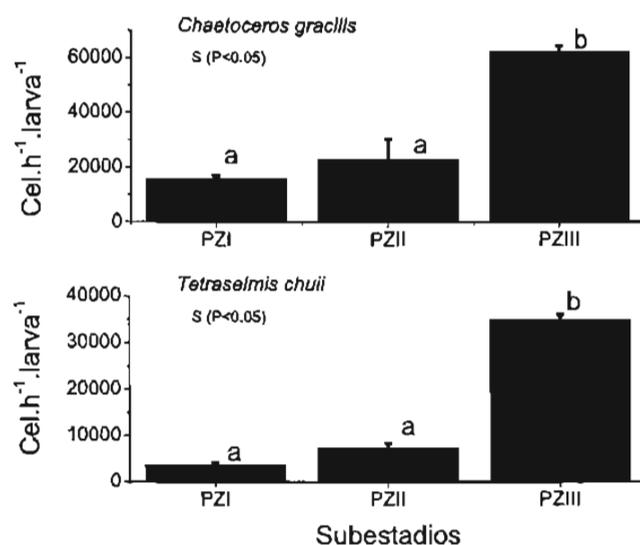


Fig. 30.- Tasas de ingestión (TI) ( $\text{cel} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 3  $\mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 26  $\mu\text{m}$  (DCPSP26) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (Promedio  $\pm$  ES).  $N = 10$  repeticiones por tratamiento.

Los valores de las TI de ambas microalgas resultaron en términos de entrada de energía total un valor promedio de 15.54 J (Tabla 30), lo cual represento 4.6 veces mas de energía ingerida que las larvas alimentadas con las dietas CPSP-3 y CPSP-25.

Tabla 21. Energía ingerida ( $\text{J} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) de las protozoas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 3  $\mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 26  $\mu\text{m}$  (DCPSP26) y alimento vivo (AV). La ración de microcápsulas se mantuvo constante.

Tratamiento		<i>C gracilis</i>	<i>T chuii</i>	Microcápsula	Energía total ingerida
DCPSP 3	PZI			1.11	1.11
	PZII			1.11	1.11
	PZIII			1.11	1.11
Total					3.33
DCPSP 26	PZI			1.11	1.11
	PZII			1.11	1.11
	PZIII			1.11	1.11
Total					3.33
AV	PZI	0.26 + 0.03	1.04 + 0.4		1.3
	PZII	0.39 + 0.13	2.2 + 0.41		2.54
	PZIII	1.07 + 0.04	10.6 + 0.43		11.7
Total					15.54

## Consumo de oxígeno.

No se observaron diferencias en el consumo de oxígeno tanto entre tratamientos como subestadios ( $P > 0.05$ ) (Fig. 31).

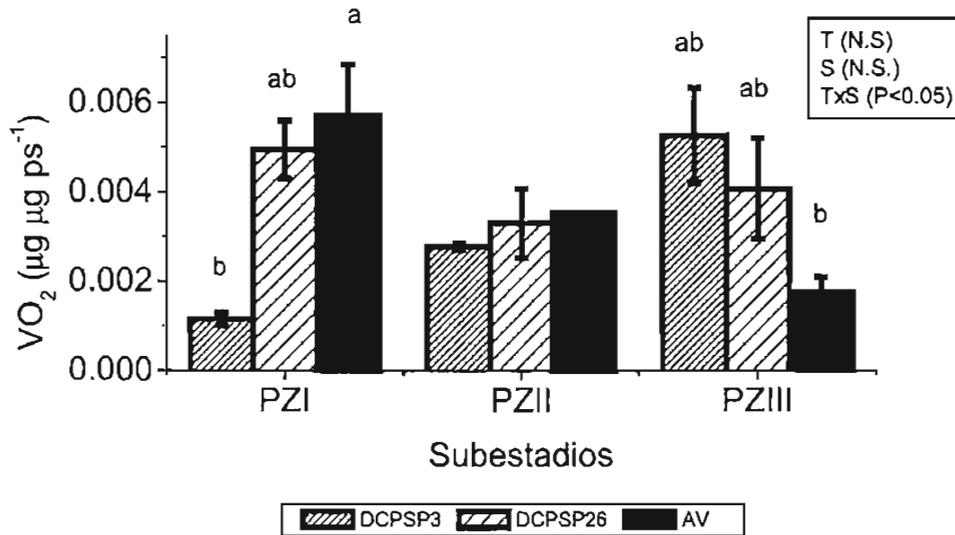


Fig. 31.- Metabolismo de rutina ( $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 3  $\mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 25  $\mu\text{m}$  (DCPSP25) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (Promedio  $\pm$  ES).  $N = 10$  repeticiones por tratamiento.

Sin embargo, mientras que se observó una disminución en el consumo durante el desarrollo en las larvas alimentadas con la dieta AV entre PZI ( $0.0057 \pm 0.001 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g de ps}^{-1}$ ) y PZIII ( $0.001 \pm 0.0003 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g de ps}^{-1}$  respectivamente), una respuesta inversa fue manifestada en la tasa respiratoria calculada para las larvas alimentadas con la dieta de 3  $\mu\text{m}$  (DCPSP-3). Ambos comportamientos no resultaron significativos después del análisis estadístico ( $P > 0.05$ ) (Fig. 31). También un efecto conjunto de tratamientos y subestadios fue obtenido de la interacción significativa ( $P < 0.05$ ).

## Balance energético

La energía bruta ingerida fue mas alta para las larvas alimentadas con el tratamiento de AV (15.54 Joules), que para aquellas mantenidas con las dietas artificiales (promedio de 3.33 Joules) (Tabla 22). Aunque esta entrada de energía en las larvas alimentadas con la dieta AV resulto 4.6 veces mas alta que para las larvas mantenidas con las dietas artificiales, la asimilación total estimada para las larvas del AV (0.60 J) solo mostró una diferencia de 0.03 J en comparación a las larvas mantenidas con la dieta DCPSP-3 (0.57 J) (Tabla 22).

Tabla 22. Energía (joules• larva<sup>-1</sup> • día<sup>-1</sup>) canalizada al crecimiento: Producción (P), metabolismo de rutina (R), exuvia (E<sub>v</sub>) durante los subestadios larvales de *L. vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 3 μm (DCPSP3), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 25 μm (DCPSP25) y alimento vivo (AV).

Tratamiento		Ingestión	Respiración	E <sub>v</sub>	Producción	Asimilación
DCPSP3	PZI	1.11	0.0003	0	0	0.0003
	PZII	1.11	0.0007	0.02	0.39	0.41
	PZIII	1.11	0.0012	0.008	0.15	0.16
Total		3.33	0.0022		0.54	0.57
DCPSP26	PZI	1.11	0.002	0	0	0.002
	PZII	1.11	0.0011	0.02	0.4	0.41
	PZIII	1.11	0.001	0.003	0.06	0.07
Total		3.33	0.0041		0.46	0.482
AV	PZI	1.3	0.003	0	0	0.003
	PZII	2.54	0.0006	0.02	0.45	0.48
	PZIII	11.7	0.0011	0.01	0.12	0.12
Total		15.54	0.0047		0.57	0.603

$$A = P + R + E_v.$$

En relación a la estrategia de repartición de energía, la eficiencia de asimilación de las larvas mantenidas con la dieta DCPSP 3 (17%) resulto 2.4 veces mas alta que la estimada para las larvas alimentadas con el AV (7%) (Tabla 23). También la Eficiencia neta de producción K<sub>2</sub>, mostró el valor mas alto con la dieta DCPSP3, con un valor promedio de 66 %, por el 63 % exhibido por las larvas alimentadas con el AV (Tabla 23).

Tabla 23 . Eficiencias energéticas estimadas para las protozoas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 3  $\mu\text{m}$  (DCPSP3), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% de 25  $\mu\text{m}$  (DCPSP25) y alimento vivo (AV).

Tratamiento	Subestadio	Respiración %	Asimilación %	K <sub>2</sub> %
CPSP3	PZI	100	0.04	0
	PZII	0.17	37.13	99.8
	PZIII	0.73	14.67	99.3
Promedio		34	17	66
CPSP26	PZI	100	0.16	0
	PZII	0.28	36.7	99.7
	PZIII	1.48	6	98.5
Promedio		34	14	66
AV	PZI	100	0.24	0
	PZII	0.14	18.7	99.9
	PZIII	0.87	1.05	99.1
Promedio		34	7	63

#### **Experimento 4: Sustitución parcial de alimento vivo en mysis de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado CPSP 90%.**

##### **Crecimiento.**

Pesos secos individuales en PL1 significativamente mas altos fueron obtenidos por las larvas mantenidas tanto con la dieta conteniendo el CPSP como las mantenidas con alimento vivo (AV) en relación a los organismos sometidos a la dieta artificial sin hidrolizado (DME) ( $P < 0.05$ ). El análisis estadístico también reflejo diferencias entre los pesos secos obtenidos entre subestadios, donde las MIII y las PL1 de los tratamientos DCPSP y AV mostraron los mayores valores en comparación a los exhibidos por las larvas del tratamiento DME ( $P < 0.05$ ) (Fig. 32).

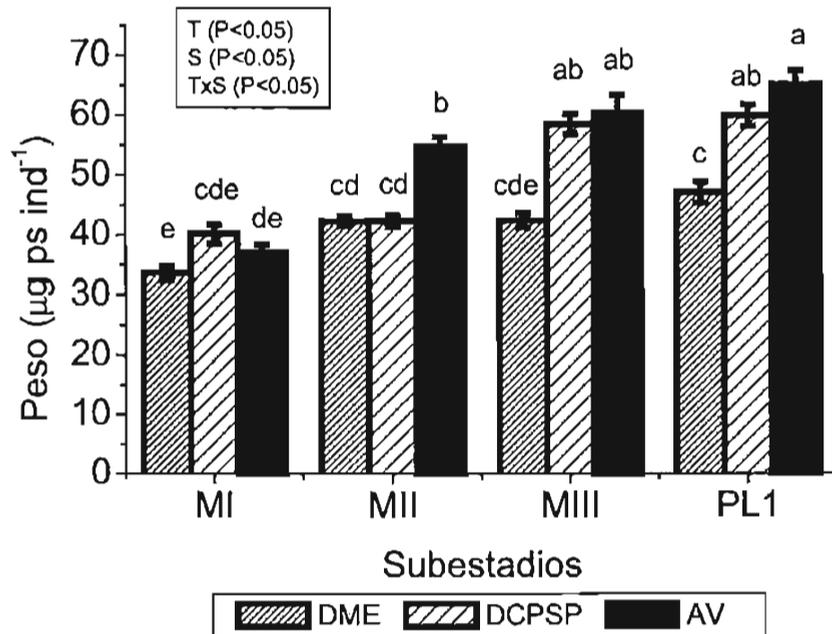


Fig. 32. Peso seco individual ( $\mu\text{g}$ ) de las larvas mysis de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas, dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCPSP) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). (Promedio  $\pm$  ES)  $N = 10$  repeticiones por tratamiento.

### Tasas de ingestión (TI) de microalgas y *Artemia* sp.

Un efecto tanto del tratamiento como de los subestadios sobre la TI de las microalgas fue observado después del análisis estadístico ( $P < 0.05$ ) (Fig. 33). Así también, se presento una interacción significativa entre ambos factores para el consumo de algas. En el caso de la TI de las diatomeas (*C. gracilis*), el mayor consumo fue presentado por las larvas mantenidas con el tratamiento de la dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, a partir de MII hasta PL1, la mayor TI de *C. gracilis* fue observada en las larvas mantenidas con alimento vivo (AV), siendo su valor promedio en el subestadio de MIII superior estadísticamente ( $P < 0.05$ ) (Fig. 33).

Con respecto a la TI de *T. chuii*, una situación similar al consumo de diatomeas se presento en MI, donde la mayor tasa fue observada en las larvas mantenidas con la dieta sin hidrolizado ( $P < 0.05$ ) (Fig. 33). El análisis bifactorial revelo diferencias estadísticas tanto

entre tratamientos como entre subestadios ( $P < 0.05$ ), así como una interacción significativa entre ambos factores analizados. En MII y MIII, mayores consumos fueron observados en las larvas alimentadas tanto con la dieta conteniendo CPSP, como las mantenidas con alimento vivo (AV) en relación a las del tratamiento DME ( $P < 0.05$ ) (Fig. 33). Una disminución significativa en la TI de *T. chuii* de estos dos tratamientos hacia PL1 fue observado ( $P < 0.05$ ).

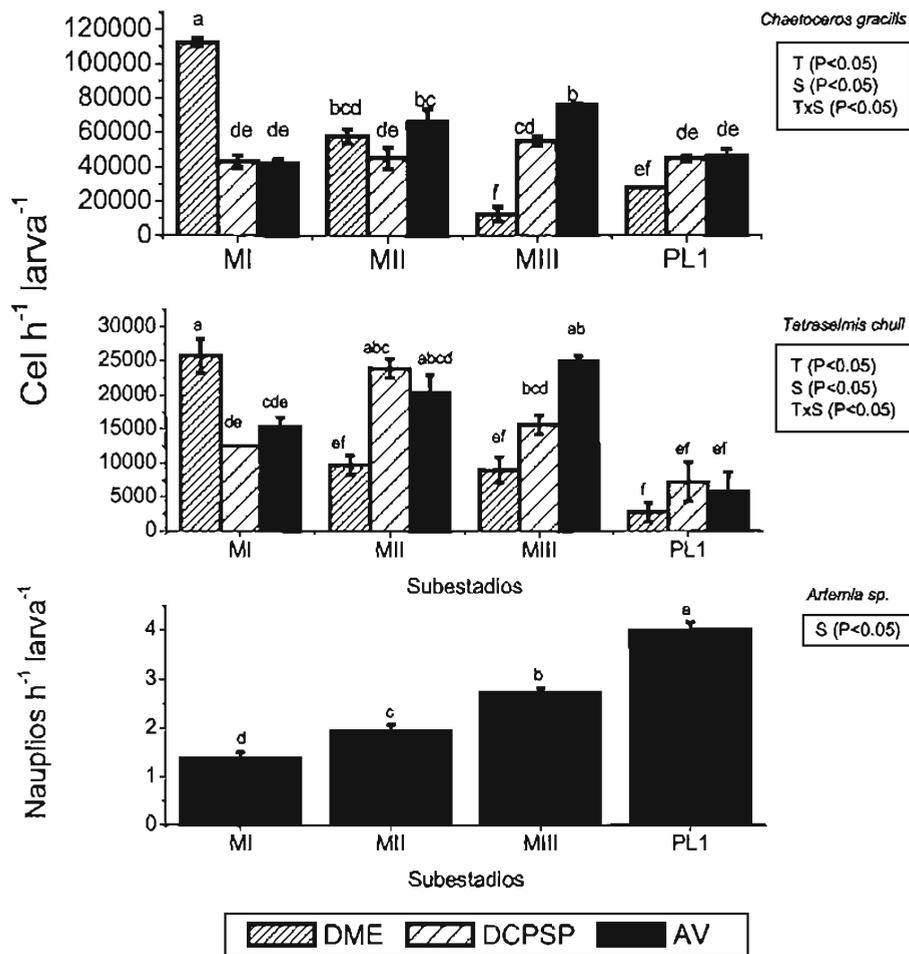


Fig. 33.- Tasas de ingestión (IR) ( $\text{cel} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas, dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCPSP) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). (Promedio  $\pm$  ES)  $N = 10$  repeticiones por tratamiento. Para la TI de nauplios de *Artemia sp.* se empleo una ANDEVA de una vía de clasificación.

La TI de los nauplios de *Artemia sp* fue afectada durante los subestadios de mysis ( $P < 0.05$ ). Los valores obtenidos mostraron un incremento significativo conforme el desarrollo larvario, llegando a un pico de ingestión en PL1 ( $4 \pm 0.1$  nauplios larva<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (Fig. 33).

La estimación de la TI en Joules larva<sup>-1</sup>•día<sup>-1</sup>, para cada alimento en los regímenes de alimentación, es presentada en la Tabla 24. Con los tratamientos DCPSP y AV, la entrada de energía total fue muy parecida (37.7 J para DCPSP y 38.5 J para el AV), y superior a la obtenida por las larvas del tratamiento DME (35.96 J•larva<sup>-1</sup>• día<sup>-1</sup>) (Tabla 24).

Tabla 24. Energía ingerida (J•larva<sup>-1</sup>•día<sup>-1</sup>) de las mysis de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCPSP) y alimento vivo (AV). La ración de microcápsulas se mantuvo constante.

Tratamiento		C. gracilis	T. chuii	Artemia	Microcápsula	Energía total ingerida
DME	MI	1.9 + 0.04	7.8 + 0.77		4.46	14.29
	MII	1.0 + 0.07	2.9 + 0.43		4.46	8.44
	MIII	0.2 + 0.07	2.7 + 0.56		4.46	7.44
	PL1	0.5 + 0.0	0.8 + 0.43		4.46	5.79
						35.96
DCPSP	M I	0.8 ± 0.06	3.8 ± 0		4.46	9.04
	M II	0.8 ± 0.11	5.8 ± 0.78		4.46	11.06
	M III	0.95 ± 0.04	4.8 ± 0.44		4.46	10.21
	PL1	0.78 ± 0.03	2.21 ± 0.88		4.46	7.45
Total						37.77
AV	M I	0.72 ± 0.04	4.7 ± 0.43	1.96 ± 0.18		7.33
	M II	1.15 ± 0.13	6.3 ± 0.78	2.77 ± 0.18		10.17
	M III	1.32 ± 0.01	7.6 ± 0.22	3.87 ± 0.14		12.83
	PL1	0.8 ± 0.07	1.8 ± 0.88	5.67 ± 0.23		8.24
Total						38.57

### Consumo de oxígeno.

El análisis estadístico de los valores del consumo de oxígeno de las larvas mostró diferencias estadísticas únicamente entre subestadios, así como interacción significativa entre estos con los tratamientos de alimentación ( $P < 0.05$ ) (Fig. 34). Así, los mayores

consumos se presentaron en los subestadios de mysis con las dietas artificiales, presentándose una disminución significativa en PL1 con ambos tratamientos ( $P < 0.05$ ). un incremento en la tasa respiratoria fue mostrado por las larvas mantenidas con el alimento vivo de MIII a PL1 (Fig. 34).

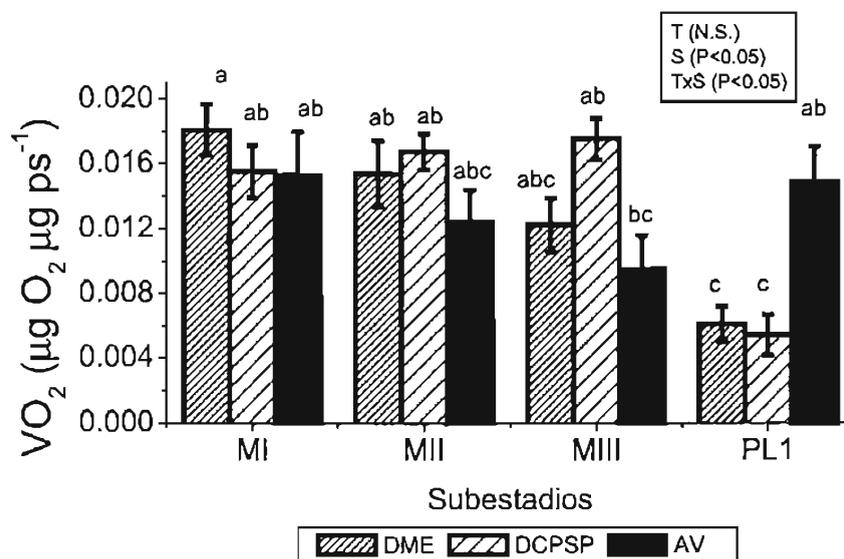


Fig. 34.- Metabolismo de rutina ( $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME) mas microalgas, dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCPSP) mas microalgas y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). (Promedio  $\pm$  ES) N = 10 repeticiones por tratamiento.

### Balance energético.

La entrada similar de energía bruta por las larvas de los diferentes tratamientos, fue reflejada en casi todos los procesos involucrados en el modelo de balance (Tabla 25). Solamente un mayor cantidad de energía total canalizada al metabolismo de rutina expresado por la respiración con la dieta conteniendo CPSP (0.97 J) fue observada (Tabla 25). Un promedio de 1.3 J para los tratamientos DCPSP y AV también puede ser calculado de la asimilación total (Tabla 25), por 1.21 estimado para las larvas de la dieta DME (Tabla 25).

Tabla 25. Energía (joules• larva<sup>-1</sup> • día<sup>-1</sup>) canalizada al crecimiento: Producción (P), metabolismo de rutina (R), exuvia (E<sub>v</sub>) durante los subestadios larvales de *L. vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCPSP) y alimento vivo (AV).

		Ingestión	Respiración	E <sub>v</sub>	Producción	Asimilación
DME	MI	14.29	0.21	0.0	Neg.	0.21
	MII	8.44	0.26	0.005	0.11	0.38
	MIII	7.44	0.21	0.005	0.11	0.33
	PL1	5.79	0.11	0.008	0.16	0.29
	Total	35.96	0.79		0.38	1.21
DCPSP	M I	9.04	0.22	0.009	0.18	0.41
	M II	11.06	0.32	0.002	0.04	0.36
	M III	10.21	0.25	Neg.	Neg.	0.24
	PL1	7.45	0.18	0.007	0.16	0.35
	Total	37.7	0.97		0.38	1.36
AV	M I	7.37	0.21	.006	0.13	0.35
	M II	10.17	0.23	0.008	0.17	0.41
	M III	12.83	0.17	0.002	0.04	0.21
	PL1	8.24	0.28	0.003	0.05	0.33
	Total	38.5	0.89		0.39	1.3

$$A = P + R + E_v$$

La estrategia de repartición de energía es mostrada en la Tabla 26. La eficiencia respiratoria (R/As) resultó mas baja para las larvas alimentadas con la dieta sin hidrolizado (promedio de 68.4 %) y las del AV (promedio de 70.7%) en comparación a la mostrada por las larvas mantenidas con la DCPSP (promedio de 73.5%).

La eficiencia de asimilación (Ef As) fue mas alta para las larvas alimentadas con la dieta sin hidrolizado (DME) en relación a los otros tratamientos, cuyo valor fu muy similar (promedio de 3.6 %) (Tabla 26). La eficiencia neta de producción (K2), mostró un valor promedio mas alto con la dieta DME (31.5 %) que el calculado para las larvas alimentadas con la DCPSP (26.2%) y AV (29.5) (Tabla 26).

Tabla 26. Eficiencias energéticas (%) estimadas para las mysis de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada sin hidrolizado (DME), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCPSP) y alimento vivo (AV).

Tratamiento		Respiración	Asimilación	K <sub>2</sub>
		%	%	%
DME	MI	100	1.48	0.0
	MII	69.6	4.54	30.4
	MIII	64.2	4.44	35.7
	PL1	39.9	4.97	60.1
Promedio		68.4	3.8	31.55
DCPSP	M I	54	4.56	46
	M II	88	3.26	12
	M III	100	2.33	Neg.
	PLI	52	4.64	47
Promedio		73.5	3.69	26.25
AV	M I	60	4.72	40
	M II	58	4.02	43
	M III	81	1.66	19
	PL1	84	4.04	16
Promedio		70.7	3.61	29.5

### **Experimento 5: Sustitución parcial y total de alimento vivo en mysis de *Litopenaeus vannamei*: efecto del hidrolizado CPSP 90%.**

En este experimento, los resultados obtenidos durante el desarrollo larval de los pesos secos individuales y consumos de oxígeno de protozoas y mysis fueron analizados separando ambos estadios. Esto resulta porque para el estadio de mysis, un tercer tratamiento (DCPSPCA) fue incluido para la sustitución parcial del alimento vivo (reemplazo de los nauplios de *Artemia sp.*), de tal forma que no se pudo hacer la comparación entre todos los subestadios larvales.

#### **Crecimiento.**

Para el estadio de protozoa, el análisis estadístico revela diferencias significativas entre subestadios, así como una interacción entre estos con el factor tratamiento. Los mayores valores de pesos secos individuales fueron obtenidos en PZIII (valor promedio entre ambos

tratamientos de 21.1  $\mu\text{m}$ ) en relación a los subestadios precedentes ( $P < 0.05$ ) (Fig. 36). los pesos secos obtenidos del experimento de reemplazo total de alimento vivo con la dieta DCPSP fueron mas altos en promedio en el subestadio de PZIII (24  $\mu\text{g}$ ) en relación a las PZI (4  $\mu\text{g}$ ) y PZII (6  $\mu\text{g}$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 36). Para los subestadios de mysis, las larvas alimentadas con la dieta microencapsulada sola tuvieron un minimo crecimiento en el paso de PZIII a MI (Fig. 36). Sin embargo, durante estos subestadios hasta PL1, las larvas alimentadas con este tratamiento incrementaron desde MI a PL1 2.8 veces su peso seco (20.2 a 57.4  $\mu\text{g}$ ) (Fig. 36). El mismo patrón de comportamiento fue observado con las larvas mantenidas con el tratamiento AV, aunque el crecimiento en peso fue detenido entre los subestadios de MI y MII (Fig. 36). Los mayores pesos en PL1 fueron obtenidos por las larvas mantenidas con AV ( $P < 0.05$ ) (Fig. 36).

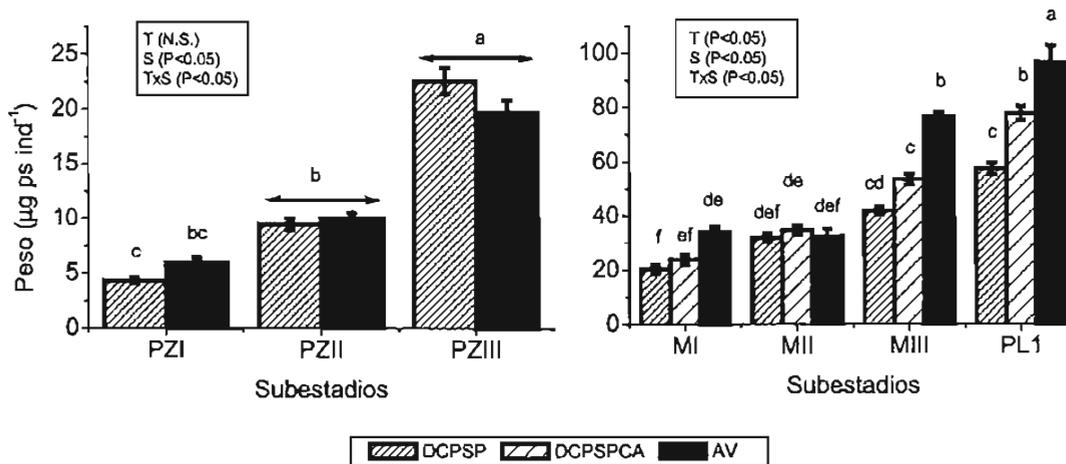


Fig. 36. Peso seco individual ( $\mu\text{g}$ ) de las larvas mysis de *Litopenaeus vannamei* para cada subestadio alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90 % mas microalgas (DCPSPCA), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCSPS) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (promedio  $\pm$  ES)  $N = 10$  replicas por tratamiento.

### Tasa de ingestión (TI) de microalgas y *Artemia* sp.

No se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos de las TI de *C. grasilis*, pero si entre subestadios, resultando los mayores consumos de esta diatomea entre los subestadios

de PZII a MI y MIII ( $P < 0.05$ ) (Fig. 37). Las menores TI de *C. gracilis* fueron observadas en PZI (Fig. 37).

En cuanto a las TI de *T. chuii*, una situación similar al consumo de las diatomeas fue presentada, observándose solo diferencias estadísticas entre subestadios ( $P < 0.05$ ) (Fig. 37), siendo las MI de la mayor TI del flagelado en relación al resto de los subestadios.

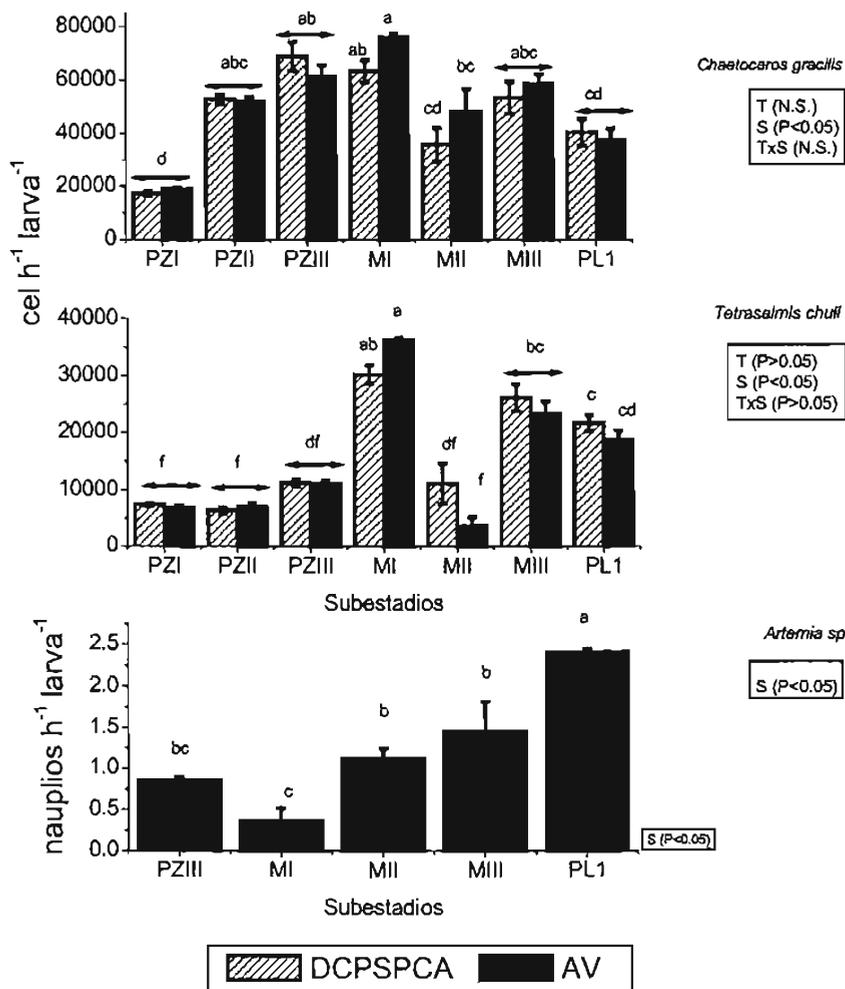


Fig. 37.- Tasas de ingestión (TI) ( $\text{cel} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$  y  $\text{nauplios} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* para cada subestadio alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90 % mas microalgas (DCPSPCA), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCSPS) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). (Promedio  $\pm$  ES) N=10 réplicas por tratamiento.

La TI de los nauplios de *Artemia* no mostró variaciones significativas entre los subestadios de PZIII y mysis ( $P>0.05$ ). Solo en PL1 la TI de nauplios de *Artemia* en el tratamiento AV mostró un valor promedio significativamente mas alto que los subestadios anteriores ( $P<0.05$ ) (Fig. 37). El menor consumo de nauplios de *Artemia sp.* fue observado en MI y resultado estadísticamente diferente a los observados en MII, MIII y PL1 ( $P<0.05$ ) (Fig. 37).

Tabla 27. Energía ingerida ( $J \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90 % mas microalgas (DCPSPCA), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCSPS) y alimento vivo (AV). La ración de microcápsulas es variable.

Tratamiento		<i>C. gracilis</i>	<i>T. chuii</i>	<i>Artemia sp</i>	Microcapsula	Energía total ingerida
DCPSPCA	MI	0.52	9.26		1.39	10.65
	MII	1.58	3.41		1.95	5.88
	MIII	2.06	8.02		2.78	12.38
	PL1	3.4	6.64		4.04	12.74
Total						41.65
DCPSP	PZI				1.11	1.11
	PZII				1.25	1.25
	PZIII				6.9	6.9
	MI				5.2	5.2
	MII				7.2	7.2
	MIII				9.05	9.05
	PL1				9.05	9.05
Total						39.76
AV	PZI	0.33	2.08			2.4
	PZII	0.91	2.16			3.06
	PZIII	1.06	3.40			5.67
	MI	1.32	11.11	1.21		12.95
	MII	0.84	1.12	0.52		3.53
	MIII	1.02	7.15	1.58		10.23
	PL1	0.65	5.74	2.06		9.82
Total						47.66

La transformación a equivalentes de energía de cada tipo de alimento ingerido en los tres tratamientos reflejo una mayor entrada de energía bruta por las larvas mantenidas con la dieta de alimento vivo (AV) y menor para las larvas mantenidas únicamente con la dieta artificial DCPSP (Tabla 27) al final del periodo experimental.

### Consumo de oxígeno.

En el estadio de protozoa, el análisis estadístico reveló diferencias estadísticas tanto entre tratamientos como entre subestadios, así como una efecto de ambos factores por la interacción significativa entre ellos ( $P < 0.05$ ). Los mas altos consumos de oxígeno fueron observados en el subestadio de PZIII con ambos tratamientos, siendo el valor promedio obtenido por las larvas mantenidas con la dieta artificial superior estadísticamente al observado con el tratamiento de alimento vivo ( $0.55 \pm 0.06 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$  y  $0.33 \pm 0.04 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$  respectivamente) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 38). Para el estadio de mysis, el análisis estadístico reveló diferencias tanto entre tratamientos como entre subestadios, así como un efecto combinado entre ambos factores ( $P < 0.05$ ) (Fig. 38). El pico de consumo fue observado por las PL1 mantenidas con el alimento vivo, cuyo valor promedio ( $1.42 \pm 0.1 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) resultó estadísticamente superior al observado por el resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 38).

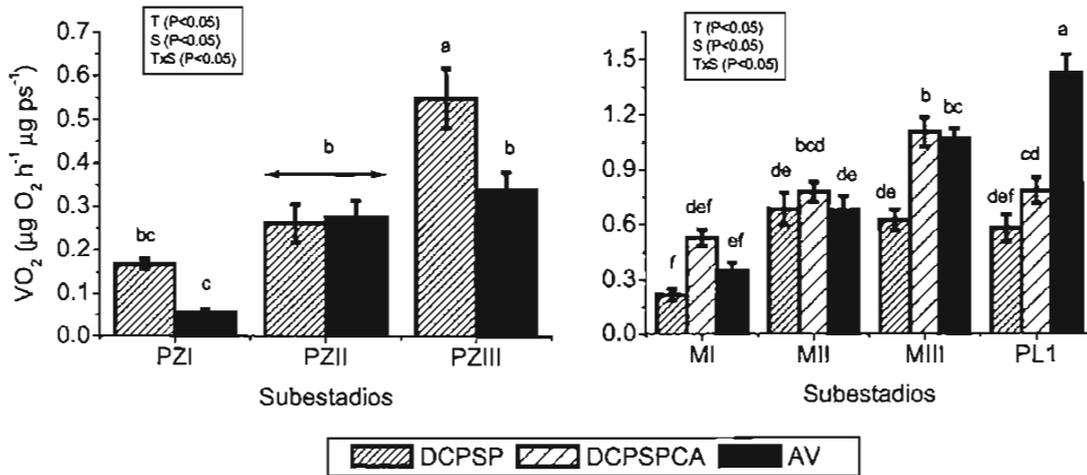


Fig. 38 .- Metabolismo de rutina ( $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g ps}^{-1}$ ) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90 % mas microalgas (DCPSPCA), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCSPS) y alimento vivo (AV). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). (Promedio  $\pm$  ES) N =10 repeticiones por tratamiento.

### Balance energético.

Un valor mas alto de asimilación fue estimado para las larvas mantenidas únicamente con el alimento vivo (AV) en relación a la dieta artificial (Tabla 28). Aunque una mayor cantidad de energía canalizada a la producción por las larvas mantenidas con la dieta artificial sola, la cual resultó 0.08 J mas alta que la mostrada por las larvas mantenidas con el tratamiento de AV (Tabla 28), la mayor cantidad de energía canalizada a la respiración fue observada en las larvas alimentadas con el AV, lo que resulto en una mayor cantidad de energía asimilada en las larvas de este ultimo tratamiento (Tabla 28).

Tabla 28. Energía (joules • larva<sup>-1</sup> • día<sup>-1</sup>) canalizada al crecimiento: Producción (P), metabolismo de rutina (R), exuvia (E<sub>v</sub>) durante los subestadios larvales de *L. vannamei* alimentados con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90 % mas microalgas (DCPSPCA), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCSPS) y alimento vivo (AV).

Tratamiento		Ingestión	Respiración	E <sub>v</sub>	Producción	Asimilación
DCPSPCA	MI	10.65	0.17	0.004	0.08	0.25
	MII	5.88	0.21	0.008	0.16	0.38
	MIII	12.38	0.35	0.01	0.2	0.56
	PL1	12.74	0.24	0.01	0.2	0.50
Total		41.65	0.97		0.64	1.69
DCPSP	PZI	1.11	0.04			0.04
	PZII	1.25	0.05	0.01	0.21	0.28
	PZIII	6.9	0.16	0.03	0.65	0.858
	MI	5.2	0.08	Neg.	Neg.	Neg.
	MII	7.2	0.26	0.01	0.22	0.51
	MIII	9.05	0.23	0.006	0.13	0.37
	PL1	9.05	0.25	0.008	0.15	0.42
Total		39.76	1.05		1.36	2.47
AV	PZI	2.4	0.02			0.02
	PZII	3.06	0.12	0.002	0.06	0.18
	PZIII	5.67	0.14	0.02	0.44	0.6
	MI	12.95	0.15	0.013	0.27	0.44
	MII	3.53	0.19	0.0008	0.02	0.21
	MIII	10.23	0.32	0.02	0.39	0.73
	PL1	9.82	0.43	0.005	0.1	0.53
Total		47.66	1.37		1.28	2.71

$$A = P + R + E_v.$$

En la Tabla 29 observamos la repartición de energía a través de las eficiencias energéticas estimadas. Una mayor eficiencia respiratoria fue observada por las larvas alimentadas con el AV, mientras que la dieta artificial utilizada como único alimento mostró la mayor eficiencia de asimilación. Los mayores valores de la eficiencia neta de producción (K<sub>2</sub>) fueron mostrados por las larvas mantenidas con las dietas artificiales (Tabla 29).

Tabla 29. Eficiencias energéticas (%) estimadas para los diferentes subestadios larvales y primera postlarva de *Litopenaeus vannamei* alimentados con diferentes dietas: dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90 % mas microalgas (DCPSPCA), dieta microencapsulada conteniendo CPSP 90% (DCPSP) y alimento vivo (AV).

Tratamiento		Respiración %	Asimilación %	K <sub>2</sub> %
DCPSPCA	MI	66.7	2.34	33.3
	MII	55.6	6.51	44.4
	MIII	61.8	4.52	38.2
	PL1	49.5	3.9	50.47
Promedio		58.4	4.31	41.59
DCPSP	PZI	100	3.7	0
	PZII	19.5	22.7	80.4
	PZIII	18.97	12.17	81.03
	MI			
	MII	52.9	7	47.08
	MIII	62	4.1	37.9
	PL1	60.8	4.7	39.2
Promedio		44.8	7.7	40.8
AV	PZI	100	0.77	0
	PZII	64.8	5.8	35.16
	PZIII	22.8	10.57	77.2
	MI	35.2	3.39	64.7
	MII	91.5	5.9	8.5
	MIII	43.9	7.13	56.0
	PL1	80.9	5.4	12.1
Promedio		62.7	5.5	36.2

## DISCUSION.

En el capítulo anterior se menciona que el crecimiento es uno de los indicadores más importantes en la valoración de una dieta, ya que el mismo resume una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos muy estrechamente ligados a los hábitos alimenticios y requerimientos nutrimentales de las larvas de camarón. En general los crecimientos obtenidos al final de los experimentos (en PZIII o bien en PL1) en los reemplazos parciales y totales de alimento vivo (sustitución de *Artemia sp.* en el estadio de mysis y sustitución de microalgas en el estadio de protozoa respectivamente), por las larvas alimentadas con las dietas artificiales, expresados por el peso seco individual, resultaron muy similares a las mostradas por las larvas mantenidas con el régimen de alimento vivo (microalgas y nauplios de *Artemia sp.*), lo cual permite establecer que las microcápsulas experimentales empleadas en los experimentos lograron reemplazar a los diferentes alimentos vivos comúnmente utilizados en la cría larvaria de *L. vannamei*.

Los pesos obtenidos en PL1 en los experimentos de sustitución parcial en el estadio de mysis con las dietas microencapsuladas conteniendo hidrolizado de krill (Fig. 14) y CPSP 90% (Fig. 23), fueron similares a los exhibidos por las larvas mantenidas con microalgas y *Artemia sp.*, lo cual señala que la dieta artificial puede ser un buen sustituto para producir postlarvas de *L. vannamei*. Cuando la dieta conteniendo CPSP 90% de proteína fue utilizada como sustituto total del alimento vivo, en la fase de protozoa (experimento 3) los pesos finales obtenidos mostraron un mayor valor promedio (Fig. 20), aunque no hubo diferencias significativas después del análisis.

En el caso de las protozoas (experimento 3 y 5), el tamaño de partícula de 3 micrómetros pudo ser el factor decisivo en la captura y aprovechamiento de la dieta. La captura del alimento y considerando el habito filtrador de las protozoas es difícil de resolver cuando se emplean dietas artificiales, principalmente porque el tamaño de partícula juega un papel importante. El tamaño de 3 micrómetros de las microcápsulas resultó apropiado para las larvas de *L. vannamei* de acuerdo con los resultados obtenidos. La captura resulta difícil también porque depende de la ración de alimento ofrecida y los requerimientos energéticos

de los organismos. Depende de muchos factores, tales como la composición del alimento, el contenido energético, el status nutricional, el tamaño, la textura, el color, etc. En general, es el punto mas débil para establecer la conversión alimenticia o bien la retención de energía (Papand *et al.*, 1999). Básicamente, la composición del alimento puede ejercer una de las principales influencias en la captura del alimento y el presente trabajo provee una comparación entre alimento artificial y alimentos vivos.

En los experimentos de sustitución parcial, un menor consumo de microalgas fue observado en los tratamientos donde las dietas microencapsuladas estuvieron presentes (experimentos 1 y 4). Considerando el aporte nutrimental de las microalgas y de los nauplios de *Artemia sp*, las microcápsulas involucradas en estos tratamientos de alimentación cubrieron las necesidades nutrimentales de las larvas de *L. vannamei*, como se comprueba con los pesos finales obtenidos en estos experimentos (Fig. 23 y 32). Estos resultados coinciden con los obtenidos para las mysis de *Marsupenaeus japonicus* por Marin – Magan y Cañabate (1995). Estos autores concluyen que las larvas se alimentan mas rápidamente de las microalgas cuando son el único alimento que cuando están en combinación con partículas alimenticias inertes.

Cuando se suministran determinadas dietas artificiales y vivas de manera controlada, es posible considerar un balance energético y determinar los beneficios de los regímenes de alimentación. En este trabajo, el aporte energético de las microcápsulas en algunos casos fue inferior al aportado por las microalgas y los nauplios de *Artemia sp* (experimento 1,2,3 y 4), y sin embargo, los resultados en el desarrollo y sobrevivencia mostrados por las larvas sometidas a las dietas artificiales presentados en el capítulo anterior, son comparables a los mostrados por las larvas mantenidas con el AV. Los menores crecimientos con las dietas artificiales en el experimento 2 con las dietas conteniendo hidrolizado de langostilla e hidrolizado de krill, pudo deberse a la baja concentración de proteína de acuacero al análisis bromatológico presentado en la Tabla 7 y que la ración de microcápsulas se mantuvo constante en todo el experimento ( $0.32 \text{ mg larva}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ). Esta ración transformada en su equivalente energético representó un valor de  $4.46 \text{ J} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  (Tabla 18), al mismo tiempo que el aporte energético de los nauplios de *Artemia sp*, donde la tasa de

ingestión mostrada por las larvas se incrementó conforme el desarrollo, fue mas elevado. Sin embargo, en el experimento 3 de sustitución total, también se mantuvo fija la ración diaria de microcapsulas ( $1.1 \text{ J larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ), siendo 4.6 veces inferior al aporte energético de las microalgas del régimen AV, pero obteniendo un crecimiento similar (Fig. 29). Esta situación puede deberse a que las PZI aun mantienen una gran cantidad de las reservas aportadas del vitelo del huevo, fundamentalmente lipoproteínas, las cuales pudieran funcionar en este subestadio de reservas nutricias importantes en el proceso de adaptación a la alimentación exógena. De hecho, en el capítulo anterior se observaron mayores concentraciones de AG y colesterol en este estadio, en relación con las PZII y PZIII. Aunado a lo anterior, el tamaño de partícula de 3 micrómetros pudo jugar un papel importante en la captura de las microcápsulas por las larvas de *L. vannamei*.

En el caso de la sustitución total del alimento vivo (experimento 5) la ración de microcápsulas a suministrar en cada subestadio fue determinada de acuerdo a los requerimientos energéticos establecidos con base en la tasa de ingestión de las microalgas y nauplios de *Artemia sp.* Su administración controlada en este experimento resulto benéfica al final del experimento, donde las PL1 obtenidas de la DCPSP sola presentaron valores de peso similares a los mostrados con el régimen AV (Fig. 36).

Lo anterior pone de manifiesto la relevancia de la contribución de las dietas artificiales en el desarrollo larvario de *L. vannamei*. En la literatura, las raciones de dietas artificiales son frecuentemente establecidas de manera fija. Por ejemplo, Gallardo *et al* (2002) reporta que, en la presencia de microalgas, la dieta microparticulada permite reemplazar a los nauplios de *Artemia sp* entre 40 y 60%, con raciones de  $0.11\text{-}0.13 \text{ mg} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  para mysis de *L. setiferus* ; Galgani y AQUACOP (1988) recomiendan niveles de  $0.025 \text{ mg} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  para larvas de *F. indicus*, *L. vannamei*, y *P. monodon* en las cuales observaron sobrevivencias superiores a 85%. Kumlu y Jones (1995) señalan que el mejor nivel de alimentación con dietas microencapsuladas para larvas protozoas de *F. indicus* es entre  $0.06 - 0.08 \text{ mg} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  con el ajuste diario de la ración de acuerdo al grado de acumulación de alimento y heces en el tanque de cría larval.

Anger (2001) menciona que el crecimiento y desarrollo implica las conversiones en energía química potencial, originada del alimento ingerido o bien de las reservas internamente almacenadas. Estos procesos de conversión son sintetizados en términos metabólicos, y debido al metabolismo intermediario de los crustáceos, depende del consumo de oxígeno (comúnmente referido como respiración) y altamente correlacionada con la tasa metabólica global. La respiración larval es continuamente afectada por la calidad y cantidad de alimento disponible en el medio; en términos generales, se ha propuesto que la alimentación incrementa la tasa respiratoria y su efecto ha sido denominado Acción Dinámica Específica (Lehninger *et al.*, 1993) o Incremento de Calor Aparente (Rosas *et al.*, 1996) y representa los costos energéticos de la alimentación y la digestión.

En el presente trabajo los mayores consumos de oxígeno fueron manifestados en el subestadio de PZIII (excepto en el experimento 2). El alto consumo de oxígeno por las PZIII puede ser asociado al cambio metamórfico (Lemos y Phan, 2001) como ha sido reportado para otras especies, como *F. paulensis* (Lemos and Phan, 2001) y *M. japonicus* (Laubier-Bonichon *et al.*, 1977; Kulkarni and Joshi, 1984). De acuerdo a Lemos y Phan (2001), este fenómeno puede ser atribuido principalmente a la disminución de la razón superficie: volumen que limita los procesos de aporte y remoción (por ejemplo, intercambio gaseoso, digestión) y al cambio de hábito planctónico de los nauplios y protozoas a los hábitos bentónicos (en transición) de las misis a las postlarvas.

La integración de todos los índices a nivel de organismo, a través de un modelo de balance energético, permitió estimar de manera global el aporte energético de cada uno de los regímenes de alimentación evaluados para las larvas de *L. vannamei* y decidir, donde las dietas artificiales, logran reemplazar al alimento vivo.

Los valores totales de respiración (R) calculados mostraron una mayor cantidad de energía para las larvas mantenidas con la dieta AV que el estimado para las larvas mantenidas con las dietas artificiales en todos los experimentos, (excepto en el experimento 4). La presencia, captura y manipulación de los nauplios de *Artemia sp* para poder ser ingeridos en el régimen de AV de los experimentos 1, 2, 4 y 5 pudo haber incrementado el consumo de

oxígeno en las larvas de este tratamiento en los experimentos mencionados, y por tanto los valores energéticos de la respiración, lo cual puede relacionarse con los costos de la digestión y asimilación del alimento. Aunque el aporte energético de las microcápsulas cuando esta fue incorporada de manera constante (experimentos 1, 2, y 4) fue menor en la toma de energía total por las larvas, pudo haber sido equilibrado debido a los costos energéticos asociados a la captura, manipulación y procesamiento de los nauplios de *Artemia sp* lo cual repercute en los pesos secos observados en las larvas mantenidas con el alimento vivo (tratamiento AV) de estos experimentos.

Existen pocos estudios sobre las estrategias de repartición de energía en lavas de decápodos, a diferencia de las etapas adultas y grandes invertebrados (Anger, 2001). De estos estudios, la mayoría de los datos publicados permiten observar los cambios ontogénicos entre subestadios sucesivos. En los resultados obtenidos en este trabajo, las variaciones ontogénicas en la distribución de energía a través del balance bioenergético, permitió analizar las tendencias ontogénicas cuando las larvas de *L. vannamei* fueron sometidas a diferentes tratamientos de alimentación y establecer por tanto, las necesidades energéticas en un subestadio particular. En el experimento de sustitución total del alimento vivo, la disminución de la eficiencia neta de asimilación en las larvas alimentadas con la dieta artificial (80 % en PZI a 32% en PL1) y también las larvas mantenidas con alimento vivo (de 77 % en PZIII a 12 % en PL1) (Tabla 29), son similares a los resultados reportados por Kurmaly *et al* (1989b) para larvas del camarón *P. monodon* (88% en PZI a 56 y 66 % en mysis y PL1 respectivamente) y Anger (2001) para larvas del cangrejo araña *Hyas areneus* (59 a 26 %). Anger (2001) menciona que este decremento en la K2 representa un patrón típico en larvas de decápodos y esta relacionado a que en los primeros subestadios larvales, el crecimiento excede las pérdidas metabólicas, declinando en los últimos subestadios del desarrollo.

Comparando los flujos de energía entre los diferentes subestadios larvales de *L. vannamei* estimados en este trabajo, el parámetro bioenergético dominante es la respiración, el cual mostró una tendencia a incrementarse hacia PL1 cuando los organismos fueron mantenidos tanto con la dieta artificial conteniendo CPSP como las mantenidas con alimento vivo

(AV) (ver Tabla 28). Este comportamiento es similar al observado en larvas de *P. monodon* por Kurmaly *et al* (1989b), donde un valor de 0.014 J larva<sup>-1</sup> en PZI y 0.136 J larva<sup>-1</sup> en PL1 es presentado en este parámetro. Anger (2001) menciona que este comportamiento esta relacionado a la baja tasa de crecimiento y altas perdidas metabólicas de las megalopas de *H. areneus* (10 y 21% en los dos estadios de protozoa y 69% en las megalopas). Aunque el tiempo de duración de los estadios del desarrollo de esta especie son muy largos (10 a 20 días, dependiendo de las condiciones de temperatura principalmente, Anger; 2001).

Según Anger (2001), existen diferencias entre las especies carnívoras y herbívoras, implicando una correlación negativa entre la asimilación y la eficiencia neta de crecimiento (K2) en estas últimas. Esto es, las especies herbívoras tienden a asimilar una pequeña proporción de lo que ellas ingieren (baja asimilación), pero son capaces de convertir una gran parte de la energía asimilada en crecimiento (alta K2). De acuerdo a Jones (1997), “los herbívoros tienden a mostrar muy bajas eficiencias de asimilación, pero un muy rápido traslado de relativamente altas cantidades de material ingerido, en tanto los carnívoros ingieren relativamente pequeñas cantidades de alimento, pero tienen mucho mas tiempos de residencia del mismo en el intestino”. Durante la fase completamente herbívora de *L. vannamei* (estadio de protozoa), los resultados observados durante las sustitución total del alimento vivo, tanto las larvas mantenidas con la dieta artificial y aquellas mantenidas con el alimento vivo, coinciden con lo señalado con estos autores, al mostrar valores altos de K2 y baja asimilación en comparación de las mysis en el mismo experimento. Esto nos sugiere que el factor alimento, sea artificial o vivo, no influye en el comportamiento de la utilización de energía provista y que este, se encuentra mas bien gobernado por las modificaciones ontogénicas propias de la especie. En larvas de *P. monodon* (especie mas carnívora y por tanto con una mayor necesidad de proteína animal como los nauplios de *Artemia sp*), alimentadas con *T. chuii*, una baja eficiencia de asimilación fue encontrada mientras la microalga fue alimento exclusivo, en tanto la K2 incremento de MI a PL1 cuando fueron incorporados los nauplios de *Artemia sp.* en el régimen de alimentación (Kurmaly *et al*, 1989b).

De acuerdo con Kurmaly et al (1989b) y dado que las eficiencias de asimilación son similares en las larvas de *L. vannamei* mantenidas tanto con la dieta artificial como las del alimento vivo (Tabla 29), es posible estimar el peso seco de alimento microencapsulado conteniendo CPSP o de alimento vivo requerido para la producción de un millón de postlarvas basado sobre la suma de energía ingerida en el balance energético presentado en la Tabla 28. Así, si 39.76 J para producir una postlarva es requerido, y que equivale a 2.8 mg de peso seco de dieta microencapsulada, entonces se requieren 2.8 Kg de DCPSP para producir un millón de postlarvas. Para el alimento vivo, si 47.66 J son requeridos para producir una postlarva, y que equivale a 1.53 mg de alimento vivo (microalgas y nauplios de *Artemia sp.*), entonces se requieren 1.53 kg de peso seco de alimento vivo para producir un millón de postlarvas.

Es notorio que una mayor cantidad de energía es necesaria cuando las larvas son alimentadas con la dieta artificial en comparación al alimento vivo; sin embargo, la disminución en los costos de producción de alimento vivo en las granjas de producción, así como la simplificación en el manejo del alimento (control de la calidad del agua y de la concentración del alimento) con el uso de microcápsulas, las coloca como una alternativa viable a considerar en la cría larvaria de *L. vannamei*. Es importante señalar que concentraciones adecuadas de dieta artificial y un control estricto en el balance aminoácido, así como tamaños de partícula mas dirigidos a cada subestadio del desarrollo son necesarios en futuras investigaciones para optimizar el suministro del alimento microencapsulado como reemplazo total del alimento vivo.

## CONCLUSIONES

Las dietas microencapsuladas conteniendo los diferentes hidrolizados proteicos fueron capaces de reemplazar al alimento vivo de acuerdo con los crecimientos y sobrevivencias obtenidas cuando fueron ofrecidas como alimento en el estadio de protozoa y mysis de las larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Un retraso en el desarrollo de PZIII a MI de larvas alimentadas exclusivamente con la dieta DCPSP puede ser debido a la cantidad de alimento suministrada, incluso, considerando que fue ajustada de acuerdo a los requerimientos energéticos dados por las tasas de ingestión de alimento vivo.

Un efecto benéfico de los hidrolizados proteicos en las larvas de *Litopenaeus vannamei* puede ser observado cuando son incluidos en las dietas microencapsuladas considerando el incremento de la actividad enzimática y la evolución del uso de reservas como los acilglicéridos y colesterol similares a los observados en larvas mantenidas con alimento vivo.

Una disminución significativa del contenido de acilglicéridos y colesterol de PZI a PZII tanto con las dietas artificiales como con alimento vivo, puede ser consecuencia del uso de estas reservas asociado al proceso de adaptación a la alimentación exógena y al desarrollo del tubo digestivo de las larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Un incremento en la actividad de enzimas proteolíticas entre PZIII y MI y entre MIII y PL1, así como en el consumo de oxígeno en estos mismos subestadios, observados en estos experimentos tanto con el alimento artificial como el alimento vivo, pueden ser asociados al efecto de la presencia de los hidrolizados proteicos de origen marino y los nauplios de *Artemia sp* respectivamente y coinciden con las modificaciones morfofuncionales del tubo digestivo y cambios conductuales que experimentan las larvas entre estos subestadios.

Menores tasas de ingestión de microalgas cuando estas fueron combinadas con las dietas artificiales fueron observadas en relación con las mostradas por las larvas mantenidas con alimento vivo.

El balance energético estimado permitió evaluar las estrategias de canalización de energía por las larvas de *Litopenaeus vannamei*, destacando un menor esfuerzo metabólico a través de la respiración cuando los organismos fueron mantenidos con las dietas artificiales.

A través de los resultados del balance energético es posible estimar la cantidad de alimento necesario para la producción de postlarvas, resultando una buena herramienta para identificar las necesidades energéticas de las larvas de *L. vannamei* como se ha planteado en otras especies comerciales.

## RECOMENDACIONES.

Mejorar aspectos de la calidad proteica de las dietas artificiales utilizadas en este trabajo, principalmente cubriendo las deficiencias de aminoácidos esenciales como la metionina y el triptofano de acuerdo al balance aminoacido presentado.

Establecer mediante bionensayos las cantidades optimas de dietas artificiales para ser incluidas como sustitutas del alimento vivo en la nutrición de larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Identificar las necesidades lipídicas y de ácidos grasos específicos de las larvas de *L vannamei* mediante bioensayos con dietas purificadas o semipurificadas microencapsuladas.

Profundizar en la caracterización del hidrolizado de langostilla para un mejor aprovechamiento como ingrediente funcional en alimentos para organismos acuáticos.

Establecer los niveles adecuados de inclusión de hidrolizados proteicos en los alimentos microencapsulados para larvas de camarón.

Evaluar a escala piloto comercial y comercial los alimentos microencapsulados con hidrolizados proteicos (considerando principalmente al hidrolizado de pescado, CPSP 90% de acuerdo a los resultados obtenidos) como reemplazo parcial y total del alimento vivo en la cría larvaria de *Litopenaeus vannamei*.

## LITERATURA CITADA

- Abubakr B. and D. A. Jones. 1992. Functional morphology and ultrastructure of the anterior midgut diverticula of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1789) larvae. *Crustaceana* 62 (2): 142 – 158.
- Aldman G., Jonson A. C.; Jensen J. and Holmgren S. (1989). Gastrin/CCK – like peptides in the spine dogfish, *Squalus acanthias*: concentrations and actions in the gut. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92C (1): 103 – 108.
- Adler Nissen, J. 1986. *Enzymic hydrolysis of food protein*. Elsevier applied sci. Pub, London. 427 pp.
- Amjad, S., Jones, D.A., and Chittravadevelu, K. 1992. Advances in penaeid larval feed technology. In : *Proceedings of seminar on new technologies in aquaculture*, pp 29-45 (Cheah, S.H. and Thalathiah, H.J., Eds) Malaysia, Malaysian fisheries Society.
- Angawattui A.M. y Heruwati E., 1990. The use of hydrolyzed protein concentrant in practical diets for *Penaeus monodon* juveniles. Research Institute for fish technology, Palmerath, Jakarta.
- Anger K. 1989. Growth and exuvial loss during larval and early juvenile development of the hermit crab *Pagurus bernhardus*, reared in the laboratory. *Mar. Biol.* 103: 503 – 511.
- Anger K. 2001. The biology of decapod crustacean larvae In: R. Vonk (ed). *Crustacean Issues Vol 14*, AA Balkema Publishers, Amsterdam Netherlands, 407 pp.
- Bautista, M.N.; Parado-Estepa, F. Millamena, O.M. y Borlongan, E.L. 1991. Large scale hatchery production of *Penaeus monodon* using natural food and artificial diets. *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh.* 43 (4): 137-144.
- Bernfeld, P. 1955. Sur une method de dosages des amylases. In *Methods in Enzimolog.* Colowick Kaplan O.C. (Eds). Vol 1 Academic press. N.Y. pp. 149 – 154.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cahu C.L., Zambonino infante, J.L. Quazuguel, Le Gall M.M. 1999. Protein hidrolisate Vs fish meal in compound diets for 10 day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171 : 109-119.

- Cahu C.L., Zambonino Infante J.L. 1994. Early waning of sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae with a compound diet : effect on digestive enzymes. *Comp. Bioch. Physiol.* 109: 213-222.
- Cahu C.L., Zambonino Infante J.L. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding ? *Aquacult. Int.* 5: 151-160.
- Carvahlo A.P., Escaffé A.M. Oliva Teles A., Bergot P., Kaushik S., 1998. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hidrolisates. *Aquacult. Int.* 5: 361-367.
- Chitravadivelu, K. 1992. Artificial penaeid larval diets. *J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka.* 20 (1): 1-6.
- Chu, K.H. 1991. Larval rearing of the shrimps *Metapenaeus ensis* (de Haan) and *Penaeus chinensis* (Osbeck) on artificial feed. *Aquaculture and fhiseries Management.* 22, 473-479.
- Chu, K. and Ovsianico-Koulikowsky, N.N. 1994. Ontogenetic changes in metabolic activity and biochemical composition in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 183, 11-26.
- Cordova - Murueta J.H.and Garcia - Carreño F.L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210: 371-384.
- Dall, W., Chandumpai, A and Smith D.M. 1992. Fatty acid composition of organs and tissues of the tiger prawn *Penaeus esculentus* during moulting cycle and during starvation. *Mar Biol.* 113 (1): 45-55.
- Fox, J. M. 1983. Intensive algal culture techniques. In: *Handbook of mariculture.* (Mc Vey, J.P. Eds.) Vol. 1, pp 43 – 69. CRC press, Boca Raton, Fl.
- Fraser, A.J. 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish,bivalve and crustacean larvae. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* Vol. 46: 1868-1873.
- Gallardo, P. P., Alfonso, E., Gaxiola, G., Soto, L. A. and Rosas, C. (1995). Feeding schedule for *Penaeus setiferus* larvae based on diatoms (*Chaetoceros ceratosporum*), flagellates (*Tetraselmis chuii*) and *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 131, 3-4.
- Gallardo, P. 2000. Aspectos nutrimentales y fisiológicos de larvas del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Linneo, 1767): Esquema de alimentación. Tesis de Maestria. UNAM. 53 p.
- Gallardo, P.P.;Pedroza-Islas, R.; Garcia-Galano, T.; Pascual, C. Rosas, C.; Sanchez, A. and Gaxiola G. 2002. Replacement of live food with a microbound diet in feeding

- García, T. 1972. Descripción de los estadios larvales del camarón blanco, *Penaeus schmitti* Burkenroad, obtenidos en el laboratorio. C. Inv. Mar, Universidad de la Habana, Cuba. Serie Invest. Mar. 1: 1-54.
- Geiger, R. (1988). Chymotrypsin In: Methods of enzymatic analysis. Enzymes 3: Peptidases, proteinases and their inhibitors (Bergmeyer J and Grab, BmM. Eds). Verlag Chemie, Einheim, Vol 5, 3 rd edition, pp 99-104.
- Geiger R., and Fritz H.. (1988). Trypsin In: Methods of enzymatic analysis. Enzymes 3: Peptidases, proteinases and their inhibitors (Bergmeyer J and Grab, BmM. Eds). Verlag Chemie, Einheim, Vol 5, 3 rd edition, pp 119-124.
- González, R., Fraga, V., Carrillo, O. 1994. Cambios ontogénicos en la actividad de las principales enzimas digestivas de *Penaeus schmitti*. Rev. Invest. Mar., 15(3): 262-268.
- Jones, D.A.; M.S. Kamarudin and L. Le Vay. 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. Journal of the World Aquac. Soc. 24 (2): 199-210.
- Jones D.A. 1998. Crustacean larval microparticulated diets. Reviews in Fisheries Science, 6 (1 y 2): 41-54.
- Johnson L. R. E.; Copeland E. M. and Dudricks S. J. (1978). Luminal gastrin stimulate growth of the distal intestine. Scand. J. Gastroenterol., 13 (49):95.
- Kanazawa, A., (1985) Microparticulated diets. In: Fish nutrition and diets (Yone Y. ed) pp 99-110, Koseisha-Koseikaku, Tokyo.
- Kanazawa, A. 1989. Microparticulate feeds for penaeid larvae. Advances in tropical aquaculture. Tahiti, Feb 20-March 4, 1989. Aquacop ifremer. Actes de colloque 9: 395-404.
- Kumlu, M., Sariahn, E., Tekelioglu, N. 1992. Trypsin activity in larvae of *Penaeus monodon* Fabricius, 1789 (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) in relation to their diet. Isr. J. Aquacult. Bamidgeh, 44: 103-110.
- Kuban F.D.; Lawrence A. D. and Wilkenfeld J.S. 1985. Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. Aquaculture, 47 (1985): 151- 162.
- Kulkarni G.K., and Joshi P.K. 1980. Some aspects of respiratory metabolism of a penaeid prawn, *Penaeus japonicus* (Bate) (Crustacea, Decapoda, penaeidae): Hydrobiologia 75: 27-32.

- Kumlu, M., Jones, D. A. 1995a. The effect of live and artificial diets on growth, survival, and trypsin activity in larvae of *Penaeus indicus*. J. World Aquacult. Soc. 26, 406-415.
- Kumlu M. y Jones D. 1995b. Feeding and digestion in the caridean shrimp larva of *Palaemon elegans* Rathke and *Machobrachium rosebergii* De Mann (Crustacea : Palaemonidae) on live and artificial diets. Aquaculture nutrition, 1 : 3-12.
- Kurmaly, K., D. A. Jones, A. B. Yule and J. East. 1989. Comparative analysis of the growth and Survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa I to postlarva 1 on live feeds, artificial diets on combination of both. Aquaculture. 81: 27-45.
- Kurmaly, K., Yule A.B., and Jones A.D. 1989b: An energetic budget for the larvae of *Penaeus monodon* (Fabriius). Aquaculture, 81: 13-25.
- Lang I. y Gil V.C. 1991. Nutritional value of spray-died *Tetraselmis suecica* for juvenile bivalves. Aquaculture 92 :207-218.
- Laubier-Bonichon A., Van Wormhoudt A and Sellos D .1977. Croissance larvaire contrôlée de *Penaeus japonicus* Bate : enzymes digestives et changements de regimes alimentaires. Publ Cent Natl Exploit Oceans Actes Colloq 4 : 131-145.
- Lehninger, A.L., Nelson D.L., and Cox M.M. 1993. Principles of biochemistry, 2 ed . Worth Publishers, New York E.U A.
- Lemos D., y Phan V.N. 2001. Ontogenetic variation in metabolims, biochemical composition and energy content during the early life stages of *Farfatepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Marine Biology 138: 985-997.
- Lemos D., y Phan V.N. 2000. Energy partitioning into growth, respiration excretion and exuvia during larval development of the shrimp *Farfatepenaeus paulensis*. Aquaculture 199: 131-143.
- Lemos, D., Rodriguez, A. 1998. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. Aquaculture 160: 103-116.
- Le Moullac, G. 1994. Adaptation des enzymes digestives á l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). Diplome EPHE Paris, 120p.
- Le Moullac, G. Van Wormhoudt, A., 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 (3): 203-210.

- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 208: 107-125.
- Le-Vay, L., Rodriguez, A., Kamarudin, M. S., Jones, D. A. 1993a. Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture* 118 (3-4): 287-297.
- Le-Vay, L., Rodriguez, A., Mourente, G., Jones, D. A. 1993b. Influence of diet on digestive activity and growth of *Penaeus japonicus* larvae. Implications for nutritional studies. *World Aquaculture'93 Int. Conf.*, Torremolinos (España).
- Le Vay, I. Jones D.A., Puello –Cruz A., Sangha R.S., Ngamphonsai, C. 2001. Digestión in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 128: 623-630.
- Licop, M. S. 1984. The influence of temperature and salinity on oxygen consumption of *Penaeus monodon* postlarvae. *Proceedings Of The First International Conference On The Culture Of Penaeid Prawns Shrimps*, Iloilo City, Philippines 1985, 178.
- Lovett, D.L., & Felder, D.L. 1989 Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda; Penaeidae). *J. Morphol.* 201: 253-272.
- Lovett, D. L., Felder, D. L. 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.* 178: 144-159.
- Lucas, A. 1993. *Bioenergética des animaux aquatiques*. Masson, Paris; 180 pp
- Maeda, M.; Nogami, K. And Ishibashi N. 1992. Utility of microbial food assemblages for culturing a crab, *Portunus trituberculatus*. *Bull. Natl. Res. Ins. Aquaculture* No. 21: 31-38.
- Mourente G., Medina A., González S., Rodríguez A. 1995. Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture* 130: 187-199.
- Masters K. 1985. *Spray Drying Handbook*. 4a. Edicion. John Wiley and Sons. N.Y.
- Palacios Metchenov E. 1999. Caracterización fisiológica del agotamiento reproductivo y optimización de la reproducción del camarón blanco del pacifico *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda:Penaeidae). Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mexico. 193 p.
- Palacios E., Ibarra A .M., Ramirez J.L. Portillo G. and Racotta I.S. 1998. Biochemical composition of eggs and nauplio in White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei* (Bonne),

- in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. Aquac. Res. 29.
- Paffenhofer G.A. 1971. Grazing and ingestion rate of nauplii copepodits and adults of the marine plancktonic copepod *Calanus helgolandicus*. Mar. Biol., 11: 286 – 298.
- Palomino, G. 1997. Efecto del tipo de alimento en el sustrato metabólico de las larvas de *L. setiferus*. Tesis de Licenciatura, UNAM. México.
- Pedroza - Islas, R. 2000. Estudios difusionales en microencapsulados para larvas de crustáceos. Tesis de doctorado. UNAM.
- Pedroza - Islas, R., Vernon-Carter, E.J., Durán-Dominguez, C. And Trejo-Marínez, S. 1999. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation. I. Particle siza, morphology and microstructure of microcapsules. Food Res. Int. 32 (5): 367-374.
- Ravallec-Plé, R. 2000. Valorisation d'hydrolysats d'origine marine: optimisation de la concentration en peptides apparentes aux facteurs de croissance et aux agents secrétagogues. Essais *in vitro* et *in vivo*. Tesis de Docteur de L'Universite de Bretagne occidentale. 206 p.
- Reifel, C.W., Mainr-Sorensen, M., and Samloff, M. 1983. Gastrin immunoreactive cells in the gastrointestinal tracts from four species of fish. Can.J.Zool., 61: 1464-1468.
- Reinecke M.; Drakemberg K.; Falkmenr S. and Sara V. R. 1992. Peptides related to insulin-like growth factor 1 in the gastro-entero-pancreatic system of bony and cartilaginous fish. Reg. Pep., 37: 155-165.
- Rosas, C., Sánchez, A., Gallardo, P., Quiroz, J., Gaxiola, G., Díaz-Iglesia, E. and Soto, L. A. 1995. Oxygen consumption and ingestion rate of *Penaeus setiferus* larvae fed *Chaetoceros ceratosporum*, *Tetraselmis chuii* and *Artemia* nauplii. Aquacult. Nutr. 1:13-20.
- Rosas, C., Sánchez, A., Díaz-Iglesia, E., Brito, R., Martínez, E., Soto, L. A. 1997a. Critical dissolved oxygen level to *Penaeus setiferus* and *Penaeus schmitti* postlarvae (PL<sub>10-18</sub>) exposed to salinity changes. Aquaculture 152: 1-4.
- Rosas, C., Sánchez, A., Gaxiola, G., Díaz, E., Brito, R., Soto, L. A. 1997b. Tasa respiratoria de larvas de *Penaeus setiferus* y *P. schmitti* Burkenroad (Decapoda: Penaeidae). Rev. Invest. Mar. 18: 51-57.
- Shin-ichi, T.; Kanazawa, A. And Sakamoto, M. 1982. Microparticulate diets for the larvae of aquatic animals. Min. Rev. Data file Fish. Res., 2: 67-86.

- Shin-Ichi, T.; Kanazawa, A. And Shunsuke, K. 1993. Recent developments in nutrition and microparticulate diets of larval prawns. The Israely Journal of Aquaculture- Bamidgeh 45 (4): 175-184.
- Slaminzka, M., Escuffe A.M., Charlon M. Bergot P., 1991. Preliminary data on semisynthetic diets for gold fish *Carassius auratus* larvae. In : Kaushik S.J. Luquet P. (eds.) Fish Nutrition in Practice.
- Sorgeloos, P., Coutteau, P., Dhert, P., Merchie, G., Lavens, P. 1998. Use of Brine Shrimp, *Artemia spp.*, in Larval Crustacean Nutrition: A Review. Reviews in Fisheries Science, 6: 1-2.
- Van Wormhoudt A. and Dircksen H. 1990. Gastrin / CCK – like peptides in the nervous system and the stomach of crustaceans. Frontiers in crustacean neurobiology. Advances in life sciences. Birkhauser Verlag Basel.
- Vergara, M. J. M. 1990. Valor nutritivo de una nueva microcápsula para larvas de almeja japonesa (*Tapes semidecussata* Reeve). Biol. Inst. Esp. Oceanogr. 6 (1): 71-80.
- Vernon-Carter E.J., Beristain C.I. y Pedroza Islas R. 1999. Mezquite gum (*Prosopis gum*). In : novel macromolecules in Food systems (Eds G. Doxastakis and V. Kiosseoglou) Elsevier Science B.V. (en prensa).
- Villarreal, H., Hinojosa, P., Naranjo, J. 1994. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* postlarvae. Comp. Biochem. Physiol., 108A (2-3): 331-336.
- Villegas, D. K. and A. Kanazawa. 1979. Relationship between diet composition and growth of the zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. Fish. Res. J. Phillipp. 4(2): 32 - 40.
- Zar, J.H., 1974. Biostatistical analysis. Prentice Hall. New York. 620 pp.

# Anexo 1.

Cinetica de flotabilidad de las microcapsulas utilizadas en el presente trabajo para la alimentacion de larvas de *Litopenaeus vannamei*.

