



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**Sustitución de alimento fresco por alimento balanceado de alta calidad
proteica y lipídica, y adicionado con aminoácidos libres sobre el
desempeño reproductivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus
vannamei***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO (A) EN CIENCIAS

PRESENTA:
SARA ORTIZ GUILLÉN

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES

MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
Unidad Académica Sisal, Facultad de Ciencias UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. CRISTINA PASCUAL DOMÍNGUEZ
Unidad Académica Sisal, Facultad de Ciencias, UNAM
DR. ILIE SAVA RACOTTA DIMITROV
Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.
DRA. MARINA J. EZQUERRA BAUER
Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
DRA. MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ DE BAZÚA
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ EXTERNO: Dr. GERARD CUZON (PCMyL)

Dr. WILSON WASIELESKY JR (PCMyL)

MÉXICO, D. F. MAYO 2015



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.



Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología.
Universidad Nacional Autónoma de México



Sustitución de alimento fresco por alimento balanceado de alta calidad proteica y lipídica, y adicionado con aminoácidos libres sobre el desempeño reproductivo del camarón blanco del Pacífico

Litopenaeus vannamei

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS
BIOLOGÍA MARINA**

P R E S E N T A:

SARA ORTIZ GUILLÉN

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS

COMITÉ TUTORAL: DRA. CRISTINA PASCUAL DOMÍNGUEZ
DR. MARINA J. EZQUERRA BAUER
DRA. MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ DE BAZÚA
DR. ILIE SAVA RACOTTA DIMITROV

COMITÉ EXTERNO: Dr. GERARD CUZON (IFREMER – COP/TAHITI)
Dr. WILSON WASIELESKY JR (FURG – BRASIL)

MÉXICO, 2015

La presente investigación se realizó en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias, UNAM con sede en Sisal, Yucatán con el apoyo financiero del proyecto CONACYT-CIENCIA BÁSICA 167670 bajo la dirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés. Asimismo, la estudiante agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (240620) durante el periodo 2010-2012.

Agradezco a las siguientes personas por su colaboración en la realización de esta tesis:

- a) Manejo de los reproductores y obtención de los nauplios: M. en C. Miguel Arévalo López y al técnico Moisés Cab Marín.
- b) Cría de larvas de camarón: Ing. Adriana del Carmen Paredes Medina.
- c) Producción de alimento vivo para las larvas de camarón: M. en C. Gabriela Palomino Albarrán.
- d) Elaboración de los alimentos balanceados para los reproductores: Biol. Gabriel Taboada Domínguez.
- e) Crecimiento y engorda: M. en C. Manuel Valenzuela Jiménez.
- f) Capacitación y ayuda técnica en el laboratorio así como sus consejos en el análisis de muestras: M. en C. Karla Susana Escalante Herrera, M. en C. Nancy Herrera Salvatierra y a la M. en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga.
- g) Por los análisis de química analítica: Dra. Elsa Noreña Barroso y Dra. Lluvia Korynthia López Aguiar.
- h) Técnicos académicos del Programa Camarón: Concepción Guadalupe Uc Burgos, Rudy Canché, Patricia Balam.
- i) A Omar Chiyean Cámara y a Eduardo Pacheco por su apoyo técnico en procesos de cómputo.
- j) A M. en C. Carmen Galindo de Santiago por su apoyo en procesos estadísticos.
- k) A mi directora de tesis, Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés y al Dr. Gerard Cuzon, por el invaluable conocimiento que me han proporcionado.
- l) A mi Comité Tutoral por su apoyo incesante: Dra. Cristina Pascual, Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa, Dra. J. Marina Ezquerro y al Dr. Illie Sava Racotta Dimitrov.

m) Agradezco al Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (240620) durante el periodo 2010-2012.

Agradecimientos

A las familias sisaleñas Chuc y Bojorques que me han adoptado como un miembro más, por su ayuda y preocupación... gracias.

A los amigos que se han cruzado en mi camino sisaleño, lleno de aventuras y experiencias maravillosas, porque han convertido una alegría en doble alegría y una pena en media pena: Gemma, Magy, Anita, Rox, Diana Blu, Diana Aguilera, Marce, Martín Romero, Marco, Maldonado y Karina, Mauricio, Adriana Ferreira, El Deivid, Ulises, Alí, Gamboa, Karlita Ne, Cecy, Ariadna, Nancy, Moy, Adrianita y Luis, Arturo George, Carmen y Joel... gracias.

A Magda, Samia y Bárbara, por ser mi familia... gracias.

A Lety y Tyson, por su amistad... gracias.

Dedicatorias

Para mis padres Erasto y Aurora, porque son los motores que me guían y los escudos que me protegen en mis batallas.

A mis hermanos Ángel y Uriel porque sin ellos no soy yo.

A mi abuelo Macario, porque sus preguntas incesantes sobre mis camarones me plantearon dudas a resolver, siempre estarás en mi corazón.

A mis tíos, primos y sobrinos por todo su apoyo y cariño.

Para la familia González-Alvarado-Miranda.

Para Gaby y Gerard, no tengo palabras para describir lo que ha significado para mí su apoyo y ayuda.

A mi hermano del alma Luis Manuel España Pech Guillén, hay amistades que perduran hasta el infinito.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	xiii
Abstract	xiv
CAPÍTULO I. PROBLEMÁTICA	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	2
1.3.1. General	2
1.3.2. Particulares	3
1.4. HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. ESTUDIOS ANTECEDENTES	4
2.2. SISTEMAS ALTERNATIVOS DE CULTIVO AMIGABLES CON EL AMBIENTE	7
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. OBTENCIÓN DE LOS PROGENITORES	9
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y DIETA	9
3.3. ELABORACIÓN DE LA DIETA	11
3.4. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL	12
3.4.1. Sala de maduración de reproductores	12
3.4.2. Sala de desove y eclosión	12
3.5. ACELERACIÓN DE LA MADURACIÓN DE LAS HEMBRAS	13
3.6. MADURACIÓN Y COSECHA DE LOS HUEVOS	13
3.7. RESPUESTAS A EVALUAR EN EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE LOS CAMARONES	14

	Continuación	Página
	3.8. ANÁLISIS DE LABORATORIO	15
	3.9. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA DE MADURACIÓN Y ALIMENTOS FRESCOS PROPORCIONADOS A REPRODUCTORES DE <i>L. vannamei</i>	16
	3.10. COLESTEROL Y CAROTENOIDES	16
	3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	18
CAPÍTULO IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
	4.1. CALIDAD DEL AGUA Y PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	19
	4.2. RESPUESTAS ZOOTÉCNICAS DE LAS HEMBRAS	19
	4.3. DESEMPEÑO REPRODUCTIVO	19
	4.3.1. Desempeño reproductivo en hembras	19
	4.3.2. Respuestas bioquímicas en hembras	21
	4.3.2.1. Acilglicéridos, Ac	21
	4.3.2.2. Colesterol, Col	22
	4.3.2.3. Proteínas, Pts	22
	4.3.2.4. Glucosa	23
	4.3.2.5. Índice nutricional Ac:Pts	23
	4.3.2.6. Índice nutricional Ac:Col	23
	4.4. PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS Y CALIDAD ESPERMÁTICA EN MACHOS	23
	4.5. RESPUESTAS BIOQUÍMICAS EN MACHOS	24
	4.6. DISCUSIÓN FINAL	25
	4.6.1. Alimentos frescos y/o congelados	25
	4.6.2. Parámetros zootécnicos	28
	4.6.3. Desempeño reproductivo	28
	4.6.3.1. Hembras	28
	4.6.3.2. Machos	31

	Continuación	Página
	4.6.4. Metabolitos en diferentes tejidos	33
	4.6.5. Ácidos grasos poliinsaturados	34
	4.6.6. Colesterol y carotenoides	36
CAPÍTULO V.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	39
	5.1. CONCLUSIONES	39
	5.2. PERSPECTIVAS	40
ANEXOS	A-1 ENSILADO DE CABEZA DE MERO ROJO	41
	A-2. ENCAPSULADO DE AMINOÁCIDOS LIBRES	42
	A-3. EXPERIMENTO PREVIO: BIOENSAYO: SUSTITUCIÓN DE ALIMENTO FRESCO POR BALANCEADO EN ORGANISMOS PROVENIENTES DE DOS SISTEMAS DE CULTIVO	43
	A-4. TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS PRODUCIDOS EN ESTA INVESTIGACIÓN Y DEL SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA MARINA	49
BIBLIOGRAFÍA		54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Formulación de la dieta a probar (g/100 g de alimento seco)	10
2	Diseño experimental	10
3	Perfil de ácidos grasos de las dietas	17
4	Aportación de colesterol de las dietas por día (% de lípidos totales)	17
5	Carotenoides $\mu\text{g/g}$ de masa seca por tratamiento	17
6	Parámetros físico-químicos (promedios \pm desviación estándar)	19
7	Desempeño reproductivo en hembras de los distintos regímenes alimenticios	20
8	Metabolitos de diferentes tejidos evaluados en hembras de <i>L. vannamei</i>	22
9	Calidad espermática y parámetros zootécnicos de reproductores de <i>L. vannamei</i>	24
10	Metabolitos en diferentes tejidos de machos de <i>L. vannamei</i>	25
11	Tabla comparativa de diferentes experimentos en sustitución de alimento fresco	29
12	Resumen del perfil de ácidos grasos	35
13	Colesterol ingerido por día	37
14	Parámetros físico-químicos del bioensayo previo	45
15	Zootecnia y desempeño reproductivo en hembras en bioensayo previo	45
16	Metabolitos en diferentes tejidos de hembras reproductoras bioensayo previo	46
17	Calidad espermática de machos reproductores de <i>L. vannamei</i> bioensayo previo	47
18	Promedios y DE de los aspectos bioquímicos de los machos de <i>L. vannamei</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Tratamientos sometidos a experimentación	11
2	Tratamientos sometidos a experimentación del bioensayo previo	44
3	Esquema de distribución de agua de mar y drenaje	50
4	Filtro de arena	51
5	Esquema de distribución de agua en el área de Desove y Eclosión	52
6	Esquema de distribución del área de Maduración	53
7	Esquema de filtración de agua del área de Maduración	53

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ac:Col	Índice nutricional que indica la relación existente entre los acilglicéridos totales y el colesterol
Ac:Pts	Índice nutricional que indica la relación existente entre los acilglicéridos y las proteínas
AG	Del inglés <i>Androgenic gland</i> (glándula androgénica)
AM, PM	Siglas latinas para el horario basado en 12 horas: “ <i>Ante meridiem</i> ” (antes de mediodía) y “ <i>post meridiem</i> ” (después del mediodía)
ANDEVA	Abreviatura de análisis de varianza
ARA	Siglas en inglés para el ácido araquidónico, uno de los ácidos grasos poliinsaturados
Arcoseno	Transformación numérica realizada a los valores presentados en porcentajes
ARG	Siglas en inglés para el aminoácido arginina
Asumir <i>versus</i> suponer	En español, asumir viene del latín <i>assumĕre</i> y significa: 1. tr. Atraer a sí, tomar para sí. 2. tr. Hacerse cargo, responsabilizarse de algo, aceptarlo. 3. tr. Adquirir, tomar una forma mayor. Suponer, por otro lado, viene del latín <i>supponĕre</i> , 1. tr. Dar por sentado y existente algo. 2. tr. Fingir, dar existencia ideal a lo que realmente no la tiene. 3. tr. Traer consigo, importar. <i>La nueva adquisición que ha hecho supone desmedidos gastos de conservación.</i> 4. tr. Conjeturar, calcular algo a través de los indicios que se poseen. 5. intr. Tener representación o autoridad en una república o en una comunidad. Por ello, ASUMIR y SUPONER NO SON SINÓNIMOS EN ESPAÑOL.
BHT	Butil hidroxitolueno (E-321) es un agente antioxidante sintético procedente de la industria petrolera. Se utiliza prácticamente siempre mezclado con el BHA (E-320), butil hidroanisol
Biofloc BFT	Sistema de cultivo basado en la denominada <i>Bio Floc Technology</i> , <i>BFT</i> , el cual consiste en realizar recambios de agua solo bajo condiciones de salinidad superiores a 40 ppm y altas concentraciones de sólidos suspendidos (40 mL/L)
BIORAD	Marca de equipo lector de microplacas por espectrofotometría
Breed S de INVE	Alimento para maduración de camarón de la empresa Aquaculture Baasrode Belgium
Calentador TRAME	Calentador de titanio de la marca TRAME®
Cámara de Newbauer	Usada para el conteo de células microscópicas que cuenta con 16 celdas divididas milimétricamente

Combinado	Nombre dado al tratamiento consistente en la alimentación de camarones reproductores consistente en la combinación de <i>pellet</i> semihúmedo + calamar y mejillón
Conteo	Es el número de células por mililitro, usando la ecuación 1: $Cel/mL = (P*16)*FD*10000$ (para 16 celdas)
Cultivo de agua clara	Sistema de cultivo acuícola que consiste en realizar un recambio continuo de agua para mantener los parámetros óptimos de calidad de la misma
DE	Desviación estándar
<i>DHA</i>	Siglas en inglés para el ácido docosahexaenoico, uno de los ácidos grasos poliinsaturados
Dt	Desoves totales
Ecdisteroides	Hormonas de la muda de los insectos (ecdisona y sus homólogos)
ED	Eficiencia del desove
<i>EDTA</i>	Siglas en inglés para el ácido etilediamintetraacético, usado para quelar los metales pesados en su forma de sal de sodio
<i>EPA</i>	Siglas en inglés para el ácido eicosapentaenoico, uno de los ácidos grasos poliinsaturados
<i>EPA/DHA</i>	Siglas en inglés para la relación existente en alimentos entre el ácido poliinsaturado eicosapentaenoico y docosahexaenoico
EPIFEED [®]	Empresa productora de alimentos para acuicultura
Eppendorf	Marca de tubos contenedores de diferentes medidas
ES	Error estándar
Extrudir	Del latín <i>extrudĕre</i> . 1. tr. Dar forma a una masa metálica, plástica, etc., haciéndola salir por una abertura especialmente dispuesta
Extrudidos	Materiales producidos en un extrusor
Extrusor	Equipo mecánico para extrudir materiales
<i>FAA</i>	Siglas en inglés para aminoácidos libres (<i>free aminoacids</i>)
FD	Factor de conversión para la ecuación 1
Floc	Una forma de cultivo “amigable con el ambiente”: denominada “floc” (Bio FlocTechnology) (Avnimelech, 2007; Emerenciano, 2007) con cero recambio de agua en el cual se propicia una flora bacteriana heterotrófica benéfica para los organismos cultivados, principalmente bacterias requeridas para la nitrificación (Cuzon <i>et al.</i> , 2008b) y un balance de C:N de 20:1
Fresco	Nombre dado al tratamiento consistente en la alimentación de camarones

	con calamar, mejillón, poliqueto y <i>Artemia</i> preparado en esta investigación
<i>GLUT</i>	Siglas en inglés para el aminoácido glutamina
<i>Golden Spawn</i>	Alimento para maduración de camarones de la empresa Tesgofarm Aqua en Holanda
<i>Gramo versus grano</i>	El gramo es la unidad de masa del sistema internacional y se abrevia g mientras que el <i>grano</i> es una unidad inglesa, equivalente a 1/7000 <i>pound (libra)</i> e igual a un <i>troy grain</i> o 64.799 miligramos o mg y se abrevia <i>gr</i>
Ha	Total de hembras con ablaciones
Hd ⁺	Número de desoves
Hf	Huevos fértiles
Hd _t	Número de hembras totales que desovaron durante el transcurso del tratamiento
HIG	Hormona inhibidora de la gónada
Higashimaru	Alimento para reproductores usado en la empresa Higashimaru en Japón
HIV	Hormona inhibidora de la vitelogénesis
<i>HUFA</i>	Highly unsaturated fatty acid (ácido graso altamente insaturado)
IGS	Índice gonadosomático (IGS), es la masa de la gónada en relación con la masa total del organismo
IHS	Índice hepatosomático (IHS), que es la masa de la glándula digestiva en relación con la masa total del organismo
KCl	Cloruro de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
<i>LA</i>	Siglas en inglés para el ácido linoleico
<i>LEU</i>	Siglas en inglés para el aminoácido leucina
LT	Lípidos totales (Tabla 13)
<i>LYS</i>	Siglas en inglés para el aminoácido lisina
MadMac-Ms Premix	Alimento usado para la reproducción de camarones de la empresa Aquafauna Biomarine, USA (EE.UU.)
Masa	La masa es una magnitud física que mide la cantidad de materia contenida en un cuerpo. Sus unidades en el Sistema Internacional de Unidades, SI, son los kg
<i>MET</i>	Siglas en inglés para el aminoácido metionina

Mg	Masa de la gónada
Mgd	Masa de la glándula digestiva
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado
MS	Masa seca
Mt	Masa total del organismo
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
Nippai	Alimento comercial usado en la maduración de camarón
Nm	Nanómetro
NutraFeed [®]	Empresa productora de alimentos para acuicultura
OH-Pro	Siglas en inglés para el aminoácido hidroxiprolina
P	Promedio para la ecuación 1
<i>Pellets</i>	Del latín <i>pila</i> , pelota, pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido. El término es utilizado para referirse a diferentes materiales
Pellet	Nombre dado al tratamiento consistente en la alimentación de camarones con pienso semihúmedo formulado y fabricado en esta investigación
Peso	En el Sistema Internacional de Unidades, que es el prioritario o único legal en la mayor parte de las naciones (excluidos Birmania y Estados Unidos), las publicaciones científicas, los proyectos técnicos, las especificaciones de máquinas, etc., las magnitudes físicas se expresan en unidades de ese sistema (SI). El peso se expresa en unidades de fuerza del SI, esto es, en newtons (N): 1 N = 1 kg 1 m/s ² o en kg _f = 9.80665 N. Por lo tanto, MASA y PESO NO SON EQUIVALENTES
pl 15	Fase de postlarva 15
<i>PR</i>	Siglas en inglés de <i>Ponds reared</i> (cultivados en estanques)
ProAqua	Empresa proveedora de productos acuícolas
<i>PUFA</i>	<i>Polyunsaturated fatty acid</i> (ácido graso poliinsaturado)
SIC	Solución isotónica para camarones
Te	Tasa de eclosión, que es el número de huevos eclosionados en relación al total de huevos desovados
Tf	Tasa de fertilización, que es el número de huevos en relación con el número total de huevos desovados
Tn	Número total de huevos eclosionados

TR	Del inglés <i>Tank reared</i> (cultivados en tanques de concreto)
<i>Tripan blue</i>	Nombre en inglés para el colorante usado para la tinción de células espermáticas en camarón, Azul de Tripan
UMDI	Siglas para la Unidad Multidisciplinaria en Docencia e Investigación
UV	Ultra violeta, radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400nm y los 15nm
Ziegler	Empresa productora de alimentos para acuacultura

Nota:

Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

Resumen

Basado en el historial de los reproductores que pueden influir en la maduración gonádica, una dieta práctica fue formulada conteniendo ingredientes de calidad más aminoácidos libres. Este alimento extrudido fue usado solo (Pellet) o en combinación con alimento fresco (Combinado) para evaluar el desempeño reproductivo. Se esperaría una equivalencia o una respuesta más baja con la mezcla de calamar *Loligo sp*, mejillón *Mytilus edulis*, poliqueto *Glycera dibranchiata* y biomasa de *Artemia*, denominada alimento Fresco. Los metabolitos fueron determinados mediante kits reactivos. Fueron aplicados análisis de variación, ANDEVA, para determinar los estadísticos. La masa de las hembras (36g), sobrevivencia (87%), IGS (2 a 3), desoves (77%), número de huevos (90 a 110 x10³), eclosión (26-36%) no son diferentes en Fresco y Combinado (p>0.05) pero fueron superiores los de Pellet (p<0.05). Los parámetros en sangre fueron similares para acilglicéridos (0.4 a 0.7), colesterol (0.2), proteína soluble (131 a 152), glucosa (0.2 mg g⁻¹) para machos y hembras. Los machos presentaron una masa promedio de 33 g y 91-99% de tasa de sobrevivencia, un IHS ~2.5-3.2, IGS ~1.2-1.4; células normales (5-7 x10³/mL) y una diferencia en células anormales fue detectada con 3.4 células/mL*10⁶ (p<0.05). El perfil de ácidos grasos (FA) entre Pellet y Fresco fue bastante diferente; Pellet reflejando fuentes vegetales con 18:2 (n-6) presente en el alimento en nivel más alto que en Fresco; la combinación de calamar, poliqueto, mejillón y *Artemia* provee suficiente cantidad de EPA y DHA para sostener la maduración. Por el contrario, Pellet fue deficiente en PUFA y esto explicaría en parte los pobres resultados en el desempeño aún con la presencia de aminoácidos. El tratamiento Fresco conteniendo mejillón desplegó el mejor perfil y suministro de aminoácidos a las hembras en combinación con calamar *Loligo sp*, poliqueto *Glycera dibranchiata* y biomasa de *Artemia*, mientras que calamar, rico en EPA puede sostener el desarrollo de la espermatogenesis pero ciertamente mejor en combinación con otros alimentos frescos. Para los reproductores provenientes de la condición “biofloc” el rendimiento fue mejorado y esta es una sustitución potencial sobre alrededor de la mitad del alimento fresco.

Palabras clave: Alimento fresco, alimento balanceado, aminoácidos libres, *Litopenaeus vannamei*, desempeño reproductivo

Abstract

Based on the history of breeders that can influence gonad maturation, a practical feed was formulated containing quality ingredients plus free amino acids. Such extruded feed was used alone (Pellets) or in combination with fresh food (Mix) to monitor reproductive performance. Equivalence or lower response than a mixture of fresh food: squid *Loligo sp*, mussel *Mytilus edulis*, polychaetes *Glycera dibranchiata* and *Artemia* biomass would be expected. Metabolites were determined by reagent kits. ANOVAS were applied to determine statistical. Weight of females (36g), survival (87%), GSI (2 to 3), spawning (77%), number of eggs (90 to 110x10³), hatching (26-36%) did not differ between F and M (p>0.05) but were superior to C (p<0.05). Blood parameters were similar for acylglycerids(0.4 to 0.7), cholesterol (0.2), soluble protein (131 to 152), glucose (0.2 mg g⁻¹) for males and females. Males had an average weigh of 33g and 91-99% survival rate, an HIS~2.5-3.2, GSI~1.2-1.4; normal cells (5-7x10³/ml) and a difference in abnormal cells was detected with 0 up to 3.4 cells/mL*10⁶(p<0.05). Fatty acids (FA) profile between Collets and Fresh were quite different; Collet reflected plant sources with 18:2 (n-6) present in feed at higher level than in Fresh; a combination of squid, worms, mussel and *Artemia* provided sufficient amount of EPA and DHA to sustain maturation. On the contrary, Collets alone was deficient in lc-PUFA that partly explained the poor results in performances in spite of a presence of free amino acids. Treatment Fresh possessed mussel that displayed the best profile and fitted to supply FA for females, while squid, rich in EPA could sustain the development of spermatogenesis but certainly better in combination with other fresh foods. For breeders coming from “floc” conditions performances were improved and there is a potential substitution of about half part of fresh food.

Key Words: Fresh feedlots, balanced feedlots, free aminoacids, *Litopenaeus vannamei*, reproductive performance

CAPÍTULO I

PROBLEMÁTICA

1.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los cuellos de botella en la tecnología de cultivo del camarón está relacionado con los altos costos de los alimentos frescos empleados para la maduración de los reproductores de camarón. Como parte de estos alimentos se emplean calamar, poliquetos, mejillón, biomasa de *Artemia*, ostiones, etc., y durante el transcurso de las últimas décadas han habido progresos pequeños en cuanto a la formulación de alimentos artificiales para camarones reproductores (Cuzon *et al.*, 2008a).

Una de las explicaciones es que los organismos reproductores son altamente costosos y las granjas camaroneras están renuentes a proporcionar organismos para experimentación; la duración de las pruebas de reproducción también se considera un factor limitante y, por último, la demanda de alimentos funcionales se mantuvo baja por varios años debido a la relativa facilidad con que se obtiene el alimento vivo o fresco. Hoy en día los horarios de alimentación varían, pero la cantidad y la calidad del alimento es un requisito primordial para obtener una buena maduración gonádica (Cuzon *et al.*, 2008a).

La importancia de la calidad del alimento está bien identificada. Algunos autores han observado que la maduración en cautiverio de varias especies de peneidos que fueron alimentados *ad libitum* con alimentos de origen marino como el mejillón, ostras, almejas, calamar, camarón, cangrejos, lombrices, gasterópodos y complementados con alimento seco presentan una buena maduración gonádica (Lawrence *et al.*, 1980; Chamberlain y Lawrence, 1981; Naessens *et al.*, 1997; Cavalli *et al.*, 1997; Cuzon *et al.*, 2008a). En algunos centros de investigación (COP/Tahití) estos productos marinos locales son usados para elaborar alimentos secos con hasta 40 % de proteína cruda, obteniéndose resultados variados en cuanto a la maduración gonádica, los cuales dependen incluso de la tecnología usada para la elaboración del alimento (Cuzon *et al.*, 2008a).

Otros autores utilizan dietas con una variación en los niveles de proteína y lípidos mezclados con otros elementos; los alimentos ricos en lípidos presentan claramente una mejor maduración, sin embargo, éstos -junto con las vitaminas (o proteínas nativas)- pueden ser alterados por la tecnología de elaboración como es la extrusión con tornillo gemelo o doble (Aquacop, 1989).

En la presente investigación se plantea la búsqueda de un alimento balanceado de alta calidad proteica y lipídica que tenga buenos resultados en la sustitución de alimento vivo o fresco para lograr una reducción de los costos de esta etapa de maduración en la camaronicultura.

Para ello se cuenta con un lote de camarones de *L. vannamei* mantenidos desde postlarvas 15 en un sistema de cultivo heterotrófico denominado “floc” (Bio Floc Technology) de cero recambio de agua de mar (el cuál proporciona al organismo cierta cantidad de nutrientes extra y flora bacteriana benéfica a la vez que reduce costos de producción y desperdicio de agua).

1.2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.- ¿Es posible formular un alimento balanceado adicionado con aminoácidos libres que presente las condiciones de calidad lipídica y proteica similares al alimento fresco que se ofrece a los reproductores de camarón *L. vannamei*?

2.- La sustitución del cóctel de alimento fresco que se ofrece a *L. vannamei* (mejillón, calamar, poliqueto y biomasa de *Artemia*; ¿Afectará la maduración, calidad de las células reproductivas (huevos y espermatozoides) en hembras y machos, la eficiencia del desove, eficiencia de eclosión y la calidad de los nauplios?

3.- El sistema de cultivo basado en la denominada *Bio Floc Technology*, *BFT*, el cual consiste en realizar recambios de agua solamente bajo condiciones de salinidad superiores a 40 ppm y altas concentraciones de sólidos suspendidos (40 mL/L) (Biofloc BFT) ¿Influye en el desempeño reproductivo de hembras y machos? ¿Afectará en la sustitución de fuentes de alimento?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

Evaluar el efecto de la sustitución total del alimento fresco por un alimento balanceado de alta calidad proteica y lipídica y adicionado con aminoácidos libres en el desempeño reproductivo, en metabolitos (triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas) de

reproductores, huevos y nauplios y ácidos grasos de las dietas evaluadas de *L. vannamei* provenientes de un sistema de cultivo tipo floc (BFT).

1.3.2. Particulares

- Evaluar la maduración, calidad de las células reproductivas (huevos y espermatozoides), la eficiencia del desove y la eficiencia de eclosión en reproductores de *L. vannamei* mantenidos en un sistema de cultivo tipo floc.
- Evaluar los cambios en los indicadores bioquímicos (triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas solubles) de los reproductores, huevos y nauplios de *L. vannamei* sujetos a sustitución total del alimento fresco.

1.4. HIPÓTESIS

Si la historia nutricional de los reproductores provenientes de la engorda de biofloc (Emerenciano *et al.*, 2012) influye en la maduración gonádica, una dieta balanceada a partir de la mezcla de ingredientes secos convencionales de alta calidad suplementada con aminoácidos libres (*FAA*, por sus siglas en inglés) podrá reemplazar al alimento fresco en los reproductores del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* (Boone, 1931).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ESTUDIOS ANTECEDENTES

Los requerimientos nutricionales de camarones juveniles han sido ampliamente estudiados; sin embargo, el conocimiento de los requerimientos nutricionales específicos de los reproductores es pobre (Cahu, 2000; Cuzón *et al.*, 2008a). Actualmente, no se cuenta con una dieta comercial para reproductores de camarón que sean 100 % eficientes para la maduración y producción de huevos, aunque algunas grandes compañías han lanzado al mercado alimentos para maduración de camarones. A pesar de lo anterior, algunos dejaron de ser producidos (Rendón, 1997), aunque otros -como el Nippai[®]- son usados aún en la actualidad como un sustituto parcial de alimento fresco o como referencia de formulaciones balanceadas (Patrois *et al.*, 1990; Cuzon *et al.*, 2008a).

Uno de los motivos por los cuales los alimentos balanceado comerciales usados para maduración de camarones dejan de producirse es que son insuficientes para sostener la maduración de los progenitores (Cuzon, *com. pers.*, 2010). Por ello, los laboratorios se han enfocado en crear su propia formulación para diferentes tipos de dietas (secas, semi húmedas, semi-purificadas, etc.). Los ingredientes utilizados por los diferentes autores para los alimentos compuestos son similares, y generalmente incluyen harina de pescado, harina de calamar, proteína de soya, aceite de pescado, lecitina de soya, mezcla de minerales y de vitaminas (Cahu, 1998), para ser usadas mediante sustituciones parciales de los alimentos frescos usados en maduración (Pérez-Velázquez *et al.*, 2003), pues se ha demostrado que presentan mejores resultados en la maduración gonádica y en la calidad de la semilla.

Las dietas frescas usadas actualmente para la maduración de camarones (y a las cuales se les hace sustituciones parciales) consisten principalmente de organismos frescos o congelados como el calamar, poliquetos, almejas, peces, etc. El uso de estos organismos es laborioso y presenta algunas desventajas como su alto costo y el deterioro de la calidad del agua, además de que el valor nutricional puede variar con la especie y/o la estación del año en que se colectan (Pérez-Velazquez *et al.*, 2003).

Al respecto, Álvarez *et al.* (1989) mostraron que el valor nutricional del mejillón congelado repercute significativamente en la producción de huevos, pues la lixiviación en los tanques es mayor después de que los alimentos son descongelados (Cahu, 1998).

Otro aspecto que ha sido ampliamente estudiado, sobre todo en la última década, es la determinación de niveles óptimos de los nutrientes presentes en la dieta tales como las proteínas (Cahu, 1998; Cuzon *et al.*, 2008a), y, sobre todo, los lípidos. Éstos son los principales nutrientes involucrados en el proceso bioquímico durante la maduración gonádica de los camarones peneidos y la inclusión en la dieta es hasta de un 11% en *L. stylirostris* (Bray *et al.*, 1990), pues son esenciales durante la vitelogénesis, así como en el desarrollo de la larva y el crecimiento de los juveniles (Cahu, 2000). Estos experimentos determinaron que el requerimiento de lípidos en reproductores es mayor que en aquellos que no lo son. Cahu (2000) también menciona que los lípidos representan de 22 al 26 % de la materia seca de los huevos al momento de la eclosión y que la transferencia de lípidos entre la glándula digestiva a los ovarios durante la vitelogénesis es rápida y por ello depende en gran medida de los lípidos recién ingeridos. De acuerdo con Villette (1990) el hepatopáncreas es el crucero metabólico donde los lípidos varían en calidad y cantidad en relación con la absorción, síntesis, catabolismo y transferencia a otros tejidos.

En cuanto a los fosfolípidos, estos representan del 45 al 52% del total de lípidos en huevos fertilizados, para ello, la dieta debe contener al menos un 2% de fosfolípidos (Cahu *et al.* 1994). El efecto benéfico global de los fosfolípidos en camarón se ha atribuido a que permiten el aumento del transporte de lípidos para la formación de lipoproteínas y que inducen a una mejor utilización de los ácidos grasos esenciales (Teshima *et al.*, 1986). Villette (1990) experimentó con 3 dietas usando fosfolípidos solos, fosfolípidos + vitamina E y lípidos neutrales + fosfolípidos; los lípidos contenidos en huevos no varió entre tratamientos (45%) a pesar de que la cantidad de fosfolípidos no era la misma en las dietas (32% en la de lípidos neutrales + vitamina E en comparación con la de fosfolípidos + vitamina E con 40%), al ser un componente esencial de las reservas vitelinas, en caso de que se presente una deficiencia en fosfolípidos, la síntesis por las células del hepatopáncreas se incrementa a partir de los lípidos neutros (los cuales son hidrolizados mono y diglicéridos) y se envían vía hemolinfa a la gónada.

Cuzon *et al.* (2008a) presentaron una tabla comparativa de los ácidos grasos presentes en algunos alimentos comerciales usados en la maduración de camarones; éstos son más variados en las dietas formuladas que los presentes en las dietas frescas debido a la mezcla de ingredientes de diversos orígenes; los alimentos formulados contienen usualmente más ácidos grasos n-6 que el alimento natural y diferentes proporciones de n-3/n-6 –sobre todo en el Nippai[®]-, dicha tabla compara el contenido de ácidos grasos en la gusana americana, el Ziegler[®] (alimento usado en alimentación de camarón) y el Nippai[®], las proporciones de PUFA, ácidos insaturados/saturados, n-3, n-6, n-3/n-6 y EPA/DHA son mucho más elevadas en los alimentos formulados que en el alimento natural proporcionado; los PUFA juegan un importante rol metabólico en la estructuración de la membrana (Villette, 1990).

En cuanto al nivel de proteínas en la dieta, la mayoría de los estudios realizados están enfocados en camarones juveniles bajo diferentes condiciones experimentales (Fox *et al.*, 1995; Huai *et al.*, 2010). Dichos estudios establecieron que no hay niveles mínimos requeridos de proteínas; sin embargo, sí se requieren niveles mínimos de inclusión para algunos de los diez aminoácidos esenciales (Van Wyk, 1999).

Se ha estudiado el papel de los aminoácidos libres (FAA) en el metabolismo de *Palaemon serratus* (Otazu-Abrill *et al.*, 1982), en el músculo y el hepatopáncreas durante el decremento de la salinidad (Richard y Cecaldi, 1975), así como en el músculo y el ciclo de muda (Richard, 1980). McNamara *et al.* (2004) reportaron el papel de los FAA en la regulación osmótica (taurina, prolina y glicina).

En cuanto a la nutrición de camarones, Fox *et al.* (1995) utilizaron fuentes de aminoácidos libres para determinar los requerimientos de lisina en juveniles de *Penaeus vannamei*. Foster *et al.* (2002) sustituyeron algunos ingredientes (específicamente la harina de pescado) hasta en un 50 % utilizando concentrados proteicos de soya, suplementado con lisina y hasta un 75 % suplementando con arginina, metionina y fenilalanina.

Huai *et al.* (2010) realizaron reducciones de niveles de proteína con suplementos de lisina, metionina, cisteína y treonina y reportan que se puede reducir la proteína cruda hasta en un 35.5%.

Aminoácidos como la hidroxiprolina (OH-Pro) y la glutamina participan en la elaboración del tejido muscular (OH-Pro) y la síntesis de proteína es muy activa en este periodo del desarrollo (Smith y Dall, 1991).

No obstante estos estudios, poco se sabe del rol de los aminoácidos libres (FAA) respecto a la alimentación y a la nutrición de los camarones (Gaxiola *et al.*, 2013). Sin embargo, son una buena opción para realizar suplementos en las dietas de juveniles, sobre todo cuando se utilizan fuentes de proteína vegetal que pueden ser deficientes en aminoácidos esenciales (Cuzon y Gehin, 1998; Ortiz, 2009).

En dietas para maduración de camarones, no se conocen estudios en los cuales se hayan usado aminoácidos libres (FAA) como suplemento para realizar la sustitución de proteínas.

Todos los estudios concernientes fueron realizados en agua clara, ya sea en condiciones experimentales o de cultivo.

2.2. SISTEMAS ALTERNATIVOS DE CULTIVO AMIGABLES CON EL AMBIENTE

La intensificación de los cultivos acuícolas va acompañada en algunos casos de contaminación ambiental debido al exceso de nitrógeno y fósforo causando eutrofización de los sistemas acuáticos, ya que -al intensificarse los cultivos- se incrementa también la ración de proteína, siendo ésta la que mayormente contribuye a la contaminación por nitrógeno en los sistemas de cultivo (Valenzuela, 2009).

El nitrógeno presente en el agua en forma de nitrito y amonio son tóxicos para los organismos si se presentan en concentraciones elevadas, afectan el crecimiento, la muda, el intercambio de oxígeno y pueden llegar a causar la muerte (Mallasen y Valenti, 2006 en Valenzuela, 2009).

Debido a esto y a la reciente problemática política y social, se han buscado alternativas de cultivo que causen menos impacto ambiental y que incrementen la bioseguridad en los cultivos (Gaxiola *com. pers.*, 2009).

Una forma de cultivo “amigable con el ambiente” es el denominado “floc” (Bio FlocTechnology) (Avnimelech, 2007; Emerenciano, 2007) con cero recambio de agua en el cual se propicia una flora bacteriana heterotrófica benéfica para los organismos cultivados, principalmente bacterias requeridas para la nitrificación (Cuzon *et al.*, 2008b) y un balance de C:N de 20:1. Estas comunidades bacterianas tienen la habilidad de sintetizar proteínas que son aprovechadas por los camarones a partir del carbono orgánico de los desechos

nitrogenados (Wasielisky *et al.*, 2006; Valenzuela, 2009).

Este tipo de cultivos tienen la ventaja de permitir altas densidades de siembra cuyos desechos a su vez mantienen la flora bacteriana y también permiten la reducción de los efluentes desechados al ambiente (Valenzuela, 2009).

Para ello se requiere una buena aireación pues se necesita mantener los sólidos suspendidos y permitir la formación de agregados que posteriormente serán colonizados por la flora bacteriana y otros organismos (Valenzuela, 2009). Estos agregados le sirven al camarón como un suplemento alimenticio (Emerenciano, 2007), también se ha demostrado que fortalece la inmunología de los camarones (Valenzuela, 2009) y permite reducir el aporte de proteína que se les da a los organismos (Emerenciano, 2009a).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE LOS PROGENITORES

Los organismos usados proceden de la granja camaronera La Marca y fueron donadas a la UMDI-Sisal en febrero de 2010 como postlarva 15 provenientes de Maricultura del Pacífico.

En las instalaciones de la UMDI se mantuvieron en estanques con capacidad de 20000 L en dispositivo de biofloc (BFT) con cero recambio de agua y con adición de fuentes de carbono para nivelar valores de amonio, nitritos y nitratos; se les proporcionó alimento comercial con 35 % de proteína con una ración diaria de 10 % de biomasa corporal dividida en 5 tomas (a las 4 y 8 PM y a las 12, 4 y 8 AM) hasta llegar a la talla de reproductores.

Los organismos reproductores provenientes de estanques exteriores fueron trasladados al área de Maduración de crustáceos para su aclimatación al área y cuarentena. Posteriormente se procedió al marcado de las hembras con elastómeros de silicón, a su ablación y a la distribución por tina, el experimento dio inicio una vez que se realizó la ablación del pedúnculo ocular en las hembras y a partir del día en que se presentó el primer desove.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y DIETA

La formulación de la dieta sometida a experimentación (Tabla 1), se tomó de la referencia de Gaxiola y Cuzon, *com. pers.*, (2010).

Para el presente bioensayo se empleó el diseño completamente aleatorizado con 2 réplicas por tratamiento en tinas con organismos que han sido mantenidos desde pl 15 en el sistema de cultivo floc (BFT) con una duración de 30 días a partir del primer desove (Tabla 2).

Se realizó una sustitución de los alimentos frescos-congelados poliqueto y *Artemia* por pellet conservando calamar y mejillón. Con los esquemas de alimentación A: alimento fresco 100% (calamar, poliqueto, mejillón y *Artemia*), B: alimento fresco 50% (calamar y

mejillón) + 50 % de alimento formulado denominado pellet¹ (el esquema de alimentación se toma como referencia a Nascimento *et al.* (1991) y C: 100% pellet.

Tabla 1. Formulación de la dieta a probar (g/100 g de alimento seco)

Ingredientes	Dieta maduración	% PC	% lípidos
Calamar fresco	5	3.8	0.4
Suero de leche	12	9.6	0.8
Harina de pescado	30	19.3	2.1
Concentrado proteico de soya	10	6	
Levadura de cerveza	5	2.3	0.3
Ensilado de cabeza <i>E. morio</i>	10	6	3.3
Aceite de hígado de bacalao	4		4
Colesterol	0.5		0.5
Lecitina	2		2
¹ Mix aa + grenetina	2.4	2.4	
Premezcla Rovimix DMS	2.5		
Carófila	0.01		
Harina de trigo	15.6	1.9	
CMC	1		
<i>Total</i>	<i>100</i>	<i>51.1</i>	<i>14.4</i>

¹Mezcla de aminoácidos /100g de dieta: LIS 0.4%, LEU 0.3 %, ARG 0.4%, OH-Pro 0.2 %, GLUT 0.5 % y MET 0.2%

Tabla 2. Diseño experimental

Exp1	Variables	Respuestas a trabajar	Diseño	Estado
	Formulación sustituyendo el 100 % de alimento fresco en sistema de cultivo Floc	Número de huevos/desove, No. de huevos fertilizados, tasa de fertilización, número de nauplios, tasa de eclosión, glucosa, acilglicéridos, colesterol, proteína total soluble, ácidos grasos	Completamente aleatorizado con 2 réplicas por tratamiento	Adultos reproductores (30gr).

A continuación, en la Figura 1 se presenta un esquema con la distribución de los tratamientos.

¹ Pellet. Alimento formulado detallado en la Tabla 1

Organismos provenientes del sistema de floc		
A  100 % fresco	B  50 % calamar y mejillón 50% pellet	C  100 % pellet
A  Réplica	B  Réplica	C  Réplica

Figura 1. Tratamientos sometidos a experimentación

Se sembraron 20 hembras y 30 machos por tina, dejando una proporción 1:1.2, respectivamente. La distribución de las raciones (se tomó como referencia a Nascimento *et al.*, 1991, con base en el 20 % de biomasa total para alimento fresco y 5% de biomasa total para alimento formulado) se realizó de acuerdo con el esquema del Área de Maduración y Reproducción de Camarón.

Esto consistió en 4 tomas diarias: A las 8 AM se alimentaban con calamar las tinas con un esquema de alimentación fresca y combinada y alimento formulado a las tinas con un esquema basado en *pellet*. A las 2 PM se alimentaban con poliqueto las tinas con un esquema de alimento que se denominó Fresco y con alimento formulado a los que se les denominó Combinado y Pellet. A las 8 PM correspondió mejillón a las tinas con esquema de Fresco y Combinado y alimento formulado a las correspondientes a Pellet. A la 1 AM se alimentaron con *Artemia* a las tinas de esquema Fresco y con alimentos formulado a las de Combinado y Pellet.

3.3. ELABORACIÓN DE LA DIETA

Los ingredientes secos se tamizaron a menos de 250 mm, se mezclaron por 20 minutos, se agregó la gelatina con la mezcla de aminoácidos libres usados. El encapsulado de los aminoácidos se realizó de acuerdo con Cuzon, *com. pers.* 2010 y Cho *et al.* (1992) con

grenetina comercial disuelta en agua a 45 °C y posterior refrigeración a 4 °C). A continuación se adicionaron los aceites y el carboximetilcelulosa (CMC) y se continuó el mezclado durante 15 minutos más hasta formar la pasta, la cual fue pasada por un molino de rodillo sinfin para extruirla y formar los pellets de consistencia semihúmeda. Por último, se almacenaron a 0°C hasta ser empleados (Maldonado, 2007).

3.4. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

3.4.1. Sala de maduración de reproductores

Se tuvieron 6 estanques de fibra de vidrio con capacidad de 10 mil litros y un área seccional de 4.62 m², con una columna de agua de mar de 40 cm, con sistema de circulación cerrado mediante diferentes filtros (mecánicos, biológicos y físicos) y recambio de agua del 100 % semanal.

La densidad de siembra fue de 20 hembras y 30 machos por tanque (cuidando una proporción hembra/macho de 1:1.2).

El agua de mar se mantuvo con aireación constante, una salinidad de 35‰ y a una temperatura de 28°C. Los reproductores se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas luz- 12 horas oscuridad. Los parámetros físico-químicos se tomaron dos veces al día, a las 8 AM y a las 4 PM. Los reproductores se alimentaron 4 veces al día con el esquema a evaluar.

3.4.2. Sala de desove y eclosión

Cuenta con tinas de desove con capacidad para 100 litros, el agua es clorada con aireación muy abundante, pasada por un filtro UV y tratada con *EDTA*, ácido 2-([2-[bis(carboximetil)amino]etil](carboximetil)amino)acético o ácido edético o ácido diaminoetanotetraacético, que una vez combinado con hidróxido de sodio forma la sal de sodio²) para quelar los metales pesados. La temperatura se mantiene estable en 30 °C con ayuda de un calentador de titanio marca TRAME.

² Aunque la etiqueta del reactivo químico dice en su traducción disódico, el sodio no puede ser sodoso ni sódico, por lo que se debe escribir de sodio (el diccionario de la lengua española requiere una adecuación química para quitar los términos sódico, cálcico, potásico, etc.). Nota de uno de los revisores

3.5. ACELERACIÓN DE LA MADURACIÓN DE LAS HEMBRAS

A los organismos, una vez adaptados al tipo de alimento y a las condiciones de las tinas de maduración, se les aceleró la maduración gonádica de las hembras mediante la ablación unilateral del pedúnculo ocular (Sainz-Hernández *et al.*, 2008), ya que en su base se encuentra el complejo neurosecretor órgano X–glándula del seno, el cual secreta las hormonas que inhiben el desarrollo del ovario. De acuerdo con Maldonado (2007), este proceso acelera la maduración de las hembras de 3- 4 meses a 7-8 días.

Al realizar la ablación de las hembras se marcaron con elastómeros de silicón para conocer el historial de desoves de cada una. A partir de ese momento, se observó diariamente la evolución del desarrollo del ovario y la conducta reproductiva de hembras y machos.

Para la identificación de los estadios de maduración gonádica se emplearon los criterios propuestos por Guitart y Quintana (1978) mencionados por Rendón (1997) y Maldonado (2007).

3.6. MADURACIÓN Y COSECHA DE LOS HUEVOS

Para la selección de las hembras maduras, se llevó a cabo la revisión de las gónadas a las 19:00 horas mediante la observación directa con una lámpara sumergible (Rendón, 1997; Emerenciano, 2009a).

Las hembras en estadio IV fecundadas fueron colocadas en tanques de cosecha de 100 L con agua de mar, filtrada y tratada con UV y EDTA y con aireación muy leve. Los tanques y el área se mantuvieron en oscuridad. Al término del desove las hembras fueron regresadas a los tanques de maduración.

Los huevos se cosecharon con una malla de 100 micras en un volumen de 10 litros de agua de mar filtrada y esterilizada con UV y tratada con EDTA (en una concentración de 10 mg/L), una vez cosechado se procedió a contar los huevos totales y los fertilizados.

Antes de realizar una cosecha total e inmediatamente después de regresar a las hembras a las tinas correspondientes (este procedimiento se realizó a la 1:00 AM) se procedió a tomar una muestra de huevos para ser congelados en nitrógeno líquido, se tomaron los huevos y se dividieron en 2 alícuotas iguales.

3.7. RESPUESTAS A EVALUAR EN EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE LOS CAMARONES

A continuación se mencionan los parámetros evaluados en cuanto al desempeño reproductivo de los reproductores de *L. vannamei*.

a. Número de desoves por hembra (remaduraciones): Para calcular la eficiencia de la remaduración. Eficiencia de remaduración: Hd^+ / Hd_t . Donde: Hd^+ = número de desoves; Hd_t = número de hembras totales que desovaron durante el transcurso del tratamiento.

b. Eficiencia del desove: Número de desoves en relación con el total de hembras ablacionadas:

$ED = Dt/Ha$. Donde: Dt = Desoves totales, Ha = Total de hembras ablacionadas.

c. Número total de huevos: En relación con el número de huevos desovados por la hembra.

d. Tasa de fertilización: Número de huevos fertilizados en relación con el número total de huevos desovados: $Tf = (Hf/Ht)*100$

e. Producción total de nauplios: Nauplios totales eclosionados del total de huevos fértiles desovados.

f. Tasa de eclosión: Número de huevos eclosionados en relación con el total de huevos desovados: $Te = (Tn/Ht \text{ desovados})*100$

g. Índice gonadosomático (IGS): Masa de la gónada en relación con la masa total del organismo: $IGS = (Pg/Pt)*100$

h. Índice hepatosomático (IHS): Masa de la glándula digestiva en relación con la masa total del organismo: $IHS = (Pg/Pt)*100$

i. Calidad espermática: La calidad espermática se evaluó a partir del conteo de espermatozoides y de su viabilidad. Para ello, un medio espermatóforo fue homogeneizado a 1000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente en solución libre de calcio: 370 mM NaCl, 15 mM KCl, 8.7 mM H_2BO_3 , 4.7 mM NaOH, 40.9 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987). Posteriormente se le agregó 0.1 mL de azul de tripán (Tripán blue 0.1% en solución salina al 0.9 %) (Arévalo, *com. pers.*, 2010). Después de 10 minutos se decantó el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf® y se procedió al conteo y la clasificación de las células en una cámara de Neubauer y un microscopio óptico (Micromaster). Se reconocieron las células anormales por la presencia de malformaciones

en la cabeza o la ausencia de la cola en base a su refringencia; células muertas se identificaron por la coloración azul. Posteriormente se le aplicó la siguiente fórmula para el conteo:

$$\text{Cel/mL} = (\text{P} \cdot 16) \cdot \text{FD} \cdot 10000$$

en donde: P = Promedio; 16 = Número de celdas; FD: Factor de conversión.

j. Índice nutricional Ac:Col: Es la relación existente entre los acilglicéridos totales y el colesterol total.

k. Índice nutricional Ac:Pts: Es la relación existente entre los acilglicéridos totales y las proteínas totales.

3.8. ANÁLISIS DE LABORATORIO

A continuación se describen los análisis bioquímicos realizados para evaluar el desempeño reproductivo de los reproductores de *L. vannamei* alimentados con alimento fresco y la dieta a evaluar. Los organismos fueron trasladados al Laboratorio Central del la UMDI en taras y con una disminución previa de 5°C a la temperatura de la tina correspondiente (Arévalo, *com. pers.*, 2010). Se procedió a tomar la muestra de hemolinfa con una jeringa preparada con una solución anticoagulante consistente en solución isotónica para camarón (SIC): NaCl 450 mM, 10 CaCl mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM, 10 mM EDTA-Na₂, 1033 mOsm kg⁻¹, pH 7.3; (Vargas *et al.*, 1993). La solución isotónica para camarón (SIC) es desechada antes de realizar la punción en el seno ventrolateral del 5° par de pereiópodos, después la hemolinfa fue diluida en 50 mL de solución isotónica para camarón (SIC en proporción 1:2). La solución con la hemolinfa fue centrifugada a 800 g por 5 minutos a 4 °C para con ello obtener el plasma (sobrenadante). Las muestras de diferentes tejidos (gónada, glándula digestiva, huevos y nauplios) se congelaron en nitrógeno líquido (-195 °C) y almacenados en un congelador marca Revco a -80°C hasta su posterior utilización.

Proteínas totales, triglicéridos, colesterol y glucosa se midieron en hemolinfa, glándula digestiva (hepatopáncreas), gónadas, huevos y nauplios (Emerenciano, 2009b), los tejidos fueron pesados y homogeneizados en 500 µL de agua libre de pirógenos a 4°C, se realizaron diluciones para medir colesterol y triglicéridos y posteriormente el homogeneizado fue centrifugado a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, con el sobrenadante se realizaron las diluciones respectivas para determinar proteínas y glucosa.

Las proteínas solubles se determinaron utilizando el kit Micro Protein Determination (Procedure No. 610) de Sigma, basados en el método de Bradford (1976). Las muestras se leen en un lector de micro placa BIORAD® modelo 550 con un filtro de 595 nm. De cada muestra se realizó una determinación por triplicado.

La glucosa fue determinada mediante la utilización del “kit” *Elitech Glucose PAPSL* y leída a 500 nm de absorbancia. Triglicéridos se determinó con el “kit” reactivo *Elitech Triglicerid Mono SL* y leído a una absorbancia de 500 nm. Para determinar colesterol se usó el “kit” *Elitech Cholesterol SL* y leído a 500 nm de absorbancia.

3.9. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA DE MADURACIÓN Y ALIMENTOS FRESCOS PROPORCIONADOS A REPRODUCTORES DE *L. vannamei*

Los análisis fueron realizados en el módulo de la Facultad de Química, UNAM de Sisal. Para evaluar los perfiles de ácidos grasos en alimento fresco y en el alimento formulado, las muestras fueron almacenadas y congeladas en el congelador marca REVCO a -80°C. Después de descongelar, los lípidos totales fueron extraídos de acuerdo a la metodología descrita por Emerenciano (2009b) siguiendo el protocolo de Folch *et al.* (1957). Las muestras fueron saponificadas en KOH (50%), la identificación de los ácidos grasos metil ésteres se realizó mediante cromatografía de gases según lo descrito por Peixoto *et al.* (2008).

En la Tabla 3 se enlistan los valores obtenidos de ácidos grasos insaturados (n-3) y (n-6) en los alimentos proporcionados a reproductores de *L. vannamei*.

3.10. COLESTEROL Y CAROTENOIDES

La Tabla 4 muestra la aportación de colesterol de cada una de las dietas al proceso de maduración, dicha determinación fue hecha mediante el cálculo por referencia (Cuzon, *com. pers.*, 2014). El total de la Tabla 4 es de 0.1 mg de colesterol libre del pellet más 23 mg del alimento fresco.

En cuanto a la cantidad de carotenoides (Tabla 5) aportados a los diferentes tratamientos, el cálculo fue hecho mediante un par de referencias bibliográficas (Fisher *et*

al., 1956; Partali *et al.*, 1989), en relación con reproductores de 35 g alimentados al 20% de biomasa en masa fresca al día y 1 mejillón por camarón.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de las dietas

	<i>Prom.</i>	<i>DE</i>	<i>Prom.</i>	<i>DE</i>	<i>Prom.</i>	<i>DE</i>	<i>Prom.</i>	<i>DE</i>	<i>Prom.</i>	<i>DE</i>
	Pellet		Calamar		Mejillón		Poliqueto		Artemia	
C16:1	6.5	0.6	0.9	0.1	7.3	0.3	7.4	0.5	11.3	0.1
C18:0	6.1	0.6	8.3	1.2	7.5	0.1	8.0	0.1	7.9	0.1
C18:1 n-9c/t	18.1	1.7	3.5	0.3	23.1	0.1	3.0	0.6	21.1	0.0
C18:2 n-6 (LA)	12.0	0.9	1.2	0.2	6.9	0.1	1.7	0.2	8.0	0.2
C18:3 n-3 (ALA)	2.2	0.2	0.2	0.0	0.7	0.0	1.1	0.1	13.1	0.4
C20:1 n-9	6.7	1.4	11.9	0.4	6.2	0.2	5.1	0.3	0.3	0.1
C20:3 n-6	0.2	0.0			0.1	0.0	0.3	0.1	0.2	0.0
C20:3 n-3	1.6	0.1	1.8	0.1	0.2	0.0	2.1	0.1	2.1	0.0
C20:4 n-6 (ARA)	0.2	0.0	0.9	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.5	0.0
C20:5 n-3 (EPA)	8.4	0.8	14.5	0.0	1.9	0.0	7.6	0.2	0.3	0.0
C22:1n-9	0.6	0.1	0.7	0.1	1.2	0.1	0.3	0.0	0.2	0.0
C22:6 n-3 (DHA)	12.8	1.0	35.6	0.4	1.3	0.2	11	0.1	0.1	0.0
(n-3)/(n-6)	1.1		7.9		0.6		9.9		1.8	
DHA/EPA	1.5		2.4		0.7		1.4		0.3	

Tabla 4. Aportación de colesterol de las dietas por día (% de lípidos totales)

Compuesto	Pellet	Calamar	Poliqueto	Mejillón	Artemia
Colesterol libre	0.1	12	6	5	
Colesterol esterificado	-	0.01	0.2	0.2	
Aportó	0.1	12	6	5	-

Tabla 5. Carotenoides µg/g de masa seca por tratamiento

Dieta	Ración	Concentración	µg	Total µg
Fresco	Calamar	800 mg	2 µg/g	1.6 ¹
	Mejillón	1 mejillón	10 µg/g	255 ²
Seco	Carofila roja	-	10 ppm	40

¹ Fisher *et al.*, 1956; ²Partali *et al.*, 1989

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados presentados en porcentajes o proporciones y fueron transformados a Arcoseno antes de aplicarles las pruebas estadísticas, para los análisis estadísticos se usó el paquete Statistical Analysis Software o SAS versión 2006.

A los resultados de desempeño reproductivo se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) factorial anidado. La ponderación de las diferencias significativas se realizó por medio de una prueba *pos hoc* de rangos múltiples de Tukey o una prueba de Cochran, Hartley y Bartlett (Zar, 1984), con una $\alpha=0.05$ (95 % de confianza).

A los valores observados en calidad espermática se les realizó una transformación logarítmica para ajustar a la normalidad antes de aplicar el ANDEVA factorial.

Para los datos no normales ni homogéneos se les aplicó un análisis no paramétrico de Mann-Whitney.

Los parámetros con 0 o 1 valor no fueron tomados en cuenta al realizar el estadístico por que no permitían realizar la prueba.

Para el análisis de la actividad de metabolitos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía y una prueba *pos hoc* de Tukey.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CALIDAD DEL AGUA Y PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para parámetros físico-químicos evaluados. No se observan diferencias significativas ($p>0.05$) y, en este caso, se realizó un recambio de 100 % del agua en forma semanal.

Tabla 6. Parámetros físico-químicos (promedios \pm desviación estándar)

	Pellet	Fresco	Combinado
Temperatura (°C)	28.4 \pm 1.2 ^a	28.6 \pm 1.2 ^a	28.8 \pm 1.3 ^a
OD (mgL ⁻¹)	6.0 \pm 0.9 ^a	6.3 \pm 0.6 ^a	6.2 \pm 0.8 ^a

Los parámetros se mantuvieron estables durante el período de experimentación

4.2. RESPUESTAS ZOOTÉCNICAS EN HEMBRAS

A continuación se muestran los resultados zootécnicos del experimento.

La Tabla 7 muestra los parámetros zootécnicos evaluados para las hembras de *L. vannamei*. No se observan diferencias significativas ($p>0.05$) en las masas finales. En sobrevivencia, en el ANDEVA de una vía tampoco se observan diferencias significativas ($p>0.05$) en cuanto a este parámetro. Sin embargo, sí se observa una menor sobrevivencia en las tinas alimentadas con alimento fresco con un promedio de 80 %, seguido de las tinas alimentadas con la combinación de alimentos y, por último, presentando las tasas más altas de sobrevivencia las tinas alimentadas con Pellet.

4.3. DESEMPEÑO REPRODUCTIVO

4.3.1. Desempeño reproductivo en hembras

En la misma tabla (Tabla 7) se observan los valores correspondientes al desempeño reproductivo de las hembras sometidas a los diferentes tipos de alimentación.

En cuanto a los índices se observan diferencias ($p>0.05$) en el gonadosomático (IGS) entre hembras maduras e inmaduras pero no en el hepatosomático (IHS).

Se presentaron en total 4 desoves en el tratamiento Pellet, a continuación Fresco con 54 y Combinado con 64, el experimento se dividió en dos periodos de tiempo, el inicial que

abarcó desde el día que las hembras fueron ablacionadas hasta el día 20 de experimentación.

Tabla 7. Desempeño reproductivo de hembras de los distintos regímenes alimenticios

Parámetro	Pellet	Fresco	Combinado	p
N	40	40	40	
Masa (g)	37.4(±3.3) ^a	36.4(±4.6) ^a	39.9(±4.5) ^a	ns
Sobrevivencia (%)	92.5 (±)	80 (±)	87.5 (±)	ns
ÍGS inmaduras	1.32±0.67 ^a	1.5±0.73 ^a	1.03±0.67 ^a	
IGS maduras	2.0±0.79 ^b	2.79±0.79 ^b	2.53±0.71 ^b	0.0000
IHS Inmaduras	3.25±0.75 ^a	2.89±0.64 ^a	2.79±0.68 ^a	
IHS maduras	2.97±0.71 ^a	2.86±0.94 ^a	2.96±0.81 ^a	ns
Desoves totales	4	54	64	na
*Desoves inicial	0 ^a	9 ^a	21 ^a	
*Desoves final	4 ^a	45 ^b	43 ^b	(0.016)
Desoves no fértiles	3	15	16	na
Eficiencia del desove (±ES)	0.1 (±0.3) ^a	1.35 (±0.5) ^b	1.6 (±0.4) ^b	(0.015)
Eficiencia de la remaduración (±ES)	1 (±0.0) ^a	1.7(±0.4) ^b	2.1(±0.1) ^b	(0.005)
Máximo orden desove	1	5	4	na
Latencia (días ±ES)	23(±2.4) ^a	20(±2.3) ^a	19(±2.5) ^a	ns
% Hembras desovadas 1 vez (±ES)	10 (±2.7) ^a	77.5(±1.9) ^b	77.5(±4.2) ^b	0.003
Maduraciones totales	14	64	74	na
Número de huevos por desove (×10 ³ ± ES)	88.7 (±255.5) ^a	103.3 (±31.2) ^a	113.4 (±59.4) ^a	ns
% fertilización inicial ⁺	-	64.9±4.3 ^a	64.1±4.1 ^a	ns
% fertilización final ⁺	3.2	58±5.5 ^a	50.3±5.3 ^a	ns
++% eclosión inicial		43.9±4.7 ^a	35.5±5.1 ^a	ns
++% eclosión final		35.9±4.7 ^a	26±4.0 ^a	ns
++Nauplios x desove inicial (±ES) ⁺	-	30426±102 ^a	34816±164 ^a	
++Nauplios x desove final (±ES) ⁺	-	27157±147 ^a	22006±121 ^a	ns
Total de huevos producidos (x10 ³)	29.4	1956.6	1879.1	na
Total de nauplios producidos (x10 ³)	0	420426	543829	na

na (no aplica), ns (no significativo)

Inicial (entre la ablación y el día 20). Final (del día 21 al día 40)

*ANDEVA factorial (2 para inicial y final y 3 para dieta)

** ANDEVA factorial para inmaduras y maduras

⁺ Se eliminó el valor solitario para poder aplicar el estadístico

⁺⁺ ANDEVA factorial anidada

El periodo final abarcó desde el día 21 hasta el día 40 de experimentación siendo en el período final donde se observan diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos, Pellet es diferente de manera significativa respecto a Fresco y Combinado.

Esto también se encuentra reflejado en el índice eficiencia del desove (con un valor de 0.1 para Pellet, 1.35 para Fresco y 1.6 para Combinado) y en la eficiencia de la

remaduración (con un valor de 1 para Pellet, 1.7 para Fresco y 2.1 para Combinado), en ambos es el tratamiento Pellet el que es diferente de manera significativa ($p < 0.05$); Pellet presentó un 10 % de hembras desovadas ($p < 0.05$) seguido de los tratamientos Fresco y Combinado, ambos con 77.5% de hembras totales desovadas.

Combinado presentó la mayor cantidad de huevos por desove con 113,409 seguido por Fresco con 103,266 y Pellet con 88,700.

No se observan diferencias significativas en los % de fertilización inicial. Fresco presentó el valor más alto con 64.9% seguido de Combinado. En cuanto al % de fertilización final se observó una mayor tendencia hacia Fresco con 58% seguido de Combinado con 50.3%.

Tampoco se observan diferencias en los porcentajes de eclosión inicial y final, en ambos Fresco es más alto que Combinado.

4.3.2. Respuestas bioquímicas en hembras

La Tabla 8 muestra los valores de metabolitos obtenidos en hembras de *L. vannamei*.

4.3.2.1. Acilglicéridos

Se presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) en hemolinfa, hepatopáncreas y gónadas.

En hemolinfa las diferencias se aprecian en Pellet pues los valores fueron significativamente superiores con respecto a los demás tratamientos y estadios de maduración ($p < 0.05$).

En hepatopáncreas, se presenta la misma tendencia en hembras maduras e inmaduras, excepto en hembras maduras del tratamiento Combinado (el tratamiento Pellet en hembras inmaduras con 3.6 mg g^{-1} tejido y Combinado en hembras maduras con 3.5 mg g^{-1} tejido son diferentes del resto de los tratamientos y estadios de maduración ($p < 0.05$).

En gónadas, las hembras maduras, excepto por Pellet, son significativamente superiores ($p < 0.05$) respecto a los demás tratamientos (Fresco con 5.5 mg g^{-1} tejido y Combinado con 5.4 mg g^{-1} tejido).

Huevos y nauplios no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) siendo los valores similares.

Tabla 8. Metabolitos de los diferentes tejidos evaluados en hembras de *L. vannamei* (mg g⁻¹ ± ES)

		HEMBRAS INMADURAS			HEMBRAS MADURAS				
		<i>Pellet</i>	<i>Fresco</i>	<i>Combinado</i>	<i>Pellet</i>	<i>Fresco</i>	<i>Combinado</i>	<i>p</i>	
Acilglicéridos (mg g⁻¹)	<i>Hemolínfa</i>	0.6±0.4(14) ^b	0.4±0.4(12) ^a	0.5±0.4(10) ^a	0.7±0.5(5) ^b	0.4±0.4(8) ^a	0.5±0.4(9) ^a	0.03	
	<i>Hepatopáncreas</i> *	3.6±1.5(10) ^b	2.9±1.4(10) ^{ab}	2.1±0.9(8) ^a	2.2±1(5) ^a	1.9±1.1(6) ^a	3.5±1.1(7) ^b	0.04	
	<i>Gónadas</i>	3.7±1.4(10) ^{ab}	3.2±0.9(10) ^a	2.5±1.1(12) ^a	2.8±1.4(5) ^a	5.5±1.4(8) ^b	5.4±1.3(8) ^b	0.002	
	<i>Huevos</i>				17.8±3.4(10) ^a			13.1±1.9(10) ^a	ns
	<i>Nauplios</i>				7.1±1.6(11) ^a			7.6±1.5(10) ^a	ns
Colesterol (mg g⁻¹)	<i>Hemolínfa</i>	0.2±0.2(15) ^a	0.2±0.2(10) ^a	0.2±0.2(9) ^a	0.2±0.1(5) ^a	0.2±0.3(6)^a	0.2±0.2(8) ^a	ns	
	<i>Hepatopáncreas</i>	2.7±1.2(6) ^a	2.9±1.1(6)^a	2.4±1.1(9) ^a	2.0±0.8(4) ^a	2.7±1(5)^a	2.0±0.8(4) ^a	ns	
	<i>Gónadas</i>	2.3±0.8(9) ^a	2.4±1.3(10)^a	1.9±1.1(12) ^a	2.1±1(5) ^a	4.3±1.4(8)^b	3.1±1.1(8) ^{ab}	0.002	
	<i>Huevos</i>				8.4±1.0(10) ^a			7.2±1.3(10) ^a	ns
	<i>Nauplios</i>				5.2±2.0(10) ^a			5.3±1.7(10) ^a	ns
PTS (mg g⁻¹)	<i>Hemolínfa</i>	131.3±4.9(10) ^a	132.8±7.9(8) ^a	133.5±5.4(10) ^a	152±4.2(5) ^a	149.2±4.4(7) ^a	142.2±4.9(9) ^a	ns	
	<i>Hepatopáncreas</i>	23.2±2.3(13) ^a	23.7±1.9(12) ^a	25.5±2.1(13) ^a	24.5±1.9(5) ^a	24.6±2.2(8) ^a	27.1±2.9(7) ^a	ns	
	<i>Gónadas</i>	44.4±3.4(9) ^b	41.6±3(10) ^b	44.8±2.6(12) ^b	44.2±1.9(5) ^b	24.9±3.3(8) ^a	36.1±3.6(7) ^b	0.004	
	<i>Huevos</i>				15.8±2.1(10) ^a			13.0±2.0(10) ^a	ns
	<i>Nauplios</i>				14.3±2.6(11) ^a			16.4±1.6(10) ^a	ns
Glucosa (mg g⁻¹)	<i>Hemolínfa</i>	0.2±0.3(7) ^a	0.2±0.3(9) ^a	0.2±0.3(8) ^a	0.3±0.3(5) ^b	0.2±0.3(5) ^{ab}	0.2±0.2(7) ^a	0.003	
	<i>Hepatopáncreas</i> *	1.8±0.7(10) ^a	1.8±0.8(11) ^a	1.3±0.7(10) ^a	1.2±0.7(5) ^a	1.1±0.7(8) ^a	1.7±0.7(7) ^a	ns	
	<i>Gónada</i>	0.3±0.4(8) ^a	0.3±0.4(9) ^a	0.4±0.4(11) ^a	0.2±0.1(4) ^a	0.4±0.4(8) ^a	0.3±0.4(8) ^a	ns	
	<i>Huevos</i>				0.3±0.2(10) ^a			0.3±0.3(10) ^a	ns
	<i>Nauplios</i>				0.4±0.4(6) ^a			0.3±0.3(9) ^a	ns
AC:PTS	<i>Hemolínfa</i>	0.004±0.03(12) ^a	0.003±0.03(8) ^a	0.004±0.03(10) ^a	0.004±0.03(5) ^a	0.002±0.02(7) ^a	0.003±0.04(9) ^a	ns	
	<i>Hepatopáncreas</i>	0.2±0.4(9) ^a	0.1±0.3(10) ^a	0.1±0.3(8) ^a	0.1±0.2(4) ^a	0.1±0.3(6) ^a	0.1±0.2(7) ^a	ns	
	<i>Gónada</i>	0.1±0.1(9) ^a	0.1±0.2(10) ^a	0.1±0.2(12) ^a	0.1±0.2(5) ^a	0.2±0.3(8) ^b	0.2±0.3(7) ^b	0.0016	
	<i>Huevos</i>				1.1±0.6(10) ^a			1.0±0.4(10) ^a	ns
	<i>Nauplios</i>				0.6±0.7(10) ^a			0.5±0.3(10) ^a	ns
AC:C	<i>Hemolínfa</i>	2.9±0.6(14) ^a	2.7±0.7(9) ^a	2.9±1(8) ^a	2.9±0.7(5) ^a	2.3±0.5(6) ^a	2.6±0.7(9) ^a	ns	
	<i>Hepatopáncreas</i>	0.5±0.4(4) ^{ab}	0.4±0.4(5) ^{ab}	0.5±0.4(5) ^{ab}	0.6±0.4(4) ^{ab}	0.3±0.3(5)^a	0.9±0.6(5)^b	0.002	
	<i>Gónada</i>	1.5±0.8(9) ^a	1.6±0.7(10) ^a	1.5±1.3(12) ^a	1.4±0.9(5) ^a	1.5±0.8(8) ^a	1.8±0.5(8) ^a	ns	
	<i>Huevos</i>				1.7±0.4(10) ^a			1.8±0.4(10) ^a	ns
	<i>Nauplios</i>				1.5±0.6(10) ^a			1.9±1.3(10) ^a	ns

4.3.2.2. Colesterol

Solamente se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) en gónadas, en el tratamiento Fresco en hembras maduras con 4.3 mg g⁻¹ tejido, respecto a hembras inmaduras y Pellet y Combinado en hembras maduras.

4.3.2.3. Proteínas

Las diferencias se presentan en el tejido gónada, los valores de hembras maduras del tratamiento Fresco (24.9 mg g⁻¹ tejido) son diferentes de manera significativa ($p < 0.05$) de Combinado (36.1 mg g⁻¹ tejido) y Pellet (44.2 mg g⁻¹ tejido) en hembras maduras, y de

Fresco (41.6 mg g⁻¹ tejido), Pellet (44.4 mg g⁻¹ tejido) y Combinado (44.8 mg g⁻¹ tejido) en hembras inmaduras.

4.3.2.4. Glucosa

Las diferencias se observan en hemolinfa en donde Pellet (0.32 mg mL⁻¹) en hembras maduras es significativamente diferente (p<0.05) respecto a Fresco (0.24 mg mL⁻¹) y Combinado (0.16 mg mL⁻¹) en hembras maduras y Pellet (0.20 mg mL⁻¹), Combinado (0.21 mg mL⁻¹) y Fresco (0.22 mg mL⁻¹) en hembras inmaduras.

4.3.2.5. Índice nutricional Ac:Pts

En cuanto al índice Ac:Pts, en el tejido hepatopáncreas es donde se aprecian diferencias significativas (p<0.05), siendo Combinado (0.93) en hembras maduras diferente significativamente (p<0.05) del resto de los parámetros.

4.3.2.6. Índice nutricional Ac:Col

Las diferencias se presentan en el tejido hepatopáncreas entre el tratamiento Fresco (0.29) y Combinado (0.93) en hembras maduras.

4.4. PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS Y CALIDAD ESPERMÁTICA EN MACHOS

En la Tabla 9 se observan algunos parámetros medidos en machos de *L. vannamei*. No hay diferencias significativas (p>0.05) en cuanto a masas finales y a sobrevivencia, siendo mayor ésta en el tratamiento Fresco con 98.5 % y con Pellet y Combinado con 91.5 %. Tampoco se observan diferencias significativas en el índice gonadosomático (IGS), siendo menor en el tratamiento Fresco con 1.19, seguido por Pellet con 1.23 y Combinado con 1.35; en el índice hepatosomático (IHS), Fresco sigue siendo el valor más bajo con 2.49, seguido de Combinado con 2.78 y Pellet con 3.15.

En cuanto al conteo de células espermáticas, el tratamiento Pellet presenta el mejor resultado a pesar de que en células normales no hay diferencias significativas (p>0.05) respecto a Fresco y Combinado, pero si existen diferencias en el número de células anormales por tratamiento pues en Pellet se presentan los valores diferentes (p<0.05).

Tabla 9. Calidad espermática y parámetros zootécnicos de reproductores de *L. vannamei*

	Pellet	Fresco	Combinado	p
Masa machos (g) ± DE	33.2±4.2 ^a	33.0±2.2 ^a	32.5±3.9 ^a	ns
Sobrevivencia% ± DE	91.5 ^a	98.5 ^a	91.5 ^a	ns
IGS	1.2±0.7 ^a	1.2±0.7 ^a	1.4±0.6 ^a	ns
IHS*	3.2±1 ^a	2.5±0.5 ^a	2.8±0.8 ^a	ns
Normales (cel/mL) x 10⁶ ± ES x 10³	7.0 ± 2.2 ^a	5.2 ± 1.3 ^a	7.2 ± 1.9 ^a	ns
Anormales (cel/mL) x 10⁶ ± ES	0.1 ± 0.7 ^a	3.1 ± 1.3 ^b	3.4 ± 1.1 ^b	0.002

* No paramétrico Kruskal-Wallis (para grupos independientes)

4.5. RESPUESTAS BIOQUÍMICAS EN MACHOS

A continuación (Tabla 10) se muestran los resultados de metabolitos obtenidos en reproductores de *L. vannamei* provenientes del sistema de cultivo floc y alimentados con la combinación de alimento fresco y/o pellet formulado.

Tabla 10. Metabolitos en diferentes tejidos de machos de *L. vannamei* (mg g⁻¹ ± ES)

p: nivel de significancia

		Pellet	Fresco	Combinado	p
acilglicéridos mg g⁻¹	Hemolinfa	0.4±0.1(9) ^a	0.4±0.1 (10) ^a	0.4±0.1(10) ^a	ns
	Hepatopáncreas	26±3.7(8) ^a	47.6±4.7 (7) ^b	47.5±8(8) ^b	0.04
	Gónada	4±2.4 (10) ^a	2.7±0.9 (8) ^a	3.8±1 (8) ^a	ns
Ac:Pts	Hemolinfa	0.004±0.002 ^a	0.003±0.000 ^a	0.003±0.001 ^a	ns
	Hepatopáncreas	1.6±1.3 ^a	3±2.5 ^a	2.9±1.8 ^a	ns
	Gónada	0.09±0.0 ^a	0.07±0.0 ^a	0.08±0.0 ^a	ns
colesterol mg g⁻¹	Hemolinfa	0.2±0.0 (8) ^a	0.2±0.0 (9) ^a	0.2±0.1(10) ^a	ns
	Hepatopáncreas	8±3.6 (8) ^a	15±5 (8) ^b	12±5.2 (9) ^b	0.003
	Gónada	2±1.5 (8) ^a	1.9±1.6 (8) ^a	1.5±0.5(9) ^a	ns
Ac:C	Hemolinfa	2.2±0.6 ^a	2.3±0.3 ^a	2.2±0.5 ^a	ns
	Hepatopáncreas	3.3±2.2 ^a	3.5±1.3 ^a	4.0±2.2 ^a	ns
	Gónada	2.7±1.1 ^a	2.3±1.6 ^a	2.5±0.8 ^a	ns
glucosa mg g⁻¹	Hemolinfa	0.1±0.1 (4) ^a	0.1±0.1 (10) ^a	0.3±0.1 (9) ^b	0.0003
	Hepatopáncreas	0.9±0.4 (10) ^a	1.1±0.4 (8) ^a	0.9±0.3 (9) ^a	ns
	Gónada	0.4±0.2 (8) ^a	0.4±0.2 (9) ^a	0.7±0.2 (9) ^b	0.001
proteínas mg g⁻¹	Hemolinfa	119.8±39.2 (9) ^a	139±22.2 (8) ^a	135±24.3 (10) ^a	ns
	Hepatopáncreas	15±4.7 (10) ^a	22±3.7 (7) ^b	18±4.4 (9) ^{ab}	0.006
	Gónada	44.8±11.4 (10) ^a	40.9±7.8 (9) ^a	49.8±13.6 (9) ^a	ns

- Mann-Whitney; Kruskal-Wallis (Chi square)

En acilglicéridos las reservas más bajas se presentan en hemolinfa, seguidos por la gónada en donde Fresco presenta el valor más bajo con 2.7 mg mL^{-1} , Combinado con 3.8 mg mL^{-1} y Pellet con 4 mg mL^{-1} ; en cambio las reservas en glándula digestiva son más bajas en Pellet con 26 mg g^{-1} tejido y más altas en Combinado (47.5 mg g^{-1} tejido) y Fresco (47.6 mg g^{-1} tejido), siendo Pellet diferente significativamente ($p > 0.05$).

En los indicadores Ac:Pts y Ac:Col no se observan diferencias significativas, apreciándose los valores más elevados en la glándula digestiva (hepatopáncreas).

4.6. DISCUSIÓN FINAL

4.6.1. Alimentos frescos y/o congelados

Un punto en el que la mayoría de los autores están de acuerdo desde que comenzó la domesticación de camarones peneidos en la época de los 60 del siglo XX (Deshiamru y Shigeno, 1980) es en la importancia de elaborar un alimento balanceado que aporte todos los requerimientos nutricionales adicionales necesarios en el proceso de la reproducción y que permita sustituir las fuentes de alimentos frescos que se les proporciona a los reproductores, Wouters *et al.* (2001) mencionan que la disponibilidad de una dieta óptima es identificada como un factor crucial para la maduración sexual y la reproducción de camarones.

Los motivos para dicha sustitución son muy diversos, van desde la accesibilidad de alimentos frescos, el precio, la calidad debido a la estacionalidad, problemas relacionados con almacenamiento, además de que expone a los reproductores a algunos riesgos de bioseguridad (NutraFeed®, 2012).

De allí la importancia de una dieta formulada, sin embargo, igualar una dieta natural con una dieta artificial no es un objetivo simple (EPIFEED®, 2012) pues no siempre se logra sostener la reproducción. Braga *et al.* (2010) encontraron que la calidad reproductiva de los machos decrece significativamente en camarones alimentados con solo alimento comercial, en el presente bioensayo los reproductores alimentados con solo alimento formulado semi-húmedo presentaron un pobre desempeño reproductivo a pesar de que se utilizaron ingredientes de alta calidad en la elaboración, incluyendo una suplementación con aminoácidos libres (LYS 0.4%, LEU 0.3 %, ARG 0.4%, OH-Pro 0.2 %, GLUT 0.5 % y

MET 0.2%), sin embargo ésta no fue suficiente debido a diferentes razones, particularmente la lixiviación (Huai *et al.*, 2010) de la dieta semi-húmeda en las tinas de maduración.

En la revisión de Wouters *et al.* (2001) solamente se reporta un alimento comercial recomendado para proporcionarse al 100% de la ración diaria (Golden Spawn de Tesgofarm Aqua en Holanda), otros como el Breed S de INVE (Aquaculture Baasrode Belgium) están recomendados para proporcionar el 60% de la ración alimentaria y otros más como el Higashimaru (Higashimaru, Japan), MadMac –MS premix (Aquafauna Biomarine USA), Nippai (Nippai, Japón), Rangen (Rangen, USA) y Zeigler (Zeigler Bros., USA) que solamente recomiendan para proporcionar el 1 % de la biomasa diaria.

Wouters *et al.* (2002a) también mencionan que los órganos reproductores sufren cambios durante esta etapa, la masa de los ovarios de una hembra puede aumentar de 4 a 9 veces en una semana y en este período de tiempo se deben depositar nutrientes suficientes dentro de la yema de los huevos para mantener el desarrollo normal de embriones y nauplios y que la ausencia de dichos nutrientes puede llegar a detener por completo el proceso reproductivo (Bray y Lawrence, 1992).

Los estudios referentes a los requerimientos necesarios para reproductores de camarón se han enfocado en proteína, lípidos y HUFA. Harrison (1990) menciona que la mayoría de los estudios realizados en reproductores se basan en experiencias de ensayo y error en la investigación usando alimentos frescos y Marsden *et al.* (1997) también mencionan que es muy difícil correlacionar los efectos de estos estudios pues dietas diferentes están aparentemente afectando aspectos diferentes de la reproducción.

Bray *et al.* (1990) igualmente hacen énfasis en que cuando se formule una dieta artificial se mantenga en mente con cual otro alimento fresco puede ser combinada y en que proporción. También influye la especie de alimento fresco utilizado. Naessen *et al.* (1997) reportan que el poliqueto *A. reseii* presenta desempeños más pobres que *Glycera dibranchiata*.

A pesar de las numerosas investigaciones enfocadas en lograr la sustitución total de alimentos frescos y/o congelados, se sigue recomendando la combinación con dietas artificiales, en el presente experimento se observan resultados similares cuando se combina calamar-mejillón con alimento artificial que cuando solamente se proporcionan alimentos frescos congelados.

Existe otro punto de vista presentado por algunos autores (Emerenciano *et al.*, 2012; Cuzon *et al.*, 2008b). Ellos sugieren que la historia nutricional de los futuros reproductores se mantenga en sistemas de cero recambio (“floc, biofloc”) pues estas condiciones proporcionan un plus de nutrientes presentes en los floculos bacterianos en suspensión (aminoácidos, lípidos y proteínas) además de que las hembras mantenidas en este tipo de sistema pueden desovar más rápidamente y presentar un mayor número de desoves que las mantenidas en sistemas convencionales de agua clara (Emerenciano, 2012).

Y, por último, respecto del punto de vista de los reproductores mantenidos en condiciones de cultivo exterior, Andriantahina *et al.* (2012) realizaron el proceso reproductivo en tanques de concreto (TR) y estanques y determinaron que los reproductores provenientes de estanques (PR) presentaron un mejor desempeño reproductivo, además de que los machos presentaron una calidad reproductiva similar a los silvestres, lo que permite no depender de organismos del medio natural para la generación de nuevas progenies (Jiang *et al.*, 2009).

Existen factores aparte de la dieta que pueden afectar la reproducción (Bray y Lawrence, 1992; Naessen *et al.*, 1997), en el presente bioensayo se consideran que las condiciones son constantes para todas las tinas (temperatura controlada, niveles de oxígeno disuelto normales, horarios de alimentación, tasas de recambio de agua, etc).

Se presentaron maduraciones en hembras alimentadas con Pellet, sin embargo, se observó un fallo en el proceso de la cópula, esto podría ser debido a que la dieta no cubre por si sola los requerimientos energéticos necesarios en los machos pues se observó una baja concentración de glucosa en hemolinfa en machos del tratamiento Pellet (Tabla 10). Además, está reportado que algunos alimentos frescos proveen hormonas que influyen en los procesos de maduración gonádica o en la cópula (Cahu *et al.*, 1994). Estos requieren una coordinación endócrina para cubrir las demandas fisiológicas y energéticas de dichos procesos.

En las hembras se centra en el proceso de la vitelogénesis, desde la vitelogenina en la yema como proteína precursora y su acumulación en el ovario en forma de vitelina (Meusy y Payen, 1988). En el caso de las hembras del tratamiento Pellet es posible que se llevara a cabo la vitelogénesis temprana pero no la tardía, impidiendo así que la gónada terminara el proceso de maduración, causando una reabsorción de lípidos vía hemolinfa hacia el

hepatopáncreas (regresión gonádica). Otro punto importante es el nivel de inclusión de colesterol en la dieta y que afecta directamente a la hormona inhibidora de la gónada (HIG) que refrena la vitelogénesis secundaria mediante la hormona inhibidora de la vitelogénesis (HIV) (Greve *et al.*, 1999).

En el caso de los machos, este rol es responsabilidad de la glándula androgénica (AG) ubicada en los testes (Chang y Sagi, 2008); a pesar de que no se aprecian diferencias en colesterol en la gónada, en hepatopáncreas en el tratamiento Pellet si se observa una diferencia significativa respecto a los otros tratamientos (Tabla 10).

4.6.2. Parámetros zootécnicos

Se observan sobrevivencias superiores al 80 % en machos y hembras a pesar de la constante manipulación debido al proceso de selección de hembras fertilizadas y a las rutinas de limpieza diarias, además del estrés resultante de la ablación y marcado de hembras al inicio del experimento.

Naessen *et al.* (1997) reportan que el estrés del manejo pueden afectar dichas tasas de sobrevivencia cuando las hembras y machos son separados por sexos pues sus tasas de sobrevivencia oscilaron desde el 7 al 36 % en hembras y 28 a 34 % en machos.

4.6.3. Desempeño reproductivo

4.6.3.1. Hembras

Los criterios usados en combinación para evaluar el desempeño reproductivo de camarones peneidos incluyen frecuencia de desoves, porcentaje de hembras que desovan, desoves por hembra, fecundidad (huevos por gramo), tasas de eclosión y sobrevivencia de larvas hasta protozoa 1 (Primavera, 1984; Emerenciano, 2012).

La Tabla 11 presenta algunos de los estudios obtenidos de referencias consultadas para comparar los resultados de esta investigación.

Galgani *et al.* (1989) reportan algunos parámetros de desempeño reproductivo para reproductores alimentados con solo alimentos frescos congelados o con combinaciones del 88% de dietas formuladas + 12% del mix de alimentos fresco sin que se observen diferencias significativas entre ambos (105,600 huevos/desove en fresco y valores que van desde los 99,200 hasta 136,800 huevos/desove en dietas formuladas, así como porcentajes

de fecundación en fresco de 30.2 y en alimentos formulados desde 16.2 hasta 24.8) para *Penaeus vannamei*.

Tabla 11. Tabla comparativa de diferentes experimentos en sustitución de alimento fresco

Referencia	Alimento	Especie	Resultados
Galgani <i>et al.</i> , 1989	Fresco (<i>Perna viridis</i> , <i>Trocas niloticus</i> , <i>Nototodarius sloani</i> (calamar), <i>Katwuwanus pelamis</i>), 88 % formulado A, B y C + comb. frescos	<i>P. vannamei</i> <i>P. stylirostris</i>	Mix fresco/artificial mejor resultado
Nascimento <i>et al.</i> , 1991	Ostras, camarón, calamar, lombrices y pellet	<i>P. schmitti</i>	Combinado, mejor resultado
Naessen <i>et al.</i> , 1997	Calamar, cal + poliqueto, cal + biomasa de <i>Artemia</i> enriquecida	<i>P. vannamei</i>	Calamar + <i>Artemia</i> enriquecida mejor resultado
Regueira <i>et al.</i> , 1999	NIPPAI® + Fresco (camarón, calamar, <i>Artemia</i>)	<i>P. schmitti</i>	NIPPAI® + Camarón
Coman <i>et al.</i> , 2007b	Control (32.5 % calamar, 32.5 % bivalvos, 5% <i>Marphysa sp</i> y 30 % pellet comercial),	<i>P. monodon</i>	Control fue mejor en desempeño de machos
Braga <i>et al.</i> , 2010	Fresco (calamar, jaiba y peces), Breed S INVE, Mix fresco+pellet	<i>F. paulensis</i>	Decrece la calidad reproductiva con Breed S
Andriantahina <i>et al.</i> , 2012	Calamar, almeja, poliqueto y mejillón en tanques y estanques	<i>L. vannamei</i>	Estanques (PR) mejor resultado

En cambio, las mismas dietas en *Penaeus stylirostris* presentan una mejor tendencia en dietas formuladas que en alimento fresco (tasas de mortalidad más bajas, desoves más numerosos y mayor número de nauplios). Marsden *et al.* (1997), para *Penaeus monodon*, presentan desoves 1.4 veces más frecuentes en la dieta formulada que en la dieta fresca-congelada consistente en manto de calamar (*Loligo sp.*) y mejillón (*Perna canaliculatus*).

Wouters *et al.* (2002b) en *Litopenaeus vannamei* silvestres, señalan que se presentan mejores desempeños en reproductores alimentados con una mezcla de alimentos frescos y dieta seca experimental (50% de masa seca de frescos congelados + dieta seca experimental

sustituyendo *Artemia* totalmente) que solamente en alimentos frescos (calamar, ostras, mejillón y biomasa de *Artemia* enriquecida).

De acuerdo con Wouters *et al.* (2002b) se presentaron desoves más numerosos (22 en alimento fresco y 50 y 60 en dietas control y dieta *Artemia* respectivamente), una fecundidad más alta representado por el número de huevos por desove (181,600 en fresco, 213,500 y 230,800 en dietas control y *Artemia* respectivamente), hembras que desovaron 2 o más veces, el número de huevos por hembra fue significativamente superior en dietas experimentales. Igualmente, las tasas de fertilización (51.6 % en fresco y 69.2 % en la mezcla de alimentos) y eclosión fueron ligeramente superiores (39.5 en fresco y 52.9 en la combinación de alimentos).

Estos resultados respaldan los valores obtenidos en el presente ensayo (Tabla 7): reproductores alimentados con Pellet presentan pobres desempeños como se ha discutido anteriormente (probablemente debido a la lixiviación y a una mala inclusión de proporciones lipídicas y proteicas o inadecuadas para sustentar por sí solas el proceso reproductivo). Sin embargo, reproductores alimentados con Fresco y Combinado no presentan diferencias significativas entre sí: Un número similar de desoves totales (54 y 64 respectivamente), desoves no fértiles (15 y 16 respectivamente), eficiencias del desove (1.35 y 1.6) y de la remaduración (1.7 y 2.1), hembras desovadas al menos 1 vez (en ambos del 77.5%), fecundidad representada por el número de huevos por desove (103,300 y 113,400 respectivamente), % de fertilización (58 y 50% respectivamente), % de eclosión ligeramente superior en alimentos frescos (35.9 %) que en Combinados (26%) sin llegar a ser diferentes de manera significativa ($p > 0.05$) y nauplios totales producidos (Fresco con 420,426 y Combinado con 543,829).

Todo esto puede permitir sustituir los elementos de precio más elevado en el mercado (el poliqueto *G. dibranchiata* y biomasa de *Artemia*). Igualmente, existe la creencia de que los “stocks” de camarones domésticos tienen un desempeño reproductivo bajo; sin embargo, Andriantahina *et al.* (2012) mencionan que esto ya ha sido previamente refutado (Peixoto *et al.*, 2003; Coman y Crocos, 2003).

Un factor muy importante que afecta correlativamente el desempeño reproductivo de hembras (Arnold *et al.*, 2012) es el estado fisiológico del macho reproductor (mejor calidad del macho equivale a un mejor desempeño en hembras), en relación a otros estudios en

camarones peneidos. En los machos se presentó un relativo bajo número de células normales (7×10^6 cel mL⁻¹).

También está comprobado que el desempeño reproductivo de hembras y machos y la calidad de huevos y larvas se ve afectado con el transcurso del tiempo de experimentación (Palacios *et al.*, 1999; Vázquez-Boucard *et al.*, 2004). Sin embargo, en el presente bioensayo quizá se necesitó alargar el período de experimentación para comprobar si el desempeño de los reproductores alimentados con Pellet mejorara en el tiempo.

4.6.3.2. Machos

A pesar de que la calidad de machos reproductores es de igual importancia que el de las hembras, en la producción larvaria se ha prestado poca atención a las funciones reproductoras de machos y a los requerimientos necesarios. La calidad del espermátforo se ha medido por una serie de parámetros entre los que destacan: masa del espermátforo, conteo espermático, % de espermatozoides vivos y % de espermatozoides anormales (Pascual *et al.*, 1998, 2003; Alfaro-Montoya, 2010).

Meunpol *et al.* (2005) reportan masas promedio del saco espermático (ámpula seminal) en *Penaeus monodon* alimentados solo con dietas formuladas (experimentales o comerciales), el promedio fue significativamente más bajo en comparación con aquellos reproductores a los que se les proporcionó una mezcla de alimentos frescos congelados (poliquetos, calamar y ostras) + dieta experimental, el número de células espermáticas totales fue significativamente más bajo en la dieta comercial con $31.9 (x 10^6)$ y los conteos más elevados en la mezcla de dieta experimental + fresco con $50.6 (x 10^6)$, estos valores también se reflejan en el % de células anormales pues la dieta experimental fue significativamente más elevado (54.7 %).

Marsden *et al.* (1997) señalan que se presenta mejor calidad espermática en reproductores de *P. monodon* alimentados con una mezcla de alimento fresco (calamar) y dietas experimentales. El número de células espermáticas fue significativamente superior que en reproductores alimentados con alimentos frescos congelados (12.02×10^6 y 6.23×10^6 respectivamente). En el presente bioensayo, y a pesar de que la dieta Pellet en hembras presentó pobres desempeños, en machos no se aprecian diferencias significativas entre los 3 tratamientos (7.02×10^6 en Pellet, 5.16×10^6 en Fresco y 7.23×10^6 en Combinado). Es más,

se observa el menor número de células anormales por mL (0.0624×10^6 en comparación a Fresco y Combinado que oscilan en 3×10^6). En cambio, Wouters *et al.* (2002b) en *L. vannamei* de origen silvestre reportan valores de células espermáticas ligeramente superiores en reproductores alimentados con combinaciones de alimentos frescos-dietas artificiales (21.3×10^6 espermatozoides) sin ser diferentes a los alimentados con frescos (17.3×10^6). Para *Farfantepenaeus paulensis* (Braga *et al.*, 2010) se reportan valores similares a los del presente estudio en reproductores alimentados con alimentos fresco, dieta comercial y una mezcla de ambos (6, 3.4 y 5.9×10^6 cel normales).

Otro factor que puede influenciar el conteo espermático y el índice gonadosomático (Cevallos *et al.*, 2010) es la edad del reproductor (Jiang *et al.*, 2009) pues la calidad puede disminuir drásticamente en organismos demasiado jóvenes o que tengan más de 12 meses de edad.

El nivel de proteínas en la dieta puede también afectar la calidad espermática. Goimier *et al.* (2006); Alfaro-Montoya (2010) recomiendan un nivel de proteína óptimo de 45% para *P. setiferus*. Galgani *et al.* (1989) recomiendan niveles de proteína de para *L. vannamei* entre 43.2 a 65.5 % en dietas formuladas y 71.7 % en la mezcla de alimentos frescos. Wouters *et al.* (2002b) recomiendan un 52% de proteína en dietas para reproductores de *L. vannamei*.

Existen otros factores, además del nutricional, que pueden afectar el desempeño reproductivo de machos y hembras. Chamberlain (1988) y Alfaro-Montoya, (2010) asociaron la reducción de la calidad espermática con deficiencias de vitamina E y Cahú *et al.* (1995) con ácido ascórbico (vitamina C). A este efecto, Pérez-Velázquez *et al.* (2003) reportan que existen deficiencias de vitaminas y/o minerales en alimentos frescos o congelados usados comúnmente en maduración y, en consecuencia, afectan la calidad espermática de los reproductores. Tampoco se tienen en cuenta aspectos asociados al manejo físico de los alimentos pues las pérdidas durante la manufactura y el almacenaje y por lixiviación pueden ser considerables (Fenucci y Fernández, 2004).

Por otra parte, en *Litopenaeus setiferus* (Pascual *et al.*, 1998) reportan que la calidad del espermátforo puede verse afectada por temperaturas elevadas y estrés debido a la aclimatación (valores que fluctúan desde 2.06×10^6 de células totales, alrededor de 75 a 90 % de células normales y entre 10 y 25% de células anormales al inicio y a 33 °C se observa

una reducción de células normales desde 1.2×10^6 células en el inicio y 0 células normales después de 6 días, y un aumento en el porcentaje de células anormales y muertas).

4.6.4. Metabolitos en diferentes tejidos

Teshima *et al.* (1988) demostraron que, en *Marsupenaeus japonicus*, los lípidos se transfieren al ovario del hepatopáncreas vía hemolinfa. En todas las especies de peneidos, se observa un aumento en la concentración de lípidos totales en ovarios, y en la mayoría de las especies un simultáneo decrecimiento de lípidos totales en el hepatopáncreas (Wouters *et al.*, 2001); sin embargo, Wouters *et al.* (2001) mencionan también que en algunos estudios no se observa el decrecimiento-incremento de lípidos hepatopáncreas – ovario, lo cual sugiere que la tasa de síntesis de nuevos lípidos fue demasiado baja para contribuir significativamente al incremento de los lípidos en ovarios, en el presente trabajo, se observa un aumento significativo de lípidos (acilglicéridos y colesterol) en ovarios de hembras maduras en relación con los encontrados en el hepatopáncreas.

Palacios *et al.* (2000) demostraron que la calidad de los huevos y los nauplios se ve afectada de manera significativa cuando las hembras son sometidas al desgaste del proceso reproductivo a nivel comercial, en el presente bioensayo no se observan diferencias significativas en los parámetros bioquímicos medidos, tal vez debido al tiempo de experimentación pues este no excedió los 45 días desde la ablación.

Los acilglicéridos representan la reserva energética más importante en la embriogénesis y en el desarrollo larval temprano, en hembras inmaduras estos valores fueron más altos en el tratamiento Pellet; sin embargo, en las gónadas de hembras maduras, los valores más elevados se presentaron en Fresco y Combinado, el mismo comportamiento se aprecia en colesterol siendo el tratamiento Pellet el que presenta los valores más bajos. Cahu y Quazugel, (1989), Lavens y Sorgeloos, (1991) y Rothlisberg *et al.* (1991) demostraron que la calidad del desove está correlacionado con la composición bioquímica, particularmente lípidos.

En esta investigación, Fresco y Combinado presentaron una composición bioquímica similar lo cual no nos permite apreciar diferencias significativas entre ambos en hembras maduras y en huevos y nauplios en dichos tratamientos. La ausencia de maduración en el tratamiento Pellet también podría explicarse si se presenta una regresión gonádica debido a

estrés por manejo (Cuzón, *com. pers.*, 2013), pues, como se menciona en Teshima *et al.* (1988), el transporte de nutrientes del hepatopáncreas a la gónada vía hemolinfa es muy rápido y es de suponer que el proceso inverso se presente igual.

4.6.5. Ácidos grasos poliinsaturados

Está reportado que calamar, poliquetos y moluscos son cruciales por sus componentes nutricionales y su efecto positivo en la reproducción de camarones peneidos debido a sus elevados niveles de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (Hoa *et al.*, 2009; Wouters *et al.*, 2001; Coman *et al.*, 2007a).

La Tabla 12 presenta un resumen de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las materias primas usadas en la investigación.

Tabla 12. Resumen del perfil de ácidos grasos

	Pellet	Calamar	Mejillón	Poliqueto	Artemia
(n-3)/(n-6)	1	8	0.6	10	2
DHA/EPA	2	2.4	0.6	1.4	0.3
Σ (n-9)	38	52	18	31	22
Σ (n-9)-24:1(n-9)	25	16	8	31	22

Las dietas deficientes de ácidos grasos pueden retardar el desarrollo del ovario en *M. japonicus* si se usan dietas libres de ácidos grasos (Alava *et al.*, 1993).

La calidad de los ingredientes utilizados para elaborar la dieta también influye en la cantidad de HUFA proporcionados a los reproductores. Xu *et al.* (1994) variaron la composición de ácidos grasos en la dieta utilizando diferentes fuentes de lípidos en *F. chinensis*.

Cuando la dieta contenía aceite de anchoveta con 17.8% (n-3) y 5% (n-6) presentó el mejor nivel de HUFA (n-3) en huevos (110,000 huevos por desove y una tasa de eclosión de 80% y proporciones (n-3)/(n-6) de 5.7 en huevos).

El pobre desempeño de la dieta Pellet podría deberse a niveles bajos de EPA (8.4 %) necesarios en el desove, tal vez la relación fue demasiado baja y podría explicar este desempeño en primera instancia. Sin embargo, también se considera otro factor de dicho

desempeño y es la pérdida de nutrientes mediante la lixiviación de la dieta semihúmeda en el agua de la tina de maduración (Huai *et al.*, 2010).

En los alimentos frescos (Tabla 3) mejillón (1.9%) y *Artemia* (0.3%) también se aprecian niveles bajos del ácido graso poliinsaturado EPA, pero se compensa con los valores más elevados de Calamar (14.5%) y poliqueto (7.6%) lo cual permitirá en un futuro sustituir estos alimentos por una mezcla pellet + calamar + mejillón. A este respecto, Naessen *et al.* (1997) reportan valores de 7.6% de EPA y 1.5% en DHA para *Artemia* y 8.6% de EPA y 4.2% de DHA en poliqueto panameño y en la mezcla de alimentos frescos-dieta artificial, 10.4% para EPA y 12.4% para DHA; mientras que en el perfil de ácidos grasos de los alimentos probados, la dieta Pellet presentó valores de 8.4% en EPA y 12.8 % en DHA esenciales en huevos y eclosiones; sin embargo, la relación (n-3)/(n-6) es baja (1.1) y puede explicar parcialmente los pobres resultados en la maduración, esta relación influye tanto en la gametogénesis como en la fase larvaria (dicha fase no se encuentra incluida en el presente trabajo).

Hoa *et al.* (2009) reportan altas tasas de fertilización (93%) y de eclosión (81%) en reproductores alimentados con diferentes mezclas de alimentos frescos (ostras, calamar, poliqueto e hígado de cerdo) y un mayor número huevos por desove (458,796) con proporciones n-3/n-6 de 3.5, ARA/EPA de 0.6 y DHA/EPA de 1.2, en contraparte con los observados en el presente experimento (58% de fertilización y 35% de eclosión en la dieta Fresco).

El ácido araquidónico presenta valores bajos (Calamar con 0.9 % es la proporción más elevada) en relación a los reportados por otros autores. Una posible explicación del por que de los pobres resultados obtenidos en cuanto al perfil de ácidos grasos es la pérdida de los mismos durante el largo proceso de almacenamiento a que se ven sometidos o a la especie de que se trate el alimento (Naessen *et al.*, 1997).

En cuanto a proporción (n-3) y (n-6), los mejillones son lo mas rico en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA). Los pellets contienen un nivel de ácido linoleico (LA) 18:2(n-6) mayor en relación con la presencia de ingredientes de origen vegetal como la harina de trigo, el concentrado proteico de soya, la levadura de cerveza y también en la lecitina de soya.

4.6.6 Colesterol y carotenoides

El colesterol es un nutriente esencial en el contexto de la reproducción y en la década de los 70 del siglo XX, por ejemplo, algunos autores considerando incorporación hasta 5% en una dieta para peneidos de cultivo para este periodo del ciclo de vida, además de los alimentos balanceados que estaban constantemente complementados con alimentos frescos para cubrir este requerimiento de forma directa. Estos alimentos frescos son en realidad una fuente de colesterol, no solamente total, sino también ésteres de colesterol que son más fácilmente metabolizados por el camarón (Cuzon, *com. pers.*, 2013); los resultados muestran claramente la gran diferencia de este nutriente entre el alimento en forma de pellets y el alimento fresco (Tabla 4) y la comparación de hembras inmaduras vs hembras maduras da diferencias significativas (Tabla 7) en tejido gonádico. El tratamiento Fresco tiene un mayor impacto en hembras maduras, no realmente en el hemolinfa pero sí en el hepatopáncreas y en las gónadas ($p < 0,05$). El énfasis en el colesterol es que es un precursor de esteroides hormonales (Ravid *et al.*, 1999). Para lograr el éxito de esta maduración la combinación (EPA+DHA) con vitamina C+E y ésteres de colesterol (Cahu *et al.*, 1995) es necesaria. Esta combinación se logró por primera vez con el tratamiento fresco y luego con la combinación de fresco+pellet (Combinado) y se detiene allí, porque el “pellet” por sí solo no respondió (aun con la complementación con aminoácidos libres LYS, LEU, ARG, OH-Pro, GLUT y MET). No solamente hay una falta de colesterol (determinado por cálculo en la Tabla 12) sino también de ácidos grasos esenciales (HUFA y ARA) y uno puede asumir también una falta de vitamina C y E, ya sea durante la adición a la mezcla de ingredientes y/o durante la lixiviación que inevitablemente se produce antes de la ingestión por los reproductores. Los resultados obtenidos dan los elementos en los que se puede trabajar en experimentos futuros y lograr como resultado fundamental el balance correcto, en concreto: de niveles de proteína nativa, de minerales + minerales traza, de lípidos (colesterol+fosfolípidos+ácidos grasos) y de vitaminas; logrando que la maduración de la gónada se obtenga en las mejores condiciones posibles, con o sin ablación unilateral de las hembras. En cuanto a los machos (Tabla 9), las diferencias son claras otra vez en colesterol en el hepatopáncreas y en gónadas ($p < 0,05$), esto indica la función esencial de este nutriente para la formación de tejido gonadal, principalmente en forma esterificada (Tabla 13).

Tabla 13. Colesterol ingerido por día

	Ácidos Grasos % Lípidos Totales (LT)					Colesterol		
	LA	ALA	ARA	EPA	DHA	%LT	mg/g MS	éster %LT
Calamar (<i>Loligo sp.</i>)	1.2	0.2	0.9	15	35.6	11	12	2
Mejillón (<i>M. edulis</i>)	6.9	0.7	0.2	2	1.3	10	6	0.4
Poliqueto (<i>G. dibranchiata</i>)	1.7	1.1	0.2	8	11		5	
<i>Floc</i>						3	1	0.1
<i>Artemia</i>	8	13	0.5	0.3	0.1	11		
⁽¹⁾ Pellet	12	2.2	0.2	8	13	1		
<i>Ingesta diaria</i>								
<i>Fresco</i>							23	
<i>Pellet</i>							0.1	

Ver Glosario para siglas

Otro factor que influye en el proceso reproductivo es la cantidad de pigmentos carotenoides que se incluyen en la dieta y que son necesarios para la pigmentación de la yema, ya sea como ingrediente purificado o como parte del tejido de los alimentos frescos que se proporcionen al reproductor, dichos carotenoides se encuentran correlacionados con la calidad del plancton presente en el lugar de captura (Jensen y Sakshaug, 1970).

Fisher *et al.* (1956) determinaron la cantidad de pigmentos carotenoides encontrados en diferentes moluscos incluyendo el calamar (*Loligo sp.*), la cantidad de carotenoides varía de acuerdo al sitio de colecta y a la parte del tejido evaluado, tentáculos de calamar presenta la menor cantidad de carotenoides en relación al resto de los tejidos.

Partali *et al.* (1989) mediante cromatografía determinaron la cantidad de carotenoides encontrados en *Mytilus edulis* colectados en sitios diferentes; también encontraron que el tipo de carotenoides presentes varía de acuerdo al tipo de alimentación proporcionado a los mejillones.

No se cuenta con la información respecto al tipo de alimentación proporcionado a los mejillones (*Mytilus edulis*) provenientes de Proaqua México con los cuales se alimentó a los reproductores de camarón.

En la Tabla 5 se observa un cálculo aproximado de la cantidad total de carotenoides proporcionados a los reproductores, al tratamiento Pellet solo se les proporcionaba 50 µg de carofila en polvo mientras que a los tratamientos Fresco y Combinado se les proporcionaron aproximadamente 257 µg de carotenoides al día (Cuzon, *com. pers.*, 2014).

En un contexto general, esto también pudo influir en los pobres resultados

presentados por el tratamiento Pellet y muestra una posible nueva directriz a tener en cuenta en una futura reformulación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSIONES

De acuerdo con el objetivo general, que era el de evaluar el efecto de la sustitución total del alimento fresco por un alimento balanceado de alta calidad proteica y lipídica y adicionado con aminoácidos libres en el desempeño reproductivo, en metabolitos (triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas) de reproductores, huevos y nauplios y ácidos grasos de las dietas evaluadas de *L. vannamei* provenientes del sistema de cultivo floc (BFT) y de los objetivos particulares, que decían: Sustituir al 100% el cóctel de alimento fresco que se ofrece a los reproductores de *L. vannamei* (mejillón, calamar, poliqueto y biomasa de artemia), evaluar la maduración, calidad de las células reproductivas (huevos y espermatozoides), la eficiencia del desove y la eficiencia de eclosión en reproductores de *L. vannamei* mantenidos en sistema de cultivo floc y evaluar los cambios en los indicadores bioquímicos (triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas solubles) de los reproductores, huevos y nauplios de *L. vannamei* sujetos a sustitución total del alimento fresco, se puede concluir lo siguiente:

- 1.- No se presentaron diferencias significativas en los promedios de huevos por desoves ni en las tasas de fertilización; sin embargo, los desoves en los tratamientos Fresco y Combinado fueron mucho más numerosos.
- 2.- A pesar de que la formulación (tratamiento Pellet) cumple con los requerimientos necesarios en cuanto a nutrientes, presentó un bajo número de desoves, bajas tasas de fertilización y cero tasas de eclosión.
- 3.- En cuanto al número de desoves, a las tasas de fertilización y las tasas de eclosión, no fue posible sustituir al 100% el alimento fresco; sin embargo, se corroboran los resultados anteriores de que es posible realizar una sustitución de los alimentos frescos *Artemia* y poliqueto por una combinación de 50% calamar y mejillón + 50 % pellet.
- 4.- La hipótesis señala que si la historia nutricional influye en la maduración gonádica, una dieta balanceada a partir de la mezcla de ingredientes secos convencionales de alta calidad

suplementada con aminoácidos libres (FAA) y combinada con alimento fresco permite un desempeño reproductivo igual o mejor en los reproductores de camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* (Boone, 1931) en comparación con una dieta tradicional a base de alimento fresco (calamar *Loligo sp*, mejillón *M. edulis*, poliqueto *G. dibranchiata* y biomasa de *Artemia*). Esta hipótesis ha sido rechazada con base en los pobres resultados presentados por el tratamiento Pellet. Sin embargo, si es posible realizar la sustitución en un 50% descrito en el punto 3.

5.2. PERSPECTIVAS

De acuerdo con esta investigación se propone continuar con las siguientes líneas de investigación:

1. Aumentar el nivel de inclusión del colesterol en la dieta pues las hormonas esteroides son sintetizadas a través del colesterol.
2. Aumentar el nivel de inclusión de vitaminas y minerales en la dieta principalmente vitamina C y E.
3. Reforzar el pellet con gluten de trigo nativo y adicionar un ingrediente que nos permita corroborar que el pellet sea ingerido (permicol red).
4. Realizar la medición de ecdisteroides en los organismos.
5. Aumentar el tiempo de experimentación a 60 días para apreciar de manera más amplia las diferencias que se presenten.
6. Probar como fuente de carotenoides aceites pigmentados con exoesqueletos y cefalotórax de camarón (Luna-Rodríguez *et al.*, 2008).

ANEXOS

ANEXO A-1

ENSILADO DE CABEZA DE MERO ROJO

Las cabezas de mero rojo (*Epinephelus morio*) fueron picadas lo más finamente posible, pesadas y molidas en una licuadora industrial marca JR. Se molieron hasta obtener una pasta homogénea, fue necesario agregar agua purificada para facilitar la molienda (no más de 300 mL por kilogramo de cabeza).

La pasta obtenida se colocó en una cubeta de plástico de 20 L, se le midió el pH a la pasta antes de agregar los reactivos, una vez registrado el pH inicial se agregaron 20 mL/kg de material homogeneizado de ácido fórmico por kg de material homogeneizado, se agitó constantemente durante 2 minutos, a continuación se agregó el BHT a razón de 0.02% en relación al contenido de lípidos (el BHT es diluido en acetona antes de agregar al material homogéneo), se homogeneizó nuevamente y se procedió a registrar nuevamente el pH al inicio, 5 y 12 horas después y posteriormente 2 veces al día; el pH debe mantenerse entre 3.5 y 4. Si se encontraba arriba de 4 se agregaron 2 mL más de ácido fórmico al producto homogéneo. El valor de pH se midió y registró durante varios días hasta que ya no hubo variaciones.

Una vez estabilizado el pH se procedió a secar en una estufa a 50 °C antes de ser molido y tamizado para obtener una harina, misma que fue neutralizada para evitar variaciones de pH al agregarse a la dieta y mezclarse con los demás ingredientes.

ANEXO A-2

ENCAPSULADO DE AMINOÁCIDOS LIBRES

La mezcla de aminoácidos libres fue encapsulada en grenetina grado alimenticio disuelta en agua a 45 °C, de acuerdo a Cuzón, *com. pers.*, 2010 y con Cho *et al.* (1992).

La gelatina obtenida fue refrigerada antes de agregar a la mezcla de harinas en la mezcladora industrial marca TorRey.

Para facilitar su homogeneización la pasta obtenida fue pasada dos veces por un molino de carne marca TorRey antes de obtener los pellets.

ANEXO A-3

EXPERIMENTO PREVIO. BIOENSAYO: SUSTITUCIÓN DE ALIMENTO FRESCO POR BALANCEADO EN ORGANISMOS PROVENIENTES DE DOS SISTEMAS DE CULTIVO

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la sustitución del alimento fresco por un alimento balanceado de alta calidad proteica y lipídica y adicionado con aminoácidos libres en el desempeño reproductivo, en metabolitos (triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas) y ácidos grasos de reproductores de *L. vannamei* provenientes de los sistemas de cultivo floc y agua clara.

Particulares

- Formular un alimento balanceado adicionado con aminoácidos libres que presente las condiciones de calidad lipídica y proteica similares al alimento fresco que se ofrece a los reproductores de camarón *L. vannamei*.
- Sustituir al 50 % el cóctel de alimento fresco que se ofrece a los reproductores de *L. vannamei* (mejillón, calamar, poliqueto y biomasa de artemia).
- Evaluar la maduración, calidad de las células reproductivas (huevos y espermatozoides), la eficiencia del desove y la eficiencia de eclosión en reproductores de *L. vannamei* provenientes del área de engorda mantenidos en sistemas de cultivo diferentes (agua clara y floc).
- Evaluar los cambios en los indicadores bioquímicos (triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas solubles) y ácidos grasos de los reproductores de *L. vannamei* provenientes de agua clara y floc sujetos a la sustitución del alimento fresco por balanceado.

CONDICIONES DEL BIOENSAYO

Aclimatación previa al experimento

Las hembras, una vez ablacionadas presentaron un cuadro sintomático consistente con vibriosis, se hizo un seguimiento molecular en medio de cultivo TCBS y se purificó el ADN para identificarse con primers universales en el laboratorio IBT de la UNAM, el resultado consistió en *Vibrio hemolyticus*. Este fue el motivo por el cual se modificara el dispositivo experimental original consistente en tres tinajas de maduración por origen de cultivo (tres para agua clara y tres para floc) con 20 hembras por tina, pues días después de ablacionar comenzaron con el cuadro sintomático; cabe la aclaración que solo las hembras presentaron esta patología, los machos no presentaron síntomas y que de las hembras, las provenientes de agua clara fueron las que se vieron más afectadas.

Dispositivo experimental

A continuación se presenta un esquema con la distribución de los tratamientos.

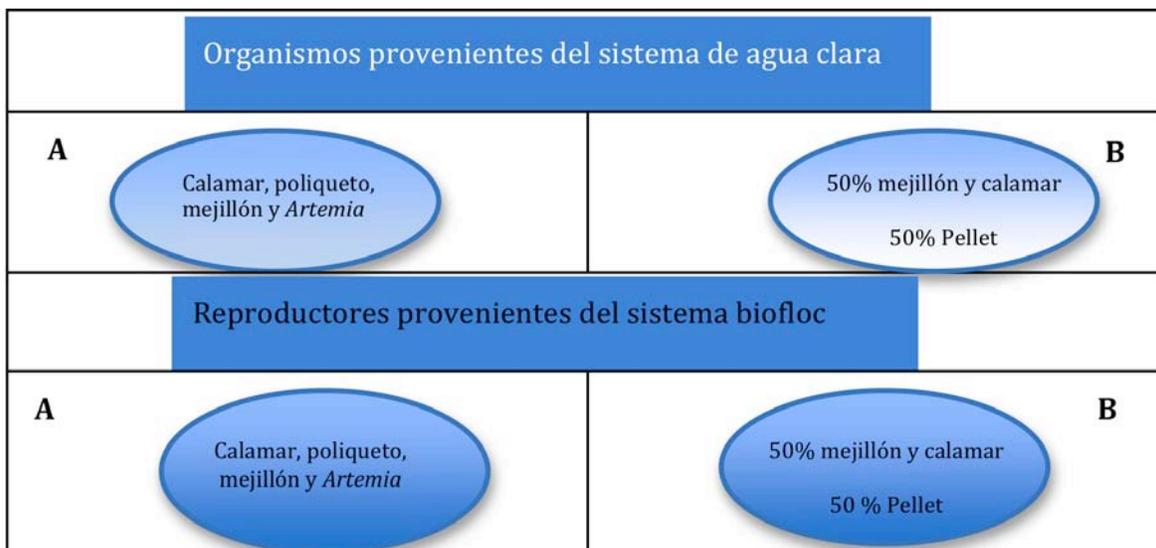


Figura 2. Tratamientos sometidos a experimentación

Se sembraron 16 hembras (excepto en ACP con 15) y 20 machos por tina, dejando una proporción 1:1.2, respectivamente.

RESULTADOS

Parámetros físico-químicos

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a parámetros físico-químicos, no se observan diferencias significativas ($p>0.05$) en cuanto a tratamientos, el sistema cuenta con recirculación y es cerrado con recambios del 20 % semanal.

Tabla 14. Parámetros físico-químicos (promedios \pm desviación estándar)

	AC/F	ACP	F/F	F/P
Temp. (°C)	28.0 \pm 1.2 ^a	28.2 \pm 1.3 ^a	28.4 \pm 1.2 ^a	28.5 \pm 1.1 ^a
OD (mgL ⁻¹)	6.5 \pm 0.6 ^a	6.0 \pm 0.8 ^a	6.9 \pm 0.9 ^a	6.2 \pm 0.8 ^a

ACF: agua clara fresco; ACP: agua clara pellet; FF: floc fresco; FP: floc pellet

Respuestas zootécnicas y desempeño reproductivo en hembras

La Tabla 15 muestra los parámetros zootécnicos evaluados

Tabla 15. Zootecnia y desempeño reproductivo de hembras

Parámetro	AC/F	ACP	F/F	F/P	<i>p</i>
N	16	15	16	16	NA
Masa (g) ³	39 \pm 7.3 ^a	36 \pm 6.1 ^a	36.2 \pm 5.5 ^a	36 \pm 5.6 ^a	ns
Sobrevivencia (%)	81.3	86.7	87.7	75	NA
Desoves totales	9	16	24	15	NA
Desoves/hembras ablacionadas	0.6	1	1.5	0.9	NA
# de huevos por desove ($\times 10^3 \pm$ ES)	152.5 \pm 27.6 ^a	146.4 \pm 13.7 ^a	116.9 \pm 8.4 ^a	136.9 \pm 11.9 ^a	ns
Tasa de fertilización* (%) (\pm ES)	60.8 \pm 2.2 ^a	90.3 \pm 1.3 ^a	75 \pm 4.6 ^a	76.7 \pm 5.2 ^a	ns
IGS inmad**	1.0 \pm 0.3 (5) ^a	1.0 \pm 0.4 (4) ^a	1.0 \pm 0.4 (4) ^a	0.7 \pm 0.5 (4) ^a	(0.0001)
IGS mad	2.4 \pm 0.8 (5) ^b	3.2 \pm 0.6 (4) ^b	2.8 \pm 0.7 (4) ^b	2.4 \pm 0.5 (4) ^b	
IHS inmad**	1.8 \pm 0.7 (7) ^a	2.2 \pm 0.6 (5) ^a	1.4 \pm 0.7 (7) ^a	2.0 \pm 0.6 (5) ^a	ns
IHS mad	2.3 \pm 0.8 (8) ^a	2.3 \pm 0.8 (5) ^a	2.2 \pm 0.3 (6) ^a	2.0 \pm 1.0 (4) ^a	

ACF: agua clara fresco; ACP: agua clara pellet; FF: floc fresco; FP: floc pellet

*En % de fertilización se aplicó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes

** ANDEVA bifactorial para tratamiento y estadio de maduración gonádica (inmaduras y maduras)

ns (No hay diferencias significativas). NA (No se aplicó estadístico)

³ La masa y el peso son dos conceptos diferentes y con unidades diferentes. La masa tiene unidades de g o kg. El peso tiene unidades de g_f o kg_f o newtons (N), que son iguales a 1 kg m/s². Nota de una de las revisoras

Respuestas bioquímicas

La Tabla 16 muestra el resumen de los metabolitos obtenidos en diferentes tejidos en hembras. Se aplicaron análisis de varianza factoriales, ANDEVA, a los resultados, en caso de ser necesario, se hizo una transformación de $\text{Log}(x+1)$ a los valores para normalizar los datos.

Tabla 16. Metabolitos en diferentes tejidos de hembras reproductoras de *L. vannamei* (ACF: agua clara fresco; ACP: agua clara pellet; FF: floc fresco; FP: floc pellet)

		HEMBRAS INMADURAS				HEMBRAS MADURAS			
		AC/F	ACP	FF	FP	AC/F	ACP	FF	FP
Acilglicéridos (mg g ⁻¹)	<i>Hepatopáncreas</i>	2.4±1.1 (3)a	1.9±0.9(3)a	11.9±10.6(6)b	6.8±6.7 (4)b	8.0±4.0(6)b	8.2±9.4(4)b	7.3±3.5(6)b	6.8 ±2.5 (4)b
	<i>Hemolínfa</i>	0.3±0.1 (6)a	0.4±0.1(4)ab	0.5±0.1(5)b	0.4±0.1 (4)a	0.4±0.1 (4)ab	0.5±0.0(2)b	0.3±0.1(2)a	0.5±0.1(3)b
	<i>Gónadas</i>	6.4±2 (3)b	2.5±2.9 (3)a	3.3±1.6(6)a	9.4±7.8 (3)b	4.9±5.6(6)a	7.5±3.2(4) ^b	8.4±5(8)b	8.±2.9(4)b
	<i>Huevos</i>	11.2±1.6 (5)a	10.3±1.5(5)a	8.4±0.9(5)a	8.3±1.6(5)a				
Colesterol (mg g ⁻¹)	<i>Hepatopáncreas</i>	4.6±2.8 (3)a	2.1±1 (3)b	5.6±1.9(6)a	6.2±5.2 (4)a	4.5±0.5 (6)a	3.8±1(4)a	3.9±1.3(7)a	4.8±2.1(4)a
	<i>Hemolínfa</i>	0.2±0.0(5)a	0.2±0.0(4)a	0.2±0.1(5)a	0.2±0.1(5)a	0.3±0.0 (4)a	0.2±0.0(3)a	0.3±0.0(3)a	0.3±0.0(5)a
	<i>Gónadas</i>	0.3±2.2 (3)a	0.7±0.5(3)a	1.6±0.9(6)a	1.7±1.4(3)ab	3.1±2.6(6)b	4.1±1.5(4)c	3.3±2.4(7)c	3.2±1.3(4)c
	<i>Huevos</i>	6.4±0.8 (5)a	6.2± 1.1(5a)	4.9±0.6(5)a	5.2±0.8(5)a				
PTS (mg g⁻¹)	<i>Hepatopáncreas</i>	57.5±44.4 (3)a	26.3±5.8 (3)a	36.1±15 (6)a	37.6±24.3 (3)a	33.4±21.5 (6)a	35.0±10 (4)a	33±13.3 (7)a	45.9±25.6 (4)a
	<i>Hemolínfa</i>	139.3±29.5 (5)a	153.9±35.4(4)a	179.2±11.5(5)ab	170.8±39.6 (5) ^{ab}	174.5±18.29(4) ^{ab}	177.3±2.69(3) ^{ab}	182.3±26.7(3)a ^b	198.2±27 (5)b
	<i>Gónadas</i>	49.8±20.6 (3) ^{ab}	49.1±24.9 (3) ^{ab}	41.5±13.1 (4)ab	62.8±18.2 (3)b	49.4±5.5(6)ab	38.8±16.1 (4)a	29.3±20.3 (7)a	28.2±4.6 (4)a
	<i>Huevos</i>	27.9±4.1 (5)a	30.3±7.5(5)a	28.3±4(5)a	28.5±8.8 (5)a				
Glucosa (mg g ⁻¹)	<i>Hemolínfa</i>	0.3± 0.2(5)a	0.2±0.1(4)a	0.3±0.1(5)a	0.2±0.1(5)a	0.3±0.0 (4)a	0.1±0.1(3)b	0.2±0.0(3)b	0.2±0.2 (4)a
	<i>Hepatopáncreas</i>	2.6±1.6(3)a	2.1±2.2(3)a	2.6±2.2(6)a	1.5±1.7(5)a	2±1.6(7)a	1.1±0.9 (4)a	1.6±1.1(7)a	2.8±1.9 (4)a
	<i>Gónada</i>	2±1.9(4)a	3.4±3.2(3)b	3.2±1.9(5)b	1.6±1.9(5)a	1.3±0.8(6)a	0.8±0.3(4)a	1.6±1.2(7)a	3.0±2.6(4)ab
AC:PTS	<i>Hemolínfa</i>	0.003±0.000a	0.003±0.001a	0.003±0.000a	0.002±0.000a	0.002±0.000a	0.003±0.000a	0.002±0.000a	0.002±0.000a
	<i>Hepatopáncreas</i>	0.1±0.0a	0.1±0.0a	0.3±0.2b	0.1±0.0a	0.3±0.2b	0.2±0.2ab	0.2±0.1a	0.2±0.1a
	<i>Gónada</i>	0.2±0.1a	0.1±0.0a	0.1±0.0a	0.1±0.1a	0.1±0.1a	0.2±0.1a	0.5±0.4a	0.3±0.1a
	<i>Huevos</i>	0.4±0.0a	0.4±0.1a	0.3±0.0a	0.3±0.1a				
AC:C	<i>Hemolínfa</i>	1.8±0.2a	2.1±0.5a	2.1±0.2a	1.8±0.4a	2.0±0.3a	2.3±0.1a	1.5±0.4a	2.0±0.3a
	<i>Hepatopáncreas</i>	0.8±0.3a	0.9±0.0a	1.5±0.8a	1.1±0.8a	1.7±0.8a	1.4±0.8a	2±0.8a	1.6±1.0a
	<i>Gónada</i>	2.9±0.3a	2.7±1.5a	1.8±0.4a	2.8±1.4a	1.7±0.7a	2.2±1.7a	2.7±1.7a	2.8±1.5a
	<i>Huevos</i>	1.8±0.3a	1.7±0.1a	1.7±0.1a	1.6±0.4a				

Calidad espermática

A continuación se muestra la Tabla 17, correspondiente a los resultados de calidad espermática de los machos de *L. vannamei*. Los valores de calidad espermática fueron transformados con ayuda de Log10 antes de aplicarles la prueba estadística que consistió en una ANDEVA factorial. En la Tabla 18 se muestran los valores reales obtenidos.

Tabla 17. Calidad espermática de machos reproductores de *L. vannamei*

Parámetro	Tratamiento			
	AC/F	AC/P	F/F	F/P
N	20	20	20	20
Masa (g)	39.0 ± 3.3 ^a	35.2 ± 2.6 ^a	37.4 ± 2.9 ^a	38.8 ± 3.6 ^a
Sobrevivencia (%)	100	90	100	95
Normales (cel/mL) x 10 ⁶ ± ES (x10 ⁻³)	18.1 ± 3.6 ^a	26.8 ± 4.1 ^b	22.2 ± .03 ^a	49.1 ± 5.6 ^c
Anormales (cel/mL) x 10 ⁶ ± ES(x10 ⁻³)	4.9 ± 1.9 ^a	0.9 ± 0.7 ^b	4.9 ± 3.1 ^a	2.1 ± 1.2 ^a
IGS*	1.1±0.1 (5) ^{ab}	1.2±0.1 (6) ^{ab}	1.0±0.1 (5) ^a	1.3±0.1 (9) ^b
IHS*	1.9±0.2 (7) ^a	2.4±0.5 (6) ^{ab}	2.4±0.3 (6) ^{ab}	2.4±0.3 (9) ^b

*IGS (p = 0.02), IHS (p = 0.02)

Respuestas bioquímicas

A continuación se muestran los valores obtenidos para los indicadores de respuesta bioquímica en machos de *L. vannamei* (Tabla 18).

- 1.- No se presentaron diferencias significativas en los desoves ni en las tasas de eclosión para los tratamientos sometidos a experimentación AC/F, AC/P, F/F, y F/P).
- 2.- La prueba de Mann-Whitney para muestras independientes aplicada a la condición de cultivo agua clara (AC) presenta diferencias, siendo AC/P superior de manera significativa (p<0.05).
- 3.- Se observan diferencias significativas (p<0.05) en calidad espermática siendo AC/P los que presentan dicha diferencia.

4.- Es necesario repetir el experimento debido a que la enfermedad presentada por los organismos enmascara los resultados obtenidos y, a pesar de que se observa una tendencia en algunos de los parámetros medidos, ésta no es concluyente.

Tabla 18. Promedios y desviación estándar de los aspectos bioquímicos (metabolitos medidos en hemolinfa, glándula digestiva y gónada) de los machos de *L. vannamei*

		AC/F	AC7P	F/F	F/P
Acilglicéridos	<i>Hemolinfa</i>	0.5±0.1(5) ^a	0.5±0.1(5) ^a	0.5±0(5) ^a	0.4±0.1(5) ^a
	<i>Hepatopáncreas</i>	30.9±11.5(5) ^a	48.6±8.9(5) ^b	44.6±15.8(4) ^a	49.3±6.8(5) ^b
	<i>Gónada</i>	6.5±2.3(6) ^a	5.6±0.7(5) ^a	4.3±0.7(4) ^a	6.2±1.9(7) ^a
Colesterol	<i>Hemolinfa</i>	0.3±0.0(5) ^a	0.3±0.1(5) ^a	0.3±0.0(5) ^a	0.3±0.0(5) ^a
	<i>Hepatopáncreas</i>	10.8±4.6(5) ^a	12.5±5.2(5) ^a	13.4±2.8(4) ^a	14.4±1.3(5) ^a
	<i>Gónada</i>	5.2±2.1(6) ^a	6.6±1.5(5) ^a	3.1±0.0(3) ^b	6.7±1.9(3) ^a
Glucosa	<i>Hemolinfa</i>	0.3±0.1(5) ^a	0.2±0.2(5) ^a	0.3±0.1(5) ^a	0.3±0.1(5) ^a
	<i>Hepatopáncreas</i>	1.0±0.4(5) ^a	1±0.4(5) ^a	1.1±0.7(4) ^a	0.8±0.2(4) ^a
	<i>Gónada</i>	0.9±0.5(4) ^a	0.8±0.2(5) ^a	0.4±0.1(4) ^b	0.7±0.2(7) ^a
Proteínas	<i>Hemolinfa</i>	186.1±21.1(5) ^a	167.9±51.7(5) ^a	181.5±21.3(5) ^a	172±46.3(5) ^a
	<i>Hepatopáncreas</i>	26.1±2.1(5) ^a	29.1±2.5(5) ^a	26±1.9(4) ^a	23.5±7.8(5) ^a
	<i>Gónada</i>	53.7±13.5(6) ^b	47.6±10.9(5) ^b	36.5±6.4(4) ^a	43.7±13.4(6) ^{ab}
Ac: PTS	<i>Hemolinfa</i>	0.003±0.000 ^a	0.003±0.002 ^a	0.003±0.000 ^a	0.003±0.001 ^a
	<i>Hepatopáncreas</i>	1.1±0.4 ^a	1.7±0.3 ^{ab}	1.7±0.5 ^{ab}	2.3±0.7 ^b
	<i>Gónada</i>	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.2±0.1 ^a
Ac:C	<i>Hemolinfa</i>	1.5±0.3 ^a	1.6±0.3 ^a	1.5±0.1 ^a	1.3±0.2 ^a
	<i>Hepatopáncreas</i>	2.9±0.5 ^a	4.3±1.6 ^b	3.4±1.5 ^b	3.4±0.4 ^b
	<i>Gónada</i>	1.3±0.2 ^b	0.9±0.2 ^a	1.3±0.1 ^b	1.1±0.0 ^b

Se aplicaron ANDEVA, de una vía

ANEXO A-4

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS PRODUCIDOS EN ESTA INVESTIGACIÓN Y DEL SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA MARINA

En el área de Reproducción de Camarón se genera muy poca materia orgánica, el estimado es de 50 g de masa húmeda cada día (Arévalo, *com. pers.*, 2014). Considerando 40 días de experimentos, se obtuvieron 2 kg de residuos para ser dispuestos de manera ecológica.

El material era lavado diariamente con abundante agua dulce (filtros de cartucho, tinas de desove y eclosión, cubetas, redes de cuchara, espumadores, etc.), la materia orgánica resultante era desechada directamente al sistema de drenaje general de la UMDI (líneas azules en las Figuras 3 a 5), que desemboca en un sistema de lagunas de sedimentación (Figura 3) reforestado con mangle (*Rhizophora mangle* y *Conocarpus erectus*) y otras especies vegetales (*Salicornia sp.*). Solamente se generaron desechos químicos cuando se midieron amonio, nitritos y nitratos. Estos desechos fueron almacenados en contenedores de vidrio y posteriormente trasladados al Laboratorio Central de la UMDI donde fueron guardados en contenedores especiales y entregados a la empresa recolectora ECOLSUR para un manejo final de los residuos ecológicamente aprobado.

En las Figuras 3, 5 a 7 se describe el flujo del agua (líneas rojas) de mar que llega al área y la distribución en ésta.

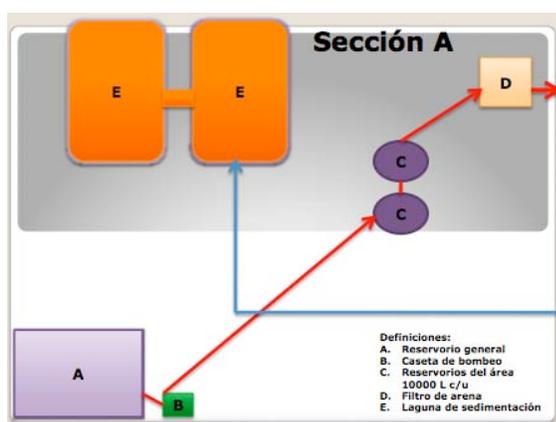


Figura 3. Esquema de distribución de agua de mar y drenaje

El agua de mar es extraída y almacenada en un reservorio general con capacidad para 100 000 L. Posteriormente, fue bombeada a los reservorios del área con ayuda de una bomba Wisperflow de 5hp. El agua fue almacenada en los reservorios del área con capacidad de 10,000 L cada uno (Figura 3, letra C), siendo recirculada durante 24 horas y ozonificada (Figura 3, letra D).

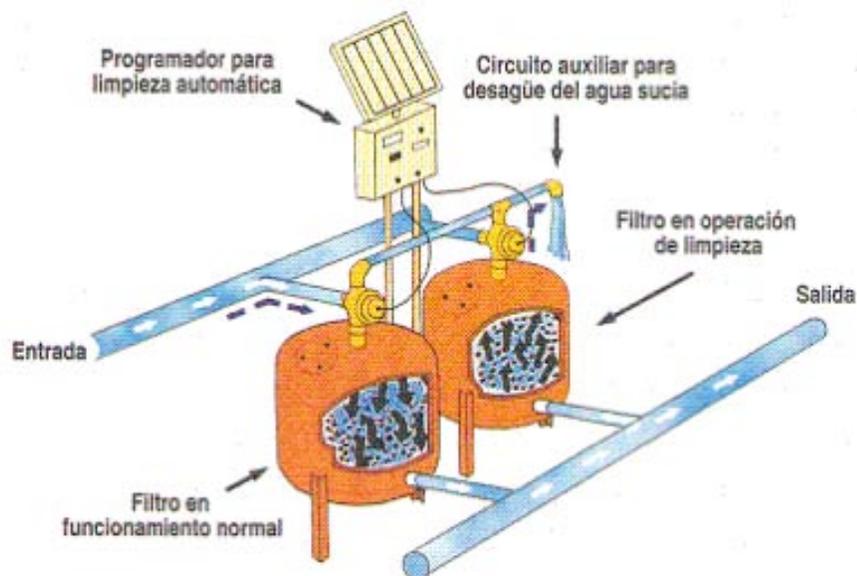


Figura 4. Filtros de arena, imagen tomada de <http://ocwus.us.es>

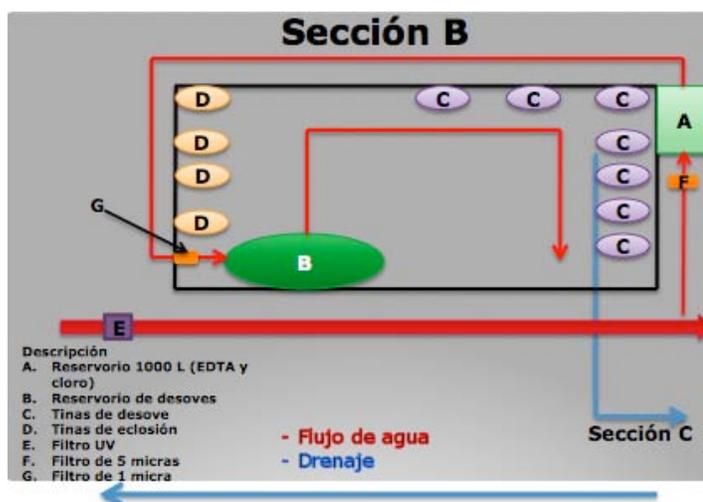


Figura 5. Esquema de distribución de agua en las áreas de Desove y Eclosión

Posteriormente, pasaba por un filtro de arena (Figura 4), donde el agua era filtrada para captar materia orgánica, algas o zooplancton. Se tenían conectados al filtro de arena unos cartuchos de filtración de 25 y 10 micras: La Figura 4 muestra un programador de limpieza, en realidad se realiza de manera manual.

El agua, una vez que pasaba por el filtro de arena y los filtros de cartucho, era llevada a continuación a una lámpara UV para eliminar bacterias y otros organismos (Figura 5, letra E). Desde ese punto se distribuía el agua al área de Desove y Eclosión y al área de Maduración (Sección B, Figura 5).

El área de Desove y Eclosión contaba con 2 reservorios (Figura 5, letras A y B). En el reservorio A (Figura 5) el agua era filtrada con un filtro de cartucho de 5 micras (Figura 5, letra F), clorada a razón de 0.3 mL de cloro por litro de agua y se agregaba también EDTA a razón de 0.01g por L de agua. Se dejaba reposar durante 24 horas con abundante aireación antes de ser bombeada al reservorio B (con un filtro de 1 micra). En este reservorio el cloro era neutralizado con una solución de trabajo de tiosulfato de sodio utilizando 0.06 mL de solución de trabajo por litro de agua a neutralizar (la solución de trabajo se preparaba diluyendo 250 g de tiosulfato de sodio en 1 L de agua).

Una vez neutralizado el cloro y agregado el EDTA, 3 horas después eran llenadas las tinas de Desove (Figura 5, letra C con capacidad de 100 L) y las tinas de Eclosión (Figura 5 letra D con capacidad de 40 L). El agua que era desechada de esta área pasaba al sistema de drenaje general (Figura 5, líneas azules). En el área de desove y eclosión la cantidad de materia orgánica que se generaba era mínima, y provenía principalmente de huevos que no eclosionaban.

La línea de distribución de agua de mar continuaba al área de Maduración (Figura 6, Sección C). El recambio era del 300% semanal (3 recambios de 100% a la semana), el agua era desechada al drenaje general (Figura 6, líneas azules). El agua se recircula continuamente en dos vías:

- 1) De las tinas de maduración al espumador (Figura 6, letra D) para atrapar la materia orgánica y por otra tubería fluye el agua del espumador (ya limpia) hacia los estanques de Maduración.

2) El agua de las tinas de maduración se encontraba conectada a un sistema de recirculación con filtro biológico, dispuesto de la siguiente manera: filtro mecánico (Figura 6, número 1), seguidamente el agua pasaba al espumador (Figura 6, número 2) y, finalmente, al biofiltro (Figura 6, números 3 y 4). En la Figura 7 se encuentra el esquema de circulación de agua por el sistema de filtrado.

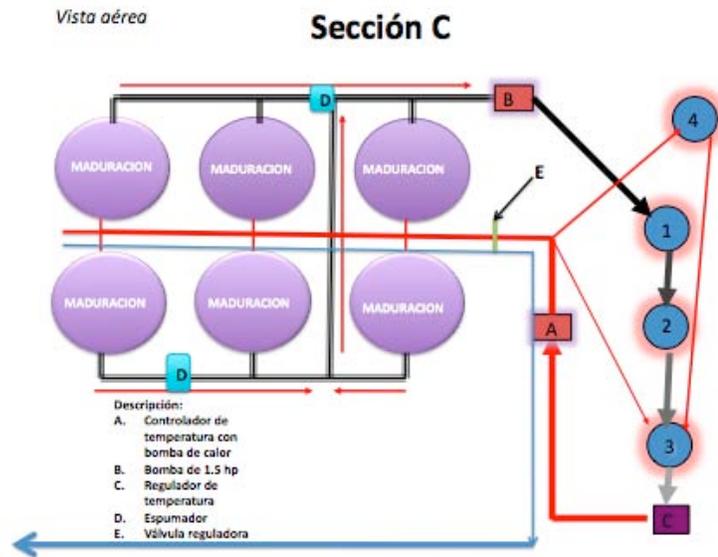


Figura 6. Esquema de distribución del área de Maduración (imagen de Arévalo, *com. pers.*, 2014)

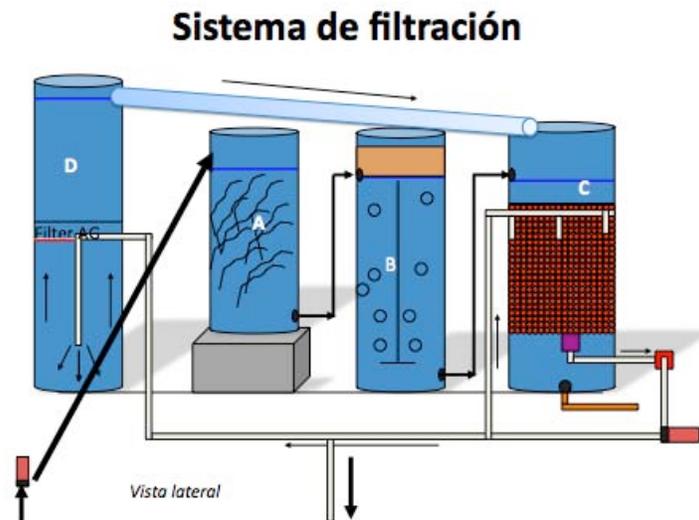


Figura 7. Esquema de filtración de agua del área de Maduración (imagen de Arévalo, *com. pers.*, 2014)

De las tinas de Maduración pasaba al filtro mecánico (letra A), luego al desfragmentador de materia orgánica (espumador, letra B) y, a continuación, a los Biofiltros C y D colonizados con bacterias nitrificantes.

Será importante, a futuro, evaluar los efluentes líquidos enviados al drenaje para considerar una planta de tratamiento de aguas residuales empleando el sistema patentado por la UNAM de humedales artificiales (Durán-Domínguez-de-Bazúa y Luna-Pabello, 2002) para la UMDI, ya que es un sistema ambientalmente idóneo para las instalaciones.

Notas:

La materia orgánica proveniente de los residuos del alimento y de las mudas fueron enterrados en un área destinada para este fin dentro del terreno de la UMDI, a una profundidad de 40 cm aproximadamente. Ya sumando esta materia orgánica tal vez se tengan aproximadamente 150 gramos en total de materia orgánica cada segundo día.

Considerando que los experimentos duraron 40 días, el total de materia orgánica producida fue de 3 kg enterrada durante toda la experimentación.

No se realizó ningún tipo de análisis químico a los residuos obtenidos durante los 40 días de experimentación pues no se consideraba parte de la rutina diaria de dicha área.

BIBLIOGRAFÍA

- Alava, V.R., Kanazawa, A., Teshima, S., Koshio, S. 1993. Effect of dietary phospholipids and *n*-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of Kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59 (7), 345 – 351.
- Alfaro-Montoya, J. 2010. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): A review. *Aquaculture*. 300, 1–9.
- Álvarez M., Cahu C., Stéphan G., 1989. Teneur en alpha-tocopherol des oeufs et des organes des reproducteurs de *Penaeus indicus*. *Océanis*. 15(4), 553-560.
- Andriantahina, F., Liu, X., Huang, H., Xiang, J., Yang, C. 2012. Comparison of reproductive performance and offspring quality of domesticated Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 324-325, 194–200.
- Aquacop. 1989. Selected ingredients for shrimp feed. Advances in tropical aquaculture, Tahiti, 20 feb- 4 march 1989. *Aquacop. IFREMER actes colloque*. 9, 405-412.
- Arnold, S. J., Coman, G.J., Burridge, C., Rao, M. 2012. A novel approach to evaluate the relationship between measures of male fertility and egg fertilization in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 338–341, 181–189.
- Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbiol blocs by tilapia in minimal discharge bio-floc technology ponds. *Aquaculture*. 264, 140-147.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 86, 248-254.
- Braga, A.L., Nakayama, C.L., Martins, J.G., Colares, E.P., Wasielesky, W. 2010. Spermatophore quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Dendobranchiata) broodstock fed with different maturation diets. *Aquaculture*. 307, 44-48.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. *Journal of the World Aquaculture Society*. 21(1), 41-52.

Bray, W. A., Lawrence, A. L. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: Fast, A., Lester, L.J. (Eds). *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 93-170.

Cahu, C., Quazugel, P. 1989. Lipid metabolism of *Penaeus vannamei* broodstock: influences of dietary lipids. *European Aquaculture Society Special Publications*. 10, 45-46.

Cahu C., Guillaume J.C., Stéphan G., Chim, L. 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. *Aquaculture*. 126, 159-170.

Cahu, C.L., G. Cuzon, Quazuguel, P. 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, *α*-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Camp. Biochem. Physiol.* 314 (112A), 417-424.

Cahu, C.L. 1998. Diets of shrimp broodstock and their effect on larval quality. IV Simp. Aquatic. Nutrition. 15-18 Nov. La Paz, BCS. México.

Cahu, C. 2000. Dietas para reproductores de camarón y su efecto en la calidad larvaria. pp 65-72. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

Cavalli, R.O., Scardua, M.P., Wasielesky, W. Jr. 1997. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *Journal of the World Aquaculture Society*. 28(3), 260-267.

Cevallos-Vázquez, B., Palacios, E., Aguilar-Villavicencio, J., Racotta, I. 2010. Gonadal development in male and female domesticated whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in relation to age and weight. *Aquaculture*. 308, 116–123.

Chamberlain, G. W., Lawrence, A.L. 1981. Maturation reproduction and growth of *P. vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. *Journal of the World Aquaculture Society*. 12, 209-224.

Chamberlain, G.W. 1988. Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp. Ph.D. Thesis, Department of Wildlife and

Fisheries Sciences, Texas A & M University, USA.

Chang, E., Sagi, A. 2008. Male reproductive hormones. *Reproductive Biology of Crustaceans* (Ed. Mente, E.). pp. 299-318. Enfield, NH: Science Publisher.

Cho, Y.C., Kaushik, S., Woodward, B. 1992. Dietary arginine requirement of young rainbow trout (*O. mykiss*). *Camp. Biochem. Physiol.* 1 (102A), 211-216.

Coman, G.J., Crocos, P.J. 2003. Effect of age on the consecutive spawning of ablated *Penaeus semisulcatus* broodstock. *Aquaculture.* 219, 445 – 456.

Coman, G.J., Arnold, S.J., Callahan, T.R., Preston, N.P. 2007a. Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture.* 263, 75 – 83.

Coman, G.J., Arnold, S.J., Jones, M.J., Preston, N.P. 2007b. Effect of rearing density on growth, survival and reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture.* 264, 175 – 183.

Cuzon, G., Gehin, B. 1998. Native WHG as a Potential Protein Source for Aquafeeds. Proceedings conference WAS, Las Palmas.

Cuzon, G., Gaxiola, G., Rosas, C. 2008a. Nutrition in Relation to Reproduction in Crustaceans. In: Mente, Elena (eds). *Reproductive Biology on Crustaceans, Case Studies on Decapod Crustaceans*. Edit. Science Publishers. USA. Pp. 319-364.

Cuzon, G., Goguenheim, J.L., Gaxiola, G., Aquacop. 2008b. “Floc” Contribution to Peneid Intensive Culture. 365- 381 pp. Editores: Cruz Suárez, E., Ricque Marie, D., Tapia Salazar, M., Nieto López, M. G., Villarreal Cavazos, D. A., Juan Pablo Lazo, J.P., Viana, Ma. T. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

Deshimaru, O., Shigeno, K. 1980. Introduction to the artificial diet for prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture.* 115-133.

DOF. 2009. DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de

unidades de medida. CUARTO.- Se modifica el encabezado de la tabla 13 para quedar como sigue: Tabla 21 - Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. Diario Oficial de la Federación: Jueves 24 de septiembre de 2009. Poder Ejecutivo Federal. México D.F., México.

Durán Domínguez de Bazúa María del Carmen y Luna Pabello Víctor Manuel. 1998. Humedales artificiales de flujo horizontal o vertical, procedimiento para tratar aguas residuales. Solicitud de Registro: Diciembre 15, 1998. Cesión irrestricta de derechos a la UNAM. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Dirección Divisional de Patentes. Patente Núm. 210924. Otorgada el 21 de octubre de 2002. México.

Emerenciano, M.G.C. 2007. Flocos microbianos: aspectos zootécnicos do cultivo do Camarao-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Disertación de maestría. Universidad Federal do Río Grande-RS, 47p.

Emerenciano, M. 2009a. Reproductive performance of tank-reared and wild broodstock *Farfantepenaeus duorarum* pink shrimp. World Aquaculture Society Meeting 2009, Veracruz. CD of Abstracts.

Emerenciano, M. 2009b. Haemolymph metabolites comparison from tank-reared and wild broodstock *Farfantepenaeus duorarum* pink shrimp from different spawns. World Aquaculture Society Meeting 2009, Veracruz. CD of Abstracts.

Emerenciano, M., Cuzon, G., Mascaró, M., Arévalo, M., Noreña, E., Jerónimo, G., Racotta, I.S., Gaxiola, G. 2012. Reproductive performance, biochemical composition and fatty acid profile of wild-caught and 2nd generation domesticated *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) broodstock. *Aquaculture*. 344-349, 194-204.

Emerenciano, M.G. 2012. Biofloc technology (BFT) application on reproduction of penaeid shrimp (Decapoda, Penaeidae) and its effects on biochemical composition and fatty acid profile. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. 207 p.

Fenucci, J.L., Fernández, A.F., 2004. Acción de las vitaminas en la dieta de camarones *Penaeoideos*. In: Cruz Suárez, L. E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U., González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, Hermosillo, Sonora, México.

Fisher, L.R., Kon, S.K., Thomson, S.Y. 1956. Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates. V. Mollusca: Cephalopoda. *J. Mar. biol. Ass. U.K.* 35, 63-80.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 266, 497-509.

Foster, I., Dominy, W., Tacon, A.G.J. 2002. The use of concentrates and other soy products in shrimp feeds. In: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Mariee D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés G., Simoes N. (eds). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3-6 de Septiembre del 2002. Cancún. México.

Fox, J.M., Lawrence, A.L., Li-Chan, E. 1995. Dietary requeriment for lisien by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acids sources. *Aquaculture.* 131(3-4), 279-290.

Gaxiola, M.G., Ceccaldi, H.J., Cuzon, G. 2013. Foods vs feed: what makes the point with shrimp?. *J. Nutrition & Metabolism*. Unpublishing results.

Galgani, M.L., Aquacop., Goguenheim, F., Cuzon, G. 1989. Influence du régime alimentaire sur la reproduction en captivité de *Penaeus uannamei* et *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture.* 80, 97-109.

Goimier, Y., Pascual, C., Sánchez, A., Gaxiola, G., Sánchez, A., Rosas, C. 2006. Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Anim. Reprod. Sci.* 92, 193-208.

Grevé, P., Sorokine, O., Berges, T., Lacombe, C., Van Dorsselaer, A., Martin, G. 1999. Isolation and amino acid sequece of a peptide with vitellogenesis inhibiting activity from the terrestrial isopod *Armadillium vulgare* (Crustacea). *Gen. Comp. Endocrin.* 115, 406-

414.

Guitart, B., Quintana, M. 1978. Estudio de la maduración gonadal en las especies comerciales importantes del género *Penaeus* en el Banco de Campeche. *Rev. Inv. Mar.* 3 (1), 82-126.

Harrison, K. E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *Journal of Shellfish Research*, 9(1), 1-28.

Hoa, N.D., Wouters, R., Wille, M., Thanh, V., Dong, T.K., Van Hao, N., Sorgeloos, P. 2009. A fresh-food maturation diet with an adequate HUFA composition for broodstock nutrition studies in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). *Aquaculture*. 297, 116–121.

Huai, M. Y., Liu, Y. J., Tian, L. X., Deng, S. X., Xu, A. L., Gao, W., Yang, H. J. 2010. Effect of dietary protein reduction with synthetic amino acids supplementation on growth performance, digestibility, and body composition of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture international*. 18(3), 255-269.

Jensen, A., Sakshaug, E. (1970) Producer-consumer relationships in the sea. 1. Preliminary studies on phyto- plankton density and *Mytilus* pigmentation. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 5, 180-186.

Jiang, S.G., Huang, J. H., Zhou, F.L., Xu, C., Yang, Q.B., Wen, W.G., Ming, Z. 2009. Observations of reproductive development and maturation of male *Penaeus monodon* reared in tidal and earthen ponds. *Aquaculture*. 292, 121–128.

Lavens, P., Sorgeloos, P. 1991. Chapter XIII: Production of *Artemia* in culture tanks. In: *Artemia Biology*. R.A. Browne, P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (Eds). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA, pp 317-350.

Lawrence, A.L., Akamine, Y., Middleditch, D.S., Chamberlain, G., Hutchins, D. 1980. Maturation and reproduction of *Penaeus setiferus* in captivity. *Proc. World Maric. Soc.* (11), 481-487.

Leung-Trujillo, J. R., Lawrence, A. L. 1987. Observation the decline in sperm quality on *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture*. 65, 367-370.

- Luna-Rodríguez, A., Medina-Reyna, C.E., Pedroza-Islas, R., Durán-Domínguez-de-Bazúa, C. 2008. Oleous extraction of carotenoids from shrimp cephalothorax and its effect on a microencapsulated diet with Nauplii larvae. *Journal of Aquatic Food Product Technology. J. Aq. Food Prod. Technol.* 17(4), 367-386.
- Maldonado-Flores, J.C. 2007. Efecto de alimentos ricos en proteínas vegetales en la nutrición, fisiología digestiva y balance bioenergético de reproductores de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de grado maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 69.
- Marsden, G.E., McGuren, J.J., Hansford, S.W. 1997. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 149, 145-156.
- McNamara, J. C., Rosa, J., Greene, L.J., Augusto, A. 2004. Free amino acid pools as effectors of osmótica adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 3 (37), 193–208.
- Meunpol, O., Panadda, M., Piyatiratitivorakul, S. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research*. 36, 1216-1225.
- Meusy, J.J., Payen, G. 1988. Female reproduction in malacostraca crustacea. *Zoological Sciences*. 5, 217-266.
- Naessens, E., Lavens, P., Gómez, L., Browdy, C. L., McGovern-Hopkins, K., Spencer, A.W., Kawahigashi, D., Sorgeloos, P. 1997. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations. *Aquaculture*. 155, 87-101.
- Nascimento, I.A., Bray, W.A., Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A. 1991. Reproduction of ablated and unablated *Penaeus schmitti* in captivity using diets consisting of fresh-frozen natural and dried formulated feeds. *Aquaculture*. 99, 387-398.
- Ortiz-Guillén, S. 2009. Efecto de concentrados proteicos vegetales sobre la digestibilidad aparente y la fisiología enzimática digestiva del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus*

vannamei (Boone, 1931). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Campeche. Campeche, México. 92 pp.

Otazu-Abril, M., Martin, B.J., Ceccaldi, H.J. (1982). Influence des acides aminés libres purifiés ajoutés Dans les aliments composés, sur le métabolisme des pigments carotenoides chez *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*. 28, 303-309.

Palacios, E., Perez-Rostro, C.I., Ramirez, J.L., Ibarra, A.M., Racotta, I.S. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp *Penaeus vannamei* reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture*. 171, 309 – 321.

Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*. 185, 353-371.

Partali, V., Tangen, K., Liaaen-Jensen, S. 1989. Carotenoids in food chain studies III. Resorption and metabolic transformation of carotenoids in *Mytilus edulis* (edible mussel). *Comp. Biochem. Physiol.* 2 (92B), 239-246.

Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sánchez, A., Ramos, L., Soto, L.A., Rosas, C., 1998. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *J. World Aquac. Soc.* 29, 447–484.

Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C., 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*. 218, 637–650.

Patrois, J., Cuzon, G., Aquacop. 1990. Mise au point d'un aliment maturation, i comparación de 3 alimentos, cas de *P. vannamei*. Report Interne IFREMER COP Tahití, 13 pp.

Peixoto, S., Wasielesky, W., D'Incao, F., Cavalli, R.O. 2003. Comparison of the reproductive performance of similarly-sized wild and captive *Farfantepenaeus paulensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 34 (1) 50-56.

Peixoto, S., Wasielesky, Jr. W., Martino, R. C., Milach, A., Soares, R., Cavalli, R.O. 2008. Comparison of reproductive output, Offspring quality, ovarian histology and fatty acids composition between similiary-sized wild and domesticated *F. paulensis*. *Aquaculture*. 285, 201-206.

Pérez-Velázquez, M., González, M. L., Lawrence, A. L., Bray, W. A. 2003. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Journal of the World Aquaculture Society*. 34(1), 92-98.

Primavera, J.H., 1984. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. Proceedings of 1st International Conference on Culture of Penaeid Prawns/Shrimps, SEAFDEC Aquaculture Dept., Iloilo, Philippines.

Ravid, T., Tietz, A., Khayat, M., Boehm, E., Michelis, R., Lubzens, E. 1999. Lipid accumulation in the ovarios of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (De Haan). *The Journal of Experimental Biology*. 202, 1819–1829.

Regueira, E., Tizol, R., Artiles, M.A. 1999. Efecto de alimentos naturales sobre la maduración y reproducción del camarón blanco (*Penaeus schmitti*). *Bol. Centr. Invest. Biol.* 33(3), 141-152.

Rendón-Cabrera, M. L. (1997). Efecto de tres alimentos artificiales complementarios sobre la maduración de hembras ablacionadas del camarón blanco del Golfo de México *Penaeus setiferus* (Linneo, 1767), en condiciones controladas. Tesis de grado licenciatura. Universidad Autónoma de Campeche. Pp 41.

Richard, P. 1980. Le metabolisme amino acide de *Palaemon serratus*: variations des acides aminés libres du muscle et de l'hépatopancreas au tours du cycle de mue. *Comp. Biochem. Physiol.* 67A, 553-560.

Richard, P., Ceccaldi, H.J. 1975. Variations des acides aminé libres du muscle et de l'hépatopáncreas de *Penaeus kerathurus* (Forskall) en fonction de la dessalure. *Proc. 9th Mar. Biol. Symp.* 451-461.

Rothlisberg, P. C., Crocos, P. J., Smith, D. M. 1991. The effect of diet and ablation on maturation, spawning, hatching and larval fitness of *Penaeus esculentus*. In : P. Lavens, P.

Sorgeloos, E. Jasper y F. Ollevier (Editors). Larvi 91- Fish and Crustacean Larviculture Symposium. August, 1991. European Aquaculture Society Special Publication. 15, pp 247-250.

Sainz-Hernández, J. C., Racotta, I. S., Dumas, S., Hernández-López, J. 2008. Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*. 283, 188-193.

Smith, D M; Dall, W. 1991. Metabolism of proline by the tiger prawn *Penaeus sculentus*. *Marine Biology. Berlín, Heidelberg*. 110(1), 85-91.

Teshima, S.I., Kanazawa, A., Yamashita, M. 1986. Dietary value of several proteins and supplemental amino acids for larvae of the prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 51, 225-235.

Teshima, S., Kanazawa, A., Horinouchi, K., Koshio, S. 1988. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus japonicus*: induced maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 54(7), 1123–1129.

Valenzuela-Jiménez, M.A. 2009. Condição fisiológica e imunologica do camarão-rosa do Golfo do México *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) cultivado em sistema BFT (Bio Floc Technology). Dissertação de mestrado. FURG, Rio Grande-RS. 113p.

Vargas, A. F., Guzmán, M. M. A., Ochoa, J. L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 106A, 299-303.

Vazquez-Boucard, C.G., Patrois, J., Ceccaldi, H.J. 2004. Exhaustion of lipid reserves in the hepatopancreas of *Fenneropenaeus indicus* broodstock in relation to successive spawnings. *Aquaculture*. 236, 523 – 537.

Villette, M. 1990. Influence des fosfolipides et de l'α-tocopherol sur les performances de reproduction de *Penaeus indicus*. Mémoire DAA ENSAT, Brest, 49 pp.

Wasielesky Jr., W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C. L. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive system for

white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 258, 396-40.

Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*. 202,1-21.

Wouters, R., Nieto, J., Sorgeloos, P. 2002a. Dietas artificiales para el camarón peneido. *Boletín Nicovita*. 7(1).

Wouters, R., Zambrano, B., Espin, M., Calderon, J., Lavens, P., Sorgeloos, P. 2002b. Experimental broodstocks diets as parcial fresh food substitutes in White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 8, 249-256.

Van Wyk, P. 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. In: P. Van Wyk, M. Davis-Hodgkins, R. Laramore, K.L. Main, J. Mountain & J. Scarpa. (eds.). Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Harbor Branch Oceanic Institute, Florida, pp. 125-139.

Xu, X.L., Ji, W.L., Castell, J.D., O'Dor, R.K. 1994. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn *Penaeus chinensis* broodstock. *Aquaculture*. 119, 359-370.

Zar, J. H. 1984. Biostatistical Analysis. Editorial Prentice-Hall Inc. Englewood cliffs, N. J., 661 pp.

Referencias en línea: www.Nutrafed.com

