



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL  
NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA HARINA DE *Spirulina platensis* COMO  
ALIMENTO Y ADITIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
POSTLARVAS DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus schmitti* (Pérez-  
Farfante y Kensley, 1997)**

## **TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

en

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

Presenta

**Barbarito Jesús Jaime Ceballos**

La Paz, B.C.S. Noviembre, 2006

## **COMITÉ TUTORIAL Y DE REVISIÓN DE TESIS**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. HUMBERTO VILLARREAL COLMENARES**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Mar Bermejo No 195 Col Playa

Palo de Santa Rita. La Paz, 23090, Baja California Sur. México.

**CO-TUTORA: DRA TSAI GARCÍA GALANO**

Centro de Investigaciones Marinas- Universidad de la Habana

Ave 16 entre 1ra. y 3ra. Miramar, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba.

**DR. ALFREDO HERNÁNDEZ LLAMAS**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

**DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

**DR. HÉCTOR NOLASCO SORIA**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

DR. HUMBERTO VILLARREAL COLMENARES	CIBNOR, S. C.
DRA. TSAI GARCÍA GALANO	CIM. UH, CUBA
DR. ALFREDO HERNÁNDEZ LLAMAS	CIBNOR, S. C.
DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO	CIBNOR, S. C.
DR. HÉCTOR NOLASCO SORIA	CIBNOR, S. C.
DR. HERVEY RODRÍGUEZ GONZÁLEZ (SUPLENTE)	CIBNOR, S. C.

## Resumen

El alto costo que conlleva el empleo de microalgas vivas, los riesgos de contaminación del cultivo larvario por el uso de las mismas, y las variaciones en las condiciones de cultivo sobre el valor nutritivo de las algas, constituyen un problema para cualquier operación de larvicultura. El precio que han alcanzado los quistes de *Artemia* en el mercado internacional y las necesidades cada vez superiores en Cuba, a consecuencia del desarrollo de la camaronicultura, han hecho imprescindible la búsqueda de alternativas de alimentación que puedan de forma satisfactoria disminuir el consumo de alimento vivo en la larvicultura del camarón. La harina de la microalga *Spirulina platensis* que se produce en Cuba de forma comercial, posee características nutricionales adecuadas para su utilización como alimento para el cultivo de animales acuáticos, por lo que en este trabajo de tesis se propone determinar el valor nutricional de dicho recurso, en el esquema de alimentación de larvas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, como: a) sustituto de alimento vivo fitoplanctónico de protozoas; b) aditivo en alimentos microparticulados, a fin de sustituir a los nauplios de *Artemia* para las fases de mysis y postlarva, y c) atrayente en el alimento. Los experimentos se realizaron en el Centro de producción de postlarvas de camarón, Yaguacam, Provincia Cienfuegos, Cuba. Se realizaron 5 experimentos, donde se aplicaron diseños totalmente al azar en la alimentación de larvas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, en los estadios de protozoa P<sub>I</sub> a P<sub>III</sub> y mysis M<sub>I</sub> – PL<sub>I</sub>. En un primer experimento se evaluaron tres especies de microalgas secas: *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* y dos cepas de *Spirulina* sp. (GENIX y EARTHRISE) en la alimentación de protozoas en un ensayo con tres réplicas; el control consistió en la combinación de cultivos *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Tetraselmis tetrathele*. Los resultados demostraron que las protozoas de *L. schmitti* son capaces de consumir microalgas secas. La microalga que permitió obtener los mejores resultados en cuanto a longitud total, índice de desarrollo y supervivencia fue la harina de *Spirulina platensis* (HSP) de GENIX. Con la combinación de la harina de *Spirulina* y microalgas vivas se alcanzaron resultados similares con respecto al control. En función a estos resultados se realizó un segundo experimento donde se evaluó la respuesta nutricional de las protozoas de *L. schmitti* ante diferentes niveles de sustitución (S) de *Chaetoceros muelleri* por HSP (0, 25, 50, 75 y 100 %), con el propósito de buscar el nivel óptimo de sustitución. La longitud final (LF) de las larvas para los diferentes niveles de sustitución varió de 1.98 a 3.16 mm, encontrándose una relación significativa entre el nivel de sustitución (S) y la longitud final (LF), la cual fue descrita a través de la ecuación  $LF = 2.853 + 0.01598 S - 0.000233 S^2$  ( $p < 0.01$ ), alcanzando un valor óptimo con 34.2% de sustitución. El índice de desarrollo (ID) varió en un intervalo entre 2.84 y 3.93, y fue dependiente del nivel de sustitución (S), de acuerdo a la ecuación  $ID = 3.799 + 0.00945 S - 0.000189 S^2$  ( $p < 0.01$ ). El valor máximo de ID se obtuvo con un 25% de sustitución. La supervivencia fue alta en todos los tratamientos (82 – 87%). En función a los resultados, y para lograr una mejora simultánea de LF e ID, se sugiere un nivel de sustitución de *Chaetoceros muelleri* por HSP de 30%. En el tercer experimento, de alimentación del estadio mysis, la harina de *Spirulina platensis* fue incluida en porcentajes de 0, 2.5 y 5, como aditivo en un alimento microparticulado, y evaluada en un diseño experimental con 4 tratamientos y tres repeticiones, utilizando nauplios de *Artemia* como control. El índice de desarrollo (ID) fue más alto a medida que se incrementó el nivel de

HSP, encontrándose una relación significativa entre estos dos factores ( $r^2= 0.9868$ ). Las larvas que consumieron el alimento vivo y la dieta con 5% de HSP tuvieron supervivencias e ID similares, sin embargo, las que consumieron los alimentos con 0 y 2.5% de HSP fueron inferiores ( $p<0.05$ ) al control. El cómputo químico de los alimentos microparticulados ensayados mostró la similitud de las dietas en cuanto a su composición proteica, y el patrón aminoacídico reportado para postlarvas de *L. schmitti*. Se sugiere que es posible utilizar el microparticulado con 5% de HSP como sustituto parcial de nauplios de *Artemia*. Tomando como base estos resultados, en el cuarto experimento el objetivo consistió en determinar el nivel óptimo de sustitución de nauplios de *Artemia* por el alimento microparticulado enriquecido con 5% de harina de *Spirulina*. Se evaluaron 5 tratamientos por triplicado donde se sustituyeron 0, 25, 50, 75 y 100% de las raciones de *Artemia* por alimento microparticulado enriquecido con *Spirulina*. El índice de desarrollo varió en un intervalo de 6.15 a 6.86 para los diferentes niveles de sustitución (S). Se estableció una relación entre ambos factores a través del método de “línea quebrada” descrita según la ecuación  $ID = ((6,82556) + 0*S)*(S \leq 7) + ((8,31) + (-,18)*S)*(S > 7)$ . El intercepto de las rectas indicó que el valor óptimo de sustitución de raciones de nauplios de *Artemia* por alimento microparticulado es 66.6%, correspondiendo a la combinación de 8 raciones de microparticulado y 4 de *Artemia* en 24 horas. El quinto experimento se realizó en el laboratorio húmedo del Centro de Investigaciones Pesqueras, La Habana, Cuba, con un diseño totalmente aleatorizado (4 tratamientos con 6 repeticiones). Se evaluó el poder atrayente de la harina de *Spirulina platensis* como aditivo en la alimentación de *Litopenaeus schmitti*, con respecto a un control, dentro de un dispositivo experimental consistente en un acuario rectangular al que se le colocaron dos divisiones de vidrio, que permitieron que el acuario quedara dividido en tres compartimentos iguales. Diez camarones con peso promedio de  $0.503 \pm 0.018$  g se colocaron en la sección central, que tiene acceso a los otros dos compartimentos del acuario. Los resultados mostraron que el alimento que contenía harina de *Spirulina* fue más atractivo para juveniles de esta especie, concluyendo que es posible mejorar la atractabilidad de los alimentos para camarón con la inclusión de 5% de harina de *Spirulina platensis*, y que el dispositivo experimental utilizado permite evaluar el efecto atrayente de dietas formuladas para camarones.

**PALABRAS CLAVE:** Harina de *Spirulina platensis*, *Litopenaeus schmitti*, alimentación, larvas, aditivo alimenticio, atrayente.

## ABSTRACT

The high cost of using live microalgae and the variations in nutritional value during larval culture constitute a problem for any operation relying on the massive culture of unicellular microalgae. The price of *Artemia* cysts in the international market and the increasing demand in Cuba, due to the development of the shrimp culture industry, has made essential the search of feeding alternatives that diminish the live food consumption in shrimp larviculture. *Spirulina platensis* meal (SPM), produced commercially in Cuba, has optimal nutritional characteristics to be used as a food ingredient in any aquatic animal culture.

For that reason in this thesis we set out to improve the efficiency in the production of *Litopenaeus schmitti* shrimp postlarvae, through the inclusion of SPM in the feeding schedule by testing it as: a) substitute of fitoplanctonic food in the protozoa stage; b) feed additive in microparticulate diets in order to replace *Artemia* nauplii used in mysis and postlarvae feeding; and c) an attractant in feeds for juveniles. Four experiments were carried out at the Yaguacam Hatchery, Cienfuegos Province, Cuba, using a completely randomized experimental design. In the first trial, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella saline* and two stocks of *Spirulina* sp. (GENIX and EARTHRISE) meals were fed, in triplicates, to protozoa. The control consisted of a combination of *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* and *Tetraselmis tetrathele*. The results demonstrated that *L. schmitti* larvae consuming micralgae meal (SPM) and microalgae, produced similar results to those obtained with the control treatment. *Spirulina platensis* meal (SPM) from GENIX promoted the best results in final length, development index and survival. A second experiment evaluated the nutritional response of *L. schmitti* larvae to different substitution levels (S) of *Chaetoceros muelleri* by SPM (0, 25, 50, 75 and 100 %). Final larval length (FL) varied from 1,98 to 3,16 mm, with a significant relationship between the level of substitution (S) and FL, described by the equation:  $FL = 2,853 + 0,01598 S - 0,000233 S^2$  ( $p < 0.01$ ). Optimum substitution level was 34.2%. The development index (DI) varied between 2.84 and 3.93 depending on the substitution level (S). The equation was  $ID = 3.799 + 0.00945 S - 0.000189 S^2$  ( $p < 0.01$ ), with a maximum DI value at 25% substitution. Survival was high for all treatments (82-87%). From the results obtained, a substitution level of *C. muelleri* by SPM of 30% to obtain simultaneous improvement in FL and DI is suggested. In the third experiment, SPM was included as feed additive (0, 2.5 and 5%) in microparticulated diets for mysis and tested in triplicate. *Artemia* nauplii were used as control. DI was higher when SPM level increased, with a significant relationship between these two factors ( $r^2 = 0.98$ ). Larvae that consumed live food and the 5% SPM diet had similar survival and DI compared to the control. Nevertheless, those that consumed feeds with 0 and 2.5% SPM were smaller ( $p < 0.05$ ) than the control. The chemical score of the three microparticulated diets showed that diets were similar in protein composition and the *L. schmitti* postlarvae aminoacid profile. Results suggest that it is possible to use the 5% SPM microparticulated diet as partial substitute for *Artemia* nauplii. The fourth experiment consisted of determining the optimal *Artemia* nauplii substitution level by SPM5. Five treatments with three replicates were applied, where 0, 25, 50, 75 and 100% of the *Artemia* rations were replaced by the SPM5 microparticulated diets. The DI varied from 6.15 to 6.68 for the different levels of substitution (S). The relationship between both factors was

described by the broken line method as  $DI = ((6,82556) + 0*S)*(S \leq 7) + ((8,31) + (-,18)*S)*(S > 7)$ . The intercept of the straight lines indicated that the optimal substitution value of *Artemia* nauplii by microparticulate food is 66.6%, corresponding to the combination of 8 rations of microparticulate and 4 of *Artemia* per day. In the fifth experiment the capacity of *Spirulina* meal as attractant was evaluated at the Fisheries Research Center laboratory in Habana, Cuba, with 4 treatments and 6 repetitions, where two foods and two positions of the food were evaluated. The experimental device consisted of a rectangular aquarium with two glass divisions, that allowed the aquarium to be divided in three equal compartments. Ten *Litopenaeus schmitti* shrimp (average weight  $0,503 \pm 0,018$  g) were placed in the central section, and had access to the other two compartments of the aquarium, where the experimental feeds were placed; one with 5% of SPM, and a control without SPM. The results showed that feed containing SPM was more attractive for this species, concluding that is possible to improve the attractability of shrimp feeds by the inclusion of 5 % of SPM, and that the use of this experimental device allows to evaluate the attractability of shrimp diets.

**KEY WORDS:** *Spirulina platensis* meal, *Litopenaeus schmitti* larvae, feeding, Attractant, feed additive.

*A MI MADRE QUE CON TANTO CARIÑO Y DEDICACIÓN ME EDUCÓ PARA QUE  
FUERA UN BUEN PROFESIONAL*



## ***AGRADECIMIENTOS***

*AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE MEXICO POR LA BECA DE DOCTORADO OTORGADA (No. 182857) Y A LA EMBAJADA DE CUBA EN MEXICO, POR SU APOYO A TRAVES DEL CONVENIO DE RECIPROCIDAD Y AL PROGRAMA DE BECAS PARA LA REALIZACION DE ESTOS ESTUDIO.*

*AL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, SC., A SU PROGRAMA DE POSGRADO E INVESTIGADORES.*

*A LOS DRES. TSAI GARCIA GALANO Y HUMBERTO VILLARREAL COLMENARES, POR ASESORAR LA PRESENTE INVESTIGACION, POR SU APOYO Y CONSIDERACIÓN.*

*A LOS DOCTORES, ROBERTO CIVERA CERECEDO, ALFREDO HERNANDEZ LLAMAS y HECTOR NOLASCO MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL Y DE REVISIÓN DE TESIS, POR SU DEDICACIÓN Y AYUDA.*

*AL CENTRO DE INVESTIGACIONES PESQUERAS, MINISTERIO DE LA INDUSTRIA PESQUERA DE CUBA Y A LOS TRABAJADORES DE YAGUACAM.*

*A LA DRA ALINA FORRELLAT, MC ELVIRA ALFONSO Y MC JOSE GALINDO POR SU COLABORACION*

*A SONIA ROCHA MEZA, DOLORES RONDERO ASTORGA, ERNESTO GOYTORTUA Y ROBERTO HERNANDEZ POR LOS ANÁLISIS QUÍMICOS PROXIMALES Y ELABORACIÓN DE DIETAS*

*A LOS 12 COLEGAS CUBANOS QUE ME ACOMPAÑARON EN ESTA ETAPA DE TRABAJO TAN IMPORTANTE,*

*A LA DRA ADELA PRIETO POR SU EMPEÑO EN LA MATERIALIZACION DE ESTE CONVENIO.*

*A LOS ESTUDIANTES DE POSGRADO DEL CIBNOR POR SU AGRADABLE AMISTAD.*

*A LIZ, LUPITA, MINERVA Y LA CHULA POR SU AMISTAD Y APOYO.*

## ÍNDICE GENERAL

Índice general	i
Lista de Publicaciones	iv
Lista de Figuras	vi
Lista de Tablas	viii
Lista de Abreviaturas	xi
<b>Capítulo 1: Introducción</b>	
1.1 Introducción	1
1.2 Alimentación y nutrición de larvas de camarones penéidos	10
1.3 Alimentos artificiales	13
1.4 Requerimientos nutricionales	15
1.5 Importancia de las microalgas en la acuicultura	19
1.6 Justificación	26
1.7 Hipótesis	26
1.8 Objetivo general	27
1.9 Objetivos específicos	27
<b>Capítulo 2: Materiales y Métodos</b>	
2.1 Obtención de los organismos experimentales	28
2.2 Protocolo general de los experimentos realizados	30
2.3 Experimento I. Sustitución parcial y total de alimento vivo fitoplanctónico por harinas de diferentes microalgas en el desarrollo larvario de <i>Litopenaeus schmitti</i>	31
2.3.1 Obtención de alimento vivo usado como control y sus características generales	34
2.3.2. Ajustes de la ración de alimento vivo	36
2.3.3 Harinas de microalgas y composición química proximal	36
2.3.4 Cómputo químico de los alimentos experimentales	39
2.3.5 Digestibilidad de la proteína	40
2.3.6 Longitud final de las larvas (LF)	40
2.3.7 Supervivencia final por tratamiento	40
2.3.8 Índice de desarrollo (ID)	40
2.3.9 Análisis estadístico de los resultados	41
2.4 Experimento II. Nivel óptimo de sustitución del alimento vivo fitoplanctónico ( <i>Chaetoceros muelleri</i> ) por harina de <i>Spirulina platensis</i> (HSP) en la alimentación de protozoas de <i>Litopenaeus schmitti</i> en cultivo	41
2.4.1 Análisis estadístico de los resultados	44
2.5 Experimento III. Empleo de la Harina de <i>Spirulina</i> (HSP) como aditivo en alimentos microparticulados para mysis de <i>L. schmitti</i>	45

2.5.1 Elaboración de alimentos balanceados	47
2.5.2 Ingredientes y composición química proximal de los alimentos experimentales	47
2.6 Experimento IV. Evaluación del nivel de sustitución de raciones de nauplios de <i>Artemia</i> por alimento microparticulado conteniendo 5% HSP en la alimentación de mysis de <i>L. schmitti</i>	49
2.6.1 Características generales de nauplios de <i>Artemia</i>	53
2.6.2 Análisis estadístico de los resultados	54
2.7 Experimento V. Poder atrayente de la HSP como aditivo en alimentos para juveniles de <i>L. schmitti</i>	54
2.7.1 Análisis estadístico de los resultados	56

### Capítulo 3: Resultados

3.1 Experimento I. Evaluación de harinas de diferentes especies de microalgas en la alimentación de protozoas de <i>L. schmitti</i>	58
3.2 Experimento II. Determinación del nivel óptimo de sustitución del alimento vivo fitoplanctónico ( <i>Chaetoceros muelleri</i> ) por la HSP-GENIX en la alimentación de protozoas de <i>L. schmitti</i>	65
3.3 Experimento III. Evaluación de la harina de <i>Spirulina</i> (HSP) como aditivo en alimentos microparticulados para larvas de <i>L. schmitti</i>	69
3.4 Experimento IV. Evaluación del nivel de sustitución de nauplios de <i>Artemia</i> por alimento microparticulado en la alimentación de mysis y postlarvas de <i>L. schmitti</i>	72
3.5 Experimento V. Determinación del poder atrayente de la HSP como aditivo alimentario para juveniles de <i>L. schmitti</i>	75

### Capítulo 4: Discusión

4.1 Experimento I. Evaluación de harinas de diferentes especies de microalgas en la alimentación de protozoas de <i>L. schmitti</i>	77
4.2. Experimento II. Nivel óptimo de sustitución del alimento vivo fitoplanctónico por harina de <i>Spirulina platensis</i> (HSP-GENIX) en la alimentación de larvas de <i>L. schmitti</i>	83
4.3 Experimento III. Evaluación de la harina de <i>Spirulina</i> (HSP) como aditivo en alimentos microparticulados para larvas de <i>L. schmitti</i>	86
4.4 Experimento IV. Evaluación del nivel de sustitución de nauplios de <i>Artemia</i> por alimento microparticulado en la alimentación de mysis de <i>L. schmitti</i>	89
4.5 Experimento V. Evaluación de poder atrayente de HSP en el alimento para juveniles de <i>L. schmitti</i>	93
4.6 Discusión General	94

<b>Capítulo 5: Conclusiones</b>	<b>100</b>
---------------------------------	------------

<b>Capítulo 6: Recomendaciones</b>	102
<b>Capítulo 7: Literatura citada</b>	104
<b>Capítulo 8: Anexos</b>	134
8.1 Composición química proximal (% materia seca) de <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Thalassiosira</i> sp. y <i>Tetraselmis</i> sp. usadas como control en el ensayo donde se evaluaron diferentes especies de microalgas secas (Tomado de Brown, <i>et al.</i> , 1989)	
8.2 Composición aminoacídica de <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Thalassiosira</i> sp. y <i>Tetraselmis</i> sp. usadas como control en el ensayo donde se evaluaron harinas de diferentes especies de microalgas (g/100g del total de la fracción de aminoácidos) (Tomado de Brown, <i>et al.</i> , 1989)	
8.2.1 Posición taxonómica de las microalgas vivas usadas como alimento comercial.	
8.3 Composición química proximal (% de materia seca) y perfil de aminoácidos esenciales (AAE) de nauplios de <i>Artemia</i> recién eclosionados (Tacon, 1989), utilizados como alimento control, en el experimento donde se reemplazan las raciones de nauplios de <i>Artemia</i> por raciones del alimento microparticulado (HSP5%)	
8.4 Composición química proximal de la harina de <i>Spirulina platensis</i> (EARTHRISE®) (Anónimo, 2002b) usado como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoas de <i>Litopenaeus schmitti</i>	
8.5 Composición química proximal de <i>Chlorella</i> sp., para su evaluación como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoas de <i>Litopenaeus schmitti</i>	
8.5.1 Composición aminoacídica de <i>Chlorella</i> sp (% de materia seca) para su evaluación como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoas de <i>Litopenaeus schmitti</i>	
8.5.2 Posición taxonómica de <i>Chlorella vulgaris</i> .	
8.6 Composición química proximal de la harina de <i>Dunaliella salina</i> producida en Cuba, para su evaluación como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoas de <i>Litopenaeus schmitti</i>	
8. 6.1 Composición aminoacídica de <i>D. salina</i> producida en Cuba, para su evaluación como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoas de <i>Litopenaeus schmitti</i>	
8.6.2 Posición taxonómica de <i>Dunaliella salina</i> .	

## LISTA DE PUBLICACIONES

La presente tesis se compone de las siguientes publicaciones y manuscritos:

Jaime, B., Hernández-Llamas, A., García, T. y H. Villarreal. (2006): **Sustitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997) larvae.** Aquaculture. 260(1-4):215-220.

Jaime, B., Villarreal, H., García, T., Pérez, L. y E. Alfonso. (2005): **Effect of *Spirulina platensis* meal as feed additive on growth, survival and development in *Litopenaeus schmitti* shrimp larvae.** Revista de Investigaciones Marinas 26(3):235-241.

## OTROS PRODUCTOS

Jaime-Ceballos, B., Villarreal-Colmenares, H., García-Galano, T., R, Civera-Cerecedo, y G. Gaxiola-Cortes. (2004): **Empleo del polvo de *Spirulina platensis* en la alimentación de zoeas y mysis de *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante y kensley, 1997).** En: Cruz-Suárez, L. E., Ricqué Marie, D., Nieto López, M. C., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 16-19 Nov, 2004, Hermosillo, Sonora, México. Pp.617-635.

Jaime, B., Civera, R., Villarreal, H., Galindo, J. y L. Pérez. **Uso de la harina de *Spirulina platensis* (Turpini, 1827) como atrayente en el alimento para el camarón *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante & Kensley, 1997)** Sometido: Revista Hidrobiología.

Jaime, B., Villarreal, H., García, T. y J. Galindo. **Sustitución de nauplios de *Artemia* por un alimento microparticulado en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante y Kensley 1997) (Decapoda: Penaeidae).** Manuscrito.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Producción anual en millones de postlarvas de camarón blanco del Caribe *Litopenaeus schmitti* en Cuba desde que comenzó su producción a escala comercial (Base de datos GEDECAM, MIP. Cuba) (Pág. 4).
- Figura 2 Ubicación geográfica de la estación para la producción de postlarvas de camarón Yaguacam y el resto de los laboratorios y granjas de engorde de camarón en Cuba (Pág. 29).
- Figura 3 Vista panorámica de la Estación para la producción de “semilla” de camarón Yaguacam, provincia Cienfuegos, Cuba (Pág. 30).
- Figura 4 Vista del área exterior para la producción de fitoplancton en la Estación Yaguacam (Pág.36).
- Figura 5 Recipientes experimentales utilizados para evaluar diferentes niveles de sustitución de raciones de nauplios de *Artemia* en la alimentación de larvas (M<sub>I</sub>-PL<sub>1</sub>) de *Litopenaeus schmitti* en cultivo (Pág.53).
- Figura 6 Dispositivo experimental diseñado (75x40x40cm) para la evaluación del poder atrayente de alimentos conteniendo HSP para juveniles de *Litopenaeus schmitti* (Pág. 56).
- Figura 7 Composición porcentual de los subestadios larvales de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con harinas de diferentes especies de microalgas combinadas con alimento vivo fitoplanctónico, durante 144 horas (Pág. 61).
- Figura 8 Porcentaje de digestibilidad proteica *in vitro* de HSP (EARTHRISE), HSP (GENIX), harina de *Chlorella* y harina de *Dunaliella*. Exponentes iguales no difieren significativamente ( $p>0.05$ ) (Pág. 64).
- Figuras 9 Efecto de diferentes niveles de sustitución de *C. muelleri* por HSP sobre la respuesta nutricional de larvas de *Litopenaeus schmitti* a) Longitud total. b) Índice de desarrollo. Las líneas discontinuas indican el porcentaje óptimo de sustitución donde se alcanza la mayor respuesta. Letras minúsculas iguales no difieren significativamente ( $p>0.05$ ) (Pág.67).
- Figura 10 Relación entre el Índice de desarrollo (ID) y el nivel de inclusión de HSP en alimentos para larvas de *Litopenaeus schmitti*. ( $y$  = nivel de inclusión de HSP,  $x$  = Índice de desarrollo) (Pág.71).

Figura 11 Cómputo químico (%) de los alimentos microparticulados evaluados en relación al perfil de aminoácidos esenciales (AAE) de postlarvas de *Litopenaeus schmitti*. \* Primer AAE limitante. \*\* Segundo AAE limitante (Pág. 72).

Figura 12 Efecto de diferentes niveles de sustitución de raciones de nauplios de *Artemia* por microparticulado sobre el Índice de desarrollo de larvas de *Litopenaeus schmitti*. La línea discontinua indica el número óptimo de raciones de microparticulado a utilizar para alcanzar la mayor respuesta (Pág. 75).

Figura 13 Cómputo químico de nauplios de *Artemia* tomando como referencia el perfil de aminoácidos de *L. schmitti*. \* Primer AAE limitante. \*\* Segundo AAE limitante (Pág. 76).

Figura 14. Porcentaje de camarones (promedio  $\pm$  DE) que se desplazaron hacia los alimentos con y sin HSP (Experimento V). Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Pág. 77).



## LISTA DE TABLAS

- Tabla I. Posición taxonómica de la especie objeto de estudio (Pág. 5)
- Tabla II Clases y géneros de microalgas más empleadas en acuicultura (Tomado de De Pauw *et al.*, 1988) (Pág. 21)
- Tabla III Características generales de cada uno de los experimentos realizados (Pág. 32)
- Tabla IV Distribución de tratamientos y concentración de alimentos utilizados para evaluar diferentes especies de microalgas secas en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti* (Pág. 33)
- Tabla V Parámetros físico-químicas del agua registrados durante la evaluación de diferentes especies de microalgas en la alimentación de larvas de *L. schmitti* (Pág. 34)
- Tabla VI. Fórmulas de fertilización utilizadas en el cultivo de fitoplancton en recipientes de 100 litros en la Estación de Yaguacam, Cuba, cuyas microalgas fueron utilizadas como control en los ensayos (Experimentos I y II) donde se evaluaron diferentes harinas de microalgas (Alfonso *et al.*, 1992) (Pág. 36)
- Tabla VII Composición química proximal (promedio $\pm$ DE) y perfil aminoacídico de la Harina de *Spirulina* (HSP) producida por la Empresa de producción y comercialización de microalgas y sus derivados GENIX (Anónimo 2002a) (Pág. 38)
- Tabla VII-I Composición en vitaminas, minerales, ácidos grasos y pigmentos de la HSP, (10 g de HSP en base húmeda) Producida por la Empresa de producción y comercialización de microalgas y sus derivados (GENIX) (Pág. 39)
- Tabla VIII Protocolo de alimentación usado durante el ensayo para determinar el porcentaje óptimo de sustitución de microalgas vivas (*Chaetoceros muelleri*) por HSP en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti* (Pág. 43)
- Tabla IX Composición química proximal (g/100 g de materia seca) y nivel de energía (J/g de materia seca) de *Chaetoceros muelleri* y HSP (Pág. 44)
- Tabla X Valores de proteína, lípidos y energía (20  $\mu$ g de alimento/ml) según la combinación de *Chaetoceros muelleri* y HSP por tratamiento en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti* (Pág. 44)
- Tabla XI Registros de los parámetros físico-químicos en el cultivo durante la alimentación de larvas de *L. schmitti* con diferentes niveles de inclusión de HSP en el alimento (Pág. 47)

- Tabla XII Composición en ingredientes (g/100g), proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) e Hidroestabilidad de las dietas experimentales utilizadas para la alimentación de larvas y juveniles de *Litopenaeus schmitti* (Pág. 49)
- Tabla XIII Tratamientos de alimentación aplicados, donde las raciones de nauplios de *Artemia* fueron reemplazadas por un alimento microparticulado con 5% de HSP (HSP5') (Pág. 51)
- Tabla XIV Fórmula del alimento experimental HSP5' elaborado en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, BCS, México, utilizado como sustituto de nauplios de *Artemia* en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti* (Pág. 52)
- Tabla XV Registro de los parámetros físico-químicos del agua en el desarrollo del experimento donde las raciones de nauplios de *Artemia* se sustituyeron por alimento microparticulado (HSP5') (Pág. 53)
- Tabla XVI Distribución de tratamientos por repetición, alimentos y posición (Pág. 57)
- Tabla XVII Longitud total final (mm) de las larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con harinas de diferentes especies de microalgas combinadas con alimento vivo fitoplanctónico, durante 144 horas (Pág. 60)
- Tabla XVIII Índice de desarrollo de las larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con harinas de diferentes especies de microalgas combinadas con alimento vivo fitoplanctónico a las 144 horas (Pág. 62)
- Tabla XIX Supervivencia (%) estimada, por replicas y tratamientos, en larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con harinas de diferentes especies de microalgas combinadas con alimento vivo fitoplanctónico durante 144 horas (Pág. 63)
- Tabla XX Cómputo químico calculado (%) para las diferentes especies de microalgas evaluadas como alimento para larvas de *Litopenaeus schmitti* (Pág. 65)
- Tabla XXI Cómputo químico (%) de *C. muelleri* y HSP en relación al perfil aminoacídico de *L. schmitti* informado por Gallardo y colaboradores (1989) (Pág. 69)
- Tabla XXII Valores promedio ( $\pm$  DE) para longitud total, supervivencia e índice de desarrollo de larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con diferentes niveles de inclusión de HSP en el alimento\*. \*Valores con la misma letra dentro de las columnas no difieren significativamente ( $p > 0.05$ ) (Pág. 70)
- Tabla XXIII Comportamiento de la supervivencia, longitud total e índice de desarrollo de las larvas de *L. schmitti* alimentadas con diferentes combinaciones de nauplios de

*Artemia* y alimento microparticulado HSP5' Valores promedio  $\pm$  Error Estándar alcanzados por tratamiento al final del Experimento IV. Valores con iguales letras en las columnas no difieren significativamente ( $p>0.05$ ) (Pág. 74)

## ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  = Microgramo

$\mu\text{m}$  = Micrómetro

A = *Artemia*

AA = Ácido ascórbico

AAE = Aminoácidos esenciales

AGPI= Ácido graso polinsaturado

C Q = cómputo químico

C = cenizas

Cel = Célula

DE = Desviación Estándar

EE = Extracto etéreo

ELN = Extracto Libre de Nitrógeno

g = gramo

HSP = Harina de *Spirulina platensis*

HSP0 = Alimento sin HSP

HSP5' = Alimento con 5 % HSP (Elaborado en México)

HSP2.5 = Alimento con 2.5 % de HSP

HSP5 = Alimento con 5 % de HSP (Elaborado en Cuba)

ID = Índice de Desarrollo

J/L/d = Joule por larva por día.

J = Joule

Kg = kilogramo

l = litro

L= Larva

M = Microparticulado

$\text{m}^3$  = Metro cúbico

mg = Miligramo

mg/l = Miligramo por litro

M<sub>I</sub> = Mysis 1

M<sub>II</sub> = Mysis 2

M<sub>III</sub> = Mysis 3

ml = Mililitro

mm = Milímetro

N = Nitrógeno

Na<sub>2</sub> EDTA = Sal disódica del ácido etilendiamino tetracético

PC = Proteína cruda

P<sub>I</sub> = Protozoa 1

P<sub>II</sub> = Protozoa 2

P<sub>III</sub> = Protozoa 3

PL<sub>1</sub> = Postlarva 1

PL<sub>2</sub> = Postlarva 2

sp = Especie

t = Tonelada

T °C = Temperatura en grados Celsius

U.V. = Luz Ultravioleta

UI = Unidades Internacionales

ups = Unidades prácticas de salinidad

# Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Introducción

El aprovechamiento y manejo de recursos bióticos son más eficientes en la medida en que se tiene mejor conocimiento sobre ellos. El cultivo de un organismo acuático requiere necesariamente del conocimiento de aspectos tales como anatomía y fisiología, alimentación, aspectos reproductivos y efecto de parámetros ambientales, entre otros (Anderson, 1995).

Aunque los primeros organismos marinos empezaron a ser cultivados hace miles de años (Pillay, 1972), el despegue real de esta actividad es relativamente reciente y, en la actualidad, adquiere una importancia relevante. A esto han contribuido principalmente los siguientes factores:

- El aumento constante de la población mundial y, por lo tanto, de las necesidades cada vez mayores de alimentos.
- El estancamiento y, en algunos casos, el decremento de la producción natural de algunas especies.
- La posibilidad de obtener grandes ganancias, sobre todo en el cultivo de ciertas especies de alto valor comercial.
- El conocimiento cada vez mayor de la biología y ecología de algunos organismos marinos.

Actualmente la acuicultura se practica en mayor o menor medida en casi todos los países del mundo, aunque algunos por su situación geográfica, socioeconómica y política, están más avanzados. En total la producción camaronícola mundial se ha duplicado desde 1999

hasta el 2004 y se estima que llegue a alcanzar más de 2 millones de toneladas métricas en los próximos años. Dentro de los países que realizan los mayores aportes se encuentran China, Vietnam y Tailandia (Rosenberry, 2004).

Los crustáceos y, en particular, los camarones peneidos, ocupan un lugar destacado en la acuicultura a escala mundial debido a los buenos precios que históricamente han mantenido en el mercado internacional, propiciando que su cultivo muestre un ritmo de desarrollo acelerado. Así, mientras que en 1980 menos del 1% del camarón producido provenía de granjas camaroneras comerciales, en un futuro cercano se estima alcance el 50% de la producción mundial de camarón (Rosenberry, 2004).

Los camarones marinos en Cuba constituyen el segundo renglón exportable por concepto de producto pesquero. Las dos especies de peneidos más importantes en la plataforma insular son el camarón rosado, *Farfantepenaeus notialis* y el blanco, *Litopenaeus schmitti* con volúmenes de captura anual promedio de 1,451 t en los últimos 5 años (Base de datos pesqueros del Centro de Investigaciones Pesqueras, Cuba, 2005). La primera representa las mayores capturas en arrastres comerciales y, aunque se ha intentado su cultivo, presenta pobre crecimiento en la fase de engorda. La segunda representa a la industria del camarón en el país y es la especie que se cultiva con éxito a escala comercial, alcanzando como promedio, en 2004, una producción anual de 2,000 toneladas métricas, en las 2,000 ha disponibles.

Se tiene actualmente un programa de desarrollo para el 2006, con una especie introducida (*Litopenaeus vannamei*), con el que se espera subir sustancialmente la producción. Esta es la razón por la cual los aportes en la investigación se han encaminado no sólo hacia la

biología de esta especie en poblaciones silvestres, sino también hacia un manejo óptimo en la tecnología de su cultivo (Ramos *et al.*, 1994; Pérez, 1996).

Uno de los problemas mayores para el crecimiento equilibrado de la acuicultura marina es el abastecimiento adecuado y sostenido de “semilla” para el engorde, que garantice la continuidad de las actividades de los sistemas de producción, los cuales idealmente deberían mantenerse en operación a plena capacidad y en forma continua, para su mejor éxito financiero y comercial. Por esto, se ha creado dentro del sector acuícola un subsector dedicado específicamente a la producción y comercialización de “semilla”, que consiste en laboratorios donde se crían, a gran escala y en sistemas intensivos, las larvas de los organismos que se ofertan al mercado para su siembra y engorde. Esto trae consigo la necesidad de mantener alimento vivo (principalmente microalgas y algunas especies de zooplancton) disponible de buena calidad y en la cantidad requerida para el organismo que se cultiva. Sin embargo, la producción de dicho alimento implica dificultades de escalamiento y no siempre es posible obtener una calidad uniforme, por lo que la tendencia actual es hacia la búsqueda de sustitutos de los alimentos vivos por medio del uso de alimentos inertes, tales como dietas artificiales microparticuladas o microencapsuladas (Pedroza-Islas *et al.*, 1999).

En el cultivo de camarón, la larvicultura tiene un papel fundamental en la supervivencia de las operaciones acuícolas. Sin embargo, en muchos de estos sistemas de producción, los requerimientos nutricios, fuentes de alimentación no convencionales, tasas de crecimiento, mortalidad y condiciones óptimas para el cultivo de larvas no son bien conocidas, y los sistemas económicos de larvicultura, como parte verticalmente integrada a las operaciones de cultivo, reciben poca atención (Anderson, 1995).



La ubicación taxonómica de la especie objeto de estudio se presenta en la Tabla I. Aunque la primera producción de cultivo comercial de *Litopenaeus schmitti* en Cuba se logró en 1986, se han presentado fluctuaciones importantes en las producciones y la calidad de las postlarvas en los últimos años (Figura 1) debido, entre otras causas, a que aún se depende de la producción variable y costosa del cultivo del alimento vivo y de alimentos microparticulados importados, diseñados para otras especies (Fernández de Alaiza, comunicación personal).

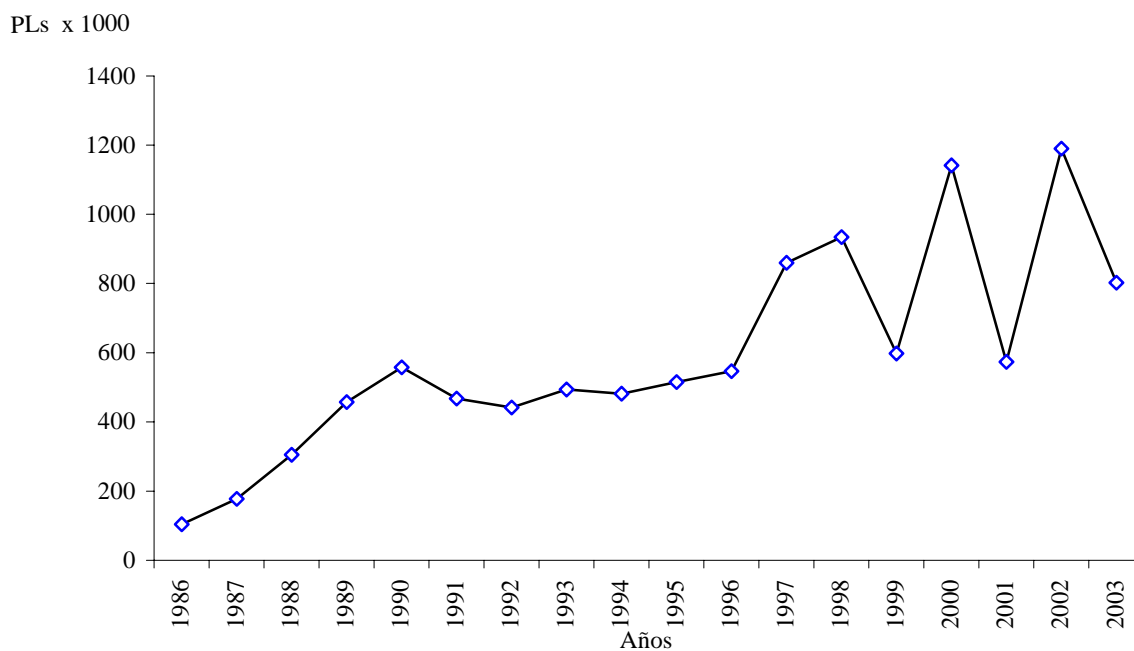


Figura 1. Producción anual de postlarvas de camarón blanco del Caribe *Litopenaeus schmitti* en Cuba desde que comenzó su producción a escala comercial (Base de datos GEDECAM, MIP. Cuba).

Tabla. I. Posición taxonómica de *Litopenaeus schmitti*.

Reino	Animal
Phylum	Artrópoda
Subphylum	Crustácea
Clase	Malacostraca
Subclase	Eumalacostraca
Superorden	Eucárida
Orden	Decápoda
Suborden	Dendobranchiata
Superfamilia	Penaeoidea
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>schmitti</i>

Se reconoce que la alimentación y nutrición se encuentran entre los aspectos fundamentales para el éxito económico de la acuicultura comercial (Tacon, 1992). En este sentido, es importante señalar que para *Litopenaeus schmitti* existen numerosas referencias sobre la evaluación de fuentes proteicas en dietas artificiales (Galindo *et al.*, 1989 b; Álvarez *et al.*, 1989 a; Álvarez *et al.*, 1989 b; Jaime y Mola, 1989; Reyes *et al.*, 1989; García y Jaime, 1990; Jaime y García, 1992); así como algunos estudios sobre requerimientos nutricionales (Galindo *et al.*, 1989 a; García y Galindo, 1990; Gaxiola, 1991).

Durante el desarrollo, las larvas cambian de estadios y presentan diferentes estrategias de alimentación: desde filtrador herbívoro (protozoa) hasta carnívoro u omnívoro (mysis y postlarvas); por eso, las larvas requieren fitoplancton y zooplancton (Kanazawa, 1985). En los primeros ensayos realizados en Japón las larvas de *M. japonicus* se alimentaron con plancton cosechado del mar, pero este método no resultó factible a gran escala (Léger y Sorgeloos, 1992), por lo que se empezaron a buscar alternativas.

Como primer alimento convencional de las larvas de camarón se han empleado diferentes especies de diatomeas (vgr. *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros muelleri*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Thalassiosira fluviatilis*, *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros ceratosporum*) y flagelados (vgr. *Tetraselmis suecica*, *T. chuii*, *T. tetrathele* e *Isochrysis galbana*), lográndose un mejor balance nutricional al realizar combinaciones entre diferentes especies de ambos grupos. Esto conlleva al aumento en la velocidad de metamorfosis y a un mejor desarrollo larval, en comparación con dietas monoalgales (Coutteau, 1996), por lo que ha sido recomendado por diferentes autores (i.e. Mock *et al.*, 1980; Quintio y Villegas, 1982; Smith y Lawrence, 1987; Alfonso *et al.*, 1985 y 1988).

El alto costo que conlleva el empleo de microalgas vivas, por la necesidad de su cultivo *in situ*, los riesgos de contaminación con protozoos, hongos y bacterias, y las variaciones según las condiciones del cultivo sobre el valor nutritivo de las algas (Kanazawa *et al.*, 1982), constituyen un problema para cualquier operación de acuicultura que dependa del cultivo masivo de algas unicelulares. Con el objetivo de reducir estos problemas, varios investigadores han intentado reemplazarlas por otros tipos de alimentos de más fácil manejo, incluyendo el empleo de algas preservadas, dietas microparticuladas, microencapsuladas, levaduras y diferentes especies de bacterias no patógenas (Estévez,

1985; Gelabert *et al.*, 1988; Biedenbach *et al.*, 1990; Baert *et al.*, 1995; Narciso, 1995; Couteau, 1996; Márquez *et al.*, 1997).

Una alternativa para el empleo de microalgas vivas puede ser su distribución como producto conservado, ya que son producidas a costos relativamente bajos, en condiciones climatológicas óptimas (Cotteau y Sorgeloos, 1993).

Las microalgas, además de contener proteínas, presentan también lípidos, carbohidratos, vitaminas hidro y liposolubles, y otras moléculas útiles como carotenoides, clorofila, y enzimas (Herrero, 1995).

Rao y colaboradores (1981) informaron que el valor de una microalga, como fuente de proteína dietética, depende de muchos factores, siendo finalmente evaluado a través de experimentos de alimentación animal, donde se determina su valor biológico, aunque algunas mediciones químicas de su composición son de gran utilidad.

También se han desarrollado diferentes tecnologías para la preservación de algunas microalgas, como *Dunaliella salina*, *Thalassiosira pseudonana*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana*, etc. (Buitrago, 1988; Coutteau, 1996). Sin embargo, son escasos los estudios con vistas a su empleo en el cultivo de larvas de camarón.

La cría larval comercial de organismos acuáticos, y de manera particular de camarones peneidos, aún depende de los alimentos vivos naturales (microalgas y nauplios de *Artemia*), los cuales son muy variables en su valor nutricional y de altos costos de producción (Kanazawa, 1989, Chitradivelu, 1992, Fegan, 2004, Robinson *et al.*, 2005). Sin embargo, la carencia de estudios de requerimientos nutricionales en esta fase del ciclo de vida y la experiencia demostrada por algunos autores en las investigaciones en este campo, empleando dietas prácticas con diversas fuentes de nutrientes, ha permitido transitar a la

sustitución del alimento vivo (Gallardo, 2005). Por ello, diferentes empresas se han dado a la producción de alimentos artificiales para sustituir parcial o totalmente el alimento natural en los últimos años, con vistas a disminuir los costos de producción, la contaminación y agilizar el proceso productivo, (Kanazawa, 1989; Kurmaly *et al.*, 1989; Avale y Rothius, 1991; Ottogalli, 1991; Chitradivelu, 1992; Fegan, 1992; 2004; Baert *et al.*, 1995; Narciso, 1995; Sunilkumar, 1996; Jones, 1998; Wouters *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2005).

Una práctica común en la cría larval de camarones peneidos es el uso de nauplios de *Artemia spp*, durante los estadios de mysis y postlarva. Esto está asociado a un cambio en los hábitos alimenticios de herbívoro a carnívoro u omnívoro durante el desarrollo larval (Alfonso *et al.*, 1988; Amjad y Jones, 1992; Gallardo *et al.*, 2002).

Las necesidades cada vez superiores de los quistes de *Artemia*, producto del desarrollo de la camaronicultura, y el precio que han alcanzado en el mercado internacional, hace imprescindible la búsqueda de alternativas de alimentación que puedan disminuir el consumo de nauplios de *Artemia* en la larvicultura del camarón de forma satisfactoria (Wouters *et al.*, 2003).

La búsqueda de alternativas en la alimentación para la cría larval del camarón ha sido una de las constantes en la industria de fabricación de alimentos para la acuicultura, y propósito de investigadores y productores, debido fundamentalmente a la enorme necesidad de la eliminación de cultivos paralelos, como son los cultivos de microalgas y de nauplios de *Artemia*, los cuales son necesarios para la alimentación durante esta fase del ciclo de vida del organismo (Jones, 1998). A pesar de que existen variaciones en su valor nutricional, la dependencia de los laboratorios de camarón en los quistes de *Artemia* ha traído consigo un

incremento significativo en su precio en el mercado internacional en los últimos años (Wouters *et al.*, 2003).

Las estrategias de alimentación establecidas en Cuba para el cultivo de *Litopenaeus schmitti*, pueden optimizarse. Entre los factores a mejorar se encuentra la obtención de un alimento inerte de producción nacional, fácil de manipular y almacenar, con estabilidad en el suministro y composición, además de presentar características físicas y nutricionales adecuadas para combinarse con el alimento vivo o en caso necesario, emplearse como único alimento.

*Spirulina* spp. es un alga filamentosa característica de lagos someros salinos y alcalinos de aguas calidas de África y América. Su velocidad de crecimiento es mayor a la de cultivos agrícolas y cercanas a la de otros microorganismos, como levaduras y bacterias, duplicando su biomasa en 3-5 días. Bajo estas condiciones se pueden producir 25 t/ha/año de la microalga, equivalente a 15 t de proteína (Richmond, 1988; Göhl, 1991). Adicionalmente, es una fuente rica en proteínas, vitaminas, aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos (gama-linolénico), y pigmentos antioxidantes, como los carotenoides (Belay *et al.*, 1996; De Lara Andrade *et al.*, 2005) Además de su alto valor nutricional, ha sido efectiva para la modulación de la respuesta inmune y protección contra la radiación. (Takeuchi *et al.*, 2002). Sin embargo, su contenido de ácidos nucleicos es bajo en comparación a otros microorganismos (Richmond, 1988). Varios estudios se han desarrollado con harina de *Spirulina*, como suplemento en dietas para crustáceos (vgr. Person-Le Ruyet, 1976; Tsai, 1979; Cuzon *et al.*, 1981; Castro, 1993; Narciso, 1995).

En general, la adición de harina de *Spirulina* en pequeñas cantidades en el alimento de peces produce efectos favorables sobre el crecimiento, factor de conversión del alimento,

condición física, respuesta al estrés, resistencia a enfermedades, así como calidad de su carne en cuanto al contenido de grasa y coloración (Hirano y Suyama, 1985; Mori *et al.*, 1987; Chow y Woo, 1990; Watanabe *et al.*, 1990; Mustafa *et al.*, 1994; Mustafa y Nakagawa, 1995).

La harina de *Spirulina platenses*, que se produce de forma comercial, posee características nutricionales adecuadas para su utilización como alimento en el cultivo de animales acuáticos (Belay *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 2002). En Cuba alcanza una producción anual de 100 t (Santoyo, 2002).

Por lo anterior, en este trabajo de tesis se propone evaluar el uso de la harina de *Spirulina platensis*, de producción nacional, en la alimentación de larvas del camarón blanco del Caribe *Litopenaeus schmitti*, como sustituto de alimento vivo fitoplanctónico y como aditivo en microparticulados, con el fin de disminuir el consumo de nauplios de *Artemia* para las fases de mysis y postlarvas.

## **1.2 Alimentación y nutrición de larvas de camarones peneidos**

Desde el huevo hasta la postlarva, el desarrollo larval de los peneidos es complejo. Este incluye tres estadios: nauplio, protozoa y mysis. El estadio de nauplio tiene de 5 a 6 subestadios, dependiendo de la especie, mientras que protozoa y mysis tienen tres subestadios respectivamente. El desarrollo larval completo normalmente se alcanza en alrededor de 15 días (Jory, 1996). En el estadio de nauplio, el organismo no ha desarrollado la boca y se alimenta del vitelo. A partir del estadio de protozoa I, la larva necesita del alimento externo para satisfacer sus requerimientos nutricionales y energéticos, por lo que es necesario garantizar un alimento artificial de tamaño adecuado a sus posibilidades

(Shigueno, 1975; Kurmaly *et al.*, 1989) o producir un florecimiento de fitoplancton, preferiblemente diatomeas (CICTUS, 1982), ya que las microalgas unicelulares producen mejores crecimientos y supervivencias en las larvas. (Simon, 1978; Emerson, 1980; Liao *et al.*, 1983, Brown *et al.*, 1997). Las especies de microalgas más frecuentemente usadas son *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum* y *Tetraselmis chuii* (Kuban *et al.*, 1985). Como consecuencia de los cambios de alimentación de herbívoro a carnívoro que ocurren en el estadio de mysis, la cantidad de microalga puede ser reducida, manteniendo un nivel mínimo suficiente como estabilizador de la calidad del agua (Liao, *et al.*, 1993; Jory, 1996).

Ceccaldi (1987) indicó que es necesario conocer las variaciones cuantitativas y cualitativas de la alimentación de larvas planctónicas de crustáceos durante su desarrollo. Las larvas eligen células de especies de fitoplancton en función del tamaño de su boca o de la dureza o forma de éstas; después seleccionan partículas orgánicas y pequeños animales planctónicos, adquiriendo de forma progresiva el comportamiento y la fisiología de animales carnívoros.

El suministro de alimentos cuya composición esté adaptada a las capacidades fisiológicas digestivas de las larvas es importante. Esta composición debe corresponder a las actividades enzimáticas del tubo digestivo y a su evolución a lo largo de su crecimiento y desarrollo (Gallardo, 2005).

En *Palaemon serratus*, el crecimiento es rápido durante las primeras fases, disminuyendo durante los últimos estadios larvarios. Paralelamente, se reduce la actividad de las enzimas digestivas, sobre todo las amilasas. La relación amilasa/proteasa aumenta desde zoea I a la III, disminuyendo después en mysis. La alimentación de las primeras zoeas está compuesta



generalmente por especies fitoplanctónicas, y el aumento de las proteasas tiene lugar cuando las larvas comienzan a ingerir presas animales en el estadio mysis I (Van Wormhoudt, 1980).

Lovett y Felder (1989) investigaron la ontogenia de la glándula digestiva de *Litopenaeus setiferus*, indicando que la formación del hepatopáncreas se completa en postlarvas tardías (PL<sub>21</sub>) donde adquiere su función. Por su parte, Nakamura y Tsuru (1990) indicaron que la alimentación de las larvas de camarón *Marsupenaeus japonicus*, que comienza en la fase de protozoa, no se sincroniza con el desarrollo de la glándula digestiva.

Lovett y Felder (1990a) observaron que la mayor actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus setiferus* se encuentra durante los estadios de protozoa y mysis temprana, mostrando poca actividad durante la metamorfosis. Estos resultados reflejan un cambio en la síntesis de las enzimas, producto del cambio en la función y tamaño relativo del hepatopáncreas, durante su diferenciación.

Trabajos en *Penaeus monodon* (Fang y Ning, 1992); *Macrobrachium rosenbergii* (Kamarudin *et al.*, 1994) y *Litopenaeus schmitti* (González *et al.*, 1993) ofrecieron conclusiones similares.

En general, las protozoas muestran una baja respuesta en la actividad enzimática cuando se alimentan exclusivamente con dietas artificiales. La adición de microalgas eleva la actividad de la tripsina, mejorando el crecimiento y la supervivencia (Le Vay *et al.*, 1993; Kumlu y Jones, 1995). Se ha sugerido que las microalgas podrían contener algunas sustancias que estimulan la actividad enzimática o mejoran la digestión del alimento,

además de proporcionar fuentes proteicas fácilmente digeribles (Le Vay *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1994).

En *Litopenaeus schmitti*, González (1998) detectó actividad de dos endopeptidasas (tipo tripsina y tipo quimotripsina) y dos exopeptidasas en protozoa II, mysis I y PL<sub>5</sub>, así como en juveniles y adultos, lo cual proporciona a los individuos de esta especie los medios para asimilar la fracción proteica de la dieta. Debido a la presencia de actividad tipo tripsina fundamentalmente, y tipo quimotripsina en el hepatopáncreas, y a su papel predominante en la proteólisis total, es recomendable en la formulación de dietas artificiales para estos organismos la inclusión de ingredientes ricos en aminoácidos esenciales básicos y aromáticos sobre los que actúan estas enzimas, para elevar la asimilación y la eficiencia de la proteína en la dieta, y con ello cubrir los requerimientos en aminoácidos de la especie.

### **1.3 Alimentos artificiales**

La variabilidad en el contenido del ácido Eicosapentaenóico (20:5 $\omega$ 3) y la ausencia de niveles significativos de Docosahexaenóico (22:6 $\omega$ 3), en los alimentos vivos tradicionalmente usados en la larvicultura de camarón, ha estimulado las investigaciones sobre el desarrollo comercial de alimentos ricos en ácidos grasos polinsaturados de la serie  $\omega$ <sub>3</sub> como suplementos o sustitutos algales (Ej. microcápsulas, levaduras ricas en  $\omega$ <sub>3</sub>, dietas microparticuladas, etc.), así como productos para enriquecimiento de organismos zooplanctónicos [(vgr. microcápsulas, emulsiones, micropartículas, etc. (Leger y Sorgeloos, 1992).].

La tecnología de fabricación de alimentos, ya sea en forma de micropartículas o microcápsulas, puede influir tanto en la calidad del agua de cultivo, como en el aprovechamiento del alimento por los organismos. Amjad y colaboradores (1992) demostraron una fuerte correlación entre el crecimiento y supervivencia de las larvas, y la estabilidad de los alimentos en el agua, y no con el contenido nutricional o el tamaño.

Jones et al. (1987) indicaron que al utilizar microcápsulas en sustitución del alimento vivo, los resultados de supervivencia fueron mejores a los obtenidos utilizando sólo alimento vivo, con larvas de *Marsupenaeus japonicus*, *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*.

La sustitución total o parcial de alimentos vivos por microdietas en la cría larval de los camarones ha sido estudiada por diversos autores (Jones *et al.*, 1997; Jones, 1998; Kovalenko *et al.*, 2002). De acuerdo a Jones (1998) la sustitución total del alimento vivo, resulta en larvas con bajos crecimientos. Chitravadivelu (1992) señaló que existe un amplio rango de esquemas de alimentación para larvas de camarón que incluyen la sustitución parcial del alimento vivo por alimento microparticulado o microencapsulado. Jones colaboradores al. (1987) lograron el reemplazo de nauplios de *Artemia* en la alimentación de larvas de *Litopenaeus vannamei*, incluyendo levaduras y una mezcla de microalgas en el régimen de alimentación.

Con el avance en los procesos tecnológicos de elaboración de los alimentos (Pedroza *et al.*, 1999 y 2000) y la incorporación de nuevas materias primas (Chu *et al.*, 1999; Gallardo *et al.*, 2003), se ha mejorado la aceptabilidad de micropartículas por las larvas e incrementado

de manera general la supervivencia y desarrollo hasta postlarva, de forma tal que el empleo de microdietas ha permitido la sustitución parcial del alimento vivo, fundamentalmente de nauplios de *Artemia* (Gallardo *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2003; Pedroza *et al.*, 2004).

Según Barclay y Zeller (1996) son usadas diferentes técnicas de bioenriquecimiento en la larvicultura, incluyendo enriquecimiento con microalgas, el empleo de aceites microencapsulados con alto contenido en ácidos grasos polinsaturados y aceites de organismos marinos emulsificados. Estos autores realizaron una investigación donde mejoraron el valor nutricional de rotíferos y nauplios de *Artemia* con ácidos grasos poliinsaturados, y sugieren que la mejor estrategia para el bioenriquecimiento con estos nutrientes esenciales para las larvas es a través del empleo de algas como *Schizochytrium* sp., ricas en ácidos grasos polinsaturados.

El desarrollo futuro en el campo de la nutrición y alimentación de larvas de camarón debe estar dirigido a la sustitución de microalgas vivas, como fuente de alimento. Sin embargo, éstas tienen una función importante en el mantenimiento de las condiciones en la calidad de agua durante la cría larval (Amjad y Jones, 1992).

#### **1.4 Requerimientos nutricionales**

Los cambios que ocurren en los requerimientos nutricionales de las larvas se cubren de forma satisfactoria en la alimentación natural debido a la amplia variedad y abundancia de organismos del plancton de diferentes tamaños y composición bioquímica (Leger y Sorgeloos, 1992).

La mayoría de los estudios sobre requerimientos nutricionales se han realizado para juveniles de diferentes especies, debido a las dificultades que se presentan en la elaboración de dietas para los estadios de protozoa y mysis. En 1984, Teshima y Kanazawa, abrieron el camino de las investigaciones sobre la nutrición larval con significativos aportes en este campo. El desarrollo de alimentos microencapsulados para crustáceos, y el empleo de técnicas de bioencapsulación, han permitido mejorar el entendimiento en las necesidades nutricionales de protozoas y mysis en cautiverio (García, 1998).

Teshima y Kanazawa (1984) examinaron el efecto de diferentes niveles de proteína, lípidos y carbohidratos en dietas purificadas sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas de *Marsupenaeus japonicus*, indicando que el porcentaje óptimo de proteínas en los alimentos, en relación con el índice de crecimiento y el porcentaje de supervivencia, es variable y está relacionado con el de carbohidratos. Así, establecieron como óptimo 45%, si la dieta contenía un 25% de carbohidratos, o entre 45 y 55% si los carbohidratos disminuyen hasta un 15%, o aún por encima de 55%, cuando éstos disminuyen hasta el 5%. Encontraron además, que si el alimento contenía suficiente cantidad de carbohidratos, el porcentaje de lípidos puede ser de un 6.5%, y que un aumento de este nivel no implicó mejoras en crecimiento y supervivencia.

El requerimiento de aminoácidos esenciales ha sido demostrado para *Farfantepenaeus aztecus* (Shewbart *et al.*, 1972); *Penaeus monodon* (Coloso y Cruz, 1980); *Marsupenaeus japonicus* (Kanazawa y Teshima, 1981). Simulando en la dieta la composición aminoacídica del cuerpo entero de las larvas de *M. japonicus*, Teshima *et al.* (1986) obtuvieron resultados satisfactorios en la cría larval.

Durante la embriogénesis de peces marinos los aminoácidos libres son la fuente principal de energía; cuando inician la alimentación exógena, un suministro de éstos parece ser necesario, ya que su tracto digestivo es incompleto morfológica y funcionalmente (Fyhn, 1989). En los estadios larvales de peneidos ocurren grandes cambios en la morfología y funcionamiento del sistema digestivo, por lo que una situación semejante podría presentarse (Lovett y Felder, 1989), en la que la alimentación natural se constituye por algas y pequeños invertebrados, ricos en aminoácidos libres (Gilles, 1979; Admiral *et al.*, 1986).

Muy poco se conoce sobre la utilización de los carbohidratos en la fase larval de los camarones peneidos. Niall *et al.* (1989) señalaron que los carbohidratos de bajo peso molecular deben ser los constituyentes apropiados para las dietas de protozoas de *P. monodon* debido a las bajas actividades encontradas de  $\alpha$ -amilasa. El uso de mezclas de diferentes carbohidratos en la dieta parece ser más efectiva que el empleo de una sola fuente (D'Abramo y Conklin, 1995). Niveles dietéticos de 20% de carbohidratos producen en las protozoas de *L. vannamei* los mejores índices de desarrollo (Le Moullac *et al.*, 1994).

En los camarones penéidos, aún no se han definido los requerimientos de lípidos totales en la fase larvaria. Los únicos aspectos de la nutrición de los lípidos que han sido estudiados a detalle, son los requerimientos de ácidos grasos polinsaturados, fosfolípidos y esteroides (Shiau, 1998).

Existe una necesidad de ácidos grasos polinsaturados (AGPI) de la serie linolénico ( $\omega$ -3) para los estadios larvales de *M. japonicus*, siendo más efectivos que los de la serie linoléico ( $\omega$ -6) (Jones *et al.*, 1979; Teshima *et al.*, 1982).

A medida que avanza el desarrollo larval de *Penaeus monodon*, los niveles de los ácidos grasos 16:1 y 18:1 decrecen con un correspondiente incremento de los AGPI, particularmente 20:5 $\omega$ -3 y 22:6 $\omega$ -3, indicando la importancia de los AGPI como componentes dietéticos (Millamena y Qunitio, 1985). Por otro lado, se ha sugerido que los AGPI mejoran la resistencia a las enfermedades (Chamberlain, 1995).

El segundo componente lipídico más abundante dentro del cuerpo del animal son los fosfolípidos, después de los triglicéridos, y tienen un importante papel en el transporte de los triglicéridos y el colesterol, del hepatopáncreas a la hemolinfa (Teshima, *et al.*, 1986 a y b). La necesidad de incluir fosfolípidos en la dieta de las larvas de *Marsupenaeus japonicus* fue consignada por Teshima *et al.* (1993).

Los crustáceos son incapaces de sintetizar esteroides *de novo* a partir de acetato y mevalonato (Kanazawa, 1985). Se estima que el nivel óptimo de colesterol en larvas de *M. japonicus* es de 1%, y el de fosfolípidos de soya en 3% (Teshima *et al.*, 1982).

Por otro lado, la determinación de los requerimientos de vitaminas en larvas ha estado basada en las investigaciones realizadas en *Marsupenaeus japonicus*. Kanazawa *et al.* (1982) usando una dieta microparticulada, encontraron que esta especie requiere de vitamina E, ácido nicotínico, colina, piridoxina, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico, cianocobalamina, vitamina D, inositol, riboflavina, tiamina y  $\beta$ -caroteno. La carencia de al

menos una de estas vitaminas causa problemas en la metamorfosis y una alta mortalidad durante el desarrollo larval.

El desarrollo de los organismos acuáticos parece ser particularmente susceptible a deficiencias de vitamina C (ácido ascórbico), por lo que constituye uno de los componentes dietéticos esenciales para varios estadios del desarrollo. El nivel recomendado de vitamina C debe ser superior a 2000 mg/kg de dieta, lo que permite mejorar la resistencia a situaciones de estrés y al ataque de enfermedades (Lavens *et al.*, 1998, Koshio y Teshima, 2005).

Los estudios dirigidos a determinar las necesidades de minerales durante el período larval son escasos. Besbes y Guillaume (1989) suplementaron con hierro alimentos para larvas de *M. japonicus*, indicando que su ausencia provoca retardo en el crecimiento. Sin embargo, D'Abramo y Conklin (1995) sugirieron que algunos minerales (vgr. Ca, P) suplementados en exceso pueden actuar de forma negativa al alterar la asimilación de otros minerales.

### **1. 5 Importancia de las microalgas para la alimentación en acuicultura**

Durante los últimos veinte años se han logrado grandes avances en el cultivo de microalgas. Esto ha permitido que se utilicen para una gran variedad de fines tales como acuicultura, producción de pigmentos y antibióticos, y purificación de residuales, entre otros (Yépez de Leal y Silva, 1997).



Un inventario global demostró que 107 géneros y 493 especies de microalgas están siendo usados con propósitos nutricionales en la alimentación de animales y humanos (Indergaard y Minsaas, 1991).

El valor nutricional de las microalgas es un aspecto interesante a considerar. Después que se comprobó, en una serie de estudios nutricionales en animales, que la harina de *Scenedesmus* sp. era una fuente protéica de alto valor sin efectos tóxicos, se iniciaron un grupo de pruebas con seres humanos (Nakamura y Yamada, 1960; Waslien *et al.*, 1970; Soeder y Pabst, 1975). Por otro lado, varios autores han informado con detalle el resultado de las pruebas clínicas con las microalgas en Alemania, Perú, India y Japón, concluyendo, que es un alimento de excelentes características.

Las microalgas constituyen la principal fuente de alimento en el cultivo de todos los estadios de bivalvos marinos, de los estadios larvales de algunos gasterópodos marinos, larvas de un gran número de especies de peces marinos y camarones peneidos, y zooplancton (Coutteau, 1996).

Una gran cantidad de especies diferentes de microalgas han sido aisladas en distintas partes del mundo y son sometidas a cultivos intensivos. En la Tabla II se muestra una lista de las 8 clases y 32 géneros más comúnmente usados en la alimentación de diferentes grupos de organismos acuáticos de importancia comercial. Esta lista incluye especies de diatomeas, flagelados, algas verdes y algas verde-azules filamentosas, en rangos de tamaños desde 2 hasta más de 100  $\mu\text{m}$ .

Tabla II. Clases y géneros de microalgas más empleadas en acuicultura (Tomado de De Pauw *et al.*, 1988).

Clase	Género	Ejemplos de aplicación
Bacillariophyceae	<i>Skeletonema</i>	PL,BL,BP
	<i>Thalassiosira</i>	PL,BL,BP
	<i>Phaeodactylum</i>	PL,BL,BP,ML,BS
	<i>Chaetoceros</i>	PL,BL,BP,BS
	<i>Cylindrotheca</i>	PL
	<i>Bellerochea</i>	BP
	<i>Actinocyclus</i>	BP
	<i>Nitzchia</i>	BS
	<i>Cyclotella</i>	BS
Haptophyceae	<i>Isochrysis</i>	PL,BL,BP,ML,BS
	<i>Pseudoisochrysis</i>	BL,BP,ML
	<i>Dicrateria</i>	BP
Chrysophyceae	<i>Monochrysis</i>	BL,BP,BS,MR
Prasinophyceae	<i>Tetraselmis</i>	PL,BL,BP,AL,BS,MR
	<i>Pyramimonas</i>	BL,BP
	<i>Micromonas</i>	BP
Cryptophyceae	<i>Chroomonas</i>	BP
	<i>Rhodomonas</i>	BL,BP
Xanthophyceae	<i>Olisthodiscus</i>	BP
Chlorophyceae	<i>Carteria</i>	BP
	<i>Dunaliella</i>	BP,BS,MR
	<i>Chlamydomonas</i>	BL,BP,FZ,MR,BS
	<i>Chlamydomonas</i>	BL,BP,FZ,MR,BS
	<i>Chlorococcum</i>	BP
Cyanophyceae	<i>Spirulina</i>	PL,BP,BS,MR

PL, larvas de camarones peneidos; BL, larvas de moluscos bivalvos; ML, larvas de camarones de agua dulce; BP, postlarvas de moluscos bivalvos; AL, larvas de abulones; MR, rotíferos marinos (*Brachionus*); BS, camarón salado (*Artemia*); SC, copépodos de agua salada; FZ, zooplancton de agua dulce.

Usualmente las microalgas empleadas en la nutrición larval de especies marinas pertenecen al nanoplancton, con intervalo de tamaños de 2-20  $\mu\text{m}$ , con excepción de las diatomeas que pueden formar cadenas de 60  $\mu\text{m}$  de longitud, y las diatomeas mayores de 20  $\mu\text{m}$  (Brown *et al.*, 1997).

En un estudio sobre las propiedades de las microalgas para la maricultura, donde se analizó el contenido nutricional de diferentes grupos, no se encontraron diferencias específicas entre los grupos analizados, aunque se encontró que las Chlorophytas son típicamente más ricas en carbohidratos que otras clases, y que las diatomeas contienen generalmente más lípidos que otras algas (Brown *et al.*, 1997).

La composición proximal no siempre está correlacionada directamente con el valor nutricional (Webb y Chu, 1983; Brown *et al.*, 1989). Sin embargo, cuando los nutrientes esenciales (ej: ácidos grasos polinsaturados, vitaminas, etc.) están en proporciones adecuadas, las diferencias pueden adquirir importancia.

De manera general, la calidad proteica de las microalgas es alta, sin embargo, las diferencias en la composición de azúcares en los polisacáridos pudieran explicar las diferencias encontradas en el valor nutricional de algunas especies (Brown *et al.*, 1989).

Los ácidos grasos polinsaturados esenciales 20:5 ( $\omega$ -3) y 22:6 ( $\omega$ -3) son nutrientes fundamentales en la nutrición animal y muchas microalgas son ricas en uno o en ambos. Las Clorofitas carecen de estos ácidos grasos polinsaturados de cadena larga, aunque son ricas en ácidos grasos polinsaturados de cadena corta C16 y C18, y pueden ser útiles mezcladas con otras especies de microalgas (Brown y Jeffrey, 1992).

Debido a que la composición bioquímica de las microalgas varía apreciablemente, pueden estar limitadas en uno o más nutrientes, aún cuando las condiciones de cultivo se estandaricen. Por ello, la alimentación con mezclas de microalgas provee un mejor balance y constituye una práctica en la maricultura comercial.

Entre las microalgas más comúnmente usadas en la alimentación de especies acuáticas como fuente de proteína están: *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., y *Spirulina* sp., (Nose, 1960; Stanley y Jones, 1976; Matty y Smith, 1978; Tsai, 1979). Sin embargo, empleando microalgas como única fuente proteica en la alimentación de peces, resulta en ocasiones en malformaciones y crecimientos disparejos (Meske y Pfeffer, 1978).

Entre los trabajos relacionados con la eficiencia de asimilación de algunas algas consumidas por crustáceos podemos mencionar:

Algas Verde-azules	<i>Metapenaeus</i> sp.	48-87 % (Moriarty, 1976)
Diatomeas	<i>Penaeus</i> sp.	87% (Condrey <i>et al.</i> , 1972)

A pesar de esto, algunos autores consideran que la calidad de las microalgas es un criterio totalmente subjetivo y dependiente de los organismos que se están alimentando, de las técnicas que se utilizan para el cultivo y de las condiciones de cultivo (Voltolina *et al.*, 1998).

Por otra parte, el contenido en ácidos nucleicos de las microalgas, su fuerte color verde (que puede enmascarar a otros) y su costo de producción, son algunas de las objeciones que se hacen para su uso como alimento. Las bacterias y levaduras, tienen igualmente un elevado contenido en ácidos nucleicos con valores fluctuantes entre 10-20 % de peso seco y las microalgas contienen aproximadamente el 4 % de su peso seco (Soeder, 1975).

Un número de investigaciones se han realizado con el objetivo de preservar microalgas para su posterior empleo en la alimentación de diferentes especies acuícolas. Por ejemplo,

Brown (1972) utilizó técnicas de liofilización y congelación en la alimentación de larvas de camarón. Umebayachi (1975) refiere que algunas especies de diatomeas pueden ser almacenadas hasta tres años en condiciones de baja temperatura (5°C) y oscuridad, para después ser transferidas a un medio fresco y comenzar su crecimiento. Buitrago (1988) emplea la floculación como medio de concentración y utiliza sustancias crioprotectoras para la preservación de microalgas como reservas de alimento de organismos marinos cultivables.

Los cultivos de microalgas pueden ser concentrados para su almacenamiento de dos formas: por centrifugación y por floculación (Coll Morales, 1983). El almacenamiento de microalgas para su posterior utilización presenta muchas ventajas cuando se están cultivando larvas de animales marinos, ya que reduce la dependencia de los cultivos frescos para la alimentación y disminuyen los riesgos de pérdida total de las larvas por algún motivo que impida el buen desarrollo de los cultivos de fitoplancton (Buitrago, 1988).

La obtención de microalgas en tanques a la intemperie de grandes volúmenes para la producción de “harina de microalgas” ha estado limitada a un número reducido de especies, como son *Spirulina* sp. y *Dunaliella salina*, que pueden ser utilizadas como complemento de microalgas vivas, mejorando el crecimiento de larvas de bivalvos (Coutteau y Sorgeloos, 1993). Utilizada como aditivo en alimentos para especies acuáticas, a la harina de *Spirulina* sp. se le ha atribuido un grupo significativo de funciones de importancia metabólica, entre ellas antioxidantes, respiratorias e inmunológicas (Mustafa *et al.*, 1994; Miyasaki *et al.*, 1995; Gabaudan, 1998; Takeuchi *et al.*, 2002).

Además, técnicas recientes de producción se aplican a gran escala con algunas especies de microalgas marinas bajo condiciones heterotróficas de cultivo, con el empleo de carbono orgánico en lugar de luz como fuente de energía (Coutteau, 1996). Con este método se pueden alcanzar concentraciones 1000 veces más altas que en cultivos fotoautotróficos y pueden ser secadas por aspersión y preservadas. Desafortunadamente estas técnicas de producción masiva se han podido realizar sólo con pocas especies de algas (*Chlorella* sp., *Spirulina* sp. y *Dunaliella* sp.). Varias especies con alto valor nutricional, pertenecientes a los géneros *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Monochrysis*, etc., no son capaces de crecer en la oscuridad, por lo que es importante desarrollar técnicas de cultivo y de preservación, que permitan mejorar la composición bioquímica y la diversidad de microalgas secas en el futuro (Coutteau, 1996).

Para la producción de “semilla” de camarón en Cuba, se ha trabajado en la búsqueda de soluciones en cuanto a la optimización de la alimentación de larvas en cultivo, mediante la selección y mejoramiento de la producción masiva de especies fitoplanctónicas (Leal, 1990; Alfonso *et al.*, 1992; Leal y Bonachea, 1994; Leal, 1995). También se ha estudiado el uso de alimentos inertes que influyan positivamente en el crecimiento, la supervivencia y el desarrollo de las larvas (Gelabert, 1988; Jaime *et al.*, 1996; Márquez, 1997; Artiles *et al.*, 1999; Jaime *et al.*, 2000.). Sin embargo, no se había estudiado la inclusión de la harina de *Spirulina platensis* como alternativa en el esquema de alimentación para la larvicultura de *Litopenaeus schmitti*.

Las investigaciones en cuanto al empleo de la harina de *Spirulina platensis* en la alimentación de camarones son escasas. Sin embargo, una gran cantidad de compañías

productoras de alimentos para camarones peneidos y peces, incluyen en sus formulaciones harinas de microalgas como aditivos, con resultados satisfactorios (Chow y Woo, 1990; Watanabe *et al.*, 1990; Chamberlain y Hunter, 2001).

### **1.6 Justificación**

Con el propósito de hacer un mejor uso de los recursos disponibles en Cuba, entre los que está la harina de *Spirulina platensis* (HSP) que se produce de forma comercial, se propone con este trabajo mejorar la eficiencia del cultivo de *Litopenaeus schmitti*, a través del empleo de HSP, como alimento en la etapa de producción de “semilla”, desde su utilización como sustituto de microalgas vivas en la fase de protozoa, hasta su inclusión como aditivo en alimentos microparticulados para el reemplazo de nauplios de *Artemia* en la etapa larval. La microalga *Spirulina platensis* posee características importantes desde el punto de vista nutricional, por su alto porcentaje en proteína, contenido en aminoácidos esenciales, lípidos, carbohidratos, pigmentos carotenoides, atrayentes químicos, vitaminas y minerales. Por otro lado, el amplio programa de desarrollo de la camaronicultura en Cuba, requiere de la optimización de los costos particularmente relacionados con el cultivo de fitoplancton y los altos precios en el mercado internacional de los quistes de *Artemia*,

### **1.7 Hipótesis**

1. Las características nutricionales de la harina de *Spirulina platensis* (65% proteína, 6% de lípidos, 10.5% carbohidratos, 16.5g/100g de pigmentos, etc.), permiten considerar que es posible la sustitución de al menos 30% del alimento vivo fitoplanctónico por harina de *Spirulina platensis* en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

2. La inclusión de la harina de *Spirulina platensis* como aditivo en los alimentos mejora el valor nutricional de la dieta, al incrementar el nivel de pigmentos, aminoácidos, lípidos, vitaminas y minerales, permitiendo aumentar el porcentaje de alimento microparticulado y disminuyendo la demanda de nauplios de *Artemia* durante el cultivo de mysis y las primeras fases postlarvales del camarón blanco *L. schmitti*.

3. La presencia de nucleótidos, aminoácidos y pigmentos en la harina de *Spirulina platensis* tienen una función atrayente cuando se incorpora en el alimento para juveniles de *L. schmitti*.

### **1.8 Objetivo general**

Determinar el valor nutricional de la harina de *Spirulina platensis* como alimento y aditivo para la producción de postlarvas del camarón blanco del Caribe *Litopenaeus schmitti*.

### **1.9 Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto del uso de diferentes especies de microalgas como alimento sobre el desarrollo de protozoas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*.

2. Determinar el nivel óptimo de sustitución del alimento vivo fitoplanctónico por harina de *Spirulina platensis* para la alimentación de protozoas de *L. schmitti*.

3. Determinar el efecto de la harina de *Spirulina platensis*, como aditivo en alimentos microparticulados, sobre el desarrollo de larvas de *L. schmitti*.

4. Determinar el nivel óptimo de sustitución de nauplios de *Artemia* por alimento microparticulado con harina de *S. platensis* para el estadio mysis de *L. schmitti*.

5. Evaluar el valor de la harina de *Spirulina platensis* como atrayente en el alimento para juveniles de *L. schmitti*.



## Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención de organismos experimentales

Los experimentos se realizaron en el Centro de Producción de “semilla” de camarón Yaguacam, Provincia Cienfuegos, Cuba (Figuras 2 y 3).

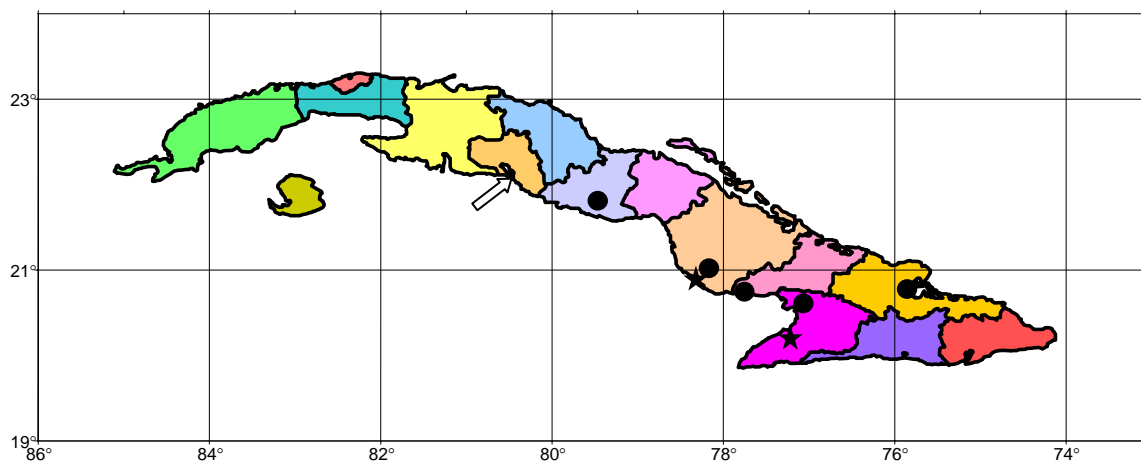


Figura 2. Ubicación geográfica de la Estación Yaguacam para la producción de postlarvas de camarón y el resto de los laboratorios y granjas de engorde de camarón en Cuba.

- ↗ YAGUACAM (Estación para la producción de “semilla” de camarón, Provincia Cienfuegos, Cuba)
- Granja de precría y engorde de camarón
- ★ Centro de Producción de “semilla” de camarón (Laboratorio)



Figura 3. Vista panorámica de la Estación Yaguacam para la producción de “semilla” de camarón, provincia Cienfuegos, Cuba.

Las larvas de *Litopenaeus schmitti*, fueron obtenidas a partir de hembras cultivadas, maduras y copuladas de forma natural y desovadas en tanques de fibra de vidrio, cilíndricos y fondo cónico, de 200 l de capacidad. Los estadios de Protozoa III a Mysis I fueron obtenidos de cultivos comerciales en tanques de 20 m<sup>3</sup>, cuya historia alimenticia y manejo en general fue seguido desde su siembra en el estadio de nauplio hasta su colecta, verificando el estadio larval de acuerdo por lo propuesto por García (1972). Los juveniles de la misma especie, para evaluar el efecto atrayente de la harina de *Spirulina*, fueron tomados de una pre-cría comercial, cuyos procedimientos para su cultivo en estanques de

tierra de 0.5 ha se describen en el Manual de Procedimientos Operacionales de Trabajo 004/03 (Anónimo, 2003). Los juveniles fueron colectados y trasladados al laboratorio para su aclimatación antes del bioensayo.

Se realizaron 5 experimentos:

Experimento I. Influencia de diferentes harinas de microalgas en la alimentación de protozoas de *L. schmitti*.

Experimento II. Sustitución de *Chaetoceros muelleri* por la harina de *Spirulina platensis* en dietas para larvas de *L. schmitti*.

Experimento III. Efecto de la harina de *Spirulina platensis* como aditivo en el alimento sobre el crecimiento, supervivencia y desarrollo en larvas de *L. schmitti*.

Experimento IV. Sustitución de nauplios de *Artemia* por alimento microparticulado en la cría larval de *L. schmitti*.

Experimento V. Uso de la harina de *Spirulina platensis* (Turpini, 1827) como atrayente en el alimento para el camarón blanco *L. schmitti*.

## **2.2 Protocolo general de los experimentos realizados**

Los cinco experimentos se desarrollaron con diseños completamente aleatorizados, correspondiendo a los distintos estadios larvales y la etapa juvenil, para la cual se determinó el poder atrayente de la HSP. Las características generales de los experimentos se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Características generales de los experimentos realizados.

Experimento	I	II	III	IV	V
Objetivo	Evaluación de diferentes especies de harinas de microalgas	Nivel óptimo de sustitución de <i>C.muelleri</i> por HSP*	Empleo de HSP* como aditivo en microparticulados	Sustitución de nauplios de <i>Artemia</i> por microparticulado HSP5%**	Poder atrayente de HSP en el alimento para juveniles
Estadio de los organismos	$N_V - M_I$	$N_V - M_I$	$P_{III} - PL_1$	$P_{III} - PL_1$	Juvenil
Densidad (# de org.)	150 $N_V/l$	150 $N_V/l$	120 $P_{III}/l$	100 $P_{III}/l$	10 juv
Número de tratamientos	9	5	4	5	4
Número de réplicas	3	3	3	3	6
Duración del ensayo	144 horas	140 horas	120 horas	122 horas	24 días

\* Harina de *Spirulina platensis*. \*\* Harina de *Spirulina platensis* al 5% de inclusión en el alimento (ver Tabla 12).

### 2. 3 Experimento I. Sustitución parcial y total de alimento vivo fitoplanctónico por la harina de diferentes microalgas en el desarrollo larvario de *Litopeaneus schmitti*

Se evaluó la sustitución parcial y total de alimento vivo fitoplanctónico por la harina de diferentes especies de microalgas en el estadio de protozoa. En la Tabla IV se presenta el esquema de alimentación, de 9 tratamientos por triplicado, en base a diferentes combinaciones y concentraciones de microalgas vivas (cel/ml) y/o harinas (mg/l/ración).

Tabla IV. Distribución de tratamientos y concentración de alimentos utilizados para evaluar diferentes especies de microalgas secas en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

Tratamientos	Microalga	Protozoa I	Protozoa II	Protozoa III
		células/ml		
Control I	<i>Chaetoceros muelleri</i>	25, 000	30, 000	35, 000
	<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	5, 000	10, 000	12, 000
	<i>Tetraselmis tetrathele</i>	-	1, 000	1, 500
mg/l/ración				
II	<i>S. platensis</i> (GENIX®)	4	6	6
III	<i>S. platensis</i> (EARTHRISE®)	4	6	6
IV	<i>Chlorella vulgaris</i>	4	6	6
V	<i>Dunaliella salina</i>	4	6	6
VI	<i>C. muelleri</i>	15, 000cel/ ml		
	<i>S. platensis</i> (GENIX®)	6 mg/l/ración		
VII	<i>C muelleri</i>	15, 000 cel / ml		
	<i>S. platensis</i> (EARTHRISE®)	6 mg/l/ración		
VIII	<i>C. muelleri</i>	15, 000 cel/ ml		
	<i>Chlorella vulgaris</i>	6 mg/l/ración		
IX	<i>C. muelleri</i>	15, 000 cel/ ml		
	<i>Dunaliella salina</i>	6 mg/l/ración		

A partir de la observación de las primeras protozoas (P<sub>1</sub>), en los tratamientos donde se combinaron las harinas de microalgas con *Chaetoceros muelleri*, se adicionó diariamente y durante todo el período de la etapa experimental, *C. muelleri* a razón de 15, 000 cel/ml a las 11:00 horas de cada día, mientras que el polvo de las microalgas se adicionó en tres raciones (08:00; 16:00 y 24:00 horas) a razón de 6 mg/l/ración cada una. En los tratamientos donde se evaluaron microalgas secas solamente, se comenzó a alimentar cada 4 horas (04:00; 08:00; 12:00; 16:00; 20:00 y 24:00 horas) al observarse las primeras

protozoas, ajustando las dosis a razón de 4 mg/l durante la fase de protozoa I, y aumentando a 6 mg/l a partir de protozoa II.

Se utilizaron tanques de fibra de vidrio cilindro-cónicos, con 50 litros de agua de mar, iluminación artificial con luz fluorescente situada a 40 cm de la superficie de los tanques durante 24 horas, aireación artificial procedente de sopladores (5 HP) y el empleo de piedras difusoras. Los nauplios fueron sembrados a una densidad de 150 organismos por litro. Al agua de los tanques se le añadió Na<sub>2</sub> EDTA a una concentración de 10 mg/l como quelante de metales pesados (Lawrence *et al.*, 1981). Diariamente se realizaron registros de las variables físico-químicas: salinidad (ups) con un Refractómetro Atago® Modelo 2401, con una precisión 0.01 ups; concentración de amonio utilizando un Fotómetro SQ 118 (MERCK®) de +/- 0.001 mg/l de precisión; temperatura y oxígeno disuelto con un Oxímetro YSI® Modelo 58 con 0.1 °C y 0.1 mg/l de precisión, y pH con un Potenciómetro Toa HM-18ET de +/- 0.01 U. de precisión.

Los valores (medios  $\pm$  DE) de los parámetros ambientales registrados durante el experimento se comportaron como se presenta en la Tabla V.

Tabla V. Parámetros físico-químicos (promedio  $\pm$  DE) del agua registrados durante la evaluación de diferentes especies de microalgas en la alimentación de larvas de *L. schmitti*.

Parámetros	Promedio $\pm$ DE
Temperatura (°C)	27.60 $\pm$ 0.85
Salinidad (ups)	35.00 $\pm$ 0.50
pH	8.03 $\pm$ 0.22
Oxígeno disuelto (mg/l)	6.40 $\pm$ 1.20

Diariamente fueron realizadas observaciones microscópicas de las larvas para apreciar la motilidad, respuesta a la luz y determinar el sub-estadio de desarrollo, inspeccionándoles el tracto digestivo para confirmar el consumo del alimento suministrado.

### **2.3.1 Obtención de alimento vivo usado como control y sus características generales**

Los cultivos de las especies del fitoplancton que fueron utilizadas como control se realizaron en el área de alimento vivo de la Estación Yaguacam (Figura 4), donde se produjeron en cultivos monoalgales, de acuerdo al protocolo de producción comercial (Anónimo, 2003) de aumento progresivo de volumen. Los inóculos utilizados para iniciar el cultivo fueron extraídos de recipientes de 100 litros, mientras se encontraban en la fase exponencial de crecimiento (después de 3-4 días de cultivo). El cultivo se realizó mediante fertilización inorgánica (Tabla VI) a temperatura ambiente ( $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), iluminación natural y 35 ups. La composición química proximal, de aminoácidos y posición taxonómica de las tres especies utilizadas como control se muestra en los Anexos 8.1 y 8.2, respectivamente.



Figura 4. Vista del área exterior para la producción de fitoplancton en la Estación Yaguacam.

Tabla VI. Fórmulas de fertilización utilizadas para el cultivo de fitoplancton en recipientes de 100 litros en la Estación de Yaguacam, Cuba (Alfonso *et al.*, 1992).

Reactivo	Grupo	
	Flagelados	Diatomeas
Urea (mg/l)	200	100
Superfosfato simple (mg/l)	20	10
Na <sub>2</sub> EDTA (mg/l)	10	10
Fe Cl <sub>3</sub> (solución al 70 %)	Una gota en 20 l de agua	
Vitamina B <sub>12</sub>	0.02 ppm	
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> (mg/l)	-	16



### 2.3.2 Ajuste de la ración de alimento vivo.

Diariamente en la mañana (07:00 horas), y en la tarde (16:00 horas) se realizaron conteos de microalgas, ayudados por un microscopio estereoscópico (OLYMPUS VM, Japón, 1x-4x) y un hematocitómetro con cámara Neubauer, para determinar la concentración de fitoplancton. Para ajustar la ración de nauplios de *Artemia* se utilizó la cámara Bogorov, calculando éstos de forma volumétrica, según la Fórmula 1 tomada de Alfonso y colaboradores (1988):

#### Fórmula 1

$$V_a = V_r \frac{(C_d - C_r)}{C_a - C_d}$$

donde:

V<sub>a</sub>: Volumen de alimento a añadir.

V<sub>r</sub>: Volumen de agua en el tanque de larvas.

C<sub>d</sub>: Concentración deseada de alimento

C<sub>r</sub>: Concentración residual.

C<sub>a</sub>: Concentración del alimento a añadir.

### 2.3.3. Harinas de microalgas y composición química proximal.

La harina de *Spirulina platensis* (HSP) utilizada en el presente trabajo fue suministrada por la empresa de producción y comercialización de microalgas y sus derivados GENIX, de La Habana, Cuba. La composición química proximal, de vitaminas, minerales y pigmentos se presenta en las Tablas VII y VII-I. La producción de *Spirulina platensis* se realizó en la provincia de Matanzas, Cuba, empleando el medio de cultivo desarrollado por Zarrouk (1966), fue concentrada a través de filtrado mecánico mediante mallas y gravedad, para posteriormente ser secadas en bandejas a 70°C.

Tabla VII. Composición química proximal (promedio  $\pm$  DE) y perfil aminoacídico de la harina de *Spirulina* (HSP) producida por la empresa de producción y comercialización de microalgas y sus derivados GENIX (Anónimo 2002a).

<b>Composición química proximal</b>	
<b>(g/100g de materia seca excepto humedad)</b>	
Proteínas	65.0 $\pm$ 4.92
Humedad	5.0 $\pm$ 0.6
Extracto Etéreo	6.0 $\pm$ 1.0
Extracto Libre de Nitrógeno	15.5 $\pm$ 3.5
Ceniza	12.2 $\pm$ 3.4
Fibra	8.5 $\pm$ 1.1
<b>Perfil aminoacídico (mg/ 10 g de HSP en base seca)</b>	
Alanina	430
Arginina	425
Ácido Aspártico	610
Cistina	47
Glicina	310
Histidina	95
Isoleucina	381
Leucina	540
Lisina	295
Metionina	133
Fenilalanina	241
Prolina	240
Serina	311
Treonina	300
Triptofano	89
Tirosina	290
Valina	375

Tabla VII-I. Composición de vitaminas, minerales, ácidos grasos y pigmentos de la HSP, (10 g de HSP en base húmeda) de la empresa de producción y comercialización de microalgas y sus derivados GENIX (Anónimo 2002a).

<b>Vitaminas</b>		<b>Minerales</b>	
β-caroteno (provit. A)	23 000 UI	Calcio	113.6 mg
Vit.E	1.00 mg	Fósforo	84.0 mg
Vit.B1	0.31 mg	Magnesio	44.0 mg
Vit.B2	0.38 mg	Hierro	16.0 mg
Vit.B3	1.40 mg	Cromo	27.0 µg
Vit.B6	80.00 µg	Sodio	65.0 mg
Vit.B12	30.00 mg	Zinc	300.0 µg
Inositol	6.4 mg	Cobre	110.0 µg
Acido fólico	1.00 µg	Potasio	130.0 mg
Vit.h	0.5 µg	Manganeso	500.0 µg
Acido Pantoténico	10.00 µg	Germanio	6.0 µg
<b>Ácidos grasos</b>	mg	Selenio	2.0 µg
Gamma Linolénico	134	<b>Pigmentos</b>	mg
Estearico	4	Ficocianina	1 500
Palmítico	210	β-caroteno	13.8
Oleico	37	Clorofila	105
Palmitoleico	32	Carotenoides	38
Palmitolénico	35		

*Spirulina platensis* (Earthrise Company, Calipatria, CA) procedente de Estados Unidos fue concentrada por centrifugación y secada mediante aspersión, envasada en recipientes plásticos translúcidos, con un tamaño de partícula de 20-80 µm. En el Anexo 8.4 se presenta la composición química proximal de este producto, evaluado como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoos de *Litopenaeus schmitti*. (Experimento I).

*Chlorella sp*, fue cultivada en agua dulce proveniente de residuales de la Industria Pesquera en la Empresa Hacendado, La Habana, Cuba. La cepa, una mutación de *Chlorella vulgaris*, fue concentrada por centrifugación y secada por aspersión. La composición química proximal y de aminoácidos se muestra en los Anexos 8.5 y 8.5.1. (Tomado de Romero, 1996).

*Dunaliella salina*, fue cultivada en aguas de residuales de la industria pesquera en una laguna de alta velocidad y a salinidad de 20 ups, para posteriormente ser secada en estufa a 80° C. Su composición química proximal y aminoacídica se muestran en los Anexos 8.6 y 8.6.1, respectivamente.

Las harinas de microalga fueron maceradas en mortero para disminuir el tamaño de partícula y posteriormente se pasaron por un tamiz de 30  $\mu\text{m}$ , antes de ser almacenadas en un refrigerador a 10°C. Previo a su uso, se pesaron en una balanza analítica (0.01 g de precisión) para luego ser hidratadas en 50 ml de agua, con agitación durante 30 segundos. En el momento de ser suministradas, las harinas de microalga se pasaron a través de una malla de plancton (150  $\mu\text{m}$ ) para separar las partículas y evitar la formación de grumos en las unidades experimentales.

#### **2.3.4. Cómputo químico de los alimentos experimentales.**

El cómputo químico realizado a los alimentos experimentales se basó en el concepto de que la utilización de la proteína depende, en primera instancia, del nivel de aminoácidos esenciales que se encuentren en menor cantidad en éstas (Mitchell y Block, 1946). Dicho cómputo químico se estableció tomando como proteína de referencia el perfil de aminoácidos de las larvas de *M. japonicus* (Teshima *et al.*, 1986).

### **2.3.5. Digestibilidad de la proteína.**

La digestibilidad “*in vitro*” de la proteína de las harinas de microalgas fue determinada de acuerdo a la técnica descrita por Hsu y colaboradores (1977) modificada por Forrellat (1998), y la utilización de hepatopancreatina como fuente de enzimas digestivas (Carrillo, *et al.*, 1993).

### **2.3.6. Longitud final de las larvas (LF).**

La longitud promedio de las larvas se determinó al final de los experimentos mediante mediciones con microscopio estereoscópico (OLYMPUS VM, Japón, 1x-4x) de 30 ejemplares de cada tanque. Las mediciones para las P<sub>I</sub> (protozoa 1) se realizaron desde el extremo anterior del cefalotórax hasta el final de la furca, excluyendo las espinas. Para las P<sub>II</sub> (protozoa 2) y P<sub>III</sub> (protozoa 3), desde el extremo anterior del rostrum hasta el final de la furca, excluyendo las espinas; y para las mysis y las postlarvas, desde el extremo anterior del rostrum hasta el extremo posterior del telson García (1972).

### **2.3.7. Supervivencia final por tratamiento.**

Para el cálculo de la supervivencia, se consideró la razón entre el número de organismos colectados al terminar el experimento y el número de organismos sembrados.

### **2.3.8. Índice de desarrollo (ID).**

Para la determinación del índice de desarrollo, se procedió a la identificación de los subestadios larvales de tres muestras de 100 ejemplares de cada tanque experimental, con la ayuda de un microscopio estereoscópico (OLYMPUS VM, Japón, 1x-4x), de acuerdo a las descripciones informadas para *Litopenaeus schmitti* por García (1972). Se aplicó el Índice de Desarrollo definido por Villegas y Kanazawa (1979):

### Fórmula 2

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

donde:

A: valor absoluto asignado X número de larvas examinadas en cada subestadio, siendo los valores P<sub>I</sub>=1; P<sub>II</sub>=2; P<sub>III</sub>=3 y M<sub>I</sub>=4

N: Total de larvas examinadas en cada muestreo.

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

Los datos de longitud final y los valores del ID fueron sometidos a un ANOVA de una vía, previo análisis de la normalidad y homocedasticidad de los datos (Prueba de Kolmogorov-Smirnov y Prueba de Bartlett respectivamente). Las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan, y se trabajó con una probabilidad de  $\alpha = 0.05$  (Sigarroa, 1985). Para comparar los porcentajes de supervivencia entre los tratamientos y los valores de digestibilidad *in vitro* se aplicó la prueba de  $\chi^2$  (Lerch, 1977). Se utilizó el paquete de programas estadísticos STATISTICA 6.0.

### **2.4. Experimento II. Nivel óptimo de sustitución del alimento vivo fitoplanctónico (*Chaetoceros muelleri*) por harina de *Spirulina platensis* (HSP) en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti* en cultivo.**

Con el objetivo de determinar el nivel recomendable de sustitución del alimento vivo fitoplanctónico por HSP en la cría de protozoas, se desarrolló un experimento en condiciones controladas de laboratorio. Se aplicaron cinco combinaciones de alimentación de larvas por triplicado, según se estableció en el esquema experimental (Tabla VIII), con un ajuste de la ración tres veces al día. Se utilizaron tanques de fibra de vidrio cilindro-

cónicos de 100 litros de capacidad con 50 litros de agua de mar (35 ups), sedimentada, filtrada por arena y por cartucho de 5  $\mu\text{m}$  y pasada por luz UV. Adicionalmente se añadieron 10 mg/l de  $\text{Na}_2$  EDTA. La aireación se mantuvo constante para asegurar concentraciones de oxígeno disuelto en el orden de 5 mg/l, utilizando un soplador de 5 HP y el empleo de piedras difusoras. Se mantuvo iluminación constante con luz fluorescente de 40 watts. Diariamente se realizaron registros de las variables físico-químicas conforme se describió en el apartado 2.3. Para mantener la concentración de microalgas por tratamiento y eliminar los restos fecales, se renovó entre 20 y 50% del agua de los tanques.

Tabla VIII. Protocolo de alimentación usado durante el ensayo para determinar el porcentaje óptimo de sustitución\* de microalgas vivas (*Chaetoceros muelleri*) por HSP en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

<b>Dieta</b>	<b><i>C. muelleri</i> (cels/ml)</b>	<b>HSP (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
S0 (100 % <i>C. muelleri</i> )	40, 000	0
S25 (75 % <i>C. muelleri</i> y 25% HSP)	30, 000	5
S50 (50 % <i>C. muelleri</i> y 50% HSP)	20, 000	10
S75 (25 % <i>C. muelleri</i> y 75 % HSP)	10, 000	15
S100 (100 % HSP)	-	20

\* El peso seco de 40, 000 células de *C. muelleri* equivalen a 20 $\mu\text{g/ml}$  de HSP (Harina de *Spirulina platensis*).

El cultivo del alimento vivo usado como control (*Chaetoceros muelleri*) se obtuvo según se explicó en el apartado 2.3.1.

La composición química proximal, nivel de energía y los valores de proteína, lípidos y energía de las dietas empleadas en cada tratamiento durante el experimento se muestran en las Tablas IX y X respectivamente.

Tabla IX. Composición química proximal (g/100 g de materia seca) y nivel de energía (J/g de materia seca) de *Chaetoceros muelleri* y HSP.

Composición (g/100g)	<i>C. muelleri</i>	HSP
Proteína	43.11±0.54	65.0 ± 4.92
Extracto Etéreo	21.48± 0.27	6.0 ±1.0
ELN	17.07±0.32	10.5 ± 3.5
Ceniza	18.33 ±0.43	12.2 ± 3.4
Energía (J/g)		
Proteína	7,760±19.8	11,700±89.0
Extracto Etéreo	7,560±80.0	2,110±352
ELN	2,930±55.0	1,720±602
Total	18, 250±154	15,530±1043

Tabla X. Valores estimados de proteína, extracto etéreo y energía (20 µg de alimento/ml) de la combinación de *Chaetoceros muelleri* y HSP por tratamiento, para la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti*.

Dieta	Proteína (µg/ 20 µg)	Extracto Etéreo (µg/ 20µg)	Energía (Joules/20µg)
S0	8.62	4.29	0.364
S25	9.71	3.52	0.348
S50	10.81	2.75	0.336
S75	11.90	1.97	0.322
S100	13.00	1.20	0.310

Los valores de energía se calcularon a partir de los factores de conversión reportados por Baukema y De Bruin (1979), donde 18.0, 35.2 y 17.2 kJ/g de peso seco corresponden a proteína, lípidos y carbohidratos, respectivamente.



Diariamente fueron realizadas observaciones microscópicas de 30 larvas para apreciar la motilidad, respuesta a la luz, verificar el consumo del alimento suministrado inspeccionándoles el tracto digestivo y determinar el sub-estadio de desarrollo.

El cómputo químico de *Chaetoceros muelleri* y HSP se realizó tomando como proteína de referencia el perfil de aminoácidos de postlarvas de *Litopenaeus schmitti* (Gallardo *et al.*, 1989). El procedimiento se describe en el apartado 2.3.4.

Para definir las variables bióticas al final del experimento, se siguió lo indicado para longitud final (apartado 2.3.6), supervivencia (apartado 2.3.7) e índice de desarrollo (apartado 2.3.8).

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

Para la determinación el nivel óptimo de sustitución de *Chaetoceros muelleri* por HSP en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti*, a los datos finales de longitud total e índice de desarrollo (ID) se les aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Bartlett para normalidad y homogeneidad de varianza. El nivel óptimo de sustitución con base a la talla final y el índice de desarrollo, fue determinado a través de la ecuación cuadrática (Shearer, 2000):

$$Y = a_0 + a_1S + a_2S^2$$

donde Y es la talla final (o índice de desarrollo),  $a_0$ ,  $a_1$ ,  $a_2$  son los coeficientes de regresión, y S es el porcentaje de sustitución. El nivel de sustitución que muestra los valores óptimos de talla final e índice de desarrollo ( $Y_m$ ) fue calculado según la ecuación:

$$Y_m = - a_1 (2a_2)^{-1}$$

Se aplicó un ANOVA para determinar las diferencias entre los porcentajes de supervivencia de los tratamientos aplicados, previa transformación ( $1/x$ ) de los datos. Para comparar la digestibilidad proteica entre los alimentos empleados se usó una prueba t de student. El nivel de significación fue de  $p < 0.05$  para todos los casos. Para el procesamiento de los análisis se usó el paquete de programas estadísticos STATISTICA 6.0.

El registro de los parámetros abióticos del agua durante el experimento se mantuvo dentro de los rangos permisibles para el cultivo de la especie en estudio. Oxígeno disuelto de  $7.25 \pm 0.25$  mg/l, la temperatura fue mantenida a  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , el pH de  $8.25 \pm 0.05$  y la concentración de  $\text{NH}_4\text{-N}$  alcanzó un rango entre  $0.013 \pm 0.005$  mg/l.

### **2.5. Experimento III. Empleo de la Harina de *Spirulina* (HSP) como aditivo en alimentos microparticulados para larvas de *Litopenaeus schmitti*.**

Para determinar el efecto de la harina de *Spirulina platensis* (HSP) como aditivo en alimentos para larvas de *L. schmitti*, se evaluaron tres dietas artificiales con inclusiones de HSP de 0.0, 2.5 y 5.0% (HSP0, HSP2.5 y HSP5.0, respectivamente) y un control alimentado con *Artemia* a razón de 5 nauplios/ml. El experimento cubrió desde mysis I (M<sub>I</sub>) hasta la primera postlarva (PL<sub>1</sub>), durante 120 horas, y se determinó el cómputo químico tomando como referencia la composición amionoacídica de postlarvas de *Litopenaeus schmitti* informada por Gallardo y colaboradores (1989).

Se utilizaron tanques de fibra de vidrio cilindro-cónicos de 200 litros de capacidad con 100 l de agua de mar filtrada ( $5 \mu\text{m}$ ), aireación constante utilizando piedras difusoras. Se

renovó el 50% del agua de los tanques diariamente y se registraron los parámetros abióticos del agua (Tabla XI) según lo referido en el apartado 2.3.

Tabla XI. Registro de los parámetros físico-químicos (promedio  $\pm$  DE) en tanques de cultivo, durante la alimentación de larvas de *L. schmitti* con diferentes niveles de inclusión de HSP en el alimento.

Parámetro	Promedio $\pm$ DE
Temperatura (°C)	27.6 $\pm$ 1.15
Oxígeno (mg/ l)	6.90 $\pm$ 0.70
Salinidad (ups)	35.0 $\pm$ 0.00
pH	8.00 $\pm$ 0.30
Amonio (mg/l)	0.052 $\pm$ 0.02

Diariamente fueron realizadas observaciones microscópicas de las larvas para apreciar la motilidad, respuesta a la luz y determinar el sub-estadio de desarrollo, inspeccionándoles el tracto digestivo para verificar el consumo del alimento suministrado.

Al finalizar el ensayo, con la aparición de las primeras postlarvas, se determinó la longitud final de mysis y postlarvas desde el extremo anterior del rostrum hasta el extremo posterior del telson (apartado 2.3.6), supervivencia (apartado 2.3.7) e índice de desarrollo (apartado 2.3.8). Los valores absolutos utilizados en la fórmula 2 para el cálculo del ID fueron  $M_I = 4$ ,  $M_{II} = 5$ ,  $M_{III} = 6$  y  $PL_1 = 7$ .

Para el procesamiento estadístico de los resultados se siguió lo descrito en el apartado 2.3.9.

### **2.5.1. Elaboración de alimentos balanceados.**

Los alimentos se elaboraron en el laboratorio de nutrición del Centro de Investigaciones Pesqueras, La Habana, Cuba. Los ingredientes secos, con tamaño de partícula inferior a 50  $\mu\text{m}$ , se mezclaron hasta su completa homogeneización utilizando una mezcladora eléctrica (1kg de capacidad). Posteriormente se adicionaron los aceites y aproximadamente 250 ml de agua/kg de mezcla. La masa se procesó en la mezcladora eléctrica y se pasó por un molino de carne con dado de 2mm  $\varnothing$ . El alimento peletizado fue secado en una estufa con recirculación de aire forzado a 60 °C durante 10 horas, triturado con la ayuda de un mortero, tamizado hasta obtener tamaños de partículas entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ , y se almacenó en un refrigerador a 10°C hasta su empleo.

### **2.5.2. Ingredientes y composición química proximal de los alimentos experimentales.**

Los alimentos experimentales formulados, ingredientes utilizados y la composición química proximal se presentan en la Tabla XII.

La composición proximal de los alimentos balanceados fue determinada según los procedimientos establecidos por AOAC (1999), mientras que los pigmentos totales se determinaron por el método tricromático (Strikland y Parson, 1972).

Tabla XII. Composición en ingredientes (g/100g), proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) e hidroestabilidad de las dietas experimentales utilizadas para la alimentación de larvas y juveniles de *Litopenaeus schmitti* en los Experimentos III y V.

Ingredientes	Composición porcentual		
	Dieta HSP0	HSP2.5	HSP5
Harina de pescado <sup>1</sup>	35	32.5	30
Harina de soya <sup>2</sup>	13	13	13
Harina de camarón <sup>3</sup>	15	15	15
Harina de calamar <sup>3</sup>	16	16	16
Harina de Spirulina <sup>4</sup>	-	2.5	5
Aceite de pescado	4.5	4.5	4.5
Aceite vegetal	4.5	4.5	4.5
Premez- Vit+Min <sup>5</sup>	5	5	5
Carboximetilcelulosa.	5	5	5
Vit.C	0.5	0.5	0.5
Colesterol	0.5	0.5	0.5
Total	100	100	100
Composición química proximal (%)			
Humedad	8.4±0.06	8.1±0.05	7.9±0.07
Proteína cruda	46.0±0.08	46.9±0.12	47.0±0.09
Extracto Etéreo	13.9±0.04	14.2±0.06	14.4±0.02
Cenizas	8.3±0.02	8.4±0.04	8.5±0.03
Pigmentos Totales	0.05±0.003	0.48±0.07	0.84±0.08
Fibra cruda	2.5±0.02	2.6±0.04	2.7±0.05
Hidroestabilidad* (%)	92.26 ± 1.23	91.81± 0.95	92.23± 1.07

<sup>1</sup> Harina de anchoveta (*Engraulis* sp.) CORPESCA S.A., Chile.

<sup>2</sup> Molinera de Santiago de Cuba., Cuba

<sup>3</sup> Harina de camarón entero (*Litopenaeus schmitti* y *Farfantepenaeus notialis*) y harina de calamar (*Loligo* sp.), fabricadas en el laboratorio a partir de organismos obtenidos de la pesquería comercial.

<sup>4</sup> *Spirulina platensis*. GENIX®, La Habana, Cuba.

<sup>5</sup> Unión de Empresas de Piensos del MINAGRI. Cuba. (Cantidades por tonelada de premezcla):

Retinol, 12,500, UI; Tiamina, 10,000 mg; Riboflavina, 20,000 mg; Piridoxina, 10,000 mg; Cianocobalamina, 40.0 mg; Ácido Ascórbico, 500,000 mg; Calciferol, 2,400, UI; DL-alfatocoferol, 100,000 mg; Menadiona, 4,000 mg; Ácido Pantoténico, 40,000 mg; Cloruro Colina 1,600, mg; Ácido Fólico, 2,000 mg; Acido Nicotínico, 140,000 mg; Biotina, 1,000 mg; Inositol, 300,0 mg; Ácido Paraminobenzoico, 35,000 mg; Cobalto 200 mg; Cobre 2,000 mg; Hierro 20,000 mg; Yodo 1,500 mg; Manganeseo 40,000 mg; Zinc 20,000 mg; Selenio 00 mg.

\* De acuerdo a la metodología descrita por Goytortúa-Bores (2000).

Para el cálculo del cómputo químico de los alimentos (HSP0, HSP2.5 y HSP5) se siguió la metodología descrita en el apartado 2.3.4, utilizando el perfil aminoacídico de postlarvas de *Litopenaeus schmitti* (Gallardo et al., 1989).

Al finalizar el ensayo, con la aparición de las primeras postlarvas, se determinó longitud final de mysis y postlarvas desde el extremo anterior del rostrum hasta el extremo posterior del telson (apartado 2.3.6), supervivencia (apartado 2.3.7) e índice de desarrollo (ID) (apartado 2.3.8). Los valores absolutos utilizados en la fórmula 2 para el cálculo del ID fueron  $M_I = 4$ ,  $M_{II} = 5$ ,  $M_{III} = 6$  y  $PL_1 = 7$ .

Para el procesamiento estadístico de los resultados se siguió lo expresado en el apartado 2.3.9, aplicando además una regresión lineal entre el índice de desarrollo y el nivel de inclusión de HSP en el alimento.

## **2.6. Experimento IV. Evaluación del nivel de sustitución de *Artemia* por alimento microparticulado conteniendo 5% de harina de *S. platensis* (HSP5') en la alimentación de mysis de *Litopenaeus schmitti*.**

Para determinar el nivel de sustitución de nauplios de *Artemia* por alimento microparticulado, se desarrolló un ensayo con 5 tratamientos y tres repeticiones. La Tabla XIII muestra el esquema y las raciones de alimento (0.01mg/larva/ración) utilizados en cada tratamiento, y la Tabla XIV muestra la fórmula del alimento microparticulado que se utilizó. El experimento cubrió los estadios de mysis I ( $M_I$ ) hasta la primera postlarva ( $PL_1$ ), durante 120 horas. Se determinó el cómputo químico tomando como referencia la

composición aminoacídica de postlarvas de *Litopenaeus schmitti* informada por Gallardo *et al.* (1989).

En el ensayo se utilizaron recipientes plásticos circulares de 10 litros de capacidad y 5 litros de agua de mar filtrada con 35 ups, (Figura 5) y una densidad de 100 larvas/l. Los valores de los parámetros físico-químicos del agua registrados durante el experimento se presentan en la Tabla XV.

Tabla XIII. Tratamientos de alimentación, donde las raciones de nauplios de *Artemia* fueron reemplazadas por un alimento microparticulado con 5% de HSP (HSP5').

Tratamiento	Horas de alimentación											
	AM						PM					
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
HSP5-0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
HSP5-3	A	M	A	A	A	M	A	A	A	M	A	A
HSP5-6	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
HSP5-9	M	A	M	M	M	A	M	M	M	A	M	M
HSP5-12	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

A – Nauplios de *Artemia* (2 nauplios/ml)

M – Alimento microparticulado (1mg/l)

Tabla XIV. Fórmula del alimento experimental HSP5' elaborado en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, BCS, México, utilizado como sustituto de nauplios de *Artemia* en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti*.

<b>Ingredientes (HSP5')</b>	<b>g/100g en base húmeda</b>
Harina de pescado <sup>1</sup>	30.0
Pasta de soya <sup>1</sup>	13.0
Harina de camarón entero <sup>2</sup>	15.0
Harina de calamar <sup>1</sup>	16.0
Harina de <i>Spirulina platensis</i> <sup>3</sup>	5.0
Aceite de girasol <sup>1</sup>	5.56
Aceite de pescado <sup>1</sup>	5.65
Premezcla de vitaminas <sup>4</sup>	2.0
Premezcla de minerales <sup>5</sup>	0.5
Vitamina C	0.5
Colesterol	0.5
Lecitina de soya	1.0
Cloruro de colina <sup>6</sup>	0.2
Aglutinante (grenetina)	5.0
<b>Composición química proximal</b>	<b>g/100g de materia seca excepto humedad</b>
Proteína cruda	57.00 ±0.30
Extracto etéreo	13.53 ±0.04
Ceniza.	9.83 ±0.06
Fibra cruda	2.55 ±0.02
E.L.N.	17.09 ±0.43
Humedad	5.28 ±0.05
Energía (K J/g)	20.70±21.8

<sup>1</sup>PIASA®, La Paz, BCS. México.

<sup>2</sup> Harina de camarón entero (*Lipenaeus vannamei*) fabricada en el laboratorio.

<sup>3</sup> *Spirulina platensis*. GENIX®, La Habana, Cuba.

<sup>4</sup> Vit. A Acetato (20,000 UI/g) 5\*, Vitamina D<sub>3</sub> (850,000 UI/g) 0.001\*, dl-alfa-tocoferol acetato (250 UI/g) 8\*, Menadiona 2\*, Tiamina-HCl 0.5\*, Riboflavina (B<sub>2</sub>) 3\*, Piridoxina-HCl (B<sub>6</sub>) 1\*, DL Ca-Pantoténico 5\*, Ácido Nicotínico 5\*p, Biotina 0.05\*, Inositol 5\*, Vitamina B<sub>12</sub> 0.002\*, Ácido Fólico 0.18\*, alfa-celulosa 865.266\*, Vitamina C (Stay C con (35% aa) en 0,1 g/100 alimento seco y Cloruro de colina (62% aa) en 0.2 g/100 g. alimento seco.

<sup>5</sup> Cloruro de cobalto 0,004\*\*, Sulfato de cobre pentahidratado 0,25\*\*, Sulfato Férrico 4\*\*, Sulfato de Magnesio heptahidratado 28,397\*\*, Sulfato de Manganeso monohidratado 0,65\*\*, Ioduro de Potasio 0,067\*\*, Sulfato de Zinc heptahidratado 13,19\*\*, Alfa-celulosa 53,43\*\*, Fosfato de Calcio 0.2 g/100 g, Fosfato de Sodio dibásico, anhidro 2,9g / 100g (0,029%). \*g/Kg. \*\* g/100 g de premezcla.





Figura 5. Recipientes experimentales utilizados para evaluar diferentes niveles de sustitución de raciones de nauplios de *Artemia* en la alimentación de larvas ( $M_1$ - $PL_1$ ) de *Litopenaeus schmitti* en cultivo.

Tabla XV. Registro de parámetros físico-químicos del agua en el desarrollo del experimento donde las raciones de nauplios de *Artemia* se sustituyeron por alimento microparticulado (HSP5') para *L. schmitti*.

Parámetro	Promedio $\pm$ DE
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	28.10 $\pm$ 0.25
pH	8.05 $\pm$ 0.15
Salinidad (ups)	35.00 $\pm$ 0.00
Oxígeno disuelto (mg/l)	6.60 $\pm$ 0.65
Amonio (mg/l)	0.058 $\pm$ 0.032

Diariamente fueron realizadas observaciones microscópicas de las larvas para apreciar la motilidad, respuesta a la luz y determinar el sub-estadio de desarrollo, inspeccionándoles el tracto digestivo para verificar el consumo del alimento suministrado.

Para determinar la concentración y el residuo de nauplios *Artemia*, se utilizó un microscopio biológico y la cámara Bogorov, , ajustando la concentración según fuera el tratamiento, como se describió en el apartado 3.2.2.

### **2.6.1. Características generales de nauplios de *Artemia*.**

Se utilizaron nauplios recién eclosionados de *Artemia* (INVE, Utah,<sup>®</sup> E.U.A.). Los quistes fueron incubados en tanques cilindro-cónicos de 200 litros, durante 24 horas con iluminación continua por la parte superior. Se les suministró aireación vigorosa desde el fondo del reservorio mediante el empleo de piedras difusoras y un soplador de 5 Hp. La temperatura del agua osciló entre 27 y 28° C y la salinidad permaneció en 35 ups.

Para la elaboración del alimento se siguió la metodología descrita en el apartado 2.5.1.

En el Anexo 8.3 se presenta la composición química proximal y el perfil de amino ácidos esenciales de nauplios de *Artemia* recién eclosionados (Tacon, 1989).

Para determinar el cómputo químico de la fórmula HSP5' y nauplios de *Artemia* se siguió la metodología descrita en el apartado 2.3.4, utilizando la composición de postlarvas de *Litopenaeus schmitti* informada por Gallardo et al. (1989).

Al finalizar el ensayo, con la aparición de las primeras postlarvas, se determinó la longitud final de mysis y postlarvas desde el extremo anterior del rostrum hasta el extremo posterior del telson (apartado 2.3.6), supervivencia (apartado 2.3.7) e índice de desarrollo (apartado 2.3.8). Los valores absolutos utilizados en la fórmula 2 para el cálculo del ID fueron  $M_I = 4$ ,  $M_{II} = 5$ ,  $M_{III} = 6$  y  $PL_1 = 7$ .

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

Para el procesamiento estadístico de los resultados se siguió lo establecido en el apartado 2.3.9. La determinación del porcentaje óptimo de sustitución de raciones de nauplios de *Artemia* por alimento microparticulado, con base en la dependencia del ID, se realizó a través del método de la línea quebrada (Shearer, 2000).

### **2.7. Experimento V. Poder atrayente de HSP como aditivo alimentario para juveniles de *Litopenaeus schmitti*.**

Con el objetivo de conocer el poder atrayente de la harina de *Spirulina platensis* como aditivo alimentario para juveniles de *Litopenaeus schmitti*, se desarrolló un experimento con dos alimentos: uno con 5% de harina de *Spirulina platensis* (HSP5) y un control sin la microalga (HSP0). Se utilizaron juveniles de la misma especie (peso promedio de  $0,503 \pm 0,018$  g), ya que en esta fase de vida son más quimotácticamente activos que las postlarvas y los sub-adultos (Fernández, 1999). Los camarones fueron adaptados a las condiciones del laboratorio durante 15 días y en ese periodo se alimentaron con un pienso comercial de precría elaborado en la Fábrica de Santa Cruz del Sur, provincia Camagüey, Cuba.

El dispositivo experimental consistió en un acuario de vidrio de 75x40x40 cm, al que se le colocaron dos divisiones que permitieron que en el mismo quedara el espacio distribuido en tres partes iguales (izquierda-central-derecha) (Figura 6). Diez camarones (peso promedio  $0.503 \pm 0.018$  g), se ubicaron en la parte central con acceso a cualquiera de las secciones, en las cuales se depositaron los alimentos.

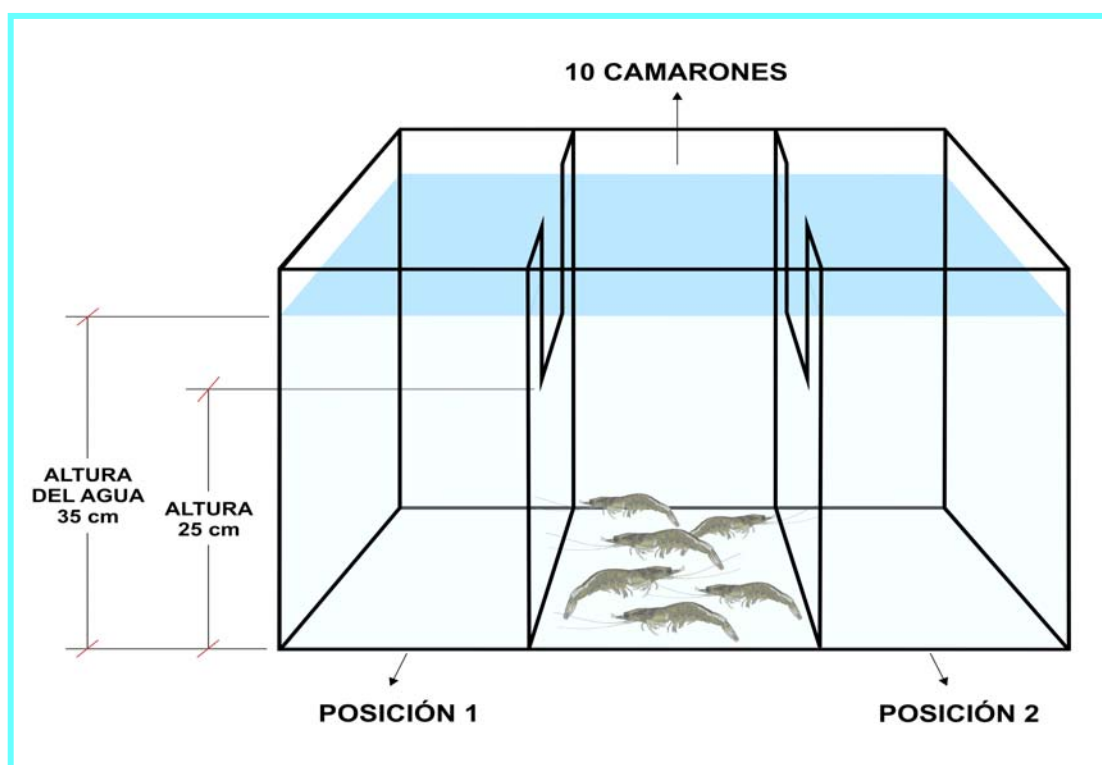


Figura 6. Dispositivo experimental diseñado (75x40x40cm) para la evaluación del poder atrayente de alimentos conteniendo HSP para juveniles de *Litopenaeus schmitti*.

Los juveniles ubicados en la parte central del dispositivo fueron sometidos a un ayuno de 24 horas antes de ser sometidos a la prueba. Para disminuir la influencia de factores externos, (i.e. en cuanto a la posición de los alimentos), el ensayo se repitió en 6 ocasiones, cambiando la posición de los alimentos, identificando el lado izquierdo con la letra P1 y el

derecho con la letra P2 (Tabla XVI). En cada uno de los ensayos, se situaron los alimentos y se esperó por 5 minutos posterior al retiro de la aireación, para observar el desplazamiento de los animales hacia el alimento de preferencia. Esta se estableció en función de la cantidad de camarones que se desplazó hacia cada alimento, e inició el proceso de ingestión.

Tabla XVI. Distribución de tratamientos por repetición, alimentos y posición.

Posición del alimento	Alimentos	
	HSP0	HSPS5
P1	P1-HSP0	P1-HSP5
P2	P2-HSP0	P2-HSP5

### 2.7.1. Análisis estadístico de los resultados.

Al final del ensayo se organizaron los datos primarios y se transformaron al inverso ( $1/x$ ). Se determinó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la Prueba de Bartlett. Se aplicó un modelo estadístico bifactorial y la prueba de Duncan de comparación múltiple de medias (Sigarroat, 1985). Los datos se presentan en porcentaje para su mejor comprensión.

Los parámetros físico-químicos que se evaluaron incluyeron temperatura (27.5- 28.2 °C), salinidad (32 ups), oxígeno disuelto (5.6-8.3 mg/l), y pH (8- 8.3).

En la Tabla XII del apartado 2.5.2 se muestran los alimentos experimentales utilizados para evaluar el valor de la harina de *Spirulina platensis* como atrayente (HSPO y HSP5) en juveniles de *Litopenaeus schmitti*. Los alimentos se colocaron razón de 20% de la biomasa de los camarones, para evitar que la cantidad de alimento pudiera interferir en los resultados.

## Capítulo 3. RESULTADOS

### 3.1. Experimento I. Evaluación de harinas de diferentes especies de microalgas en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

#### Crecimiento

En la Tabla XVII se muestran los valores mínimos, promedio ( $\pm$  DE), y máximos de las tallas alcanzadas por los camarones de cada tratamiento. El ANOVA indicó que el tamaño final no fue significativamente diferente ( $P > 0.05$ ) entre el control con alimento fitoplanctónico y los tratamientos donde se combinó *Chaetoceros muelleri* con las harinas de *Spirulina* (GENIX) o (EARTHRISE), y *C. muelleri* con harina de *Chlorella*. Los valores promedio en esos tratamientos variaron entre 2.64 y 2.67 mm. Sin embargo, con la combinación de *C. muelleri* con harina de *Dunaliella* se observaron larvas significativamente más pequeñas ( $P < 0.05$ ).

Tabla XVII. Longitud total final (mm) de las larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con harinas de diferentes especies de microalgas combinadas con alimento vivo fitoplanctónico, durante 144 horas.

Tratamientos	Media (x ± DE)	Mínimo	Máximo
I (control)*	2.65 ± 0.021 a	2.60	2.70
II= HSP (GENIX)	2.29 ± 0.060 c	2.20	2.40
III= HSP (EARTHRISE)	1.40± 0.020 d	1.40	1.50
IV= harina de <i>Chlorella</i>	0.96 ± 0.044 e	0.90	1.00
V= harina de <i>Dunaliella</i>	0.94± 0.020 e	0.90	1.00
VI= <i>C. muelleri</i> + HSP (GENIX)	2.67 ± 0.021 a	2.60	2.70
VII= <i>C. muelleri</i> + HSP (EARTHRISE)	2.67 ± 0.047 a	2.60	2.70
VIII= <i>C. muelleri</i> + harina de <i>Chlorella</i>	2.64± 0.016 a	2.60	2.70
IX= <i>C. muelleri</i> + harina de <i>Dunaliella</i>	2.55± 0.098 b	2.50	2.60

Exponentes iguales no difieren significativamente. DE : Desviación Estándar

\* *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Tetraselmis tetrathele*

Respecto a los tratamientos donde sólo se utilizaron las harinas de microalgas, el mejor crecimiento (2.29 mm) se alcanzó con HSP (GENIX), seguido de HSP (EARTHRISE) con 1.40 mm. Con el resto de las variantes (harina de *Chlorella* y harina de *Dunaliella*), menos del 20 % de las larvas rebasaron el subestadio de P<sub>I</sub> (Figura 7).

### Índice de Desarrollo

En la Tabla XVIII se señalan los valores del Índice de Desarrollo a las 144 horas del inicio del experimento para los 9 tratamientos. El mejor resultado ( $p < 0.05$ ) se obtuvo con la combinación de *Chaetoceros muelleri* + HSP (GENIX), seguida de la combinación de *C. muelleri* + harina de *Chlorella*, el Control y *C. muelleri* + HSP (EARTHRISE), entre los cuales no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los resultados más pobres se obtuvieron con las larvas alimentadas con harina de *Dunaliella* y las que consumieron



harina de *Chlorella*, en los cuales sólo pasaron al subestadio Protozoa II (P<sub>II</sub>) el 5.2 y el 12.5% respectivamente, del total de las larvas que se mantenían vivas al finalizar el experimento (Figura 7).

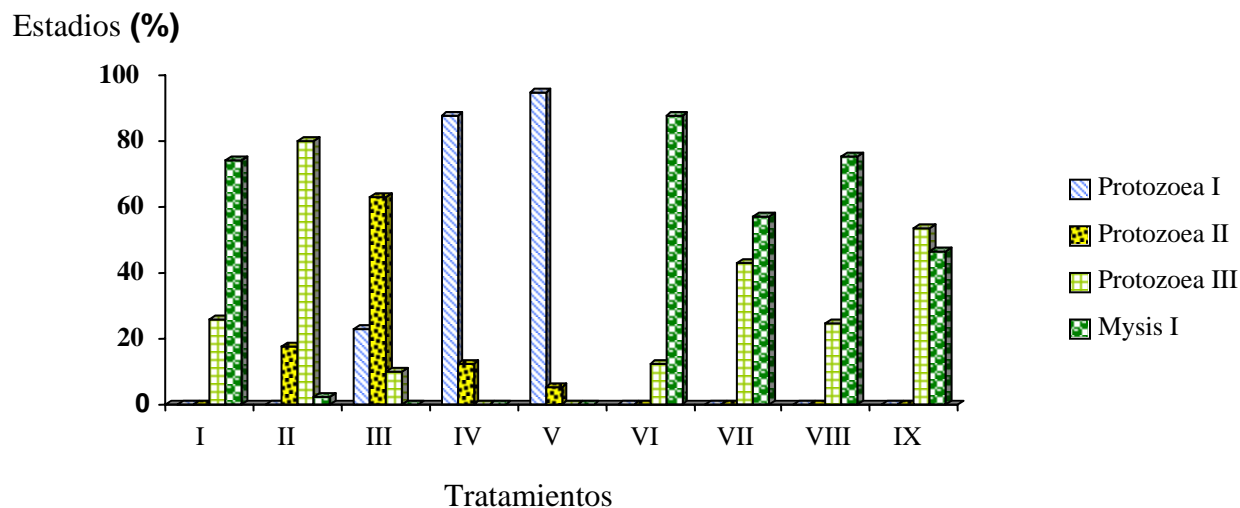


Figura 7. Composición porcentual de los subestadios larvales de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con harinas de diferentes especies de microalgas combinadas con alimento vivo fitoplanctónico, durante 144 horas. **I**= *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Tetraselmis tetraathele*; **II**=HSP (GENIX); **III**=HSP (EARTHRISE); **IV**=harina de *Chlorella*; **V**=harina de *Dunaliella*; **VI**=*C. muelleri* + HSP (GENIX); **VII**=*C. muelleri* + HSP (EARTHRISE); **VIII** = *C. muelleri* + harina de *Chlorella*; **IX**=*C. muelleri* + harina de *Dunaliella*.

Tabla XVIII. Índice de desarrollo de las larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con harinas de diferentes especies de microalgas combinadas con alimento vivo fitoplanctónico a las 144 horas.

Tratamientos	Media ( $\bar{x} \pm DE$ )	Mínimo	Máximo
I (control)*	$3.74 \pm 0.05^b$	2.69	3.78
II= HSP (GENIX)	$2.85 \pm 0.08^d$	2.79	2.94
III= HSP (EARTHRISE)	$1.82 \pm 0.023^e$	1.79	1.84
IV= harina de <i>Chlorella</i>	$1.12 \pm 0.02^f$	1.11	1.14
V= harina de <i>Dunaliella</i>	$1.07 \pm 0.06^f$	1.03	1.14
VI= <i>C. muelleri</i> + HSP (GENIX)	$3.88 \pm 0.03^a$	3.83	3.92
VII= <i>C. muelleri</i> + HSP (EARTHRISE)	$3.61 \pm 0.09^b$	3.49	3.78
VIII= <i>C. muelleri</i> + harina de <i>Chlorella</i>	$3.78 \pm 0.10^b$	3.69	3.89
IX= <i>C. muelleri</i> + harina de <i>Dunaliella</i>	$3.46 \pm 0.09^c$	3.36	3.54

Exponentes iguales no difieren significativamente ( $p > 0.05$ ). DE: Desviación Estándar

\* *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Tetraselmis tetrahele*

### Supervivencia

En la Tabla XIX se presentan los porcentajes de supervivencia por réplica y el promedio para cada tratamiento, lográndose los mejores resultados en las larvas que se alimentaron con alimento vivo fitoplanctónico y la combinación de alimento vivo con HSP (GENIX). Con las harinas de *Chlorella* y *Dunaliella* se obtuvieron las supervivencias más bajas, los cuales difieren significativamente respecto al resto ( $p < 0.05$ ).

Tabla XIX. Supervivencia (%) estimada, por réplicas y tratamientos, en larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con harinas de diferentes especies de microalgas combinadas con alimento vivo fitoplanctónico durante 144 horas.

Tratamientos	Réplicas			Promedio± D.E.
	1	2	3	
I (control)*	74.4	80.7	73.0	76.1± 4.1 <sup>a</sup>
II= HSP (GENIX)	64.4	68.6	64.0	65.7± 2.54 <sup>b</sup>
III= HSP (EARTHRISE)	51.7	53.9	50.4	52.0±1.56 <sup>c</sup>
IV= harina de <i>Chlorella</i>	36.5	40.3	34.1	36.9±3.12 <sup>d</sup>
V= harina de <i>Dunaliella</i>	26.1	20.2	22.1	22.8±3.01 <sup>e</sup>
VI= <i>C. muelleri</i> + HSP (GENIX)	79.7	80.4	71.9	77.3±4.71 <sup>a</sup>
VII= <i>C. muelleri</i> + HSP (EARTHRISE)	62.7	69.2	72.0	68.0±4.77 <sup>b</sup>
VIII= <i>C. muelleri</i> + harina de <i>Chlorella</i>	73.4	65.0	67.5	68.8±4.31 <sup>b</sup>
IX= <i>C. muelleri</i> + harina de <i>Dunaliella</i>	69.3	71.8	62.6	67.9±4.75 <sup>b</sup>

Exponentes iguales en la columna no difieren significativamente ( $p > 0.05$ )

\**Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Tetraselmis tetrathele*

En la Figura 8 se muestra la digestibilidad “*in vitro*” de proteína de las harinas de las diferentes especies de microalgas evaluadas. El valor alcanzado por HSP (GENIX) de Cuba (90.37%) fue significativamente superior a los demás tratamientos.

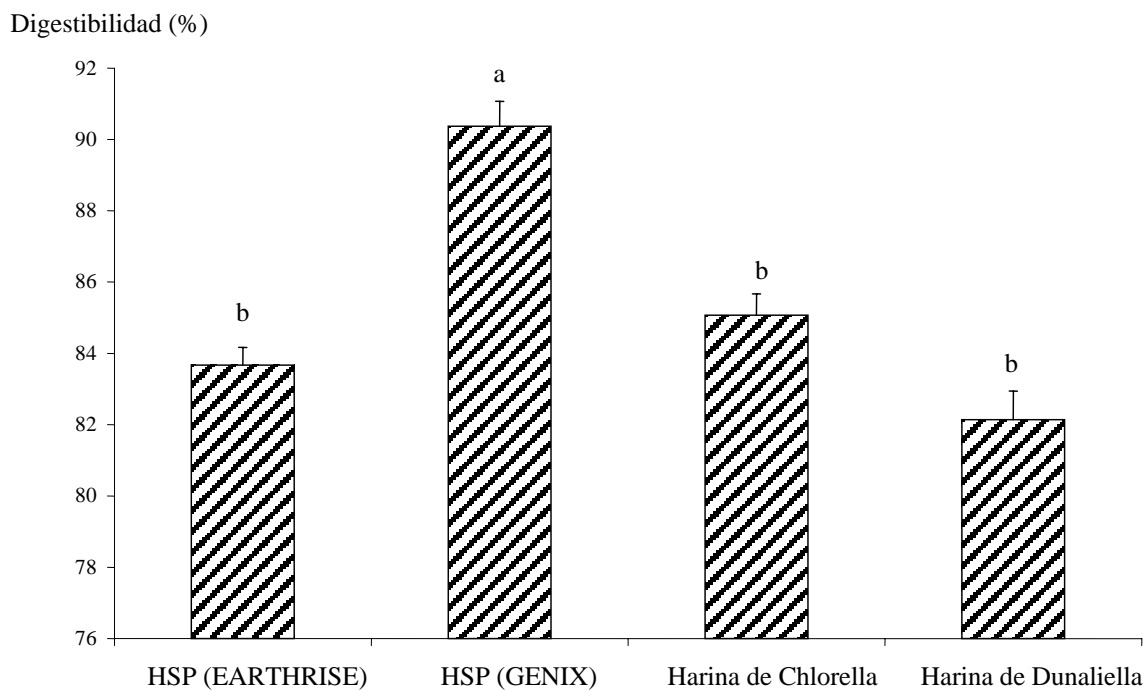


Figura 8. Porcentaje de digestibilidad proteica “*in vitro*” de HSP (EARTHRISE), HSP (GENIX), harina de *Chlorella* y harina de *Dunaliella*. Exponentes iguales no difieren significativamente ( $p>0.05$ ).

El cálculo del cómputo químico realizado a las diferentes harinas de microalgas, con respecto al patrón de aminoácidos esenciales para las larvas de *Marsupenaeus japonicus*, muestra cambios en los AAE limitantes de los diferentes alimentos utilizados (Tabla XX).

Tabla XX. Cómputo químico calculado (%) para las diferentes especies de microalgas evaluadas como alimento para larvas de *Litopenaeus schmitti*.

Aminoácidos (g/100g de peso seco)	Larva <sup>^</sup>	sp. 1	sp. 2	sp. 3	sp. 4	sp. 5	sp. 6
Treonina	3.8	78	165	79	155	110	95
Valina	5.6	46	64	67	105	119	126
Metionina	3.7	104	86	36	62*	62	54
Isoleucina	5.9	35*	39**	65	93	95	69
Leucina	7.8	87	64	69	116	123	41**
Fenilalanina	5.6	71	80	43	105	107	60
Lisina	8.4	38**	n.d	35	87	75	78
Histidina	2.1	38**	41	33**	79	83	76
Arginina	9.1	46	10*	47	70**	72	70
Triptofano	4.1	n.d	61	22*	n.d	10*	12*
Tirosina	5.9	39	n.d	49	76	61**	164

\* Primer aminoácido limitante

\*\*Segundo aminoácido limitante

n.d = no determinado

**Larva<sup>^</sup>:** *Marsupenaeus japonicus* (Teshima *et al.*, 1986)

**sp 1:** *Chlorella vulgaris*, **sp 2:** *Dunaliella salina*, **sp 3:** *Spirulina sp.*,

**sp 4:** *Chaetoceros sp.*, **sp 5:** *Thalassiosira sp.*, **sp 6:** *Tetraselmis sp.*

**3.2. Experimento II. Determinación del nivel óptimo de sustitución del alimento vivo fitoplanctónico (*Chaetoceros muelleri*) por harina de *Spirulina platensis* (HSP-GENIX) en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti* en cultivo.**

**Crecimiento y desarrollo de larvas de *Litopenaeus schmitti*.**

La respuesta de las larvas de *Litopenaeus schmitti* en términos de longitud total al final del ensayo mostró un intervalo de valores promedio entre 1.98 y 3.16 mm, e índices de desarrollo (ID) entre 2.84 y 3.93 para los diferentes niveles de sustitución evaluados. El análisis de regresión mostró relaciones significativas entre longitud total e ID con el porcentaje de sustitución de *Chaetoceros* por harina de *Spirulina platensis*. Los valores ajustados a un modelo cuadrático indicaron que el porcentaje óptimo de sustitución de *C. muelleri* por harina de *Spirulina* (Figura 9 a) fue de 34.2% para la longitud total ( $y = 2.853 + 0.01598x - 0.000233x^2$ ,  $r^2 = 0.8767$ ,  $P < 0.05$ ) y para el Índice de desarrollo (Figura 9 b), fue de 25% ( $y = 3.799 + 0.00945x - 0.000189x^2$ ,  $r^2 = 0.9961$ ,  $p < 0.05$ ).

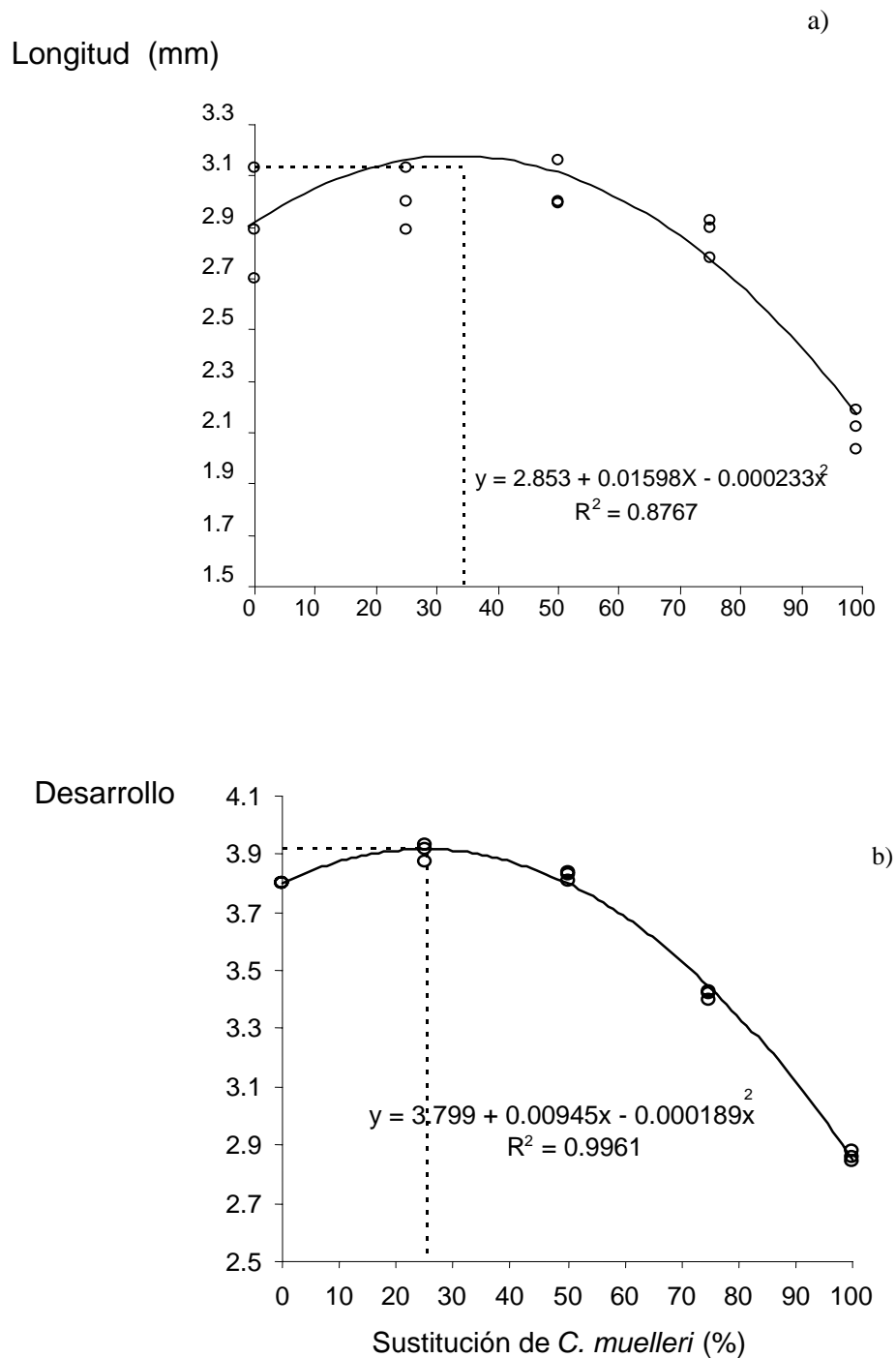


Figura 9. Efecto de diferentes niveles de sustitución de *C. muelleri* por HSP sobre la respuesta nutricional de larvas de *Litopenaeus schmitti* a) Longitud total. b) Índice de desarrollo. Las líneas discontinuas indican el porcentaje óptimo de sustitución donde se alcanza la mayor respuesta.

Las dietas logradas con las combinaciones de los alimentos muestran aumentos de 8.62 a 13.0  $\mu\text{g}$  en los valores proteicos estimados y una disminución en cuanto a lípidos de 4.29 a 1.20 $\mu\text{g}$  y de energía de 0.364 a 0.310 Joules/ 20 $\mu\text{g}$  de dieta (Tabla X).

Teniendo en cuenta los porcentajes de sustitución óptimos estimados (34.2 y 25%) se consideró como recomendable un valor intermedio de 30% de sustitución de *C. muelleri* por HSP, el cual es equivalente a 0.078 mg/larva/día de proteína; 0.026 mg/larva/día de lípidos y 2.732 J/larva/día de energía.

### **Supervivencia**

La supervivencia alcanzada varió de 82–87% y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de alimentación aplicados ( $p>0.05$ ).

### **Índices nutricionales**

Los resultados de la digestibilidad proteica “*in vitro*” fueron de 90.37% para la HSP y de 92% para *C. muelleri*. No hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre ambos alimentos.

El cómputo químico (Tabla XXI) mostró que el primer y segundo aminoácidos limitantes para HSP fueron histidina y lisina, y para *C. muelleri* fueron histidina y arginina.



Tabla XXI. Cómputo químico (%) de *C. muelleri* y HSP en relación al perfil aminoacídico de *L. schmitti* informado por Gallardo et al. (1989).

AAE	<i>L. schmitti</i> (g/100g de peso seco)	<i>C. muelleri</i>	HSP
Arginina	8.96	71.4**	106
Metionina + Cistina	2.66	86	151
Histidina	3.36	68*	63*
Isoleucina	4.80	114	178
Lisina	8.89	82.1	74.5**
Fenilalanina+Tirosina	4.72	220	252
Treonina	3.06	192.8	221
Triptofano	1.14	nd	175
Valina	5.0	118	168
Leucina	7.9	115	153

AAE: Amino ácidos esenciales. nd = no determinado

\* Primer AAE limitante.

\*\* Segundo EAA limitante.

### 3.3. Experimento III. Evaluación de la Harina de *Spirulina* (HSP) como aditivo en alimentos microparticulados para larvas de *L. schmitti*.

#### Crecimiento, Desarrollo y Supervivencia.

En la Tabla XXII se muestran los valores promedio para la longitud total, porcentaje de supervivencia e índice de desarrollo al final del experimento. Las larvas que fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* (tratamiento control) fueron significativamente más grandes en longitud ( $p < 0.05$ ) con respecto a las que consumieron microparticulados. Sin embargo, el crecimiento de las larvas no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los alimentos microparticulados. El índice de desarrollo fue más alto a medida que se incrementó el nivel de HSP en la dieta (Figura 10), encontrándose una relación significativa entre estos dos factores ( $R^2 = 0.9868$ ). Las larvas que consumieron el alimento vivo y la dieta microparticulada enriquecida con 5% de HSP tuvieron supervivencias e índices de desarrollo similares y los que consumieron los alimentos HSP0 y HSP2.5 fueron menores ( $p < 0.05$ ) que el control.

Tabla XXII. Valores promedio ( $\pm$  DE) para longitud total, supervivencia e índice de desarrollo de larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con diferentes niveles de inclusión de HSP en el alimento.

Tratamiento	Longitud total (mm)	Supervivencia (%)	Índice de Desarrollo
Control	$3.71 \pm 0.03^b$	$85.3 \pm 3.1^a$	$7.00 \pm 0.12^c$
HSP0	$3.43 \pm 0.02^a$	$86.1 \pm 4.3^a$	$6.72 \pm 0.03^a$
HSP2.5	$3.48 \pm 0.05^a$	$80.5 \pm 3.8^a$	$6.78 \pm 0.04^b$
HSP5	$3.44 \pm 0.03^a$	$84.2 \pm 3.5^a$	$6.82 \pm 0.04^c$

Valores con la misma letra dentro de las columnas no difieren significativamente ( $p > 0.05$ ).

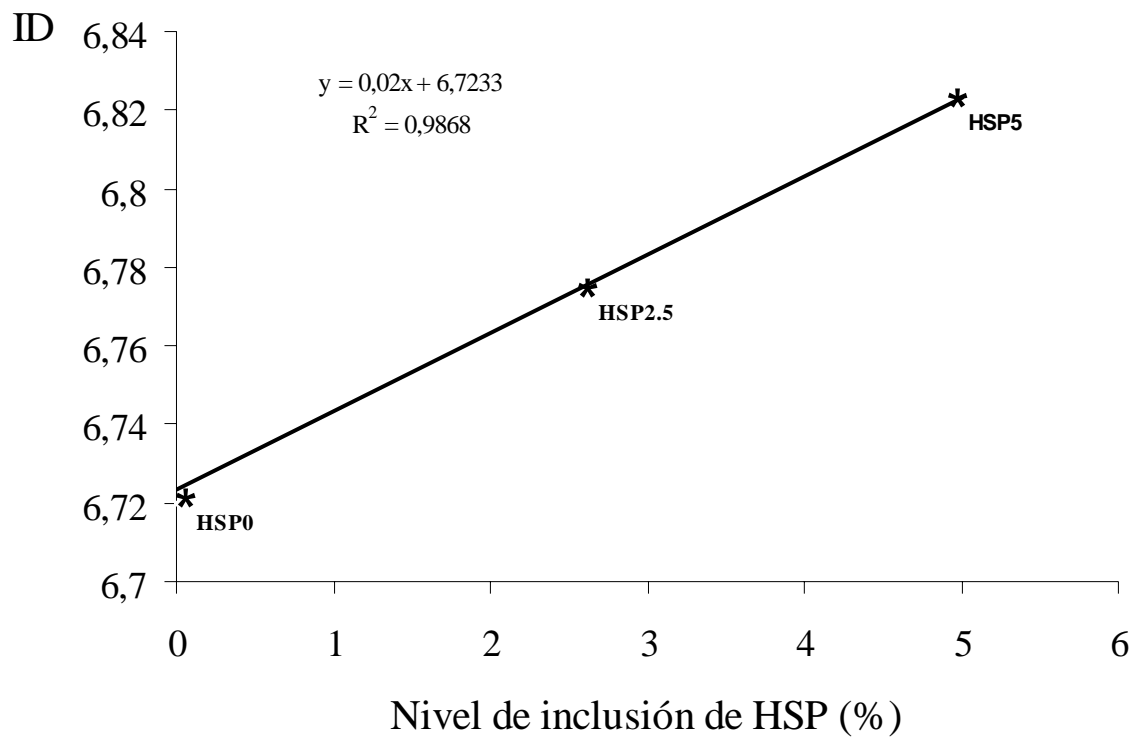


Figura 10. Relación entre el Índice de desarrollo (ID) y el nivel de inclusión de HSP en alimentos para larvas de *Litopenaeus schmitti*. (x= nivel de inclusión de HSP, y = Índice de desarrollo).

## Cómputo Químico

El cómputo químico realizado a las dietas experimentales (Figura 11) muestra la similitud de las formulaciones con respecto al balance de aminoácidos de las fuentes proteicas utilizadas y su relación con el patrón de AAE de postlarvas de *L. schmitti*, tomado como referencia. Es importante señalar que triptofano e histidina fueron el primer y segundo aminoácidos limitantes.

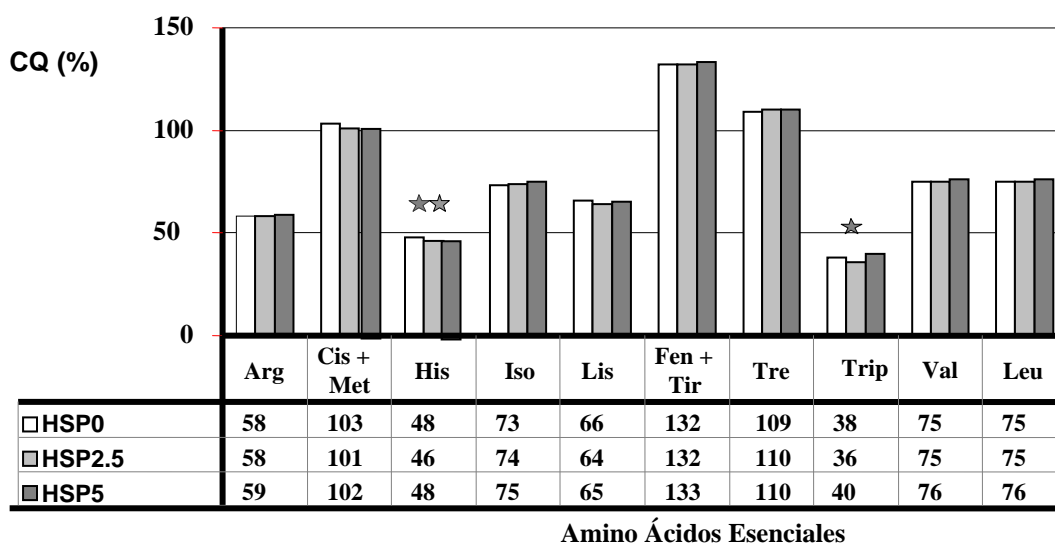


Figura 11. Cómputo químico (CQ %) de los alimentos microparticulados evaluados en relación al perfil de aminoácidos esenciales (AAE) de postlarvas de *Litopenaeus schmitti*. \* Primer AAE limitante. \*\* Segundo AAE limitante.

### **3.4. Experimento IV. Sustitución parcial y total de las raciones de nauplios de *Artemia* por alimento microparticulado en la alimentación de larvas de *L. schmitti*.**

No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en cuanto a la longitud total de las larvas alimentadas con los diferentes niveles de sustitución de raciones de *Artemia* (Tabla XXIII). El índice de desarrollo de las larvas disminuyó significativamente ( $p<0.05$ ) al sustituir el 100% de las raciones de nauplios de *Artemia* por el alimento microparticulado HSP5'. Los valores de ID en relación con las combinaciones de raciones de alimentos empleadas, fueron ajustados a un modelo de línea quebrada, donde el intercepto entre las rectas resultantes indica que la combinación óptima fue de 8 raciones de microparticulado y 4 de nauplios de *Artemia* (Figura 12) para alcanzar el mayor Índice de desarrollo en las larvas. Esta relación fue descrita por la ecuación  $[y = ((6,82556) + 0*x)*(x \leq 7) + ((8,31) + (-,18)*x)*(x > 7)]$  por lo que según este resultado es posible sustituir el 66% de las raciones de nauplios de *Artemia* por el alimento balanceado microparticulado utilizado en este estudio.

No se encontró influencia del alimento suministrado en la supervivencia final de las larvas, encontrándose porcentajes cercanos al 70 % (Tabla XXIII).

Tabla XXIII. Supervivencia, longitud total e índice de desarrollo (promedio  $\pm$  Error Estándar) de larvas de *L. schmitti* alimentadas con diferentes combinaciones de nauplios de *Artemia* y alimento microparticulado HSP5' (Experimento V).

<b>Tratamientos</b>	<b>Longitud total (mm)</b>	<b>Índice de Desarrollo</b>	<b>Supervivencia (%)</b>
HSP5-0	3.68 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>	6.81 $\pm$ 0.031 <sup>b</sup>	71.7 $\pm$ 8.82 <sup>a</sup>
HSP5-3	3.74 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>	6.79 $\pm$ 0.064 <sup>b</sup>	68.0 $\pm$ 4.41 <sup>a</sup>
HSP5-6	3.69 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>	6.86 $\pm$ 0.031 <sup>b</sup>	70.0 $\pm$ 4.99 <sup>a</sup>
HSP5-9	3.72 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	6.69 $\pm$ 0.080 <sup>b</sup>	70.0 $\pm$ 5.77 <sup>a</sup>
HSP5-12	3.75 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>	6.15 $\pm$ 0.075 <sup>a</sup>	68.0 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>

Valores con iguales letras en las columnas no difieren significativamente ( $p > 0.05$ ).

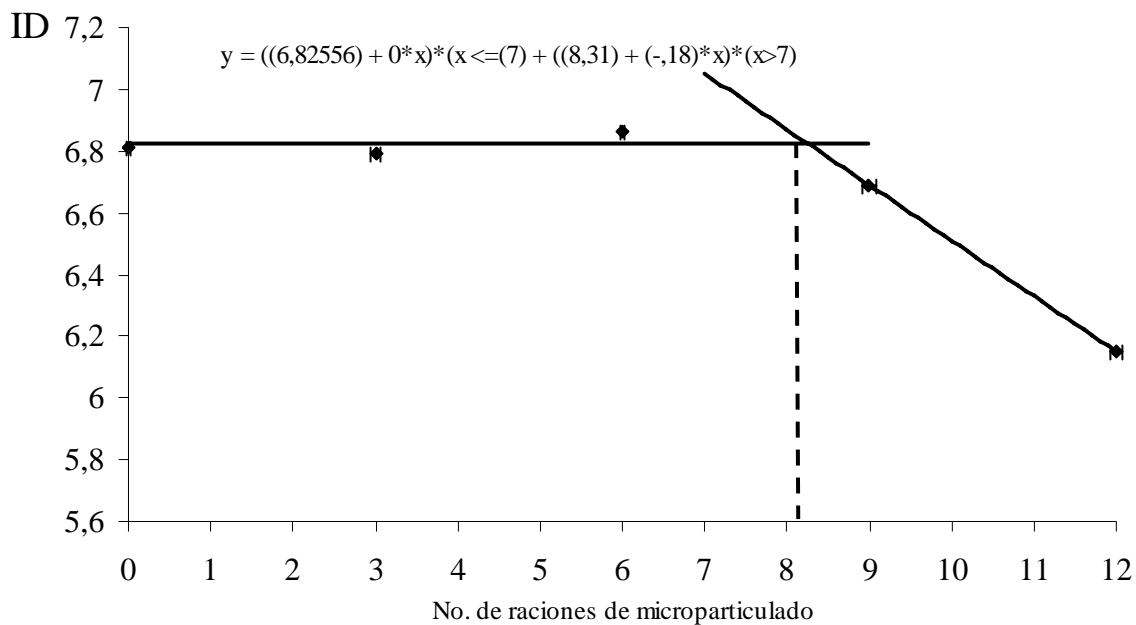


Figura 12. Efecto de diferentes niveles de sustitución de raciones de nauplios de *Artemia* por microparticulado sobre el índice de desarrollo de larvas de *Litopenaeus schmitti*. La línea discontinua indica el número recomendable de raciones de microparticulado a utilizar para alcanzar la mayor respuesta.

### Cómputo químico

El cómputo químico estimado del alimento experimental HSP5 (Figura 11), tomando como referencia el perfil de aminoácidos de postlarvas de *Litopenaeus schmitti*, muestra que en su composición están presentes todos los aminoácidos contenidos en las postlarvas de *L. schmitti*, siendo triptofano e histidina el primer y segundo aminoácidos limitantes.

Por otro lado, en la Figura 13 se muestra la similitud del perfil aminoacídico de los nauplios de *Artemia* en relación con la composición de aminoácidos de *L. schmitti*. Aunque histidina y la combinación de cistina + metionina, se encontraron como el primer y segundo aminoácidos limitantes, respectivamente.

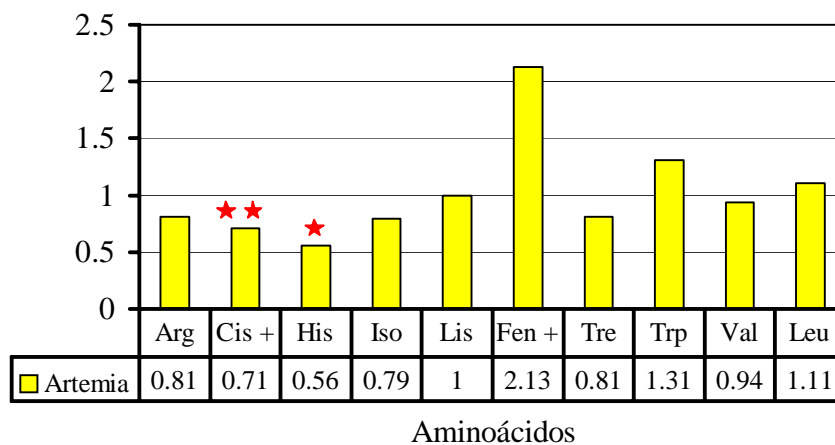


Figura 13. Cómputo químico de nauplios de *Artemia* tomando como referencia el perfil de aminoácidos de *L. schmitti*. \* Primer AAE limitante. \*\*Segundo AAE limitante.

### 3.5. Experimento V. Determinación del poder atrayente de HSP como aditivo alimentario para juveniles de *Litopenaeus schmitti*.

#### Hidroestabilidad de los alimentos.

Los resultados de las pruebas de hidroestabilidad realizadas a los alimentos experimentales se presentan en la Tabla XII. No hubo diferencia entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ). Este factor influyó de manera similar en el comportamiento de los camarones, frente a los alimentos formulados, al alcanzar valores de cercanos al 92 % de materia seca retenida.

#### Poder atrayente de la HSP.

El dispositivo experimental permitió desarrollar de forma satisfactoria este estudio y puede ser replicado sin dificultades en condiciones de laboratorio para evaluar el poder atrayente de alimentos para camarones.



El análisis bifactorial mostró que no hubo interacción significativa entre los factores, y que el tipo de alimento influyó significativamente en la atracción, aunque la posición no tuvo efecto significativo alguno. Del total de camarones sometidos a experimentación, el porcentaje mayor (68%) se desplazó a la posición donde se encontraba el alimento con 5% de inclusión de HSP, demostrando el mayor poder atrayente de HSP sobre los camarones juveniles de la especie *Litopenaeus schmitti*.

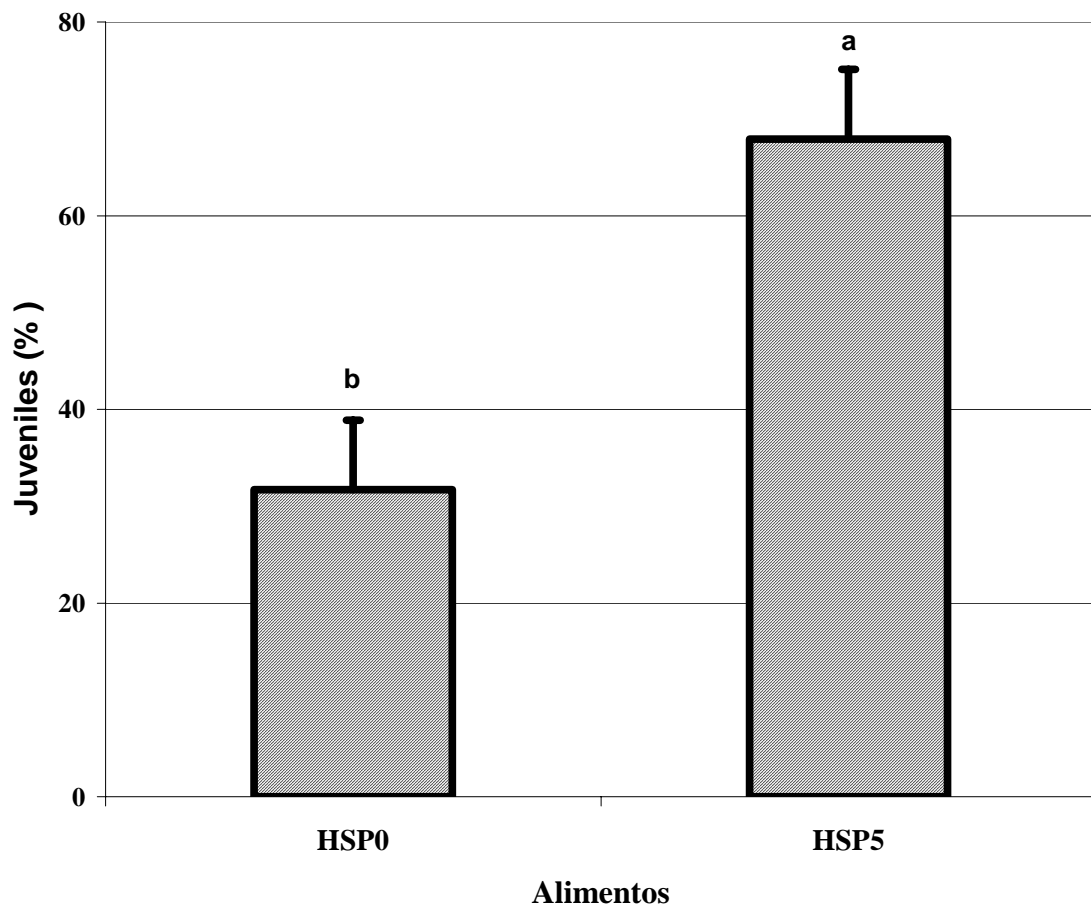


Figura 14. Porcentaje de camarones (promedio  $\pm$  DE) que se desplazaron hacia los alimentos con y sin HSP (Experimento V). Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## Capítulo 4: Discusión

### 4.1 Experimento I. Evaluación de harinas de diferentes especies de microalgas en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

Los resultados de esta investigación demuestran que el suministro de microalgas en forma combinada produce mejores resultados que cuando la alimentación se basa en el uso de una sola especie de microalga, coincidiendo con lo recomendado por Lovell (1998). Los tratamientos que incluyeron harina de *Spirulina* sp. producen la mejor respuesta en términos de ID, longitud total y supervivencia, mientras que cuando se emplearon harinas de microalgas por separado los resultados fueron pobres. El crecimiento mostró diferencias significativas respecto al control (Tabla XV). Las tallas mayores se encontraron cuando se utilizó HSP (GENIX). Este resultado contrasta con el obtenido por Narciso (1995), quien comparó diferentes especies de microalgas vivas con harina de *Spirulina* sp. como fuente de alimento, y no encontró que las dietas influyeran significativamente en la longitud total de las larvas de *Melicertus kerathurus*.

Los resultados del crecimiento en este experimento al emplear las combinaciones de microalgas vivas y secas fueron similares a los alcanzados por Gelabert et al. (1988), quienes obtuvieron incrementos entre 2.64 a 2.71 mm desde P<sub>I</sub> hasta M<sub>I</sub> al emplear dietas consistentes en levadura tórula como alimento suplementario, combinado con *Chaetoceros ceratosporum* y *Tetraselmis tetrahele*.

Los valores más bajos de ID se encontraron en las larvas que fueron alimentadas con microalgas secas aunque, entre ellas, la mejor respuesta correspondió a HSP (GENIX) de Cuba, con un valor de 2.85. Cuzón (1996) concluyó que las larvas de *Litopenaeus*

*vannamei*, *Penaeus monodon* y *Litopenaeus stylirostris* no se desarrollaron en el mismo tiempo, cuando evaluó la levadura de pan como alimento, asegurando que ésta carecía de algunos nutrientes, como los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga, o que había una pobre digestión del alimento. Esto pudiera explicar la respuesta de protozoas alimentadas con las microalgas secas *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella salina*, las cuales no lograron rebasar el subestadio de protozoa II (P<sub>II</sub>), mostrando índices de desarrollo cercanos a 1. Kurmaly et al. (1989), al comparar la respuesta a diferentes alimentos de protozoas de *Penaeus monodon*, lograron índices de desarrollo menores a 2 al emplear *Dunaliella tertiolecta*, debido al pobre contenido de ácidos grasos poli-insaturados 20:5 $\omega$ 3 y 22:6 $\omega$ 3. En el presente estudio, *D. salina* se comportó de manera similar con un índice de desarrollo promedio de 1.07.

Por otro lado, Sunilkumar (1996), buscando minimizar el empleo de microalgas vivas, utilizó diferentes bacterias marinas no patógenas como alimento en la dieta de larvas de *P. monodon*. Al sustituir totalmente a *Chaetoceros calcitrans* las larvas no cambiaron de estadio de protozoa III (P<sub>III</sub>) a mysis I (M<sub>I</sub>).

Las investigaciones sobre la cría larvaria de penéidos con alimento vivo, dietas artificiales y la combinación de éstas, señalan los efectos benéficos en el uso de combinaciones de alimentos (Amjad y Jones, 1992; Sunilkumar, 1996; Márquez, 1997). Al producirse una mezcla complementaria de nutrientes, generalmente se obtienen mejores resultados que cuando se emplea un sólo alimento en particular. Tal es el caso de, por ejemplo, los aminoácidos, los cuales pueden llegar a cubrir o exceder los requerimientos nutritivos por el animal (Lovell, 1998).

Aunque la metamorfosis hasta mysis I se dificultó cuando se alimentó con harina de microalgas solamente, la supervivencia alcanzada en los tratamientos con HSP puede considerarse aceptable para la cría de larvas, siendo superior a las logradas por Narciso (1995) al alimentar larvas de *M. kerathurus* con harina de *Spirulina* sp. Otros autores (vgr. Kumlu y Jones, 1995) han reportado resultados satisfactorios de supervivencia (entre 81 y 95%) en larvas de *F. indicus* alimentadas con dietas microparticuladas.

Ottogalli (1993), por su parte, no encontró diferencias significativas en cuanto a la supervivencia al sustituir el 100% de algas vivas por alimento artificial microparticulado, asegurando que con este reemplazo se logra una reducción significativa de los costos de la producción. De forma similar, Kurmaly et al. (1989) no encontraron diferencias significativas en supervivencia y crecimiento de mysis de *P. monodon* al sustituir dietas basadas en microalgas (*Rhodomonas baltica* y *Tetraselmis chuii*), por alimentos microencapsulados.

El cómputo químico realizado a los diferentes alimentos muestra que ninguna de las especies de microalgas secas evaluadas cubre los requerimientos de aminoácidos esenciales para las larvas de penéidos. Sin embargo, es de notar que el género *Spirulina* constituyó un mejor alimento para las larvas que *Chlorella* y *Dunaliella*, pues tienen representados en su composición todos los aminoácidos esenciales para las larvas. Todo parece indicar que las proporciones en que se presentan permiten lograr un mejor equilibrio nutricional con respecto al resto de las microalgas secas.

Venkataraman y Becker (1985) y Brown et al. (1989) reportaron que durante el almacenamiento prolongado o tratamiento con calor de microalgas, los grupos aminos libres de la lisina tienden a formar compuestos con carbohidratos reducidos, haciendo a la

lisina no digerible. Por otro lado, las proteínas de las microalgas generalmente son deficientes en metionina y cistina, por lo que estos aminoácidos pueden volverse limitantes para el desarrollo de las larvas. Además, los procesos de conservación, así como las condiciones de cultivo, pueden influir en el contenido de vitaminas en las microalgas, afectando con ello su calidad como alimento de las larvas. Ohs y D'Abramo (1998) informaron que las técnicas de secado por aspersión incrementan el contenido de proteínas y lípidos de las partículas microalgales, pero pueden provocar reducción de su digestibilidad.

Aunque el contenido proteico de los ingredientes secos es lo suficientemente elevado como para poder ser utilizados en las dietas, parte de su contenido en nitrógeno proviene de los ácidos nucleicos, reduciendo el porcentaje real de proteína (Higuera y Cardenete, 1987).

En general, los estadios larvales herbívoros de los camarones penéidos no tienen requerimientos elevados de proteína, pero ésta debe ser de alta calidad nutricional para que se manifieste en mejores tasas de crecimiento, mayor velocidad de metamorfosis y altos porcentajes de supervivencia (Besbes y Guillaume, 1989).

Por otro lado, Pascaud (1993) reporta que la composición de los lípidos de *Spirulina* sp. varía dependiendo de la cepa de *Spirulina* y de las condiciones en que fueron cultivadas, ocurriendo que muchas cepas son ricas en el ácido graso polinsaturado (AGPI)  $\gamma$ -linolénico 20:3 $\omega$ 6, pero pobres en el ácido linolénico 18:3 $\omega$ 3, mientras que otras son pobres en AGPI de la serie  $\omega$ 6, pero ricas en ácido linolénico.

Considerando lo antes expuesto, se puede inferir que los mejores resultados alcanzados con la *Spirulina* sp. producida en Cuba en relación con la marca EARTHRISE, pudieran estar

dados por varios factores: 1) Porque son cepas distintas del mismo género; y 2) las condiciones de cultivo, así como los procesos de cosecha y secado para la obtención de la harina, fueron diferentes. De ser este el caso, estos factores pudieron provocar una disminución en la digestibilidad *in vitro* de la proteína de la cepa de EARTHRISE (83.67%) con respecto a la cubana (90.37%).

Alfonso et al. (1988) reportaron que el desarrollo de las larvas se ve afectado cuando la calidad del alimento es limitada y que la metamorfosis no se diferencia ante regímenes adecuados de alimentación. Estadísticamente, el mejor índice de desarrollo en el Experimento I, se alcanzó con la mezcla de microalgas vivas y HSP, con un valor de 3.8 en 144 horas. Esto es inferior a lo publicado por Gelabert et al. (1988), quienes observaron las primeras mysis a las 72 horas a partir de P<sub>I</sub>, al utilizar una mezcla de *Chaetoceros ceratosporum* con *Tetraselmis tetrathele* y la combinación de éstas con levadura tórula respectivamente.

Estévez (1985) al alimentar protozoas de *Farfantepenaeus notialis* con la levadura marina *Rhodotorula sp.* obtuvo 85% de P<sub>III</sub> después de 142 horas, tiempo similar al alcanzado en el presente experimento. Por su parte, Márquez (1997), al alimentar protozoas de *L. schmitti* usando una dieta microparticulada con 30% de inclusión de levadura tórula, observó que el 100% de las larvas arribó al estadio de mysis a las 144 horas.

Biedenbach et al. (1990) alimentaron larvas de *L. vannamei* con microalgas secadas por aspersión y no encontraron diferencias significativas en crecimiento y supervivencia en sustituciones de alimento vivo de hasta 75%. En el presente experimento, las supervivencias más altas fueron del orden de 77.3% para HSP cubana + *C. muelleri* y 76.1% para el control con *C. muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Tetraselmis tetrathele*, que

son inferiores a las reportadas por Gelabert et al. (1988) en la cría de larvas de *L. schmitti*, en donde alcanzaron supervivencias entre 91.4% y 94.5% hasta M<sub>III</sub> al emplear levadura tórula como complemento de microalgas vivas, pero similares a las alcanzadas por Márquez (1997) para dicha especie, al alimentar con una mezcla de fitoplancton y alimento microparticulado.

Por otra parte, la sustitución de 70% de *Chaetoceros calcitrans*, por *Micrococcus* sp. y una cepa de *Pseudomonas* sp. en la alimentación de protozoas de *P. monodon* permitió alcanzar supervivencias superiores que con el empleo de la diatomea como único alimento Sunilkumar (1996). Durante la acumulación de fuentes nutricias, el alimento vivo fitoplanctónico estimula la secreción de enzimas digestivas, fundamentalmente la tripsina, que permiten una mejor asimilación de los alimentos artificiales, mejorando el crecimiento y la supervivencia de las protozoas (Kurmary *et al.*, 1989; Kumlu y Jones, 1995; Drenar, 1996).

Coutteau (1996) afirma que el crecimiento de animales alimentados con mezclas de diferentes especies microalgales es frecuentemente superior al que se obtiene cuando son alimentados sólo con una especie. Dicho planteamiento se ha corroborado con este experimento, aunque es importante destacar que, para fines de investigación, es necesario evaluar distintos alimentos como componente único de la dieta, para así discernir las ventajas nutricionales que puede tener uno con respecto al resto y la forma en que pueden complementarse cuando se combinan.

#### **4.2. Experimento II. Nivel óptimo de sustitución de alimento vivo fitoplanctónico (*Chaetoceros muelleri*) por harina de *Spirulina platensis* (HSP-GENIX) en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti*.**

Los resultados de este experimento muestran que, con base al ID, es posible reemplazar hasta el 50% de *C. muelleri* por HSP en la alimentación de larvas de *L. schmitti*, mientras que en términos de longitud final es posible retirar hasta un 75% de la microalga. Aunque se han establecido los efectos benéficos del uso de mezclas de alimentos en la cría de las larvas (Biedenbach *et al.*, 1990; Sunilkumar, 1996; D'souza *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 1989; Ottogalli, 1991; Amjad y Jones, 1992; Boeing, 2005), son pocas las investigaciones que estiman los valores óptimos de sustitución. Las ventajas de usar el análisis de regresión para determinar el valor óptimo ha sido planteada por Shearer (2000). De los resultados de las ecuaciones aplicadas en este estudio, se sugiere que el nivel óptimo de sustitución, para mejorar simultáneamente el índice de desarrollo y la longitud final de las larvas, es aproximadamente 30%.

Por otro lado, cabe destacar que tasas de supervivencia similares a las encontradas en este trabajo fueron reportadas para ensayos de alimentación de larvas de *L. schmitti* (Gelabert *et al.*, 1988; Jaime *et al.*, 1996; Márquez, 1997) y otras especies de penéidos (Galgani y AQUACOP, 1988; Ottogalli, 1991; Kumlu y Jones, 1995).

Entre las características del alimento que determinan su aprovechamiento por los crustáceos, se encuentran su tamaño, digestibilidad, la biodisponibilidad de nutrientes y la presencia de factores nutricionales esenciales (Kurmaly *et al.*, 1989; Webster *et al.*, 1994). Durante la etapa de protozoa, la alta actividad enzimática maximiza la asimilación de la



dieta ingerida (Jones, 1998), aunque algunos autores refieren problemas con la digestibilidad de microalgas, asociados a su pared celular (Rodríguez *et al.*, 1994; Le Vay *et al.*, 2001). Los estudios de digestibilidad “*in vivo*” (Kawamura *et al.*, 1995) brindan información sobre la asimilación de nutrientes. En este estudio, la digestibilidad *in vitro* de proteína de *C. muelleri* y HSP fue similar, por lo que consideramos que las diferencias en respuesta de las larvas son fundamentalmente consecuencia de la composición nutritiva lograda en cada dieta.

La combinación de nutrientes que se logró con la sustitución de microalga viva por HSP muestra que a medida que se incrementa el porcentaje de reemplazo de *Chaetoceros muelleri* por HSP se hace mayor el nivel proteico de la dieta, y el contenido lipídico y energético disminuye (Tabla VII). Esto implica que al realizar sustituciones de *Chaetoceros* por encima de 50% pueden afectarse negativamente los índices productivos (ID, crecimiento y supervivencia) por carencia de nutrientes importantes, como los AGPI o déficit en el valor energético de la dieta por debajo de lo requerido por la especie en este estadio del ciclo de vida.

El análisis de los aminoácidos esenciales muestra que histidina y lisina pueden ser limitantes, cuando se incrementan los niveles de sustitución por encima del 50%. Shuli y Baoqing (1992) determinaron que las proporciones de lisina, arginina y metionina en *Spirulina* fueron inferiores a las del músculo de *Penaeus orientalis*, y argumentaron que esta puede ser una de las causas por las que el uso de una sola especie redundó en peores resultados, independientemente del nivel proteico que contengan.

Los valores óptimos en longitud total e índice de desarrollo estimados para las larvas en este estudio pueden ser explicados en términos del equilibrio de nutrientes alcanzado con

una dieta en particular. Sin embargo, es necesario focalizar futuras investigaciones a definir, a partir del alimento consumido, los requerimientos energéticos de larvas de *L. schmitti* en cultivo.

Varios estudios han demostrado la importancia alimenticia de los lípidos para el desarrollo larval de diferentes especies de penéidos (Ward *et al.*, 1979; Teshima y Kanazawa 1982; Kanazawa *et al.*, 1985; Teshima *et al.*, 1986; Cahu *et al.*, 1988; Sorgeloos y Leger, 1992). La disminución de ácidos grasos en el alimento puede dar lugar a larvas de bajo crecimiento y poco desarrollo (Kurmalý *et al.*, 1989; Cuzon, 1996; Shuli y Baoqing, 1992). La composición teórica de las diatomeas y de HSP sugiere que limitaciones de ácidos grasos esenciales pudieron haber influido en el desarrollo de las larvas de *Litopenaeus schmitti*. Son necesarias investigaciones futuras para confirmar que la reducción observada en el crecimiento con niveles de sustitución superiores al 50% está relacionada con la carencia en ácidos grasos.

Por otro lado, un posible efecto tóxico de la microalga marina *Spirulina subsalsa*, sobre el camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) fue reportado por Lightner (1978). Sin embargo, los organismos alimentados con la HSP en este estudio no mostraron evidencias de intoxicación, y no se encontraron reportes sobre efectos nocivos de la microalga *Spirulina platensis* en camarones penéidos.

Los resultados de esta investigación contribuyen al desarrollo de dietas que optimizarán la producción en cautiverio de *L. schmitti*. Se evidenció que un equilibrio nutricional adecuado del alimento es crítico para lograr un óptimo desarrollo larval de la especie.

### **4.3. Experimento III. Evaluación de la harina de *Spirulina* (HSP) como aditivo en alimentos microparticulados para larvas de *L. schmitti*.**

Se demostró que la harina de *Spirulina* es un aditivo efectivo en alimentos microparticulados para larvas de *L. schmitti*, pues la inclusión de 5% de HSP produjo un efecto benéfico sobre la velocidad de metamorfosis en las larvas, similar al alcanzado con el esquema de alimentación convencional basado en la adición de nauplios de *Artemia*. También se observó que el alimento que no contenía HSP produjo el desarrollo más lento. Márquez (1997) logró que el 100% de mysis de *L. schmitti* pasaran a postlarvas en 120 horas al utilizar alimento microparticulado con 10-30% de levadura tórula y nauplios de *Artemia*. Sin embargo, Kumlu y Jones (1995) informaron retrasos de 1.5-2 días en el desarrollo de larvas de *Fenneropenaeus indicus* al ser alimentadas con dietas microencapsuladas, con respecto a las alimentadas con nauplios de *Artemia*. En el presente estudio, el 100 % de las larvas se desarrolló hasta el estadio de PL cuando se suministró *Artemia*, pero sólo el 80% alcanzó el estadio cuando se alimentaron con el microparticulado HSP5. Por ello, a pesar de que HSP mejora el rendimiento del microparticulado, se consideró necesario definir niveles óptimos de combinación del microparticulado con nauplios de *Artemia*. En este sentido, Kurmaly et al. (1989) lograron la metamorfosis de larvas *P. monodon* desde M<sub>II</sub> hasta PL<sub>1</sub>, al alimentarlas con una dieta microencapsulada rica en proteínas de alta calidad y porcentajes de lípidos, de los cuales el 37% eran ácidos grasos polinsaturados, con una relación  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 de 1.47. Esto establece la necesidad de llevar a cabo un experimento para determinar el nivel de sustitución de nauplios de *Artemia* por el microparticulado HSP5 más recomendable en esta etapa del cultivo.

Por otro lado, las dietas para larvas de especies acuáticas deben ser formuladas para asegurar la adecuada suplementación nutricional de carotenoides, específicamente astaxantina, ya que los mismos no pueden ser sintetizados *de novo*, sino que dependen de la asimilación de un precursor, el cual sirve como patrón para su producción (Meyer, 2000). Liao et al. (1993) y Supamattaya et al. (2005) constataron que estos pigmentos (zeaxantina) pueden ser convertidos en astaxantina por los camarones, y mostrar efectos positivos en el alimento suplementario. Ringelberg (1980) refirió que, en crustáceos, la vía biosintética más probable del metabolismo de carotenoides es una secuencia oxidativa, comenzando con  $\beta$ -carotenos de origen algal. Petit (1993) demostró que la adición de astaxantina en el alimento de postlarvas de *M. japonicus* disminuyó el período de desarrollo postlarval, al inducir variaciones cuantitativas en la hormona de la muda. En este estudio, el contenido de pigmentos totales fue directamente proporcional al nivel de inclusión de HSP (Tabla XII), de lo que se sugiere que el contenido de pigmentos pudo ser una causa determinante en los valores del índice de desarrollo de las larvas (Figura 6).

Márquez (1997) obtuvo longitudes de larvas de *L. schmitti* entre 3.40 y 3.44 mm al suministrar nauplios de *Artemia*, alimento microparticulado y microalgas. Esto es similar a los valores más bajos obtenidos en este trabajo. A diferencia de los resultados obtenidos con el Índice de Desarrollo, el efecto de la HSP como aditivo en las dietas no fue tan evidente cuando se analizó la respuesta en términos de crecimiento. Los resultados del ensayo muestran que la longitud total promedio de las larvas alimentadas con los alimentos artificiales fue similar, siendo sólo superado por aquéllas que recibieron nauplios de *Artemia*.

Artiles et al. (1999) no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *L. schmitti*, al utilizar dietas artificiales en las que se incluyó pasta de *Chlorella vulgaris* como aditivo. Sin embargo, Arellano et al. (1993) obtuvieron menor crecimiento y supervivencia al alimentar larvas de *L. vannamei* con dietas microparticuladas que cuando combinaron las dietas con nauplios de *Artemia*. Esto coincide con lo observado en el presente experimento para *L. schmitti*, evidenciando la importancia de *Artemia* en la alimentación de las larvas.

La supervivencia en todos los tratamientos experimentales fue superior al 80%. La mortalidad de los animales en este ensayo se asocia al manejo durante el recambio de agua, confirmando lo planteado por Alfonso (1996) quien señaló que ante alimentos de buena calidad, la supervivencia puede estar determinada por la manipulación.

En referencia a los aminoácidos, Gaxiola et al. (2002) evaluaron alimentos purificados microparticulados con diferentes niveles proteicos, en protozoos y mysis de *L. setiferus* y *L. vannamei*. Triptofano y arginina fueron primer y segundo aminoácidos limitantes, por lo que la deficiencia de triptofano se consideró la causa de los bajos crecimientos y supervivencias de las larvas de ambas especies, ya que arginina fue ajustada para compensar su bajo contenido en la caseína. En nuestro ensayo, el cómputo químico muestra a triptofano como primer aminoácido limitante. Sin embargo, los resultados no reflejaron la limitación en supervivencia o desarrollo de las larvas cuando el contenido de harina de *Spirulina* en la dieta fue de al menos 5%.

#### **4.4. Experimento IV. Sustitución parcial y total de las raciones de nauplios de *Artemia* por alimento microparticulado con 5% de HSP (HSP%5') en la alimentación de larvas de *Litopenaeus schmitti*.**

La longitud total alcanzada por las larvas en este ensayo indica que es posible sustituir el 100 % de nauplios de *Artemia* por alimento microparticulado. Larvas con una longitud total promedio de 3.71 mm, similar al alcanzado en este apartado, fueron obtenidas en el Experimento III cuando se alimentaron exclusivamente con nauplios de *Artemia*, confirmando la posibilidad de la inclusión de microparticulados combinados con alimento vivo en el esquema de alimentación de larvas de *L. schmitti*. Márquez (1997) no logró mejores resultados de crecimiento que los obtenidos en este estudio (3.40- 3.44 mm), cuando evaluó diferentes niveles de levadura tórula, como ingrediente en dietas microparticuladas para postlarvas de *L. schmitti*. Una posible causa de este efecto pudiera ser la baja digestibilidad de la levadura tórula (Forrellat *et al.*, 1988).

Por su parte, Arellano *et al.* (1993) con *L. vannamei*, Gaxiola *et al.* (2002) con *L. setiferus*, y Wouters *et al.* (2004) con *F. indicus*, obtuvieron menor crecimiento al alimentar exclusivamente con micropartículas, que al combinar éstas con nauplios de *Artemia*. En todos los casos el desarrollo y la supervivencia resultaron favorecidos con las combinaciones, lo que evidencia que el alimento vivo continúa siendo esencial para garantizar el mejor desempeño en la larvicultura de penéidos.

Las larvas de especies marinas, alimentadas con alimentos artificiales y nauplios de *Artemia*, logran aumentar la digestión y asimilación de la dieta suministrada. Es posible que

la ingestión de *Artemia* sirva como estímulo a la secreción de enzimas digestivas y que por ello, las proteínas de los alimentos artificiales sean mejor aprovechadas (Kolkovski y Tandler, 1995; Jones, 1998). Gelabert (1994) atribuye a la *Artemia* los mejores resultados en la alimentación del camarón, durante los estadios larvales, cuando se adiciona en combinación con alimentos artificiales.

Kumlu y Jones (1995) al alimentar larvas de *F. indicus* con dietas microencapsuladas, encontraron una disminución en la velocidad de metamorfosis respecto a larvas alimentadas con nauplios de *Artemia*. Esto es similar a lo obtenido en este ensayo cuando se utilizó el microparticulado como único alimento. Como se indicó arriba, la mezcla de diferentes alimentos propicia un mejor complemento de nutrientes (Lovell, 1998). Esta parece ser la razón por la que Márquez (1997) logró la metamorfosis a PL de 100 % de larvas de *L. schmitti* después de 120 horas, alimentando con microparticulado y nauplios de *Artemia*. En el presente trabajo se logró que más del 70% de las mysis pasaran a PL en 122 horas, al sustituir el 75% de las raciones de *Artemia* con microparticulado HSP5.

Los resultados del presente estudio indican que, tomando como base el ID, estadísticamente es posible sustituir hasta un 75% las raciones de *Artemia* por alimento microparticulado HSP5 en la cría larval de *Litopenaeus schmitti*. Esto corresponde a 9 raciones del microparticulado y 3 de nauplios de *Artemia*. Sin embargo, el análisis de los resultados a través del modelo de la línea quebrada, ofrece una mejor sensibilidad que permite obtener un nivel de sustitución recomendable. En este sentido, el índice de desarrollo óptimo se alcanza con la combinación de 8 raciones de microparticulado (0.08 mg/larva/día) y cuatro raciones de nauplios de *Artemia* (0.19 mg/larva/día). El uso del microparticulado HSP5 permitiría un ahorro del 66% del total de nauplios de *Artemia* a suministrar con respecto al

control. Si lo comparamos con el proceso que se utiliza comúnmente en los laboratorios a escala comercial en Cuba, (6 raciones de *Artemia* y 6 raciones de microparticulado, en 24 horas), entonces el ahorro sería equivalente a 33%.

La supervivencia de las larvas se mantuvo en porcentajes cercanos al 70%. Supervivencias similares a las obtenidas en este trabajo fueron reportadas por Wouters et al. (2004) en la cría de *P. monodon*, demostrando la posibilidad de sustitución de *Artemia* por un microparticulado. Gelabert et al. (1988) obtuvieron supervivencias de 91-94%, en larvas de *Litopenaeus schmitti* hasta M<sub>III</sub>. Se sabe que la muda para alcanzar el estadio de PL<sub>1</sub> es crítica (Gallardo, 2005) pudiendo afectar la supervivencia. Por otro lado, Gaxiola et al. (2002) lograron mejoras significativas en la supervivencia de larvas de *Litopenaeus setiferus* al sustituir el 40% de los nauplios de *Artemia* por alimento seco microparticulado en presencia de microalgas.

Aunque de manera general las dietas artificiales contribuyen a incrementar la supervivencia, los alimentos naturales ayudan a mejorar la calidad de las larvas y postlarvas (Subasinghe, 1995).

La consistencia en supervivencia y crecimiento entre los experimentos III y IV, donde se utilizaron materias primas de diferente procedencia, puede estar relacionada a la presencia de pigmentos carotenoides en ambos alimentos, producto de un nivel de inclusión de HSP de 5%, los cuales son importantes para las larvas de camarón (Meyers 2000).

En la evaluación de la calidad aminoacídica de los alimentos artificiales, triptofano fue el primer aminoácido limitante. Esta pudo ser la causa de la disminución en el ID de las larvas cuando fueron alimentadas a base de microparticulado. Por ello, es necesario evaluar la inclusión de otras fuentes proteicas ricas en este aminoácido en la dieta. El perfil



aminoacídico de los nauplios de *Artemia* se aproxima más a las necesidades proteicas de las larvas de *L. schmitti*, que el alimento microparticulado, aunque ambos alimentos contienen niveles proteicos similares (52.8 y 57.0%, respectivamente). Esto confirma que el porcentaje de proteína en los alimentos puede ser independiente de su calidad.

Cuzon et al. (2004), encontraron una relación estrecha entre la composición aminoacídica del cuerpo de juveniles de *P. monodon* y sus requerimientos proteicos, por lo que se debe considerar al cómputo químico como uno de los índices para evaluar la calidad proteica de los alimentos de especies acuáticas en cultivo.

Aunque los resultados obtenidos en este estudio permiten afirmar que es posible utilizar alimentos artificiales como sustitutos de alimento vivo, es necesario aplicar mejoras técnicas en la elaboración de los alimentos, como la microencapsulación y profundizar en estudios sobre el tamaño de los microparticulados, así como su estabilidad y flotabilidad en el agua. Además, es necesario realizar investigaciones tendientes a determinar los requerimientos nutricios en las larvas de *Litopenaeus schmitti*, a fin de obtener un alimento práctico y económico que pueda satisfacer, en su conjunto, los requerimientos de la especie en esta etapa.

#### **4.5. Experimento V. Evaluación de poder atrayente de HSP en el alimento para juveniles de *L. schmitti*.**

Del total de camarones utilizados en el experimento, más del 50% se desplazó hacia el alimento con HSP, mostrando su poder como atrayente en los camarones ( $p < 0.05$ ).

No existen antecedentes sobre la inclusión de harina de *Spirulina platensis* como atrayente en alimentos para camarones penéidos, por lo que se desconocen las causas específicas que

le confieren su propiedad atrayente. Álvarez et al. (2004) alcanzaron resultados similares al evaluar el poder atrayente de harina de crustáceos y aceites de pescado en la formulación para juveniles de *L. schmitti*, atribuyendo este efecto al contenido de aminoácidos y ácidos grasos respectivamente. Así, es posible que el resultado obtenido en la presente investigación esté relacionado con la presencia de nucleótidos, aminoácidos y pigmentos en la harina de la microalga y/o al efecto conjunto de estos compuestos en el alimento.

Un tiempo de inanición de 24 horas fue aplicado en este ensayo para lograr que los camarones se sintieran estimulados frente a los alimentos experimentales. En este sentido, Costero y Meyers (1993) encontraron que para *Litopenaeus vannamei*, períodos de inanición de 24 a 48 horas acentuaban la respuesta, evitando cualquier condicionamiento del camarón a alguna dieta en particular y que los resultados en cuanto a la preferencia alimenticia no se afectaban.

Otro de los factores que pudiera haber influido en la preferencia de los camarones hacia algún alimento en específico es la hidroestabilidad, sin embargo la misma fue similar en ambos alimentos al alcanzar valores cercanos al 92% de materia seca retenida, por lo que se atribuye a la composición del alimento y en este caso a la inclusión de la HSP la respuesta de los camarones.

#### **4.6 Discusión general**

Los resultados alcanzados corroboran lo planteado como hipótesis en este trabajo de tesis y evidencian la posibilidad de la sustitución parcial del alimento vivo fitoplanctónico por la harina de la microalga *Spirulina platensis*, así como el efecto benéfico de la inclusión de

ésta harina como aditivo en alimentos para el cultivo larvario, permitiendo el uso del micropartulado HSP5 en combinación con nauplios de *Artemia* para larvas de *Litopenaeus schmitti*. También se pudo comprobar su efecto como atrayente al ser incluida en un 5% en el alimento para juveniles de la especie.

La implementación de estos resultados permite modificar el esquema de alimentación utilizado en la cría larval de *L. schmitti*. Esto redundaría en la disminución del costo por concepto de alimentación, además de reducir la dependencia en los cultivos fitoplanctónicos y el empleo de nauplios de *Artemia*, el cual es un insumo de alto costo, para los estadios de mysis y primera postlarva. Adicionalmente, se logra incorporar al alimento un insumo de producción nacional, hasta el momento no evaluado, aprovechando sus cualidades como alimento para camarón.

Existen varios estudios que se han realizado con el propósito de reemplazar las microalgas vivas por diferentes especies de microalgas secas o preservadas, u otras fuentes como levaduras, bacterias no patógenas, alimentos microencapsulados o microparticulados, en la alimentación de protozoas de diferentes especies de penéidos (Estévez, 1985; Gelabert *et al.*, 1988; Kurmaly *et al.*, 1989; Biedenbach *et al.*, 1990; Ottogalli, 1993; Kumlu y Jones, 1995; Narciso, 1995; Sunilkumar, 1996; Cuzon, 1996; Gallardo, 2005; Robinson, 2005). Los mejores resultados en este estudio fueron alcanzados con la cepa de *Spirulina platensis* GENIX. A partir de estos resultados, la HSP pudiera ser utilizada en la alimentación de larvas de camarón, como complemento a los cultivos de fitoplancton en los laboratorios de producción de “semilla” en Cuba. Su inclusión en el esquema de alimentación de las protozoas de *Litopenaeus schmitti* permitirá contar con una nueva alternativa de

alimentación para las larvas, ante los problemas de fluctuaciones en la producción de fitoplancton. Por ello, y como resultado de este trabajo se propone un esquema de alimentación modificado para la cría larval de *Litopenaeus schmitti*:

**N<sub>V</sub>      P<sub>I</sub>      P<sub>II</sub>      P<sub>III</sub>      M<sub>I</sub>      M<sub>II</sub>      M<sub>III</sub>      PL<sub>1</sub>... PL<sub>n</sub>**

---

-----HSP 10 µg/ml (cada 4 horas) -----

-*Chaetoceros muelleri* (20 x 10<sup>3</sup> cel/ml)-----

-----Microparticulado (5% de HSP)-----

-----\*0.08 mg/larva/en 8 raciones -----

-----\*\*2 nauplios de *Artemia*/ml en 4 raciones---

---

N<sub>V</sub> (5to Subestadio naupliar del camarón), P<sub>I</sub> - P<sub>II</sub>-P<sub>III</sub> (Estadio de protozoa), M<sub>I</sub>-M<sub>II</sub>-M<sub>III</sub> (Estadio de Mysis), PL<sub>1</sub>-PL<sub>n</sub>.... (Estadio postlarval)

(-----) comienzo y final de las alimentaciones.

HSP (Harina de *Spirulina platensis*)

\* 8.00 AM, 10.00 AM, 2.00 PM, 4.00 PM, 8.00 PM, 10.00 PM, 2.00 AM, 4.00 AM.

\*\* 6.00 AM, 12.00 M, 6.00 PM y 12.00 AM

Esto puede resultar en beneficios importantes al laboratorio de producción de postlarvas, por las ventajas que ofrecen los alimentos inertes, entre las que están: fácil almacenamiento y distribución, transportación, regularidad de suministro y composición, manipulación mínima en la instalación, reducción del riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y automatización en la distribución, entre otros efectos.

Otro de los objetivos planteados en este trabajo, fue determinar el porcentaje óptimo en que deben ser combinados el alimento vivo y la HSP. La cantidad y calidad de las microalgas

producidas en el laboratorio es variable, así como su crecimiento en el tanque de cría, lo que dificulta el balance con la HSP, y hace que las proporciones de cada alimento sea cambiante. No obstante, el presente estudio muestra que es factible una sustitución entre 25 y 34 % del alimento vivo fitoplanctónico sin afectar significativamente el desarrollo de la larva. Por ello, se recomienda, por razones prácticas, un valor intermedio de 30%.

Desde el punto de vista nutricional, en este trabajo se presentan por primera vez para larvas de *Litopenaeus schmitti*, valores estimados de proteína, aminoácidos, lípidos y energía, con los cuales se obtienen los mejores resultados, en términos de desarrollo. Estos podrían ser utilizados como referencia en tanto se investigan los requerimientos nutricios para la especie, en esta etapa del cultivo.

En el ámbito internacional, es significativo el número de laboratorios de producción de postlarvas que incorporan HSP en la alimentación, con varias compañías distribuyendo el producto. Sin embargo, las investigaciones realizadas para definir las ventajas nutritivas de este producto son limitadas, siendo necesario profundizar el conocimiento de su efecto en la fisiología de los organismos.

Aunque son pocos los reportes en la literatura referentes a la inclusión de HSP en dietas para camarón durante la fase larval, la HSP es ampliamente utilizada como aditivo en las formulaciones comerciales para larvas y reproductores de penéidos en cultivo, como fuente de pigmentos (Chamberlain y Humter 2001). En general, su adición en pequeñas cantidades en alimentos para peces produce efectos positivos sobre el crecimiento, utilización del alimento, condiciones fisiológicas, respuesta al estrés, resistencia a enfermedades, así como

en la calidad de la carne en cuanto a contenido de grasa y mejor coloración (Hirano y Suyama, 1985; Chow y Woo, 1990; Watanabe *et al.*, 1990; Mustafa *et al.*, 1994; Mustafa y Nakagawa, 1995).

Este resultado condujo al estudio de este alimento como sustituto de raciones de nauplios de *Artemia*. La sustitución de 66% de las raciones de *Artemia* en el esquema de alimentación de las larvas, sin afectar los valores de longitud total, supervivencia y desarrollo, constituye un avance en los estudios nutricionales para larvas de la especie, y permite recomendar una fórmula a los productores, con la cual se reduciría el costo hasta 66 % por concepto de quistes de *Artemia*. Los quistes de *Artemia*, pueden alcanzar un valor hasta de \$100 USD/kg, dependiendo de su calidad.

Por otro lado, la inclusión de HSP como aditivo al 5% en el microparticulado permitió elevar el valor nutricional de la formulación, al incrementar el nivel de pigmentos, vitaminas, ácidos grasos y aminoácidos esenciales en la misma. Es a estos factores a los que se le atribuyen los resultados alcanzados en cuanto al desarrollo de las larvas.

En general, los efectos benéficos de las algas son atribuidos a su contenido en fibra dietética, pigmentos carotenoides, presencia de atrayentes químicos, fuente de vitaminas y antioxidantes, entre otros (Miyasaki *et al.*, 1995; Mustafa *et al.*, 1997). En la evaluación de HSP como aditivo en las dietas para *L. schmitti*, se pudo comprobar su efecto como atrayente al ser incluido en un nivel de 5% en la formulación del alimento (HSP5). Esto pudo ser debido, entre otros factores, a la presencia de nucleótidos, aminoácidos y pigmentos en la harina de la microalga y/o al efecto en conjunto de estos compuestos en el alimento, logrando

de esta manera una mayor efecto atrayente, consumo y aprovechamiento del alimento por los camarones.

Al no existir referencias sobre los requerimientos nutricionales para las larvas de *Litopenaeus schmitti*, la calidad de la proteína se evaluó en base a su composición aminocídica, empleando el cómputo químico. Este método se basa en el criterio de que mientras más cercano sea el patrón aminoacídico de la proteína que se evalúa a los requerimientos de aminoácidos de la especie, mayor será el valor nutricional de la proteína y su utilización. Al momento de elaborar un alimento para camarón, la calidad del balanceado y su precio en el mercado dependen de este cómputo químico en gran medida. En este caso, HSP es considerada una fuente importante de proteína y posee en su composición todos los aminoácidos esenciales para el camarón, aunque la proporción en que se encuentran algunos de ellos (triptofano e histidina) no satisface en su totalidad el requerimiento de *L. schmitti*. Esta es una de las razones por las cuales los resultados no fueron satisfactorios cuando se utilizó como único alimento para la etapa protozoa.

La microalga *Spirulina* sp. ha sido utilizada como fuente de pigmentos, cuyo principal carotenoide es el  $\beta$ -caroteno. En diversos estudios Liao et al. (1993), citado por Meyers y Latsha (1997), estudiaron dietas con diferentes fuentes de carotenoides, mostrando un incremento del pigmento en el exoesqueleto de los camarones alimentados con dietas que contenían 3% de harina de *Spirulina*. Los análisis demostraron la rápida conversión de la zeaxantina de *Spirulina* en astaxantina, cuyas funciones metabólicas y esencialidad para especies acuáticas ha sido ampliamente demostrada por diversos autores (Craig, 1985; Torrissen, 1990; Miki, 1991; Grung *et al.*, 1993; Hardy y Roberts, 1998). Petit (1993)

demostró que la adición de astaxantina en la dieta disminuyó el período de desarrollo postlarval en *M. japonicus* al inducir variaciones cuantitativas en la hormona de la muda. Esto pudiera explicar la respuesta positiva de las larvas de *L. schmitti* al incrementar el contenido de pigmentos en las dietas y su relación con el índice de desarrollo (Figura 6).

Por otro lado, se considera que uno de los aspectos que influyen negativamente sobre el empleo de alimentos microparticulados en el cultivo larvario, es el deterioro de la calidad del agua, producto de la lixiviación (Chin y Chen, 1987; Arencibia, 1996). Aunque en el presente estudio no se hizo énfasis en el efecto de los microparticulados conteniendo HSP en la calidad de agua, se considera que la investigación futura deberá evaluar el uso de HSP en microparticulados y su efecto en la calidad de agua de cultivo.



## Capítulo 5: Conclusiones

- Las protozoas de *L. schmitti* son capaces de consumir harinas de las microalgas *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella salina*.
- De las harinas de las especies evaluadas, *Spirulina* sp. produjo los mejores resultados en crecimiento y desarrollo al ser empleada como único alimento para las protozoas.
- Las mezclas de microalgas secas y vivas fueron más efectivas en la alimentación de protozoas, que el uso de harinas como único alimento.
- Es posible sustituir hasta un 50% del alimento vivo fitoplanctónico por la harina de *Spirulina platensis* (HSP) en la alimentación de protozoas de camarón, sin afectar la supervivencia, el índice de desarrollo y el crecimiento de las larvas en cultivo.
- El nivel óptimo de sustitución de *Chaetoceros muelleri* por *Spirulina platensis* para alcanzar los mayores valores de longitud final se estimó en 34.2% y para el índice de desarrollo en 25%, por lo que se recomienda un porcentaje óptimo de sustitución de 30%, el cual aporta 0.078 mg de proteína/larva/día; 0.026 mg de lípidos/larva/día y 2.732 J de energía/larva/día.
- La longitud promedio final de las larvas de *L. schmitti* alimentadas con microparticulado fue significativamente menor al control con nauplios de *Artemia*.
- Las larvas que consumieron nauplios de *Artemia* y la dieta microparticulada con 5% de inclusión de HSP alcanzaron los mayores valores de índice de desarrollo. Por ello se considera posible sustituir al menos parcialmente a los nauplios de *Artemia*

en la alimentación de mysis de *Litopenaeus schmitti* por alimento microparticulado con HSP.

- Se propone que el estimado óptimo de reemplazo de las raciones de nauplios de *Artemia* en el esquema de alimentación de mysis es de 8 raciones, lo que representa un 66% de ahorro, respecto al control.
- La supervivencia y el crecimiento de las mysis y las postlarvas se comportaron de forma similar al ser alimentadas con nauplios de *Artemia*, alimento microparticulado con 5% de HSP y la combinación de ambos.
- El dispositivo experimental utilizado fue eficiente para evaluar el efecto atrayente de la HSP en alimentos formulados para juveniles de camarón.
- La HSP utilizada al 5% en dietas microparticuladas, con 47% de proteína y 14.4% de lípidos, constituye un atrayente efectivo en la dieta para camarones juveniles de *L. schmitti*.

## Capítulo 6: Recomendaciones

Es necesario realizar investigaciones encaminadas a:

- 1) Determinar los requerimientos nutricionales de larvas de *Litopenaeus schmitti*.
- 2) Determinar el consumo de alimento de las larvas y estimar el requerimiento energético de *Litopenaeus schmitti*.
- 3) Mejorar la calidad proteica de los alimentos artificiales utilizados en este trabajo, cubriendo las deficiencias de aminoácidos esenciales como triptofano e histidina de acuerdo al balance aminoacídico presentado.
- 4) Realizar estudios básicos nutricionales sobre los efectos de la harina de *Spirulina* sp. en el metabolismo de los camarones.
- 5) Mejorar la estabilidad y la eficiencia del alimento microparticulado evaluado en este trabajo, utilizando técnicas de microencapsulación.
- 6) Evaluar el efecto de la harina de *Spirulina platensis* como ingrediente en alimentos microparticulados en niveles superiores al 5% sobre crecimiento y desarrollo de *Litopenaeus schmitti* durante las etapas de cría larval y precría.
- 7) Propuesta de modificación de esquema de alimentación. Como resultado de este trabajo se propone un esquema de alimentación modificado para la cría larval de *Litopenaeus schmitti*.

**N<sub>V</sub>      P<sub>I</sub>      P<sub>II</sub>      P<sub>III</sub>      M<sub>I</sub>      M<sub>II</sub>      M<sub>III</sub>      PL<sub>1</sub>... PL<sub>n</sub>**

---

-----HSP 10 µg/ml (cada 4 horas) -----

-*Chaetoceros mulleri* (20 x 10<sup>3</sup> cel/ml)----

-----Microparticulado (5% de HSP)-----

-----\*0.08 mg/larva/en 8 raciones -----

---

-----\*\*2 nauplios de *Artemia*/ml en 4 raciones---

N<sub>v</sub> (5to Subestadio naupliar del camarón), P<sub>I</sub> - P<sub>II</sub>-P<sub>III</sub> (Estadio de protozoa), M<sub>I</sub>-M<sub>II</sub>-M<sub>III</sub> (Estadio de Mysis),  
PL<sub>1</sub>-PL<sub>n</sub>.... (Estadio postlarval)

(-----) comienzo y final de las alimentaciones.

HSP (Harina de *Spirulina platensis*)

\* 8.00 AM, 10.00 AM, 2.00 PM, 4.00 PM, 8.00 PM, 10.00 PM, 2.00 AM, 4.00 AM.

\*\* 6.00 AM, 12.00 M, 6.00 PM y 12.00 AM

## Capítulo 7: Literatura citada

- Admiral, W., Peletier, H. y R. W. Laane (1986): Nitrogen metabolism of marine planktonic diatoms: excretion, assimilation and cellular pools of free aminoacids in seven species with different cell size. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 98:241-263.
- Alfonso, E. (1996): *Larvicultura de Camaroes Marinhos*. En: Anais do Primeiro Workshop do Estado do Ceará sobre Cultivo de Camarao Mariho. T.C.V. Gesteira e A.J.P. Nunes (eds). Fortaleza, Ceará, Brasil. p: 86-100.
- Alfonso, E., Martínez, L. y S. Amador (1992): Cultivo de fitoplancton marino con fertilizantes inorgánicos comerciales. *Rev. Invest. Mar.*13 (1): 81-86.
- Alfonso, E., Martínez, L., Gelabert, R. y S. Leal (1988): Alimentación de larvas de *Penaeus schmitti* con diatomeas y flagelados. *Rev. Invest. Mar.* 9(1): 47-58.
- Alfonso, E., S. Leal y B. Guitart (1985): Ensayo sobre alimentación de protozoas de *Penaeus notialis* en el laboratorio. *Rev. Invest. Mar.* 6(1): 79-86.
- Alfonso, E., y C. Nuñez (1984): Efecto de la harina de lombriz de tierra sobre el crecimiento y desarrollo de protozoas de camarón en cultivo. *Rev. Invest. Mar.* 5(3): 99-105.
- Alvarez, J. S., Galindo, J. e I. Fraga. (1989 a): Empleo de la saccharina en dietas para camarón. III Taller de Investigaciones Fundamentales, Centro de Investí. Mar. UH. Bol.2.(sp).

- Álvarez, J. S., Pérez, M., Toledo, J. e I. Fraga. (1989 b): Niveles óptimos de inclusión de harina de pescado y soya en dietas para juveniles de camarón (*Penaeus schmitti*). Bol. Nutricam. U.P. Camaronicultura. No.1.(sp).
- Álvarez, J., García, T., Villarreal, H., Galindo, J., Fraga, I. y E. Pelegrin (2004): *Alternativas para obtener alimentos más eficientes en el engorde semi-intensivo del camarón blanco Litopenaeus schmitti*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque. Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y Gonzáles, M. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México. pp. 73-79
- Amjad, S. y D.Jones (1992): An evaluation of artificial larval diets used in the culture of penaeid shrimp larvae *Penaeus monodon* (Fabricius). *Pakistan Journal of Zoology* 24: 135-142.
- Amjad, S., Jones, D.A. y K. Chitradivelu (1992): *Advances in penaeid larval feed technology*. In: Proceedings of seminar on new technologies in aquaculture, pp 29-45 (Cheah, S.H. and Thalathiah, H.J., Eds) Malaysia, Malaysan fihseriers Society.
- Anderson, J. L. (1995): *Economics and Larviculture*:. Lavens P., E. Jasper e I. Roelants (Eds). Larvi'95- Fish and shelfish larviculture symposium, Pp: 351
- Anónimo (2002 a): Características generales del polvo de *Spirulina platensis*. Empresa de Producción y Comercialización de Microalgas y sus Derivados, Informe técnico.GENIX – CNIC. Cuba, 18 pp.
- Anónimo (2002 b): *Características generales del polvo de Spirulina platensis*. Empresa Norteamericana, Earthrise. EUA. 2 pp.

- Anónimo (2003): Manual de procedimientos Operacionales de Trabajo para el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. Departamento de Control de la Calidad. GEDECAM. 233 pp.
- Arellano, E. M., Carvaca F., Gómez L. y A. Pedrazzoli (1993): *Proyecto optimización del cultivo de larvas de camarón, "ocular"*. En. Memorias de Edgar Arellano. Once años dedicados a la investigación y desarrollo de la Acuicultura. ESPOL-CENAIM. 1993 San Pedro de Manglaralto, Ecuador. P.19-24.
- Artiles, A. M., Fraga, I., Galindo, J. y B. Jaime (1999): Empleo de dietas artificiales en la larvicultura del camarón blanco *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 20 (1-3): 75-81.
- Association of Official Analytical Chemists (1999): *Official Methods of Analysis*, AOAC. 15th edn. AOAC, Inc. Washington, D.C. 1108 pp.
- Avale, O. y J. A. Rothius (1991): Lanches shrimp project in Madagascar. *Fish Farm. Intern. FAO* 18(5): 28-58.
- Ayala, F.J. y J.W. Valentine (1983): *La evolución en acción*. Editora Alhambra, S.A.411 pp.
- Baert P., Quynh, V.D., Thanh Th. y L. Rotsaert (1995): *Hatchery technology in Vietnam: A overview*. Lavens P., E. Jasper e I. Roelants (Eds) Larvi'95- Fish and shelfish larviculture symposium. pp 414-417.
- Barclay, W. y S. Zeller (1996): Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia nauplii* by feeding spray-dried *Schyzochytrium sp.* *J.World Aquac. Soc.* 27(3): 314-322

- Barnes, H. y J. Blackstock (1973): Estimation of lipid in marine animals and tissues: detailed investigation of sulphovanillin method for total lipids. *J. Exp.Mar.Biol.Ecol.* 12:103-118
- Baukema, J. J. y W. De Buin (1979): Calorific values of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma baltica* (L.) as determined by two methods. *J.Exp.Mar. Biol. Ecol.* 37: 19-30.
- Belay, A., Kato, T. y Y. Ota (1996): *Spirulina* (*Arthrospira*): Potential application as an animal feed supplement. *J. Appl. Phycol.* 8: 303-311.
- Besbes, R. y J. Guillaume (1989): Effect of protein level on iron supplementation on the growth and survival of *Penaeus japonicus* larvae, fed microbound diets. *J. World Aquac. Soc.* 20(1): 3-12.
- Biedenbach, J.M., Smith, L. L. y A. L. Lawrence (1990): Use of a new spray-dried algal product in penaeid larviculture. *Aquaculture* 86: 249-257.
- Boeing, P. (2005): Partial replacements of live algae in the laticulture of *Litopenaeus vannamei* with microencapsulate and spray-dried algae *Schizochytrium* sp. [visited 26 may 2005]. In URL: <http://www.aquafauna.com/pt-TechnicalPaper&Trials>.
- Borowitzka, M. y L. Borowitzka (1988): *Dunaliella*. (Borowitzka, L. y M. Borowitzka Eds) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. N. Y. pp: 27-58. (Citado por Suárez *et al*, 1996).
- Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantitative of protein utilizing the principle of dye binding. *Annal. Biochem.*72: 248-254.



- Brown, M. (1972): Experimental techniques for preserving diatoms used as food for larval *Penaeus aztecus*. *Proc. Nat. Shellfish Ass.* 62: 21-25.
- Brown, M. R. y S. W. Jeffrey (1992): Biochemical composition of microalgae from the classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Aminoacids, sugars and pigments. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 161: 91-113.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W. y C. D. Garland (1989): *Nutritional aspects of microalgae used in mariculture. A Literature Review*. CSIRO Marine Lab. Report 205, 44 pp.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. y G. A. Dunstan (1997): Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331.
- Buitrago, B. E. (1988): *Concentración y preservación de microalgas como reservas de alimento de organismos marinos cultivados*. Memorias del Congreso Iberoamericano y del Caribe. Isla Margarita, Venezuela. pp: 25-29.
- Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J. L., Quazuguel, M. y .M. Le Gall (1999): Protein hidrolisate vs fish meal in compound diets for 10 day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171: 109-119.
- Cahu, C., Severe, A. y P. Quazuguel (1988): *The variation of lipid content in Penaeus indicus during larval development*. ICES, Comité de Mariculture, F:22
- Carrillo, O., Forrellat, A. y R. Gonzalez (1994): *Obtención de Hepatopancreatina como reactivo biológico*. Patente de Invención. C12N9/94.

- Castro, B. T. (1993): Biología y cultivo de *Artemia franciscana* en el Ex. Lago de Texcoco, de Ecatepec, Estado de México. Doctoral Tesis, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, 72 pp.
- Ceccaldi, H. J. (1987): *La digestión en los crustáceos en Nutrición en Acuicultura I*, CAYCYT 67 - 80
- Chamberlain, G.W. (1995): *Frontiers in shrimp nutrition research*. En: Swimming through trouble water. Proceedings Special Session Shrimp Farming. (Browdy, C. L. y J. S. Hopkins, Eds.) Aquaculture'95, pp: 108-117.
- Chamberlain, G.W. y B. Hunter (2001): Feed Additives: Global Shrimp OP: 2001 - Preliminary Report. *Global Aquaculture Advocate* 4(4): 61-65.
- Chitradivelu, K. (1992): Artificial penaeid larval diets. *J. Nat. Sci. Coun. Sri Lanka* 20 (1):1-6.
- Chow, C.Y. y N. Y. S. Woo (1990): *Bioenergetic studies on an omnivorous fish, Oreochromis mossambicus: evaluation of utilization of Spirulina algae in feed*. En: R. Irano e I.Hanyu (Eds.). The Second Fisheries Forum, Asisan Fisheries Society, Manila, Philippines. Pp. 291-294.
- Chu, K.H. (1991): Larval rearing of the shrimps *Metapenaeus ensis* (de Haan) and *Penaeus chinensis* (Osbeck) on artificial feed. *Aquaculture and fisheries management*. 22, 473-479.
- CICTUS (1982): *II Taller de Cultivo de camarón*. Universidad de Sonora, México, pp: 41-45.

- Coll Morales, J. (1983): *Cultivo de Microalgas*, Capítulo 4, Acuicultura Marina Animal. Mundi-Prensa, Madrid, pp: 328-358.
- Coloso, R. y L. J. Cruz (1980): Preliminary studies in some aspects of aminoacids biosynthesis in juveniles *Penaeus monodon* Fabricius: I. Incorporation of  $^{14}\text{C}$  from (U- $^{14}\text{C}$ ) to aminoacids of precipitable protein. *Bull. Phil. Biochem. Soc.* 3 (1-2): 12-22.
- Condrey, R. E., Gosselink, J. G. y H. J. Bennet (1972): Comparison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus*. *Fish. Bull.* 70: 1281-1292.
- Costero, M. C. y S. P. Meyers (1993): Evaluation of chemoreception of *Penaeus vannamei* under experimental conditions. *The Progressive Fish-Culturist* 55:157-162.
- Coutteau, P. (1996): *Micro-algae. Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO. Lavens P. y P. Sorgeloos (Eds.): 9-60.
- Coutteau, P. y P. Sorgeloos (1993): Substitute diets for live algae in the intensive rearing of bivalve molluscs-A state of the art report. *World Aquaculture* 24 (2): 45-52.
- Craik, J.C.A. (1985): Egg quality and pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture* 47: 61-88.
- Cuzon, G. (1996): *Utilización de levaduras por camarones marinos*. En: Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 7-9 de Noviembre de 1994. Monterrey, N.L. México. Cruz Avarés, M. y G. Ricque (Eds.): 303-310.
- Cuzon, G., Dos-Santos, R., Hew, M. y G. Poullaouec (1981): Use of *Spirulina* in shrimp (*Penaeus japonicus*) diet. *J. World Maricult. Soc.* 12, 282-291.

- Cuzon, G., Guillaume, J. y G. Gaxiola (2004): *Review on amino acid requirement in shrimp*. (Abstract Book) Aquaculture 2004. Marzo 1-5, 2004. Hawaii Convention Center. Honolulu, Hawaii, USA. Pág.140.
- D'Abramo, L. y D. E. Conklin (1995): *New developments in the understanding of the nutrition of penaeid and caridean species of shrimp*. En: *Swimming through water. Proceedings Special Session Farming Aquaculture '95*. (Browdy, C. L. y J. S. Hopkins, Eds.) pp: 95-117.
- De Lara Andrade, R., Barrera Castro, T., Castro Mejía, J., Castro Mejía, G. Malpica Sánchez, A., y V. García Castillo (2005): *La importancia de Spirulina en la alimentación acuícola*. *ContactoS* 57, 13-16.
- Depauw, N., Bruggeman, E. y J. Persoone (1978): *Research on the tertiary treatment of swine waste by mass culturing of algae*. *Mitt. Internat. Verein. Limnology* 21: 420-506.
- Drennar, D.P. (1996): *Reemplazo experimental de 30% con dietas para larvas zeigler en un laboratorio de América Central*. En: *Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 7-9 de Noviembre de 1994. Monterrey. N.L. Cruz-Suárez, M. y G. Ricque (Eds.): 265-269.
- D'Souza, F., Lecossois, D., Heasman, M., Diemar, J., Jackson C. y R. Pendrey (2000): *Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for Penaeus monodon Fabricius larvae*. *Aquaculture Research* 31, 661-670.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Jeffrey, S. W. y S. M. Barret (1992): *Biochemical composition of microalgae from the green algae classes Chlorophyceae and*

- Prasinophyceae. II. Lipids classes and fatty acids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 115-134.
- Emerson, W. D. (1980): Ingestion, growth and development of *Penaeus indicus* larvae as function of *Thalassiosira weissflogii* cell concentration. *Marine Biology.* 58: 65-73.
- Estévez, F. P. (1985): *Alimentación de protozoas de camarón en cultivo con levaduras marinas.* Univ. Habana, Trabajo de Diploma. 30 pp.
- Fang, L. S. y L. B. Ning (1992): Ontogenetic changes of digestive enzymes in *Penaeus monodon.* *Comp. Biochem. Physiol.* 103 b (4): 1033-1037.
- Fegan, D. F. (1992): Recent development and issues in the penaeid shrimp hatchery industry. Proc of Special, Session on Shrimp Farming. World Aqua. Soc: 55-70.
- Fegan, D., (2004): Technical consideration in the development of feeds shrimp larvae and broodstock. En: Cruz-Suárez, E., Ricque-Marie, D., Nieto-Lopez, M., Villarreal-Cavazos, D., Scholz, U. and Gonzalez-Felix, M. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 16-19 Nov. 2004, Hermosillo, Sonora. México.* pp. 396.
- Forrellat, A., R. Gonzáles y O. Carrillo (1988): Evaluación de la calidad proteica de alimentos para camarones. *Rev. Invest. Mar.* 9(1): 81-90.
- Forrellat, A., (1998): El hepatopáncreas de camarón: fuente de enzimas digestivas para la camaronicultura. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Biología. Universidad de la habana. Cuba. pp.120.
- Fyhn, H. J. (1989): First feeding of marine fish larvae: are free aminoacids the source of energy. *Aquaculture* 8: 111–120.

- Gabaudan, J. (1998): Dietary astaxanthin improves production yield in shrimp farming. *Fish-Chimes*, 18: 37-39.
- Galvani, M. L. y AQUACOP (1988): Essais de substitution des algues vivantes par des microparticules inertes pour l'alimentation des larves zoé de crevettes péneídes. *Aquaculture* 69, 115-127.
- Galindo, J., I. Fraga, J. S. Álvarez, R. Reyes, R. González y R. Cartaya (1989 a): Requerimientos proteicos en juveniles del camarón blanco *Penaeus schmitti*. III Taller de Investigaciones Fundamentales, Centro de Investigaciones Marinas. U.H. Cuba. Bol 2. (sp).
- Galindo, J., I. Fraga, M. Pérez, J. S. Alvarez y C. M. Rosquete (1989 b): Inclusión del gicabú en dietas artificiales para camarones de cultivo (*Penaeus schmitti*). Bol. Nutricam. V. P. Camaronicultura. No 1. (sp).
- Gallardo, N., González R., Carrillo O., Valdés O. y A. Forrellat (1989): Una aproximación a los requerimientos de aminoácidos esenciales de *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 10 (3): 259-267.
- Gallardo, P. E. (2005): *Alimentos artificiales con hidrolizados proteicos de origen marino en la nutrición de larvas del camarón blanco Litopenaeus vannamei (Bonne, 1931)* Tesis de Doctorado. Laboratorio de Biología Marina Experimental, Campeche, Facultad de Ciencias, UNAM. pp 163.
- Gallardo, P., Martínez, G., Brito, A., Barrera, J., Pedroza, R., Cuzon, G., Rosas, C. y G. Gaxiola (2003): Effect of *Artemia* nauplii replacement by artificial feed containing Krill hydrolysates on ingestion rate, oxygen consumption and energetic budget in mysis of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Nauplius*. 1 (2): 1-13.

- Gallardo, P.P., Pedroza-Islas, R., García-Galano, T., Pascual, C., Rosas, C., Sánchez, A. y G. Gaxiola (2002): Replacement of live food with a microbound diet in feeding *Litopenaeus setiferus* (Burkenroad) Larvae. *Aquaculture Research*. 33 (9): 681.
- García, G. T. y B. Jaime (1990): Utilización de la harina de lombriz de tierra (*Eudrilus eugeniae*) en la alimentación de postlarvas del camarón blanco *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar*, 11(2): 147-155.
- García, T y J. Galindo (1990): Requerimientos de proteínas en las postlarvas de camarón blanco *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar*, 11: 247-250.
- García, T. (1972): Descripción de los estadios larvales del camarón blanco, *Penaeus schmitti* Burkenroad, obtenidos en el laboratorio. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Cuba. *Serie Invest. Mar*. 1: 1-54.
- García, T. (1993): Nutrición. En: Alfonso, E., Ramos, L., Díaz, E., García, T., Rosas, C. (Eds.) Manual del II Curso Internacional de Producción de Postlarvas de Camarones Peneidos del Atlántico de América. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Cuba, pp. 97-115.
- García, T. (1998): *Nutrición de larvas de camarón*. En: IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C. J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L. E. (Eds.) Nov. 15-18, La Paz, B. C. S., México. 2da. Parte, 9 pp.
- Gaxiola, G. (1991): *Requerimientos nutricionales en postlarvas de Penaeus schmitti*. *Relaciones proteína/vegetal*. Universidad de la Habana, Tesis de Maestría: 81 pp.
- Gaxiola, G., Gallardo, P., Ravallec, R., Durruty, C., García, T., Cuzon, G., Van Wormhoudt, A. y A. Pedroza (2002): *Avances en el uso de alimentos artificiales en la larvicultura de camarón*. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar,

- M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. Pp: 227-242
- Gelabert, R. (1988): Alimentación de larvas del camarón *Penaeus schmitti* con alimento artificial. *Rev. Invest. Mar.* 9(2): 95-103
- Gelabert, R., Alfonso, E., Hernández, O. y S. Leal (1988): Experiencia de alimentación de larvas del camarón blanco *Penaeus schmitti* con levaduras obtenidas industrialmente. *Rev. Invest. Mar.* 9(1): 59-69.
- Gilles, R. (1979): *Intracellular organic osmotic effectors*. En: Mechanism of osmoregulation in animals. R. Gilles (Ed.), Wiley and Sons, Chichester. pp: 111–154.
- Göhl, B. (1991): Tropical feeds.FAO/Oxford Computer Journal LTD.Ver 1.7
- González, R. V. (1998): *Variación de la actividad proteolítica y amilolítica en el hepatopáncreas de Penaeus schmitti*. “Ontogenia y efecto de algunos factores externos e internos”. Tesis de Doctorado. CIM, U.H. Facultad de Biología. 100 pp.
- González, R., Fraga, I. y O. Carrillo (1993): Cambios ontogenéticos de la actividad de las principales enzimas digestivas de *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 15(3): 262–268.
- Goytortúa, E. B. (2000): *Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla Pleuroncodes plenipes para camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima. México 86 pp.
- Grung, M., Y.S. Svendsen y S. Liaaen-Jensen (1993): The carotenoids of eggs of wild and farmed cod. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 237-242.



- Guillard, R. R. L. (1975): *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. En: Culture of Marine Invertebrates Animals (W.L.Smith y M.H.Chanley, Eds.), pp: 29–60.
- Hardy, R.W. y R .J. Roberts (1998): Atlantic Salmon-Species Profile. *International AquaFeed* 2: 21-23.
- Herrero, L. (1995): *Las microalgas marinas como una nueva fuente de proteínas, vitaminas y minerales*. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, España, 332 pp.
- Higuera, M. de la y H. Cardenete (1987): *Fuentes alternativas de proteína y energía en acuicultura. Proteínas de organismos unicelulares*. En: Seminario Alimentación en acuicultura. J. Montero E. y U. Labart. (Eds.). pp: 71-77.
- Hirano, T y M. Sumaya (1985): Effect of dietary micro-algae on the quality of cultured ayu. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* 72 (1): 21-41.
- Hirano, T. y M. Suyama (1985): Effects of dietary micro-algae on the quality of culture ayu. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* 72(1): 21-41.
- Hirata, H. y M. M. Watanabe (1975): Rearing of prawn larvae *Penaeus japonicus* fed soy cake particles and diatoms. *Mar. Biol.*29:9-13.
- Hsu, H.W., Vayak, D. L., Satterree, L.D. y G.A. Miller (1977): A multienzimatic technique for estimating protein digestibility. *J. Food. Sci.* 42:1269.
- Indergaar, M. y J. Minsaas (1991): *Animal and human Nutrition*. En: Sae weed resources in Europa (M. D. Guiry and G. Blunden Eds) Uses and potential John Wiley and Sons LTD. Chichester. pp: 21-64

- Jaime, B. y R. Mola. (1989): Sustitución de la harina de carne por la harina de soya en dietas prácticas para postlarvas del camarón blanco *Penaeus schmitti*. Bol. Nutricam. U.P. Camaronicultura. No.1.(sp).
- Jaime, B. y T. García. (1992): Niveles de inclusión de harina de cefalotórax de langostas en dietas para postlarvas de camarón. *Rev. Invest. Mar.* 13(2): 142-146.
- Jaime, B., Artiles M., Galindo J. e I. Fraga (1996): Evaluación de alimentos microparticulados en el cultivo larval de *Penaeus schmitti*. *Rev. Cub. Inv. Pesq.* 20 (2):22-24.
- Jaime, B., Artiles, M. Galindo, J. e I. Fraga. (1996): Evaluación de alimentos microparticulados en el cultivo larval de *Penaeus schmitti*. *Rev. Cub. Inv. Pesq.* 20(2): 22-24.
- Jaime, B., Artiles, M., Fraga, I. y J. Galindo (2000): Sustitución de *Chaetoceros muelleri* por *Chlorella vulgaris* secada por “spray” en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*. *Bol. Centro Invest. Biol.*34 (2): 127-142.
- Jeffrey, S. y W. Garland (1987): Mass culture of microalgae essential for mariculture hatcheries. *Austr.Fish*, 46(5): 18-24.
- Jones, D. A. (1998): Crustacean Larval microparticulaed diets, *Review in Fisheries Science* 6(1 y 2): 41-54.
- Jones, D. A., Kanazawa, A. y S. H. Abdel-Rahman (1979a): Studies on the presentation of artificial diets for rearing larval of *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 17: 33-43.
- Jones, D. A., Kumaly, K. y A. Arshad (1987): Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture*, 64:133-146.

- Jones, D. A.; Yule, A. B. y D. L. Holland (1997): *Larval nutrition*, p 353-389. En: D Abramo, L., Conklin., D.E., y D, M, Akiyama, (Eds), Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, Vol. 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Jones, D., Kanazawa, A. y K. Ono (1979b): Studies on the nutrition requirements of the larval stages of *Penaeus japonicus* using microencapsulated diets. *Mar. Biol.* 54:261-267.
- Jones, D., Majad, S. y K. Chitradivelu (1989): *Comparison of artificial feeds used in penaeid shrimp hatcheries*. Proceeding of the third Egyptian British Conference on Animals. Fish and poultry production help in Alexandria. Egypt 7-10 October: 15-20.
- Jory, E. D. (1996): *Penaeid shrimp hatcheries*. Pat III. En: Larval Rearing, Miami University. 6 pp.
- Kamarudin, M. S., Jones. D. A., Le Vay., L. y A. Z. Abidin (1994): Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 123 (3-4): 323-333.
- Kanazawa, A. (1985): *Nutrition of penaeid prawns and shrimp*. En: Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimp. Iloilo City. Philippines, pp: 123-130.
- Kanazawa, A. (1989): Microparticulate feeds for penaeid larvae. Advances in tropical aquaculture. Tahiti, Feb 20-March 4, 1989. *Aquacop ifremer*. Actes de colloque 9: 395-404.

- Kanazawa, A. y S. Teshima (1981): Essential aminoacids of the prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47: 1357–1377.
- Kanazawa, A., Teshima, S. y H. Sasada (1982): Culture of the prawn larvae with microparticulate diets. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48 (2): 195-199.
- Kanazawa, A., Teshima, S. y M Sakamoto (1985): Effects of dietary lipids, fatty acids phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 31, 159-167.
- Koshio, S. y S. Teshima (2005): *Recent progres in larval nutrition of marine fish and crustaceans in Japan*. En. Hedry. C.I., G.Van Stappen,M., Wille y P. Sorgeloos (eds). Larvi'2005. Fish &Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society. Special Publication No.36,Oostende,Belgium 2005. 250-251.
- Kovalenko, E., D'Abramo. L.R., Ohs, C. L. y R.K. Buddington (2002): A succesessful microbound diet for the larval culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 210: 385-395.
- Kristensen, J. H. (1972): Carbohidrases of some marine invertebrates with notes on their food and on the natural occurrence of the carbohidrases studied. *Mar. Biol.* 14: 130 – 142.
- Kuban, F. D., Lawrence, A. L. y J. S. Wilkenfeld (1985): Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. *Aquaculture* 47: 151 – 162.
- Kumlu M. y D.A Jones (1995): The effect of live and artificial diets on growth, survival and trypsin activity in larvae *Penaeus indicus*. *J. World Aquaculture Soc.* 26(4): 406-415.

- Kurmaly K., Jones D.A., Yule A.B. y J. East (1989): Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* larvae, from protozoa I to postlarvae I a live feeds, artificial diets and a combination of both. *Aquaculture* 81: 27-45.
- Lavens, P., Merchie, G. y P. Sorgeloos (1998): *Critical reviews of the larval fish crustacean feeding methods with ascorbic acid enriched diets: Effects on fish and shrimp growth, stress and diseases resistance*. World Aquaculture '98. Las Vegas. USA. 250 pp.
- Lawrence, A. L., Akiyama D. M. y W. B. Dominy (1996): *Recent Development: Shrimp Nutrition*. Conferencia Magistral, Curso Internacional. ESPOL. Ecuador. pp: 25-34
- Lawrence, A. L., Fox, J. y F. L. Castille (1981): Decreased toxicity of cooper and manganese ions to shrimp nauplii (*Penaeus stylirostris* Simpson) in the presence of EDTA. *World Maricult. Soc.* 41:1-18.
- Le Moullac, G., Van Wormhoudt, A. y AQUACOP (1994): Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) *Aqua. Living Resour.* 7: 203 - 210.
- Le Vay, L., Jones, D., Puello-Cruz, A., Sangha R. y C.Ngamphonsai (2001): Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 128, 623-630.
- Leal, S. (1990): Tamaño celular y concentración de cinco especies de microalgas cultivadas tratadas con antibióticos. *Rev. Invest. Mar.* 11(1): 51-62.
- Leal, S. (1995): *Evaluación de seis especies de microalgas utilizadas en Maricultivo*. Universidad de La Habana, Tesis de Maestría, 32 pp.

- Leal, S. e I. Banaechea (1994): Concentración óptima de nutrientes de tres especies de microalgas marinas en cultivo. *Rev. Invest. Mar.* 15 (1): 73 -79.
- Leal, S., Alfonso, E y A. Gainza (1985): Recomendaciones sobre la alimentación de larvas de camarones *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*, en cultivo. *Rev. Invest. Mar.* 6 (1): 87-93.
- Lee, P. G. y S. P. Meyers. (1996): Chemoattraction and feeding stimulation in crustacean. *Aquaculture Nutrition* 2: 157-164.
- Léger, P. H. y P. Sorgeloos (1992): *Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries*. En: Cultures of Marines Shrimp: Principles and Practice. Fast, A. W. y Lester, L. J. (Eds). Elsevier Science Publisher, p. 225 - 244.
- Lerch, G. (1977): *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*. Editorial Científico-Técnica. La Habana. 252 pp.
- LeVay. L., Rodriguez, A., Kamarudin, M. S. y D. A. Jones (1993): Influence of life and artificial diets on tissue composition and tripsin activity in *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 118: 287-297.
- Liao, I-C., Su, H. M. y J. H. Lin (1983): *Larval foods for penaeid prawns*. En: Handbook of Mariculture Vol. I Crustacean Aquaculture. CRC Press Inc. McVey, J. (Ed). 441 pp.
- Liao, W. L., Nur-E-Borhan, S. A., Okada, S., Matsui, T. y K. Yamaguchi (1993): Pigmentation of cultured black tiger prawn by feeding with a *Spirulina* supplemented diet. *Nippon Suisan Gakkaish*, 59: 165 – 169
- Lightner, D.V. (1978): Possible toxic effects of the marine blue-green alga, *Spirulina subsalsa*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. Invertebr. Pathol.* 32, 139-150

- Lovell, R., (1998): Nutrition and feeding of fish. 2<sup>nd</sup>. Klumner Academic Publishers, Boston, MA.
- Lovett, D. L y D. L. Felder (1989): Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae): *J. Morphol.* (201): 253 - 272.
- Lovett, D. L. y D. L. Felder (1990b): Ontogenetic in digestive enzyme activity of larval and post larval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea-Decapoda, Penaeidae) *Bio. Bull.* 178: 144 - 159.
- Lovett, D. L. y D. L. Felder (1990c): Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stage of *Penaeus setiferus* (Crustacea-Decapoda, Penaeidae) *Bio. Bull.* 178: 150-165.
- Lovett, D. L. y D. L. Felder (1990a): Ontogeny of kinematics in the gut of white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda Penaeidae). *J. Crust. Biol.*, Vol. 10 (1): 53 - 68.
- Márquez, C.G. (1997): *Evaluación de la levadura torula en la alimentación de larvas y postlarvas de camarón blanco Penaeus schmitti, con dietas artificiales.* Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de La Habana. 60 pp
- Matty, A. J. y P. Smith (1978): Evaluation of a yeast, a bacterium and algae as protein source for rainbow trout. I. Effect of protein level on growth, gross conversion efficiency and protein conversion efficiency. *Aquaculture.* 14:235-246
- Meske, C. y E. Pfeffer (1978): Growth experiments with carp and grass carp. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 11: 98-107
- Meyers S. M. y T. Latscha (1997): *Carotenoids.* En: Advances in World Aquaculture, Vol 6. Crustacean Nutrition. Luis R. D'Abramo (ed). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

- Meyers S. P. (2000): *Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas*.  
En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y 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. Pp: 473-491
- Miki W. (1991): Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chem.* 63: 141-146.
- Millamena, O. M. y E. T. Qunitio (1985): *Lipids and essential fatty acids in the nutrition Penaeus monodon larvae*. Proceed. First. Int. Conf. Cult. Penaeid Prawns. Philippines.  
181 pp
- Mitchell, H.H. y R.J. Block (1946): *Some relationships between the amino acid content of protein and their nutritive values for the rat*. From the division of animal nutrition. pp: 599-620
- Miyasaki, T., Sato, M., Yoshinaka, R. y M. Sakaguchi (1995): Effect of vitamin C on lipid and carnitine metabolism in rainbow trout. *Fish. Sci.* 61: 501-506.
- Mock, C. R., Revera, D. B. y C. T. Fontaine (1980): The larval culture of *Penaeus stylirostris* using modification of Galveston Laboratory Technique. *Proc. World Mariculture Soc:* 3:102-117.
- Mori, T., Muranaka, T., Miki, W., Yamaguchi, K., Konosu, S. y T. Watanabe (1987): Pigmentation of cultured sweet smelt fed diets supplemented with blue - green alga *Spirulina maxima*. *Nippon Suisan Gakkaisishi* 53 (3): 433-438.



- Moriarty, D. J. W. (1976): Quantitative studies on bacteria and algae in the food of the Mullet *Mujil cephalus* and the prawn *Metapenaeus bennettiae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 22:131-143.
- Mustafa, M.G. y H. Nakagawa (1995): A review: Dietary benefits of algae as an additive in fish feed. *Isr.J.Aquacult.* 47: 155-162.
- Mustafa, M.G., Umino, T. y H. Nakagawa (1994a): The effect of *Spirulina* feeding on muscle protein deposition in red sea bream, *Pagrus major* *J. Appl. Ichthyol.* 10: 141-145.
- Mustafa, M., Takeda, T., Umino, T., Wakamatsu, S. y H. Nakagawa (1994): Effects of *Ascophylum* and *Spirulina* meal as feed additives on growth performance and feed utilization of Red Sea bream, *Pagrus major*. *J. Fac. Appl. Biol. Sci., Horoshima Univ.* 33:125-132.
- Nakamura, K. y H. Tsuru (1990): Organogenesis of the midgut gland in the prawn *Penaeus japonicus* Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. *kagoshima Suiasngakuku Kiyō* 36 (1):221-225
- Nakamura, N. y K. Yamada (1960): Evaluation of nutritive value of unicellular green algae. *Jap. Microalgae. Res. Inst. Rep.* 1 (2):7-20
- Narciso, L. F. (1995): *The influence of the diet on the growth and survival of Penaeus kerathurus larvae*. En: Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Larvi'95. (P. Lavens, E. Jasper e I. Roelants, Eds.). pp: 420-425.
- Niall, L., MacDonald, N., Stark, J. R. y M. Keith (1989): Digestion and nutrition in the prawn *Penaeus monodon*. *J. World. Aquac. Soc.* 20(1):40-49.

- Nose, T. (1960): On the effective value of freshwater green algae, *Chlorella ellicsoidea*, as a nutritive source to gold fish. *Bull. Freshwater. Fish. Lab.*10:1-10
- Ohs, C. L. y L. R. D'Abramo (1998): Evaluation of spray-dried artificial diet for larval culture of freshwater, *Macrobrachium rosenbergii*, and striped bass *Morone saxatilis*, Blackwell Science. Ltd, *Aquaculture Nutrition* 4:73-82.
- Onishi, H., Suzuki, M. y M. Kikuchi (1985): The distribution of polisaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 51; 301-308.
- Ottogalli, L. (1991): Total substitution of microparticules for algal for *Penaeus stylirostris* larval, rearing in New Caledonia. *J. World Aquac. So.*, 22: 46-49.
- Ottogalli, L. (1993): *Nueva gestión del agua en las crías de peneidos en Nueva Caledonia*. En: Memorias del I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura (1992), J. Calderón y V. Sandoval (Eds.). pp: 87-91.
- Pascaud, M. (1993): The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune response. *Bolletín de l'Institut Ocèanografique*, 12: 49-58.
- Pedroza-Islas, R, Vermon-Carter, E.J., Durán-Dominguez, C. y S. Trejo-Martinez (1999): Using biopolymer blends for microcapsules, *Food Res. Int.* 32(5): 367-374.
- Pedroza-Islas, R., (2000): *Estudios difusionales en microencapsulados para larvas de crustáceos*. Tesis de Doctorado. 120 pp. UNAM, México.
- Pedroza-Islas, R., Gallardo, P., Vernon-Carter, E. J., Garcia Galano, T., Rosas, C., Pascual, C. y G. Gaxiola (2004): Growth, survival, quality and digestive enzymes activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquaculture Nutrition* 10(3): 167-173.

- Pérez, J. L. (1996): *Obtención de progenitores de cultivo del camarón blanco Penaeus schmitti a escala comercial*. Universidad de la Habana. Tesis de Maestría: 54 pp.
- Pérez-Farfante I. y B. Kensley (1997): Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world, keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires Muséum National d' Histoire Naturelle, Zoologie*, 175, 235.
- Person, J. (1976): Elevage larvaire d' *Artemia salina* (Branchiopode) sur nourriture inerte: *Spirulina maxima* (Cyanophyceae). *Aquaculture* 8, 157-167.
- Petit, H. (1993): *Effet de la supplementation en carotenoides de la nourriture sur le développement larvaire et postlarvaire de Penaeus japonicus (Bate, 1988)*. *Crustaceae decapode, Peneida*. Thèse de Doctorat de L'université de Montpellier, France.
- Quinitio, E. T. y C. T. Villegas (1982): Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon* Fabricius larvae fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture*, 29: 253-260.
- Ramos, L., Molina, J. M., Pérez, L. y B. Torres (1994): Producción de nauplios de *Penaeus schmitti* en instalaciones comerciales de maduración en Cuba. *Rev. Invest. Mar.* 15 (1): 28-38.
- Reyes, R., Fraga, I., Galindo, J. y S. Álvarez (1989): El salvado de arroz: un posible sustituto del trigo en dietas para camarón. *Bol. Nutricam. U.P. Camaronicultura*. No. 1. (sp).
- Richmond, A. (1988): *Spirulina*. En: M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (Eds) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 85-121.

- Ringelbert, J. (1980): *Aspects of red pigmentation in zooplankton, especially copepods*. En: Kerfoot, W.C. (ed.) *Evolution Ecology of Zooplankton Communities*. Univ. of New Hampshire, Hanover. pp. 91-97.
- Robinson, C. B., Samocha, T.M., Fox, J.M., Gandy, R.L. y D.A McKee (2005): Te use of inert artificial commercial food sources as replacements of traditional live food items in the culture of larval shrimp, *Fanfantepeanaeus aztecus*. *Aquaculture* 245, 135-147.
- Rodriguez, A., LeVay, L., Mourente, G. y D.A. Jones (1994): Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar Biol.* 1118:45-51.
- Romero, T. (1996): *Tecnología de cultivo de Chlorella sp en los afluentes líquidos de la Industria Pesquera y sub-productos derivados* Doc. XI Forum de Ciencia y Técnica 51 pp.
- Rosenberry, B. (2004): *World Shrimp Farming 2004. An annual report*. Bob Rosenberry (Ed) Shrimp News International, EUA, 276 pp.
- Sakamoto, M., Holland, D. L. y D. A. Jones (1982): Modification of the nutritional composition of Artemia by incorporation of polyunsaturated fatty acids using microencapsulated diets. *Aquaculture* (28): 311-320.
- Santoyo, J. M. (2002): *Spirulina Industry in Cuba*. En: Congreso de la ISAP. 9<sup>th</sup> Interconference on applied algology. Abstracts. *Algal Biotechnology a sea of opportunity*. 310 pp.

- Shearer, K., (2000): Experimental design, statistical analysis and modeling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. *Aquaculture Nutrition* 6, 91-102.
- Shewbart, K. L., Mies, W. L. y P. D. Ludwig (1972): Identification and quantitative analysis of the aminoacids present in protein of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Mar. Biol.* 2: 64-67.
- Shiau, S-Y. (1998): Nutrient requirement of penaeid shrimp. *Aquaculture* 164(2): 77-93.
- Shigueno, K. (1975): *Shrimp culture in Japan*, Association for International Technical Promotion 15-17:38-39.
- Shuli, C. y X. Baoqing (1992): A comparative study on protein content and aminoacid composition of eight species of unicellular marine feed algae. Yellow Sea Fisheries Research Institute. P. R. China, *Marine Science Bulletin* 11, 26-32.
- Sigarroa, A. (1985): *Manual de prácticas de biometría y diseño experimental*. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de La Habana. 793 pp.
- Simon, I. M. (1978): The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its used as a food for penaeid protozoal larvae. *Aquaculture* 14:105-113.
- Smith, L. L., y A. L. Lawrence (1987): *Experimental use of dry diets in penaeid larviculture as replacement for Artemia*. The World Aquaculture Society 18<sup>th</sup> Annual Meeting. Pág. 28.
- Soeder, C. J. y W. Pabst (1975): *Production, properties, preclinical and clinic testing of Scenedesmus*. The PAG Compendium, World mark Press, Ltd. N.Y (C-2): 2113-2120

- Sorgeloos, P. y P.Léger (1992): Improve larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *Journal of the World Aquaculture Society* 23, 251-264.
- Spamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M. y L. Borowistzka (2005): Effect of *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 248 (1-4):207-216.
- Stanley, J. G. y J. B. Jones (1976): Feeding algae to fish. *Aquaculture* 7(1):219-223.
- Strikland J.D.H. y T.R. Parson (1972): A manual of seawater analysis. *Bull. Fish.Rev. Ed.* Canadá. 125: 1-203.
- Suárez, G. y T. Romero (1997): *Aprovechamiento de la microalga Dunaliella salina*. XII Forum de Ciencia y Técnica. CIP-MIP. 6 pp.
- Suárez, G., Romero, T. y M. Borowistzka (1996): *Cultivo de microalga Dunaliella salina en medio orgánico*. Memorias IV Congreso Latinoamericano de ficología, Brasil. 22pp
- Subasinghe R. P. (1995): *Factors associated with the production of good quality shrimp postlarval*. En: Proceeding of the workshop on crab fattening, shrimp hatchery management techniques and post harvest processing on tuna. Colombo, Sri Lanka, 9-11 de Noviembre/1995: 8 pp.
- Sunilkumar, M. K. (1996): Heterotrophic marine bacterial supplementary feed for larval *Penaeus monodon*. *Naga*, 9(1): 23-26.
- Tacon, A. G. J. (1989): *Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados*. Manual de capacitación. Proyecto Aquila II. Documento de Campo 4: 572 pp.

- Tacon, A. G. J. (1990): Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Argent Laboratories Press. Redmond, Washinton,U.S.A. 454 pp
- Tacon, A. G. J. (1992): The food and feeding of farmed fish and shrimp. An annotated selection of FAO field documents, 1973-1991. FAO. Fisheries. Circular, 849: 92 pp.
- Tacon, A.G.J. (1995): Feed formulation and on-farm feed management. *FAO. Fish. Tech. Pap.* 343: 61-74.
- Takeuchi T., Lu, J., Yoshizaki, G. y S. Satoh (2002): Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw *Spirulina*. *Fisheries Science* 68(1): 34-40
- Teshima, S., Kanazawa, A. y Y. Kakuta (1986): Growth, survival and body lipid composition of the prawn larvae receiving several dietary phospholipids. *Men. Fac. Agric., Kagoshima Univ.*, 35, 17-27.
- Teshima, S., y A. Kanazawa (1982): Variation in lipid composition during the larval development of the prawn (*Penaeus japonicus*). *Mem. Fac. Agric, Kagoshima Univ.* 31, 205-212.
- Teshima, S-I y A. Kanazawa (1984): Effects of the protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates of the prawn larvae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50(10): 1709-1715
- Teshima, S-I., A. Kanazawa, y S. Koshio (1993): Recent development in nutritional and microparticulate diets of larval prawns. *ISR. J. Aquacult. Bamidhgeh.* 45(4):175-184.

- Teshima, S-I., Kanazawa, A. y M. Yamashita (1986): Dietary value of several proteins and supplemental aminoacids for larvae of the prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 51:225-235.
- Teshima, S-I., Kanazawa, A. y Y. Kakuta (1986a): Effects of dietary phospholipids on growth and body composition of the juvenile prawn. *Bull. Jap. Soc. Csi. Fish.* 52:155-158:
- Teshima, S-I., Kanazawa, A. y Y. Kakuta (1986b): Role of dietary phospholipids in the transport of C <sup>14</sup> tripalmitin in prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52; 515-523.
- Teshima, S-I., Kanazawa, A., Sasada, H. y M. Kawasaki (1982): *Requirements of the larval prawn Penaeus japonicus for cholesterol and soybean phospholipids*. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. pp: 193-199.
- Torrissen O.J. (1990): *Biological activities of carotenoids in fishes. The current status of fish nutrients in aquaculture*. En Proceedings of the third international symposium on feeding and nutrition in fish. Eds. M.Takeda and T. Watanabe. Tokyo University of Fisheries. Tokyo, Japan. pp 387-399
- Tsai, P. (1979): Evaluation of *Spirulina platensis* a protein source in fish and shrimp nutrition. *Suisanzoshoku*. 2:32-39
- Umebayashi, O. (1975): *Practical culture of microalgae*. En: Culture of marine life. Text Book of Marine Fisheries, Research Course Japan pp: 132-144.
- Van Wormhoudt, A. (1980): *Adaptation des activités digestives de leurs cycles et de leur controle, aux facteurs du milieuchèz Palaemon serratus (Crustacea:*



- decapoda:Natantia*). Thèse présentée à L'université d'Aix- Marseille II pour obtenir le grade de Doctoral d'état es Science.351 pp.
- Venkataraman, L. V. y W. E. Bécquer (1985): *Biotechnology and utilization of algae*. The Indian experience. Department of Science and Technology, New Mehruí Road, New Delhi, India. 257 pp.
- Villegas D. K. y A. Kanazawa (1979) Relationship between diet and growth of zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. *J. Zool.* 10(2): 305-399.
- Voltolina, D., Nieves, M. y P. Piña (1998): *Calidad de las microalgas para la acuicultura*. IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L. E. (Eds.) La Paz, B.C.S. México. Conferencia Magistral. 1-8 pp.
- Ward, D., Middleditch, B., Misslers, S. y A. Lawrence (1979): Fatty acids changes during larval development of *Penaeus setiferus*. *Proc. World Maricult. Soc.*, 10, 464-471
- Waslein, C. I.; Calloway, D., Magen, H. S. y F. Costa (1970): Uric acids level in men fed with algae and yeast as protein sources. *J. Food. Sci.* 35:294-298.
- Watanabe T., Liao W, Takeuchi T y H. Yamamoto (1990): Effect of dietary *Spirulina* supplement on growth performance and flesh lipids of cultured striped jack. *J. Tokyo Univ. Fish.* 77: 231-239.
- Webb, K. L. y F. E. Chu (1983): *Phytoplankton as a food source for bivalve larvae*. En: G. D. Pruder, C. J. Langdon y D. E. Conklin (Eds.). Proceeding of the second international Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Louisiana State University, Baton Rouge, L.A, 272-291 pp.

- Webster, C., Goodgame-Tiu, L., Tidwel, J. y D. Rouse (1994): Evaluation of practical feed formulations with different protein levels for juvenile red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Trans. Ky. Acad. Sci.*, 55, 108-112.
- Wouters R., VanHorenbeek T. y G. Merchie (2003): Flakes for shrimp postlarvae nutrient, retention and shrimp culture performance. *Panorama Acuicola Magazín* Mar/Abr. 8 (3): 52-53.
- Wouters, R., Van Horenbeek, T., Merchie, G. y P. Bribson (2004): Dietas larvales para camarón. Dietas secas elaboradas con ingredientes marinos frescos. *Panorama Acuicola Magazine* Mar/Abr, 9, 54-55.
- Yépez de Leal, M. y S. Silva (1997): Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de dos clones de *Chaetoceros sp.* aislados del lago de Maracaibo. *Boletín del Centro de Inv. Biol.* 31(1): 87-94.
- Zarrouk, C. (1966): *Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima.* Tesis Universidad de Paris, Francia. 150 pp
- Zimmer-Faust, R.K. (1991): Chemical signal-to-noise detection by spiny lobsters. *Biological Bulletin* 181:419-426.

## Capítulo 8. Anexos

Anexo 8.1. Composición química proximal (base seca) de *Chaetoceros* sp., *Thalassiosira* sp. y *Tetraselmis* sp. usadas como control en el Experimento I donde se evaluaron harinas de diferentes especies de microalgas (Tomado de Brown, *et al.*, 1989).

Especie	Proteína	Carbohidratos	Lípido	Minerales	Total
<i>Chaetoceros</i> sp.	33	17	10	29	89
<i>Thalassiosira</i> sp.	29	17	18	38	94
<i>Tetraselmis</i> sp.	39	8	7	23	77

“Proteína cruda” determinada como N x 6,25

Anexo 8.2. Composición aminoacídica de *Chaetoceros* sp., *Thalassiosira* sp. y *Tetraselmis* sp. usadas como control en el Experimento I donde se evaluaron harinas de diferentes especies de microalgas (g/100g del total de la fracción de aminoácidos) (Tomado de Brown, *et al.*, 1989).

Aminoácidos	<i>Chaetoceros</i> sp.	<i>Thalassiosira</i> sp.	<i>Tetraselmis</i> sp.
Valina	5.9	6.7	7.1
Treonina	5.9	4.2	3.6
Metionina	2.3	2.3	2.0
Isoleucina	5.5	5.6	4.1
Fenilalanina	5.9	6.0	3.4
Lisina	7.3	6.3	3.6
Histidina	2.3	2.4	2.2
Arginina	6.4	6.6	6.4
Prolina	n.d	4.9	3.7
Leucina	9.1	9.6	3.2
Tirosina	4.5	3.6	9.7
Triptofano	n.d	0.4	0.5
Alanina	7.7	6.8	8.7
Aspartato	11.4	10.3	10.0
Cistina	n.d	1.0	0.4
Glutamato	15.0	11.2	13.4
Glicina	5.5	7.0	7.4
Serina	5.9	5.0	4.3

Anexo 8.2.1. Posición Taxonómica de las microalgas vivas usadas como alimento control.

Phylum Bacillariophyta

Clase Bacillariophyceae

Subclase Centrales (Centro bacillariophyceae)

Orden Biddulphiales

Familia Chaetoceraceae

Género *Chaetoceros* (Ehrenberg, 1844).

Especie *Chaetoceros muelleri*

Phylum Bacillariophyta

Clase Bacillariophyceae

Orden Centrales

Familia Thalassiosiraceae Lebour

Género *Thalassiosira* Cleve, 1873

Especie *Thalassiosira fluviatilis* Hust.

El género *Tetraselmis* Stein (*Platymonas* West) antiguamente estaba incluido en la Clase Chlorophyceae, Orden Chlamydomonadales. A partir del trabajo de Stewart de 1974 se las sitúa dentro de la Clase Prasinophyceae (Guillard, 1975; Herrero, 1985).

Anexo 8.3. Composición química proximal (% base seca) y perfil de aminoácidos esenciales (AAE) de nauplios de *Artemia* recién eclosionados (Tacon, 1989), utilizados como alimento control, en el Experimento IV donde se reemplazaron las raciones de nauplios de *Artemia* por raciones del alimento microparticulado (HSP5%).

Nauplios de <i>Artemia</i> recién eclosionados	Composición Química Proximal (%)											
	PC	EE	FC	ELN	Cenizas							
	52.2	18.9	14.8	14.8	9.7							
	Composición promedio de AAE											
*(% total de AA)	Arg	Cist	Met	Treo	Iso	Leu	Lis	Val	Trip	Tir	Fen	Hist
	7,3	0,6	1,3	2,5	3,8	8,9	8,9	4,7	1,5	5,4	4,7	1,9

Proteína cruda-PC; Extracto Etéreo -EE; Fibra Cruda-FC; Extractos Libres de Nitrógeno-ELN y Cenizas-C.

\*Los valores de AAE son expresados como g/100 g de aminoácidos totales recobrados (AA): Arginina-Arg; Cistina-Cist; Metionina-Met; Treonina-Treo; Isoleucina-Iso; Leucina-Leu; Lisina-Lis; Valina-Val; Tirosina-Tir; Triptofano-Trip; Fenilalanina-Fen; Histidina-Hist.

Anexo 8.4. Composición química proximal de la harina de *Spirulina platensis* (EARTHRISE®) (Anónimo, 2002b) usado como sustituto parcial y total de microalgas vivas en el Experimento I para la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

Composición química proximal (%)	
Proteína	62.5
Lípidos	3.0
Carbohidratos	8.5
Humedad	7.0
Ceniza	12.0
Fibra Bruta	7.0
Ácidos Nucleicos	3.9
Metionina	2.5
Cistina	1.0

Anexo 8.5. Composición química proximal (% base seca, excepto humedad) de *Chlorella* sp. para su evaluación como sustituto parcial y total de microalgas vivas en el Experimento I para la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

<b>Composición química proximal (%)</b>	
Proteína	58.00
Lípidos	10.00
Carbohidratos	13.00
Humedad	7.50
Ceniza	11.20
Fibra bruta	9.80
Ácidos Nucleicos	4.50

Anexo 8.5.1. Composición Aminoacídica (g/100g de proteína) de *Chlorella* sp. para su evaluación en el Experimento I como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Concentración (g/100g proteína)</b>
Treonina	2.98
Metionina	3.86
Histidina	1.11
Valina	2.56
Lisina	3.24
Leucina	6.83
Isoleucina	2.09
Fenilalanina	3.99
Aspártico	5.39
Glutámico	7.62
Glicina	4.00
Arginina	4.18
Alanina	5.22
Tirosina	2.30
Serina	2.86

Anexo 8.5.2. Posición Taxonómica de *Chlorella vulgaris*.

División Chlorophyta

Clase Chlorophyceae

Familia Oocystaceae

Género Chlorella

Especie *Chlorella vulgaris*

Anexo 8.6. Composición química proximal (% base seca, excepto humedad) de la harina *Dunaliella salina* producida en Cuba, para su evaluación en el Experimento I como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoas de *Litopenaeus schmitti*.

<b>Composición química proximal (%)</b>	
Proteína	57
Lípidos	6
Carbohidratos	20
Humedad	7
Ceniza	10
Fibra bruta	-
Ácidos Nucleicos	-
Metionina	0.3
Cistina	-

Tomado de Suárez y Romero (1997)

Anexo 8.6.1. Composición aminoacídica (g/100g proteína) de *D. salina* producida en Cuba, para su evaluación en el Experimento I como sustituto parcial y total de microalgas vivas en la alimentación de protozoos de *Litopenaeus schmitti*.

<b>Aminoácidos</b>	<b>g/100g de proteína</b>
Alanina	6.3-12.9
Arginina	0.9-5.20
Ac. Aspártico	2.5-10.7
Cisteína	Trazas
Ac. Glutámico	7.9-11.9
Glicina	9.5-13.3
Histidina	1.2-8.80
Isoleucina	2.3-4.20
Leucina	5.0-17.6
Metionina	4.8-33.9
Fenilalanina	Trazas-1.4
Prolina	1.9-5.4
Serina	4.02-8.8
Treonina	6.3-8.6
Triptofano	2.5-6.0
Tirosina	Trazas-1.9
Valina	3,6-5.8

Tomado de Borowitzka y Borowitzka, 1988 (citado por Suárez *et al.*, 1996)

Anexo 8.6.2. Posición Taxonómica de *Dunaliella salina*.

División Chlorophyta

Clase Chlorophyceae

Orden Dunaliellales

Familia Dunaliellaceae

Genero *Dunaliella*

Especie *Dunaliella salina*