

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE

**“Metodología para determinar la variación de los
componentes del Nitrógeno y Fósforo residual en relación
con el nivel de proteína en alimentos suministrados a
diferentes tallas de juveniles de *Litopenaeus vannamei*
(Boone)”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Ciro Calderón Flores

La Paz, B. C. S. Agosto de 2007.

RESUMEN

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, es la especie de peneido dominante en el cultivo del hemisferio oeste (Jiang *et al.*, 2000). La tendencia del cultivo de organismos es hacia una forma intensificada. La alimentación es proporcionada por medio de alimentos formulados, siendo la proteína el mayor nutriente limitante para el crecimiento. Sin embargo la retención del nitrógeno (N) proteico es baja y, el desperdicio y acumulación de éste elemento y el fósforo (P) tiene serias consecuencias económicas y ecológicas, por lo que se ha buscado mejorar esta eficiencia proteica. Con este fin, el objetivo de este trabajo es el desarrollar una metodología que permita determinar los factores que afectan los niveles de los componentes del N y P residuales mediante un modelo experimental que consistió en la evaluación individual con seis réplicas de los componentes de N y P residuales que resultan de la alimentación con tres niveles de proteína (25, 35 y 45%) y durante un periodo de 24 horas, de juveniles de *L. vannamei* de diferentes tamaños (1, 2 y 3 g.) que previamente fueron sometidos a un periodo de 12 horas de ayuno y una rutina de ejercicio de 90 minutos. Para ello se montaron tres técnicas analíticas; amonio (Solórzano, 1969 montada en microplaca por Hernández, 2000), urea (Koroleff, 1977) y digestión simultánea de N y P (Valderrama, 1981). Se desarrollaron algoritmos con los cuales se formularon tres dietas isocalóricas, isolipídicas, con los distintos niveles proteicos y con una proporción similar entre tres fuentes proteicas de origen animal y vegetal. Se alimentó con ellas a animales de uno, dos y tres gramos, con el 10% de su peso y transcurrió una incubación de 24 horas. Los análisis del agua muestran una liberación de amonio, nitritos, nitratos y urea en ascenso en relación al nivel proteico de las dietas así como por el peso de los organismos. Por otro lado la concentración de nitrógeno orgánico soluble es más alta en aquellas dietas con menor contenido proteico y por consecuencia mayor contenido de carbohidratos. Los niveles de ortofosfatos liberados en 24 horas no superaron un μmol en todos los tratamientos. La concentración de fósforo orgánico particulado obtenidos, conforman más del 80% del fósforo total. Se observa un balance entre la relación N:P en los contenidos de todos los tratamientos alejado de la proporción reportada para ecosistemas acuáticos sanos. La metodología desarrollada en el presente trabajo provee herramientas para predecir la liberación de los diferentes componentes del N y P residual que resultan de la alimentación de organismos acuáticos.

ABSTRACT

Methodology to estimate the variation of Nitrogen and Phosphorus residuals based on the protein level in feed given to different sizes of *L. vannamei* (Boone) juveniles.

The Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, is the penaeid species more cultivated in the western hemisphere (Jiang, *et al*, 2000). The marine organisms culture trends is towards an intensify way. The alimentation is given by formulated food, being the protein the mayor growth limiting nutrient. However the protein nitrogen retention is low and the waste and accumulation of this element and phosphorus has serious economic and ecologic consequences, therefore a research for an improvement in the protein efficiency has been done. With this purpose, the objective of this work was to develop a methodology that allows determinate the that affect the levels of the waste nitrogen(N) and phosphorus (P) using as a model individual evaluation of N y P residuals in six replicate containers with different *L. vannamei* juvenile sizes (1, 2 y 3 g.) , feed 24 h with different protein levels (25, 35 y 45%), previously starved for 12 h and exercised for 90 min. Three analytic techniques were set: ammonia (Solórzano, 1969, set for microplate by Hernandez, 2000), urea (Koroleff, 1977) and the N and P simultaneous digestion (Valderrama, 1981). Algorithms were developed to design and formulated three diets with different protein levels, isoproteic, isocaloric and with similar proportions in vegetal and animal protein sources. Shrimps of one, two and three grams were fed with those diets equivalent to the 10% of their weight and a period of 24 hours of incubation lapsed. The analysis of the samples show a rising discharge of total nitrogen, particulate organic nitrogen, ammonia, nitrites, nitrates and urea according with the protein level and the individual weight. Soluble organic nitrogen residual was higher in low protein diets than in higher protein levels and in accordance with carbohydrate levels. Levels of ortophosphates never passed one μmol in none of the treatments. The concentration of particulate organic phosphorous obtained, makes up the 80% of the PT. Up to 50% of the soluble inorganic nitrogen was formed by ammonia. A N:P unbalance was observed in all the treatments in all the bioessays. The methodology developed in this work, provides the tools to predict the N and P residuals and the possible effects of the studied diets with organisms of the given weight.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, que a lo largo mi vida nunca han dejado de demostrarme su cariño y apoyo incondicional en todos los proyectos que emprendo. A mis hermanas, que siempre son fuente de inspiración y de energía a pesar de la distancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este trabajo. A los proyectos “Correlación de variables biológico-ambientales con la presencia de epidemias de mancha blanca” y “Diseño y puesta en Marcha de un sistema de exclusión de patógenos” del “Programa Integral de Sanidad Acuícola” financiados por CONACYT, el Gobierno del Estado de Sonora y los Comités de sanidad acuícola COSAES, CESASIN y CESANAY.

A todas las personas que colaboraron para la realización de esta tesis, empezando por mi director de tesis el Dr. Francisco Javier Magallón Barajas, el comité tutorial Dr. Carlos Lechuga, Dr. Hector Nolasco y Dr. Illie Raccotta. . A Rosalía Servín Villegas por la ayuda prestada para este trabajo. A los técnicos Roberto Hernández Herrera, Iban Murillo Murillo, Manuel Trasviña, Sofía Ramos, Norma Ochoa, Armando Monge, Daniel Ceseña, Mayra Vargas, Luis Enrique Murillo, Horacio Sandoval, Ernesto Goytortúa. A Martín Terrazas por su ayuda y consejos en momentos críticos. Quiero agradecer muy especialmente a Guillermo Portillo Clark, por sus consejos, guía y ayuda sin la cual, este trabajo simplemente no hubiera podido ser realizado.

A Luz María Romero, por soportarme en momentos de histeria, por darme mi espacio, pero sobre todo por hacerme reencontrar objetivos cuando muchas veces parecía haberlos perdido.

A la familia González Castelo, por el cariño y apoyo que siempre me han brindado, a lo largo de mi vida en La Paz.

A todos mis compañeros de la maestría por la solidaridad y ayuda que mostraron cuando hizo falta. A mis amigos que a lo largo de este período, en épocas buenas y otras no tanto, estuvieron conmigo, física, mental o espiritualmente.

INDICE

INDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
<i>Métodos aplicados para estudios metabólicos.....</i>	6
<i>Diseño y formulación en la alimentación.</i>	8
<i>Asimilación del Nitrógeno y Fósforo</i>	14
<i>Amonio</i>	16
<i>Requerimiento de proteína</i>	17
<i>Crecimiento</i>	18
<i>Estudios bioenergéticos.....</i>	19
3. JUSTIFICACION.....	22
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
<i>Objetivo General.....</i>	25
<i>Tareas.....</i>	25
6. METODOLOGÍA	26
<i>a) Modificación de las técnicas analíticas.....</i>	26
Técnica para la cuantificación de urea	26
Técnica para cuantificación de amonio.....	27
NT y PT de Valderrama (1981).....	28
<i>b) Diseño y elaboración de las dietas balanceadas.....</i>	28
<i>c) Elaboración de dietas.</i>	29
Prueba de humedad	34
Prueba de estabilidad en agua	35
<i>d) Bioensayos</i>	36
<i>Análisis Estadísticos.....</i>	40
7. RESULTADOS.....	41
<i>a) Modificación de las técnicas analíticas.....</i>	41
Método en Microplaca Koroleff (1977).....	41
Método en microplaca Solórzano (1969) modificado.....	45
Estandarización del método de digestión simultáneo de NT y PT Valderrama (1981).	48
<i>b) Diseño y elaboración de alimentos.....</i>	50
<i>c) Bioensayos.....</i>	51
Niveles de los diferentes componentes de N y P residuales obtenidos en los bioensayos	52
DISCUSIÓN.....	66
<i>a) Técnicas montadas.....</i>	66
Urea	66

Amonio	69
Nitrógeno y Fósforo Total.....	71
<i>b) Diseño y Formulación de alimentos balanceados.</i>	76
<i>c) Diseño experimental.</i>	77
<i>d) Bioensayos</i>	78
CONCLUSIONES	103
RECOMENDACIONES	104
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	105
APÉNDICE I.....	124
APÉNDICE II	129
<i>TÉCNICAS DE COMPUESTOS NITROGENADOS</i>	129
Amonio (Solórzano, 1969) modificada.....	129
Urea	134
(Koroleff miniaturizado)	134
Procedimiento para medir simultáneamente nitrógeno total y fósforo total en agua de mar	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Métodos usados para la determinación de la concentración de compuestos metabólicos en agua de mar.	7
Tabla II. Alimentación de camarones de acuerdo a la talla del animal (Tacon, 1987).	8
Tabla III. Resultados del análisis bromatológico hecho a las harinas utilizadas en las dietas.....	28
Tabla IV . Ingredientes y cantidades en gramos, utilizadas para cada una de las dietas.	30
Tabla V. Ingredientes y cantidades en miligramos del premix vitamínico	31
Figura 1 Sistema contracorriente utilizado para ejercitar a los camarones del bioensayo.	37
Tabla VI. Condiciones de ensayo e intervalo inicial obtenidos para cada técnica: proximidad de ajuste de la recta de regresión a las observaciones de la muestra r^2	41
Tabla VII. Datos de las pruebas de lixiviación y humedad hechas a las dietas experimentales.....	50
Tabla VIII. Análisis bromatológico de las dietas experimentales.....	51
Tabla IX. Parámetros ambientales registrados durante el bioensayo.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Sistema contracorriente utilizado para ejercitar a los camarones del bioensayo.....	45
Figura 2 Sistema experimental utilizado en los tres bioensayos.....	45
Figura 3 Curva patrón de la técnica de Urea de Koroleff.....	51
Figura 4. Curvas patrón de la técnica de Koroleff (1981) hechas con: ■ agua marina y agua deionizada.....	51
Figura 5. Muestras de agua analizadas con a) la técnica de Koroleff estandarizada para microplaca y b) con el kit comercial.....	51
Figura 6. Absorbancia de amonio con la técnica de Solórzano (1969) modificada en este trabajo.....	54
Figura 7. Absorbancia de amonio en agua marina y deionizada.....	55
Figura 8. Curva patrón de nitratos de la técnica de determinación simultánea de Nitrógeno y Fósforo Total de Valderrama (19) estandarizada.....	57
Figura 9. Curva patrón de fosfatos de la técnica de determinación simultánea de Nitrógeno y Fósforo total de Valderrama (19) estandarizada.....	57
Fig.10 Niveles de urea registrados en agua, con camarones alimentados con distintos alimentos con distintos niveles proteicos.....	60
Figura 11. Niveles de urea con los tres niveles de proteína divididos por talla.....	61
Figura 12. Niveles de amonio registrados en agua, con camarones alimentados con distintos alimentos niveles proteicos.....	62

Figura 13. Niveles de amonio por gramo de organismo registrados en agua, con camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos...	63
Figura 14. Niveles de nitritos registrados en agua, con camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.....	64
Figura 15. Niveles de nitratos registrados en agua con camarones alimentados con distintos niveles proteicos.....	65
Figura 16. Niveles de NIS registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos a) concentración total y b) por gramo de camarón.....	65
Figura 17 Niveles de NOS registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos a) concentración total y b) por gramo de camarón.....	66
Figura 18. Niveles de NOP registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.....	67
Figura 19. Niveles de NT registrados en agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos a) concentración total y b) por gramo de camarón.....	67
Figura 20. Niveles de PT registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.....	68
Figura 21. Niveles de POS registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.....	69
Figura 22. Niveles de POP registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.....	70
Figura 23. Niveles de PIS registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.....	71
Figura 24. Relación entre las evaluaciones de nitrógeno total y nitrógeno proteico por los métodos de Valderrama y Kjeldahl.....	72
Figura 25. Relación entre las evaluaciones del nitrógeno proteico obtenido por Kjeldahl y los valores de nitrógeno inorgánico soluble	73

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone), es una especie del Pacífico oriental tropical con una distribución que abarca, desde el norte de México hasta el norte de Perú. Actualmente, *L. vannamei* es la especie de peneido dominante en el cultivo del hemisferio oeste (Jiang, *et al.*, 2000). El cultivo de camarón es una industria que a nivel mundial produce alrededor de 900,000 toneladas por año (Burford y Williams, 2001). Conforme crece, esta industria ha tendido al cultivo de los organismos en una manera intensificada, es decir estanques con una alta densidad de organismos alimentados con alimentos formulados. Este tipo de alimentación es comúnmente utilizada en el cultivo y conforma uno de los costos más altos que los acuicultores tiene que cubrir en la producción. El requerimiento dietético de proteína de los camarones peneidos es una consideración nutricional importante ya que la proteína es el mayor nutriente limitante para el crecimiento y es uno de los principales componentes de los alimentos formulados (Cowey, 1994; Velasco et al, 2000). Además, el contenido proteico de un alimento y la disponibilidad en la dieta puede afectar la calidad del agua por medio de la excreción nitrogenada (Kureshy y Davis, 2000). El nitrógeno es proveído en altas concentraciones como parte de la alimentación de camarones, pero la mayor parte de lo que se vierte en el estanque no es retenido por los camarones, sino que se convierte en un fertilizador para la biota natural, tal y como son el plancton y las comunidades microbianas. El amonio es el substrato nitrogenado preferido del fitoplancton, después de que ha sido consumido por éste, los nitratos son

asimilados en cantidades importantes, por una ruta menos favorable para la incorporación de nitrógeno que la ruta de incorporación del amonio (Cho *et al.*, 1994; Hargreaves, 1998; Hardy y Catlin III, 2002).

El desarrollo y uso de los alimentos balanceados ha sido un factor muy importante en la expansión global de la industria del cultivo de camarón, y su uso tiene una importancia creciente en el futuro para mantener la industria estable y ecológicamente viable (Davis, *et al.*, 1994). Existe un potencial considerable para mejorar y optimizar la manera en como se maneja la alimentación actualmente, la cual puede ser específica para diferentes especies, áreas e inclusive épocas del año, si se pretende obtener una mayor eficiencia de producción y minimizar el nitrógeno y Fósforo residual en los efluentes. Un manejo adecuado del alimento balanceado maximiza el crecimiento y supervivencia de los organismos, reduce las conversiones alimenticias y la cantidad de alimento a utilizar (Hardy y Gatlin III, 2002). De otra forma se obtiene como consecuencia una producción subóptima, aparición de enfermedades, problemas de calidad de agua que afectan negativamente la producción, además de posibles efectos adversos en las condiciones naturales de los ecosistemas adyacentes (Jory *et al.*, 2001). Globalmente existen cuatro métodos para producir camarones; el extensivo, el semi intensivo y el super intensivo, y se caracterizan por una reducción progresiva en el tamaño de los estanques de engorda, aumento en los costos de construcción y producción, mayor densidad de siembra, e intensificación de prácticas de manejo, que incluyen preparación de estanques, recambio de agua, fertilización, uso de alimentos balanceados, entre otras (Tacon *et al.*, 2002 (a)). La mayoría de las granjas

en funcionamiento a nivel mundial, producen al menos dos cosechas anuales, aunque en muchas granjas se logran 2.3 -3 cosechas al año. Desde 1980 la mayoría de las granjas construidas en América Latina han sido de tipo semi-intensivo y en Asia del tipo intensivo. Actualmente una gran cantidad de granjas han sido convertidas de semi-intensivas a intensivas, y hay una tendencia a disminuir significativamente el recambio de agua, hasta llegar el punto de la recirculación dentro del sistema de cultivo (Clifford, 1999). El otro tipo de cultivo es el super-intensivo a la fecha son básicamente experimentales aunque la práctica de este sistema tiene gran potencial.

Los estanques para producción de camarones son ecosistemas abiertos, en el sentido ecológico, y están sujetos a una considerable variabilidad ambiental sobre la cual se tiene poco o ningún control. Estos estanques son sistemas de monocultivo, y por lo tanto, inestables, y fácilmente perturbables, que para mantenerse en equilibrio necesitan de “subsidios” como lo son los fertilizantes, cal, recambios de agua y alimento balanceado (Decamp *et al.*, 2003;).

La inherente eficiencia de la utilización de los nutrientes por parte de los organismos a cultivar, implica que la carga de nitrógeno de los estanques de cultivo puede ser limitada por la capacidad de asimilar los compuestos de nitrógeno y Fósforo residuales, lo cual tiene un impacto negativo en la calidad del agua y/o en el crecimiento del camarón. Y esta eficiencia para retener la proteína es inferior a la que se obtiene en la actividad agropecuaria ya que el factor de conversión no ha mejorado sustancialmente en los últimos 20 años (Magallón-Barajas, 2006). Después del oxígeno, la acumulación de nitrógeno orgánico disuelto (NOD) es el factor más limitante para la

tasa de crecimiento en los estanques de cultivo. Para minimizar el efecto que esto tiene se hacen recambios del estanque las cuales van a dar a ríos, arroyos y estuarios, acumulándose en el ambiente (Hargreaves, 1998; Burford y Williams, 2001).

Los estudios bioenergéticos aplicados a la acuicultura tienen el objetivo de revertir esta situación y ofrecer a los productores la información biológica básica que permita diseñar ambientes y condiciones que ofrezcan a los organismos las condiciones que les permitan desplegar las capacidades adaptativas que se traduzcan en rápido crecimiento y aprovechamiento de la energía ofrecida en el alimento (Rosas *et al.*, 2003).

Actualmente, el margen de utilidad en la acuicultura disminuye por la caída de los precios por efecto de la sobreproducción y del incremento en los costos debido a un rápido crecimiento de la industria, una baja retención proteica por parte de los organismos cultivados, epidemias y problemas ambientales. La baja retención proteica tiene impacto en los costos de las granjas en el medio de cultivo, la salud de los animales y el medio ambiente (Magallon, 2006). Mejorar la retención proteica no solo requiere un compromiso de las empresas que manufacturan los alimentos balanceados, sino que también del desarrollo de nuevos métodos que permitan identificar de una manera más ágil los factores nutricionales que pueden mejorarla.

Hasta la fecha se han utilizado dos enfoques para mejorar la retención proteica:

- a) estudios nutricionales clásicos
- b) estudios de excreción

Una de las ventajas del primer enfoque son los métodos muy refinados utilizados que permiten identificar los factores nutricionales, una de las desventajas es que son muchos los factores que pueden determinar la retención proteica, los métodos nutricionales requieren tiempos mayores a 7 semanas para dar respuesta y se han enfocado principalmente a organismos muy pequeños, mientras que los mayores costos derivados de la retención proteica se tienen en la engorda de organismos mayores a los que utilizan el primer enfoque.

El segundo enfoque tiene la ventaja de que puede dar respuestas en plazos mas cortos con organismos más grandes, pero tiene como limitación el que se ha enfocado principalmente a la excreción de amonio con protocolos de ayuno, mientras que la baja retención proteica esta relacionada con otros compuestos además del amonio y con organismos en alimentación y no en inanición. Por ellos se requiere desarrollar métodos igual de refinados que los nutricionales pero tan rápidos como los estudios de excreción. Esta divergencia entre ambos enfoques cuestiona la posibilidad de desarrollar métodos rápidos que puedan ser utilizados por los nutriólogos para identificar los factores que inciden en la retención proteica. Además en otras especies se ha reconocido que cuando se incrementa el nivel de racionamiento y/o el nivel de proteína, la retención disminuye, lo cual sugiere que se puede desarrollar una metodología para estudiar los factores que ayudan en la retención proteica en un gradiente de inclusión de varios niveles de proteína en la dieta.

La intención del presente trabajo de tesis es desarrollar una metodología que permita estimar en nitrógeno y fósforo residual en un modelo experimental de

alimentación de camarones juveniles de *L. vannamei* con dietas de distintos niveles proteicos.

2. ANTECEDENTES

Métodos aplicados para estudios metabólicos

En la actualidad hay varias técnicas disponibles para la cuantificación de los componentes metabólicos con distintos fines. De manera general los métodos son: a) colorímetros, donde estos compuestos forman compuestos de color, donde la intensidad refleja la concentración y b) colorimétricos-enzimáticos, donde la determinación es enzimática pero la reacción produce un color que se puede medir.

Los estudios relacionados con la medición de la concentración de los compuestos nitrogenados en camarones, se han dirigido a evaluar sus variaciones por estrés ambiental(Chen y Chen, 1996; Chen y Kou, 1996 a, 1996 b; Jiang *et al.*, 2000; Pillai y Diwan, 2002; Lee y Chen, 2003, 2004), alimento (Koshio *et al.*, 1992; Schmitt y Santos, 1998; Burford y Williams, 2001; Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Comoglio *et al.*, 2004), cambios fisiológicos (King *et al.*, 1984; Lemos y Phan, 2001) y de cultivo (Montoya *et al.*, 2002; Burford y Lorenzen, 2004; Gómez-Jiménez *et al.*, 2005).

Los métodos usados por diversos autores para la determinación de la concentración de compuestos metabólicos en agua de mar se enlistan en la tabla uno.

Tabla I. Métodos usados para la determinación de la concentración de compuestos metabólicos en agua de mar.

Compuesto	Método	Autor/Año
Amonio	Solórzano	Lee y Chen 2003
	Solórzano	Pillai y Diwan, 2002
	Solórzano	Chen y Cheng, 2002
	Solórzano	Gómez y Jiménez, 2000
	FIA	Schmitt y Santos, 1998
	FIA	Gómez y Jiménez, 2000
	Van Slyke	Sharma y Neveau 1969
	Electrodo selectivo Koroleff	Spaargen, 1982 Lemos y Phan, 2001
Urea	McCarthy	Lee y Chen, 2003
	McCarthy	Chen y Cheng, 2002
	McCarthy	Chen y Koy, 1996
	Cullen	Sharma, 1969
	Ureasa	Spaargen, 1982
	Rahmatullah y Boyde	Burford, 2001
Nitritos	Bendschneider y Robinson	Lee y Chen, 2003
	Bendschneider y Robinson	Chen y Chen, 2002
	Bendschneider y Robinson	Chen y Kou, 1996
Nitratos	Wood	Chen y Kou, 1996
	Wood	Chen y Chen, 2002
	Wood	Lee y Chen, 2003
Nitritos/Nitratos	Spottle	Gómez-Jiménez 2000
	Jones	Burford, 2001
Nitrógeno Total	Solórzano y Sharp	Lee y Chen, 2003
	Solórzano y Sharp	Chen y Chen, 2002

Esta diversidad de técnicas es indicativa de los problemas detectados en la aplicación de las técnicas anteriormente mencionadas a muestras provenientes de ambientes con amplia variación en la composición de sales. Entre ellos se pueden mencionar las reacciones entre los constituyentes de ciertos reactivos, tiempos de ebullición,

inestabilidad del color a la luz y al tiempo, interferencia por baja sensibilidad y el no tener una curva de calibración lineal (Rahmatullah y Boyd, 1980).

Diseño y formulación en la alimentación.

Los alimentos, que se usan en sistemas intensivos de cultivo se basan principalmente en las técnicas de manufactura que se han desarrollado en forma básica para la industria intensiva de producción de aves de corral. Esta tecnología fue adecuada para el desarrollo de dietas completas para el uso en sistemas de acuicultura de agua clara y para especies que consumen y engullen rápido el alimento, sin embargo el medio acuático, se encuentran otras dificultades de tipo tecnológico y nutricional para el desarrollo adecuado de la tecnología de los alimentos en la acuicultura, y el desarrollo de las raciones para camarones, los cuales tienen hábitos alimenticios muy lentos y un sistema de ingestión por fragmentación de alimentos (Tacon, 1987). Al presente, estas restricciones se han podido resolver en parte mediante la formulación de dietas con altos contenidos de nutrientes, de ésta forma se tienen factores de seguridad adecuados; el uso de éstos, es económicamente justificable, solamente por el alto valor comercial de los organismos cultivados comercialmente.

El objetivo de la formulación de alimentos es mezclar ingredientes de diferentes calidades nutricionales, de tal manera que se obtengan dietas balanceadas, cuyos perfiles de nutrientes biológicamente disponibles se aproximen a las necesidades dietéticas del animal en cuestión. De cualquier forma, en la formulación de una dieta práctica se toman en cuenta lo que es ideal desde el punto de vista nutricional, y lo que es práctico y económico. Idealmente, la formulación debe reflejar los requerimientos

nutricionales del animal exactamente y sin exceso, pero en la práctica los requerimientos de los nutrientes no son conocidos con certeza y la disponibilidad biológica de los nutrientes en los ingredientes es frecuentemente desconocida (He y Lawrence, 1994; Velasco *et al.*, 2000; Rosas *et al.*, 2001).

El sistema de compactación o granulación (“peletización”) a vapor es la técnica más común de producción empleada para la manufactura comercial de alimentos para acuicultura. Sin embargo, aparte de los beneficios generalmente reconocidos a los sistemas convencionales de compactación de granulados (“pelets”) secos o a vapor, los desarrollos más recientes y la aplicación de técnicas de granulación (“peletización”) por extrusión, como por ejemplo la expansión, ofrecen algunos horizontes nuevos para los fabricantes de alimentos para acuicultura.

Entre las ventajas que tiene la extrusión sobre la granulación a vapor se encuentran:

Las altas temperaturas empleadas por extrusión facilitan la ruptura de las membranas de celulosa que rodean a las células vegetales, tienen como consecuencia la gelatinización del almidón y el incremento de la biodisponibilidad calorífica de los carbohidratos, además de que también se facilita la inactivación o destrucción de factores antinutricionales termolábiles, que se encuentra normalmente presentes en los cereales y oleaginosas. Además de que la producción de granulados (“pelets”) hechos por extrusión que son extremadamente estables en estado seco, pueden ser almacenados por largos períodos sin degradación de los nutrientes (Tacon *et al.*, 2002). La frecuencia de alimentación óptima diaria y el alimento ingerido dependen del contenido de energía digerible en la dieta, de la temperatura del agua, tamaño del camarón, entre otros.

Debido a que los camarones comen principalmente para satisfacer sus requerimientos de energía, resulta entonces que el contenido de energía digerible de la dieta determinará la cantidad de alimento consumido; animales con dietas bajas en energía requieren una ingestión del alimento más alta. Consecuentemente, debido a que los requerimientos de energía de una animal son directamente proporcionales a la actividad metabólica de los organismos, resulta que el ingerido y la frecuencia de la alimentación deben ser medidos a tasas declinantes graduales con el incremento del tamaño del camarón y la reducción en la temperatura (Tacon y Cowey, 1985). El consumo de alimento esta relacionado con el tamaño del camarón, calidad del agua y sustrato, condiciones ambientales y fisiológicas. Debido los hábitos alimenticios lentos del camarón se recomienda alimentar con mayor frecuencia mediante la aplicación de cantidades pequeñas para evitar el desperdicio y pérdida de nutrientes solubles (Tabla II).

Tabla II. Alimentación de camarones de acuerdo a la talla del animal (Tacon, 1987).

<u>Peso camaron</u> (g)	<u>Tamaño cuerpo</u> (cm)	<u>Tasa alimenticia</u> (% por día)	<u>Frecuencia</u> (veces/día)
0.02– 1.5	1.2– 4.5	15.0–10.0	4–5
1.5 – 5.0	4.5– 7.0	10.0– 5.0	3–4
5.0 –12.0	7.0– 9.5	5.0– 3.5	3–4
12.0 –20.0	9.5–12.0	3.5– 3.0	3–4
> 20.0	> 12.0	3.0– 2.0	3–4

Si el alimento permanece mucho tiempo en el agua, pueden tener una pérdida de moléculas que le dan poder de atracción (“atractante”) originando bajo consumo y desperdicio por consecuencia. Una alimentación frecuente también resulta en un tamaño

de camarón mas uniforme. Los camarones son nocturnos y son consumidores intermitentes, por lo que algunos autores sugieren que la mayor porción de alimento diario debe ser administrado en la noche cuando los camarones estén mas activos (Mente *et al.*, 2002). Ejemplo: 6 AM 20%, 12 PM 20%, 6 PM 25% y 10 PM 35%. En sistemas como los como tanques circulares donde los camarones son forzados a movilizarse por los movimientos de agua, estos pueden estar más activos durante el día, por lo que en tales condiciones la cantidad de alimento por ración puede ser similar en los diferentes horarios.

Debido a que el alimento y los costos de alimentación generalmente constituyen los costos de operación más altos de las operaciones de una granja de engorda de cultivo intensivo es primordial que el alimento esté formulado y presentado de tal manera que proporcione un máximo de eficiencia en la producción al mínimo costo. Es por esto que los granjeros comerciales están interesados en la conversión del alimento de camarones en carne tan rápida y eficientemente como sea posible. Para que una granja de camarones sea exitosa es esencial que la estrategia de alimentación de cultivos intensivos esté basadas en criterios básicos, tales como: disponibilidad del alimento, manejo, rendimiento del alimento, costo del alimento y costo de los métodos de alimentación (Martínez-Córdova *et al.*, 2002).

En las granjas camaroneras de América Latina se alimenta normalmente 1-3 veces al día, usualmente en la mañana y en la tarde y algunas veces en la noche, mientras que los camaroneros asiáticos típicamente distribuyen la mayor cantidad de la ración diaria

durante la noche, debido al mayor grado de actividad exhibido por los animales durante la noche.

Actualmente, cerca del 90 por ciento de la producción de camarones por acuicultura en el tercer mundo y países en desarrollo (se incluye Latinoamérica y el Caribe), es realizado en sistemas de producción en estanques de cultivo semi-intensivo o extensivo, mediante el empleo de fertilización o estrategias de alimentación complementarias, y los nutrientes requeridos en la dieta de las especies en granja se obtienen parcial o completamente, a través de la producción y consumo de organismos vivos dentro del cuerpo de agua en el que se encuentra el cultivo (Tacon, 1987). Los camarones peneidos son animales que tienen hábitos omnívoros y se alimentan de manera continua a frecuente (Zendejas-Hernández, 1994). Es una usanza común suministrar la ración diaria en múltiples alimentaciones, lo cual mejora el consumo de alimento, el crecimiento y la tasa de conversión. Diversos autores han evaluado el efecto que la frecuencia y el tiempo de alimentación tienen sobre el crecimiento y supervivencia. Robertson y colaboradores (1993) demostraron que para *L. vannamei*, alimentar cuatro veces al día era mejor que dos, y dos mejor que una; así mismo reportaron una ligera tendencia a un mejor rendimiento en animales.

De acuerdo a Tacon (1993), hay cinco factores primarios que determinan el rendimiento nutricional y el éxito de un alimento balanceado:

- Las características nutricionales de la dieta formulada; selección de los ingredientes, nivel de nutrientes, digestibilidad, entre otros.

- Los procesos de manufactura usados para producir las raciones alimenticias y las características físicas de la dieta resultante; granulado (“peletizado”) frío, a vapor, molido, microencapsulado, secado al aire, al sol, liofilizado, tamaño del alimento, forma, color, textura, estabilizada, entre otros.
- El manejo y almacenamiento de las dietas manufacturadas antes de ser usada en la granja; tiempo de almacenaje, condiciones de almacenaje con respecto al ambiente, temperatura, humedad, irradiación, ventilación y materiales con los cuales han sido empacados.
- El método de alimentación empleado; a mano o alimentación mecanizada, frecuencia de alimentación, tasa de alimentación, entre otros.
- La calidad del agua del sistema de cultivo; temperatura, foto periodo, oxígeno disuelto y concentración de minerales, salinidad, turbidez, entre otros.

Los factores mencionados deben de ser considerados en un manejo integral de estanques de producción, y en el manejo del alimento balanceado. Los alimentos y las prácticas alimenticias tienen un impacto dramático en la concentración de amonio en los estanques de cultivo.

El ingrediente que más atención recibe dentro de la elaboración de alimentos balanceados es el nivel, porcentaje o proporción de proteína. Existe una gran variedad de alimentos balanceados para camarones, y la composición y valor nutricional disponible de estos alimentos es muy variable. Para producciones de unos 600 K/ha, Cook y Clifford (1997) recomiendan alimentos de “baja calidad” con un 20-22% de proteína cruda. Alimentos de “mediana calidad” con un 25% de proteína para

producciones de entre 800 y 1000 Kg/ha y para producciones de 1000 y 1200 Kg/ha, se recomienda usar alimentos con 35% de proteína. También se recomienda aplicar alimentos con niveles de 40 a 45% de proteína durante las primera etapas de la engorda. Los porcentajes de proteína recomendados para diferentes especies de camarones varían entre 20 y 60% de acuerdo a la especie. Para *L. vannamei* se recomiendan valores entre 25 y 35%. Los niveles de lípidos recomendados van desde 6 a 7.5% y ácidos grasos entre 0.3 y 0.4%. Los niveles complementarios de vitaminas varían desde 40 hasta 1000 mg/Kg, según el nivel de inclusión de la vitamina (Jory *et al*, 2001).

La selección del alimento a utilizar se fundamenta en diversos aspectos, tales como talla y peso del animal, composición proteica del alimento, sistema de cultivo empleado, disponibilidad en el mercado, entre otros. Clifford (1999) recomienda el uso de los alimentos con las siguientes características:

- Bajo potencial de contaminación
- Alta hidro-estabilidad para prevenir un deterioro demasiado rápido y prevenir la pérdida de nutrientes.
- La inclusión de atrayentes y alimentos naturales para mejorar la palatabilidad y estimular un consumo rápido.

Asimilación del Nitrógeno y Fósforo

Los diferentes compuestos que contienen fósforo y nitrógeno son dos de las familias de productos de la alimentación y la excreción de peces y camarones cultivados en estanques. El fósforo incluido en las dietas y que no es consumido y depositado en los tejidos corporales, es excretado en al agua ya sea en las heces, como fósforo

indigerible, o como urina, fósforo absorbido en exceso para el crecimiento. La proteína que no es digerida es excretada en las heces, y esta proteína, la cual contiene nitrógeno, puede ser transformada y sus subproductos liberados como péptidos o aminoácidos cuando el material fecal se descompone, o como amonio o urea excretados por las branquias. La proteína que es catabolizada para generar bioenergía más que usada para construir tejido proteico, resulta en la excreción nitrogenada, principalmente en la forma de amonio y urea. Es por esto, que materiales que son clasificados como contaminantes en las granjas de camarón son originados de la dieta, y son básicamente materiales que no son digeridos, o excreciones metabólicas (Hardy y Gatlin, 2002).

El nitrógeno contenido en la proteína de las dietas es un nutriente enriquecedor de gran importancia para la acuicultura, particularmente para la marina. Se estima que los compuestos nitrogenados excretados como desechos residuales, ascienden del 52 al 95% del nivel de nitrógeno incluido en el alimento utilizado en las dietas acuícolas, según la especie y el racionamiento (Van Wyk, 1999). Se requiere de una adecuada ingesta de proteína de alta calidad para que haya un rápido crecimiento tanto de peces como de crustáceos. Se ha observado una relación general entre los hábitos de alimentación natural y los requerimientos proteicos en las especies acuáticas, por ejemplo, las especies carnívoras tienen requerimientos proteicos más altos que aquellas que son omnívoras o herbívoras. Lo cual es importante ya que los aminoácidos utilizados para la energía metabólica, más que para la síntesis tisular, son catabolizados, y el nitrógeno amoniacal liberado a partir de los aminoácidos es excretado vía branquial, lo cual contribuye a la degradación ambiental (Hardy y Gatlin, 2002)

La inherente eficiencia en la utilización de los nutrientes por parte de los organismos a cultivar, implica que la carga de nitrógeno de los estanques de cultivo puede ser limitada por la capacidad de asimilar la excreción nitrogenada, lo cual tiene un impacto negativo en la calidad del agua y/o en el crecimiento del camarón. Después del oxígeno, la acumulación de nitrógeno orgánico disuelto (NOD) es el factor más limitante para la tasa de crecimiento en los estanques de cultivo. La liberación de los diferentes componentes del N y P residuales no solamente tiene un impacto directo en la calidad del agua, sino que es el insumo básico, junto con los compuestos de carbón, que fomenta el desarrollo de las comunidades autotróficas y heterotróficas que contribuyen a la eutrofización de los sistemas de cultivo, al desencadenamiento de los procesos anaeróbicos en los fondos, los eventos de hipoxia intermitente y el deterioro de la calidad del agua por la oscilación entre estados aeróbicos y anaeróbicos. Para minimizar el efecto que esto tiene sobre los sistemas de cultivo se hacen recambios de agua, cuyas descargas van a dar a ríos, arroyos y estuarios, acumulándose en el ecosistema adyacente (Hargreaves, 1998; Burford y Williams, 2001).

Amonio

El amonio es excretado como producto final del catabolismo proteico, y puede ser tóxico si se acumula. Esta toxicidad se manifiesta de diferentes formas, de las cuales las más comunes son la reducción del crecimiento corporal o la supresión de la inmunocompetencia. El amonio es más tóxico para los organismos acuáticos en general a un pH y temperatura elevados, lo cual cambia el equilibrio de ionización hacia la

forma deionizada y gaseosa, NH_3 , la cual es la más tóxica (Hargreaves, 1998; Schmitt y Santos, 1998).

Los niveles de amonio aumentan en respuesta a la concentración de proteína dietaria y la proteína total suministrada alrededor del intervalo del 24 al 40%. Por otra parte en condiciones de laboratorio las tasas de crecimiento disminuyen cuando el nivel de proteína suministrado también disminuye. Las deficiencias proteicas severas pueden llevar a una pérdida de peso, si las proteínas en el tejido muscular del camarón son usadas para mantener otras funciones vitales: por otro lado, un exceso de proteína será metabolizado por el camarón como una fuente de energía, y el nitrógeno será excretado como amonio principalmente (Van Wyk, 1997)

Requerimiento de proteína

Los porcentajes de proteína recomendados para diferentes especies de camarones varían entre el 20 y el 60% de acuerdo a la especie, en el caso de *L. vannamei* se han recomendado diversos valores que van, desde 15% (Aranyakananda y Lawrence, 1993), 30% (Cousin *et al.*, 1993), y 36% (Smith *et al.*, 1985); los lípidos recomendados van desde 6 a 7.5%; y como se mencionó anteriormente, los niveles de vitaminas complementarias varían, desde 40 mg/Kg hasta 1000 mg/Kg, de acuerdo con el nivel de inclusión de la vitamina C (Velasco *et al.*, 2000). El camarón no tiene un requerimiento dietario específico por harina de pescado, calamar o de camarón, sino un requerimiento por cerca de los 40 nutrientes esenciales dentro de una dieta balanceada. El reto para la formulación alimenticia es unir complementariamente ingredientes animales y vegetales para obtener un perfil nutritivo mas balanceado. Actualmente, hay un gran interés por

maximizar la eficiencia de la utilización de los nutrientes dietarios y minimizar la pérdida de nutrientes y provenientes del desperdicio de alimento, la desintegración del alimento suministrado, lixiviación de nutrientes y sobreformulación (Tacon, 2002).

Crecimiento

El crecimiento de un individuo es determinado por los balances de masa y energía. La adquisición y digestión de la energía contenida en el alimento es la base para la construcción de los bloques que permiten la construcción de tejido corporal. El alimento es uno de los principales limitantes del crecimiento, por lo que los acuicultores están siempre en búsqueda de nuevos y mejores alimentos que disminuyan los costos y mejoren el crecimiento. Uno de los principios básicos de la bioenergética es la relación costo beneficio. Aquellos individuos que pueden obtener los mayores beneficios netos después de haber pagado los costos metabólicos necesarios para mantenerse vivos podrán utilizar mayor cantidad de energía para la generación de biomasa y para mantener la homeostasis. La generación de biomasa tiene la ventaja fundamental en los organismos vivos de desarrollar el cuerpo para alcanzar la madurez sexual y poder garantizar la reproducción y la progenie (Rosas *et al.*, 2003). La teoría del forrajeo óptimo tiene la premisa que la selección natural actúa continuamente y permite que los organismos que tienen más altas tasas de ganancia neta de biomasa y energía, permanezcan. Esta teoría tiene grandes consecuencias en la acuicultura pues supone el diseño de ambientes y alimentos por parte de los acuicultores, que exploten al máximo las capacidades adaptativas de los animales, quienes en tales condiciones podrán ser capaces de producir la mayor biomasa en el menor tiempo posible. Los estudios

bioenergéticos aplicados a la acuicultura tienen el objetivo de revertir esta situación y ofrecer a los productores la información biológica básica que permita diseñar ambientes y condiciones que ofrezcan a los organismos las condiciones que les permitan desplegar las capacidades adaptativas que se traduzcan en rápido crecimiento y aprovechamiento de la energía ofrecida en el alimento (Rosas *et al.*, 2003).

Estudios bioenergéticos

De acuerdo con Needham (1931), la significancia filogenética de los productos de desechos nitrogenados predominantes de los animales, ya sea amonio, urea o ácido úrico, están relacionados con las necesidades de la economía del agua durante el desarrollo embrionario así como en la vida adulta. De acuerdo con este supuesto, los productos de desecho de un animal en forma de amonio aumentan cuando se tienen disponible suficientes cantidades de agua para la ionización, dilución y desecho rápido de esta sustancia altamente tóxica en su forma no-ionizada. Bajo estrés osmótico, cuando el agua no esta disponible, se incrementan los niveles de urea con respecto al amonio, como resultado de un mecanismo para conservar agua, al mismo tiempo que se detoxifica el amonio no ionizado. La falta de agua también requiere la retención temporal del producto de excreción, que en el caso de la urea, debido a su menor toxicidad puede ser almacenada por mayor tiempo a diferencia del amonio.

Tanto los crustáceos, marinos como los dulceacuícolas, son principalmente amoniotélicos, lo que implica que los desechos nitrogenados son eliminados principalmente como amonio (King *et al.*, 1985). La aclimatación de especies de los géneros *Astacus* y *Cambarus*, aclimatadas a 50% agua marina, origina un cambio

reversible hacia el ureotelismo, al excretar cantidades importantes de urea como compuesto alterno, pero contrario a lo que dijo Needham (1931), este cambio permite conservar agua y detoxificar el amonio mas eficientemente, si es acompañado por una disminución en la producción de amonio. Este cambio no puede ser relacionado a la filogenia de los crustáceos, sino que puede ser ocasionado por un aumento en la concentración de los iones inorgánicos en la sangre y los tejidos (Sharma y Neveu, 1971).

La baja retención del nitrógeno en la dieta puede deberse a la formulación inadecuada de alimentos, baja calidad de los ingredientes, sobrealimentación y pobre estabilidad de los alimentos en el agua. Se ha establecido que el amonio es el principal producto de excreción de los crustáceos decápodos con pequeñas emisiones de otros componentes (King *et al.*, 1985; Regnault, 1987). La mayoría de los peneidos son especies eurihalinos, es decir que son capaces de vivir en un amplio rango de concentraciones de sales sin afectar su metabolismo, y juveniles de *L. vannamei* (Boone) han sido exitosamente aclimatados a salinidades de entre 5 y 35 partes por mil, sin embargo estos cambios pueden afectar la fisiología del camarón y los parámetros de la calidad de agua, tales como las concentraciones de amonio y nitritos (Decamp *et al.*, 2003). Se ha reportado que la especie *L. vannamei* tiene la capacidad para modificar sus tasas de excreción de amonio y excretar otros a cambio, de conformidad con las condiciones ambientales y fisiológicas tales como salinidad, pH, concentración de amonio, concentración de nitritos, y actividad entre otros factores. (Calderón, 2004).

En su estudio, Burford y colaboradores., (2004), encontraron que solo entre el 17 y el 25% del nitrógeno que entró a su sistema experimental se convirtió en biomasa del camarón al final del período experimental, lo que concuerda con estudios en sistemas convencionales de estanques que han mostrado que solo entre el 15 y el 30% del nitrógeno de las dietas añadidos a los estanques es retenido por el camarón cultivado. La proporción de compuestos de nitrógeno restantes son liberados al sistema de cultivo como nutrientes particulados o disueltos. De acuerdo con los autores mencionados la proporción de nitrógeno mas grande en la columna de agua y en todos los tratamientos fue el nitrógeno particulado (50%) seguido del NOD (34-40%). Además, los alimentos usados en este experimentos fueron sometidos a una prueba de lixiviación en el cual se reportaron valores del 10% para el alimento de 300 g de proteína por kg de alimento, y de 16% para el de 400g de proteína por kg de alimento de proteína. Burford y Williams (2001) encontraron que mucho del nitrógeno lixiviado de los alimentos es nitrógeno orgánico disuelto (NOD), por lo que la fuente de este componente en la columna de agua fue principalmente el alimento.

Considerando que los estudios de retención de proteína en sistemas de cultivo estiman que solamente se retiene alrededor del 20% del nitrógeno proteico, que los estudios de digestibilidad estiman que alrededor del 80% de la proteína se digiere y que los estudios de excreción nitrogenada han sido orientados preferentemente al amonio en condiciones de ayuno e inanición, se requieren estudios integrales de los componentes de N y P residuales de la alimentación de *L. vannamei* en tallas superiores al gramo, en un gradiente de proteína y en condiciones postdigestivas, que permitan obtener mediciones

del nitrógeno y fósforo no consumido y contribuyan a explicar porque a pesar de la alta digestibilidad de los alimentos en laboratorio, en condiciones de cultivo se obtienen niveles bajos de retención de la proteína contenida en los alimentos.

3. JUSTIFICACION

La nutrición y la alimentación, son consideradas como las herramientas estratégicas para alcanzar un equilibrio entre el producto cultivado, su calidad y rendimiento financiero hacia el propio sistema de cultivo. La excreción de los crustáceos puede proveer los medios para estudiar el metabolismo nitrogenado de estos animales, ya que las mediciones de las tasas de éste metabolismo provee información complementaria a las tasas generales sin embargo el número de publicaciones que describen las tasas de todo el espectro del nitrógeno son muy escasas. Esto se debe principalmente, a la poca disponibilidad y accesibilidad de las técnicas para la medición de los diferentes compuestos nitrogenados en el agua y hemolinfa. Además las técnicas ya montadas para algunos de estos compuestos, requieren de grandes volúmenes de muestra que dificultan su muestreo, transporte y almacenamiento, además de que su procesamiento implica la utilización de grandes cantidades de reactivos y períodos prolongados de procesamiento para obtener las mediciones finales.

Se requiere un amplio conocimiento nutricional, reflejado en los aspectos fisiológicos y bioquímicos del metabolismo y de la excreción para comprender la mejor forma de hacer eficiente el uso de la proteína, del nitrógeno y del fósforo en el cultivo de camarones y así poder idear estrategias de manejo que permitan disminuir los efectos

del exceso de compuestos nitrogenados y de fósforo y evitar la eutrofización en los sistemas de cultivo para que estos sean sustentables.

El alimento es uno de los componentes más importantes dentro de un cultivo de camarones exitoso y además, es por lo general el insumo más caro en la acuicultura, por lo que hay la necesidad de desarrollar esta actividad bajo prácticas sustentables y un uso del alimento de mejor calidad para una mayor asimilación y menor desperdicio lo que se reflejará positivamente en el ambiente (Berger, 2000). Cuando un envío de alimento llega a una granja, se recomienda inspeccionarlo para evaluar su calidad por medio de diferentes criterios, entre los que se incluyen sus características físicas, hidroestabilidad y atractibilidad, criterios que pueden variar en cada granja. (Jory *et al*, 2001). Pero de manera general dentro de una granja, se sabe si un alimento cumplió con las expectativas nutrimentales y de composición hasta el final del ciclo de cultivo, cuando los animales alcanzan o no las tallas en el tiempo esperado.

A pesar de que la calidad y valor nutricional puede ser la misma al poseer el mismo porcentaje proteico, la variación del contenido nutricional entre marcas, y a veces entre lotes para un alimento que va a tener el mismo uso puede originar diferencias en crecimiento de los organismos lo suficientemente significativas como para causarle problemas económicos al acuicultor (Van wyk, 1999).

La alimentación en estadios iniciales es de vital importancia para aumentar las probabilidades de que los organismos alcancen las condiciones que aseguren un alto rendimiento de las etapas sucesivas, lo que requiere que los insumos más importantes tales como proteínas y grasas, sean altamente digestibles y contengan un perfil de

aminoácidos y ácidos grasos insaturados. Debido a esto, es que la mayor parte de los trabajos experimentales de nutrición clásica realizados, se llevan a cabo en animales con pesos no superiores al gramo, con el objetivo de que los animales alcancen un aumento de peso significativo, alrededor de diez veces su tamaño inicial. Más aún si esta metodología permitiera obtener resultados rápidamente en los cuales de manera simultánea se evalúe el nitrógeno y el fósforo en una forma integral.

La acuicultura, cuyo crecimiento ha sido importante y sostenido en los últimos años, puede jugar un papel importante como actividad productora de alimentos así como la optimización del uso del agua. Para su desarrollo se requiere que los cuerpos de agua utilizados mantengan niveles de calidad compatible con los grados de tolerancia de las especies cultivadas. La contribución de la acuicultura en el desarrollo económico y social dependerá de la planificación adecuada de ésta actividad en el contexto del manejo del ambiente.

La nutrición es considerada como la herramienta estratégica para alcanzar un equilibrio entre la calidad de lo que produce, lo que desecha un sistema de cultivo, su impacto en las finanzas y en el medio ambiente. Es en este aspecto donde los programas de investigación del aprovechamiento energético de los organismos se enfocan actualmente. Sin embargo la mayoría de los estudios en este rubro van dirigidos hacia el crecimiento y no hacia la eficiencia. La carencia de un método que permita la determinación del nitrógeno y fósforo total residual, así como la caracterización de sus componentes en la alimentación de *L. vannamei*, con una aplicación sobre sus posibles efectos sobre el ambiente justifica la presente investigación.

4. HIPÓTESIS

Si los métodos de evaluación de la excreción de camarones consideran todos los componentes del nitrógeno y fósforo y se realizan en condiciones postdigestivas y de postejercicio entonces es posible correlacionar el nitrógeno y el fósforo retenido con el nivel de proteína en la dieta.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar una metodología que permita determinar los factores nutricionales que afectan los niveles de componentes de nitrógeno y fósforo residuales, mediante el uso de un modelo de alimentación de juveniles de *L. vannamei*.

Tareas

- Montaje de la técnica de digestión simultánea de nitrógeno y fósforo total (Valderrama, 1981)
- Modificación de la técnica de amonio (Solórzano, 1969) adaptada a microplaca (Hernández, 2000)
- Miniaturización de la técnica de urea (Koroleff, 1969).
- Desarrollar algoritmos para la formulación de alimentos con diferentes niveles de proteína isocalóricas, isolipídicas y con un mismo patrón de aminoácidos, además de la elaboración de dietas experimentales.
- Desarrollar y utilizar una metodología para determinar la variación de los diferentes componentes del nitrógeno y fósforo residual en relación con el nivel

de proteína en alimentos suministrados a diferentes tallas de juveniles de *L. vannamei*

6. METODOLOGÍA

a) Modificación de las técnicas analíticas.

En este trabajo se incorporaron modificaciones a las técnicas para la cuantificación de urea de Koroleff (1977), a la técnica de Solórzano (1969) montada a microplaca por Hernández-López (2000) y la estandarización de la técnica para la determinación simultánea de nitrógeno y fósforo total de Valderrama (1980), para la cuantificación de NO₂, NO₃ y PO₄.

Técnica para la cuantificación de urea

La técnica de Koroleff (1977) fue miniaturizada para su utilización en microplaca, lo que permite el análisis de 96 posibles muestras en una sola lectura, además del ahorro de reactivos y disminuye el tamaño de muestra necesario. Como primer paso, se buscó el menor volumen de muestra necesario para obtener una absorbancia mayor a 0.6 y menor de 1. La temperatura de incubación se tomó del protocolo original de la técnica, dentro de las modificaciones se encuentran el tiempo de incubación que fue la mitad del original (2 horas) y la dilución del NaCl en agua, en lugar de hacerlo en la forma original, sólida, ésta se incluye en una solución líquida que se vierte sobre la muestra, lo que asegura que la cantidad necesaria esta contenida en el líquido, lo que además evita el tedioso pesaje de la sal antes de realizar el análisis, lo cual aumenta la variación entre las réplicas de las muestras.

Para determinar la eficiencia del proceso de miniaturización se evaluó la técnica con curvas patrón elaboradas de acuerdo con el protocolo original tanto con agua marina como deionizada. Además, se compararon muestras de estanques de cultivo corridas bajo el método montado y con pruebas (“kits”) comerciales.

Técnica para cuantificación de amonio.

La técnica de Solórzano (1969) montada a microplaca por Hernández-López (2000) fue modificada con el objetivo de aumentar la sensibilidad y disminuir los efectos que tienen el pH, la salinidad y las altas concentraciones de las muestras. Con este propósito se evaluaron posibles factores tanto de reactivos como del estado de la muestra, y determinar así, aquellos cambios que podrían ayudar a cumplir con el propósito.

El primer protocolo para lograrlo fue un aumento en la concentración de todos los reactivos (fenol, nitroprusiato, y mezcla oxidante) en un 200% para observar diferencias en las absorbancias. Al determinar el reactivo que tuvo más efecto sobre la absorbancia se procedió a hacer curvas de calibración con agua destilada, agua marina y agua marina diluida con agua destilada (1: 2), con el objetivo de ver si hay diferencias entre los valores de la regresión obtenidos. Una vez determinado este punto se procedió a evaluar diferentes diluciones del agua marina, observando su efecto sobre las lecturas de absorbancia y las curvas de calibración, para determinar en que proporción la dilución daba las lecturas con las mas altos valores de la regresión; las diluciones utilizadas fueron (agua marina: agua destilada, en microlitos) 150:100, 125:125 y 100:150. Posteriormente se elaboraron curvas de calibración resultantes del uso de distintas

concentraciones del reactivo que tuvo la mayor influencia sobre las lecturas realizadas anteriormente. Las concentraciones aparte de la utilizada en el método original fueron 150, 175 y 200%. Por último se comparó la relación obtenida por medio de la regresión, entre la absorbancia y la concentración de amonio a partir de diluciones obtenidas desde una solución con 7 mg/L de N-NH₃, con respecto a la obtenida en un gradiente de diluciones obtenido desde una solución 1.75 mg/L de N-NH₃, lo que permitió disminuir la absorbancia para las concentraciones mayores, disminuir la sobreestimación de las concentraciones extremas, aumentar la subestimación de las concentraciones medias y aumentar el coeficiente de regresión.

NT y PT de Valderrama (1981)

La técnica de Valderrama (1981) para la determinación simultánea de NT y PT fue estandarizada para el análisis rápido y en serie de muestras de agua llevadas al laboratorio. En este caso se disminuyeron los volúmenes de muestra utilizados en comparación con la técnica original. Se corrieron series de curvas de calibración con 7 puntos del estándar preparado que sirve para ambas determinaciones, con diferentes concentraciones, para obtener la mejor correlación.

b) Diseño y elaboración de las dietas balanceadas

Se elaboraron tres dietas con distintos valores proteicos, pero con la premisa de que fueran isocalóricas, isolipídicas y con una misma proporción entre las fuentes de proteína vegetal y animal. Se analizaron 16 dietas reportadas en trabajos de nutrición (Kureshy y Davis, 2000; Mente *et al.*, 2002; Gaxiola *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002;

Burford *et al.*, 2004; Béseres *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2005; Akiyama, 2006) Estas dietas fueron diseñadas en una hoja de cálculo para que la formulación de las dietas cumpliera con los requisitos nutricionales respectivos. Los ingredientes fueron comprados a distribuidores nacionales e internacionales. Una vez obtenidos todos los ingredientes necesarios, se procedió a la elaboración de las dietas balanceadas, no sin antes mandar a analizar tres de los principales componentes del alimento, como son las harinas, a las cuales se les realizó un estudio bromatológico, para obtener así sus características de composición (Tabla III).

Tabla III. Resultados del análisis bromatológico hecho a las harinas utilizadas en las dietas.

CODIGO	HUMEDAD %	* PROTEINA %	* EXTRACTO ETEREO %	* CENIZA %	* FIBRA CRUDA %	E.L.N	* ENERGIA Cal /gr.
H. Pescado	1.97 ±0.07	66.97 ±0.30	10.82 ±0.20	19.08 ±0.17	0.03 ±0.01	3.32	4436.73 ±3.89
Pasta Soya	10.17 ±0.05	49.27 ±0.21	0.38 ±0.10	7.59 ±0.03	2.75 ±0.15	39.01	4132.65 ±10.09
H. Trigo	8.32 ±0.03	13.93 ±0.27	1.06 ±0.18	1.71 ±0.05	1.91 ±0.15	81.05	5878.30 ±3.79

Con estos datos se procedió a la formulación de las tres dietas, por medio de el desarrollo de algoritmos que permitieran obtener un distinto nivel proteico, y al mismo tiempo mantener ciertas propiedades en común entre ellas (isocalorías e isolípidos) (Tabla IV y V)

c) Elaboración de dietas.

Tabla IV . Ingredientes y cantidades en gramos, utilizadas para cada una de las dietas

INGREDIENTE	Nivel de proteína	Nivel de proteína	Nivel de proteína
	25%	35%	45%
Harina de pescado	197.44	276.42	355.40
Harina de soya	197.44	276.42	355.40
Harina de trigo	130.09	188.93	247.77
Celulosa	9.06	4.53	0.00
Almidon de maiz	365.47	184.34	3.22
Aceite de pescado	18.15	9.07	0.00
Colesterol 60%	1.00	1.00	1.00
Vitamina C	2.500	2.500	2.500
Premix Vitaminico	0.000	0.000	0.000
Tierra de diatomaceas	44.14	22.07	0.00
Premix minerals	3.00	3.00	3.00
Alginato de Sodio	20.00	20.00	20.00
Hexametofosfato Sodico	1.50	1.50	1.50
Etoxiquinona	0.015	0.015	0.015
Lecitina de soya	39.17	39.17	39.17

Tabla V. Ingredientes y cantidades en miligramos del premix vitamínico

Premezcla Vitaminas			
Tiamina (Vitamina B1)	45.00	45.00	45.00
Riboflavina (Vitamina B2)	60.00	60.00	60.00
Piridoxina (Vitamina B6)	75.00	75.00	75.00
Acido Pantotenico	180.00	180.00	180.00
Niacina (Ac. Nicotínico) B3	200.00	200.00	200.00
Biotina	1.00	1.00	1.00
Inositol	500.00	500.00	500.00
Acido Folico	12.00	12.00	12.00
Cianocobalamina	0.30	0.30	0.30
Vitamina A*	7000.00	7000.00	7000.00
Vitamina D3*	2000.00	2000.00	2000.00
Vitamina E	250.00	250.00	250.00
Vitamina K	70.00	70.00	70.00
Astaxantina	60.00	60.00	60.00
Cloruro de Colina	500.00	500.00	500.00
*IU= Inter. Unit			
Total (sin VA+D3)	1953.30	1953.30	1953.30

La elaboración de las dietas se realizó en las instalaciones de la planta de alimentos. El proceso para cada una de las dietas varió tanto en la cantidad de cada uno de los ingredientes, así como en el orden en el que fueron añadidos los ingredientes mayores. Las vitaminas en polvo fueron mezcladas previamente en un crisol de porcelana con

una capacidad para 4 gramos máximo. Cada premezcla (“premix”) fue pesada por separado, de acuerdo a las cantidades recomendadas por Cruz-Suárez *et al.* (2000) (Tabla V), en una microbalanza CAHN c-33, recién calibrada, la cual se encuentra en el laboratorio de Ecofisiología. Este proceso se realizó por triplicado, en cada una de las dietas a elaborar. Posteriormente se pesaron los ingredientes mayores, en una balanza Sartorius BP 34000-P que se encuentra en la planta de alimentos. Se pesaron cada uno de los ingredientes correspondientes a cada una de las dietas en bolsas de plástico transparentes marcadas con el ingrediente, la cantidad y la dieta correspondiente (25, 35 o 45% proteína). Todos, excepto el aceite de pescado, la lecitina de soya, las vitaminas líquidas y el antioxidante que fueron pesadas durante la elaboración de las dietas. Los alimentos fueron elaborados en orden ascendente de acuerdo con el nivel proteico contenido.

Como ya se mencionó el orden de inclusión de los ingredientes varió en cada una de las dietas de acuerdo al peso de los ingredientes, del más pesado hasta el más ligero. También se consideró la cantidad de almidón incluido en el alimento, ya que por ser un componente abundante en dos de las tres dietas (25% y 35% de proteína), la inclusión de una harina mas aceitosa como es la de pescado al principio, no permite que el almidón, al ser de una consistencia muy ligera, se esparciera en el aire con el movimiento de las aspas de la revolvedora, ya que le da más consistencia. Se quiso garantizar que aquellos ingredientes que por ser componentes menores (10 g), tuvieran la mayor eficiencia de integración posible, fueron mezclados en un recipiente aparte con una pequeña cantidad de harina vegetal, el cual es un vehículo sin reacciones, en este

caso fue la soya. Los ingredientes se revolvieron uno a uno con una cuchara hasta homogenizarlos todos, para después ponerlos todos en la mezcladora durante 10 minutos. Por otro lado para hacer la emulsión con la lecitina de soya y el aceite de pescado, se agregaron las vitaminas líquidas y la etoxiquinona al aceite, en las cantidades indicadas. La lecitina, conservó una consistencia muy gelatinosa, por lo que después de ser pesada se puso a baño maría en el agua que se calentaba para formar la harina. Una vez que la lecitina estuvo más líquida, se sacó del agua y se le agregó el aceite, hecho lo cual se procuró mezclar rápidamente antes de que perdiera la consistencia menos espesa. Con la mezcladora en movimiento, la emulsión se agregó a la mezcla lentamente, con los cuidados necesarios para que no se pegara a las paredes, y se mezcló durante 5 minutos. Una vez hecho esto y ya en movimiento, se añadió agua en un volumen equivalente al 30 y el 50% del peso de la masa en agua de acuerdo con la consistencia de la masa, que en el caso de la dieta de 25%, debido a la gran cantidad de almidón, que al ser un ingrediente hidrocópico absorbe grandes cantidades de agua, se tuvo que añadir un 75% de agua. Todos los ingredientes se mezclaron hasta formar una pasta uniforme para evitar se resquebraje fácilmente o que tenga consistencia arenosa.

De la masa se hicieron bolitas del tamaño la mano y se pusieron arriba del molino de carne, en la charola. Una vez que toda la masa estaba en la charola, se encendió el molino y lenta pero constantemente se hizo pasar toda la masa por el dado, tras lo cual la masa se transformó en spaghetti largos que se colectaron en una charola limpia con papel estraza. Para una mejor consistencia de la harina se hizo el mismo procedimiento

una segunda vez, con la diferencia de que una vez que la masa pasó por el dado, con una espátula se cortaron los spaghetti con una longitud de un centímetro, para quedar de la forma de un pellet. Finalizado este proceso, en la charola de recepción se separaron todos los pellets que estuvieran pegados por el proceso de cortado. Conforme cada dieta llegó hasta este punto, se metió la charola llena a una estufa de secado a 35 C se dejó ahí por alrededor de 30 horas.

Prueba de humedad

A las dietas se les hizo una prueba en un analizador OHAUS, para comprobar que sus niveles de humedad estuviesen por debajo del 10%. La prueba consistió en tomar alrededor de 5 gramos del alimento, pulverizarlo en un mortero, y de ahí pesar 3 gramos de alimento en una charola de aluminio previamente tarada en el analizador, los cuales se dispersaron a lo largo y ancho de la charola. El analizador fue encendido 15 minutos antes para calentar la resistencia, y fue programado para alcanzar los 100 °C con un análisis de 5 minutos. Se cerró el analizador de manera que la muestra estuvo directamente debajo de la parte superior de la máquina. El porcentaje de humedad reportado para cada alimento se anotó después de 5 minutos, tiempo en el que sonó la alarma del analizador.

Prueba de estabilidad en agua.

Por último se realizó una prueba de estabilidad de alimentos en agua de acuerdo con el protocolo propuesto por Obaldo *et al.* (2002), el cual consistió en lo siguiente:

1. Se pesaron 2g de alimento y colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se adicionaron 100 mL de agua de mar con una temperatura y salinidad conocida.
3. Se agitó en agitador horizontal por espacio de 1 hora a 100 cpm.
4. Se filtró el contenido del matraz con la ayuda de un sistema de filtración mediante el uso de papel filtro No. 3 (previamente secado y peso conocido) y se recuperó el material adherido a paredes con agua destilada.
5. Se secó el material colectado junto con el papel filtro a 40C por 18 horas
6. Se colocaron las muestras en el desecador por 1 hora.
7. Se pesaron las muestras y el papel filtro.
8. Por último se realizaron los siguientes cálculos para determinar el porcentaje de estabilidad:

$$\text{Estabilidad (\%)} = \frac{\text{Peso seco del alimento final}}{\text{Peso seco del alimento inicial}} \times 100$$

Hecho esto, se tomo una muestra de 25 gramos de cada alimento y se llevó al laboratorio de Análisis Químico Proximal para su análisis bromatológico. Al resto del alimento se guardó en una bolsa negra con una etiqueta de identificación y se refrigeró a 5 C .

d) Bioensayos

El experimento consistió en la determinación de un índice catabólico por medio de una metodología diseñada para su posible aplicación en las granjas de cultivo. El bioensayo consistió en tres etapas, cada una de ellas de acuerdo con las tres tallas de camarón seleccionadas (1, 2 y 3 gramos). Los 30 animales de los distintos pesos fueron obtenidos de los estanques intermareales del CIBNOR, y para cada talla se hizo lo siguiente: después de llevar a cabo una selección para homogeneizar las tallas, se llevaron los animales al laboratorio de Ecofisiología, donde ya los esperaba un tanque de 200 L de agua con aireación y calentadores gracias a los cuales el agua se encontraba a temperatura similar a la registrada en los estanques el día anterior a esa misma hora y se colocaron los animales en el tanque correspondiente a su peso; los animales fueron alimentados con alimento de 35% de proteína y con recambios diarios de agua del 50%. El ciclo de pruebas inició con los animales de menor talla (1 g). Los animales atravesaron un período de 24 horas de ayuno.



.Figura 1 Sistema contracorriente utilizado para ejercitar a los camarones del bioensayo.



Figura 2 Sistema experimental utilizado en los tres bioensayos.

Después de esto, por medio de un sistema de contracorriente (Fig.1), se hizo que los animales hicieran ejercicio por un período de alrededor de 3 horas se separaron 18 animales en 18 acuarios de 19 L de capacidad, con 10 L de agua marina artificial, los cuales corresponden a los 3 tratamientos y sus seis réplicas (Fig. 2). El agua que contenían estos garrafones fue preparada con agua destilada y sal de la marca Instant Ocean, los cuales fueron mezclados en un tinaco de 450 L un día antes de su uso con la ayuda de aireación, para procurar movimiento interno y así una mayor disolución de las sales en el agua. Estos garrafones se encontraban en un sistema de baño maría en una tina con una capacidad para 1500 litros, en la cual había una plataforma que soportaba los garrafones y bajo la cual se encontraban 3 calentadores marca Ebo-Jager de 250 KW para mantener el agua a una temperatura promedio de 30C, además había también piedras de aireación, para promover la homogeneidad de la temperatura en todo el tanque.

Se alimentó a los animales con su respectiva dieta, con una cantidad de alimento balanceado correspondiente al 10% de su peso, se verificó que los animales comieron, y se cerró la parte superior del garrafón con una tapa plástica que permitió el acceso a una manguera y piedras de aireación. La incubación duró un total de 24 horas, transcurridas las cuales se sacó el camarón contenido en cada uno de los garrafones y se colocaron en frascos previamente etiquetados con su tratamiento y la talla que les correspondía; en caso de que hubiera animales mudados, la muda se conservó junto con el animal y en caso de que hubiera alimento no consumido se colectó en tubos Eppendorf. Después de esto manualmente se homogeneizó el contenido del agua, y se procuró que las heces se

homogeneizaran con el agua, hecho esto, con el agua en pleno movimiento envolvente, se realizó la toma de 250 mL de muestra de cada uno de los recipientes. Este procedimiento se hizo con cada una de las réplicas correspondientes a los tres niveles de proteína, en cada uno de los bioensayos correspondientes a las 3 tallas. Los parámetros ambientales (temperatura, pH y oxígeno) fueron tomados para cada uno de los garrafones antes de iniciar la incubación y una vez que ésta terminó.

Las muestras fueron llevadas a un ultracongelador con una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y permanecieron ahí hasta que se completaron las muestras de las 3 etapas. Posteriormente todas las muestras fueron llevadas al laboratorio de análisis químico de agua para realizar los análisis de: amonio, nitritos, nitratos, urea, nitrógeno total (NT), nitrógeno orgánico soluble (NOS), nitrógeno orgánico particulado (NOP), Fósforo total (PT), Fósforo orgánico soluble (POS) y Fósforo orgánico particulado (POP). Antes de iniciar el análisis, las muestras fueron descongeladas y de cada una, se filtró 50 mL por medio de un sistema de filtración al vacío con papel filtro de 0.45 micras. Conforme se filtró cada muestra, se guardó y almacenó un tubo con 50 mL de muestra etiquetado con su respectiva clave de identificación del experimento. Diez mililitros de la muestra filtrada, fue sometida a un proceso de digestión en tubos de cristal, en el cual además se agregó 1.32 mL del reactivo oxidante y se digirieron en una autoclave por 30 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, después de los cuales el pH de cada una de las muestras fue neutralizado con hidróxido de sodio 1 M. De estas muestras se analizaron amonio, nitritos, nitratos, urea y nitrógeno y fosfato soluble.

El resto de la muestra no filtrada, fue sometida a un proceso de digestión para poder analizar nitrógeno y fósforo total. El proceso de digestión fue el siguiente: se tomaron 50 mililitros en frascos previamente lavados y etiquetados, y a cada uno se le agregaron 6.6 mL de la solución oxidante. Después de esto en grupos de 12, las muestras fueron expuestas a calor y presión en una autoclave por espacio de 30 minutos a 121 °C, y al salir de la autoclave, el pH de las muestras se neutralizó con el uso de hidróxido de sodio 1 M. Cuando todas las muestras cumplieron este proceso, fueron divididos en dos partes de 5 mL cada una, contenidos en tubos limpios con una capacidad de 10 mL previamente etiquetados con su clave y el análisis a realizar. A aquellos tubos marcados para analizar nitrógeno se les agregaron 200 µL de cloruro de amonio; después las muestras fueron analizadas en el autoanalizador. Con éstas mediciones se determinó la concentración de nitrógeno y fósforo total así como sus componentes orgánicos, inorgánicos, particulados y solubles

Análisis Estadísticos.

Se graficaron los datos con su valor promedio y la desviación o error estándar. En todos los casos que fue necesario se aplicó la prueba de igualdad de varianzas y la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos y se realizaron pruebas de regresión a las curvas de calibración. El análisis de variancia bifactorial se usó para el bioensayo de excreción de camarones, sobre el efecto de las tallas y proteínas en las concentraciones de los componentes nitrogenados y fosfóricos en agua. Las gráficas se elaboraron mediante el uso del programa computacional Sigma Plot (2006) y los análisis estadísticos con el programa Statistica (VII).

7. RESULTADOS

a) *Modificación de las técnicas analíticas.*

La sensibilidad de cada una de las técnicas se determinó con base al intervalo logístico de las curvas, donde la medida del ajuste de la recta de regresión a los datos observados era grande ($r^2 = 0.97$ y 0.99) (Tabla VI)

Tabla VI. Condiciones de ensayo e intervalo inicial obtenidos para cada técnica: proximidad de ajuste de la recta de regresión a las observaciones de la muestra r^2 .

Técnica	Volumen Muestra (mL)	Sensibilidad (mg/L)	Temperatura Incubación (°C)	Tiempo incubación (min)	R^2
Amonio	0.15	0.1-1.75	ambiente	60	0.99
Urea	0.23	0.5-7	75	120	0.99
N Total	25	0.5-7	121	30	0.99
P Total	25	1-14	121	30	0.99

Método en Microplaca Koroleff (1977)

Los reactivos para esta técnica fueron preparados de la siguiente forma:

Reactivo A. Disolver 7 g de fosfato de sodio dihidrogenado monohidratado $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de agua destilada, y lentamente se le agregan 500 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Reactivo B. Disolver 8 g de cloruro de manganeso tetrahidratado $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.169 g de nitrato de potasio KNO_3 , en 20 mL.

Reactivo C. Disolver 0.6 de diacetil monoxima, $\text{CH}_3\text{-COC(NOH)-CH}_3$ y 0.007 de semicarbacida hidrocloreuro $\text{NH}_2\text{-CONH-NH}_2\text{-HCl}$ en 10 mL de etanol al 50%. Inmediatamente después de mezclar estos ingredientes, se añaden 10 mL del reactivo B en el reactivo C.

Solución Estándar Madre. Se disuelven 60.1 mg de urea $\text{CO(NH}_2)_2$ en 100 mL agua destilada, con una gota de cloroformo como preservador. Esta solución es estable por meses y contiene $10 \mu\text{mol/mL}$ de urea.

Solución estándar. Se tomó 1 mL de la solución madre y se aforó en un frasco a 100 mL con agua destilada, para obtener una concentración de $10 \mu\text{mol/L}$.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se colocaron en un tubo Eppendorf de 2 mL $330 \mu\text{L}$ de la muestra
2. Se agregaron $100 \mu\text{L}$ de la solución salina.
3. Se mezclaron $150 \mu\text{L}$ del reactivo A
4. Se enfrió durante 15 minutos
5. Se mezcló $50 \mu\text{L}$ del reactivo B+C y se puso a baño maría a 75°C durante 1 hora.
6. Se enfrió rápidamente en baño de hielo (máximo 30 minutos).
7. Se agitó suavemente para recuperar vapores.
8. Se tomaron $200 \mu\text{litros}$ de la muestra y se colocan en la microplaca por duplicado.
9. Se leyeron las muestras a 520 nm en un lector de microplaca

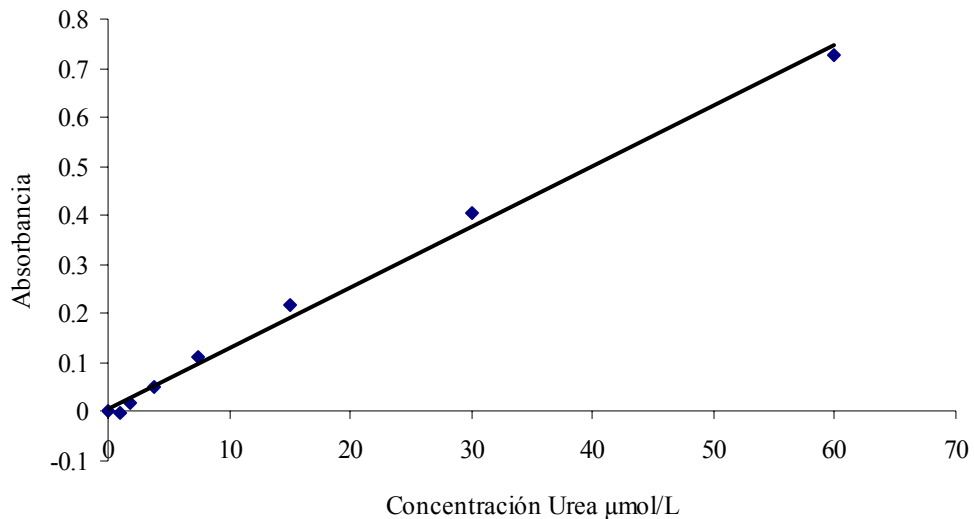


Figura 3 Curva patrón de la técnica de Urea de Koroleff.

La curva obtenida con la técnica miniaturizada (Fig.3), tiene una buena sensibilidad y un ajuste a la recta de regresión a los datos observados de gran valor ($r^2=0.99$) (Tabla VI).

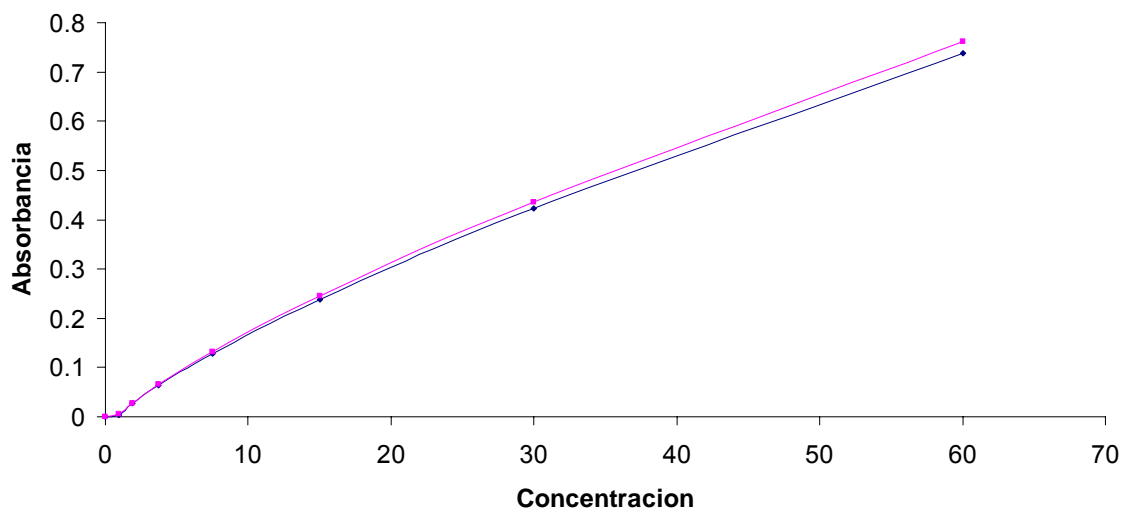


Figura 4. Curvas patrón de la técnica de Koroleff (1981) hechas con: ■ agua marina y ◆ agua deionizada.

En la figura cuatro se muestran dos curvas patrón con la misma concentración, una hecha con agua marina y otra con agua deionizada. Aquí se puede observar que si bien no existe diferencia significativa entre las curvas ($P= 0.035$), hay una mayor sensibilidad en la curva hecha de agua deionizada.

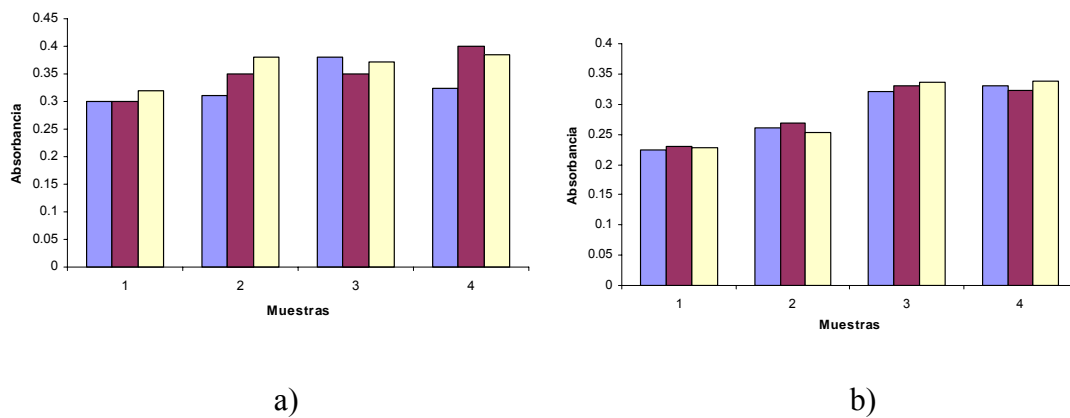


Figura 5. Muestras de agua analizadas con a) la técnica de Koroleff estandarizada para microplaca y b) con el kit comercial.

Método en microplaca Solórzano (1969) modificado.

La solución oxidante fue el reactivo que tuvo mayor efecto sobre las absorbancias registradas, y da la mejor relación en la regresión cuando es utilizada con una concentración de 150% del la solución alcalina en proporción 1:4. Por otro lado, la mejor relación con la curva y sus absorbancias fue aquella hecha con agua destilada (0.995), y se observó una disminución en el coeficiente de correlación de la regresión cuando las curvas fueron estimadas a partir de soluciones hechas de amonio con agua marina (0.981), sin embargo la curva obtenida con agua marina con una dilución (150:100) aumentó este valor (0.992), por lo que esta dilución fue la que obtuvo el coeficiente más alto en la regresión en comparación con las otras diluciones. Por último, cuando se disminuyó la curva en dos puntos de su concentración original se obtuvo el mismo valor de la regresión (0.997) pero con una menor varianza entre las réplicas.

Los reactivos para esta técnica fueron los siguientes:

Reactivo A. Se disolvieron 10 g de fenol grado reactivo en 100 mL de etanol al 95%. Esta solución se almacenó en botella ambar y se considera estable por meses.

Reactivo B. Se disolvieron 0.5g de nitroprusiato de sodio en 100 mL de agua deionizada.

Reactivo C al 150%. Se mezclaron 10 mL de la solución alcalina (15g de citrato de sodio y 0.75g de hidróxido de sodio en 50 mL de agua deionizada) con 2.5 mL de hipoclorito de sodio comercial. Este reactivo se mezcló en todos los casos justo antes de empezar a utilizarse.

Solución Madre estándar. Se diluyeron 0.382 g de cloruro de amonio NH_4Cl en 99.61 mL de agua deionizada, para dar una concentración de 1 mg/mL.

Solución estándar. Se diluyeron 700 μL de solución madre en 99.3 mL de agua destilada.

1. Se colocaron 20 μL de la solución A en los pozos de la microplaca correspondiente.
2. Se agregaron 100 μL de agua destilada.
3. Se agregaron 150 μL de la muestra.
4. Se agregaron 20 μL de la solución B.
5. Se agregaron 30 de la solución C.
6. Se incubó la microplaca en completa oscuridad durante una hora
7. Se leyó a 655 nm.

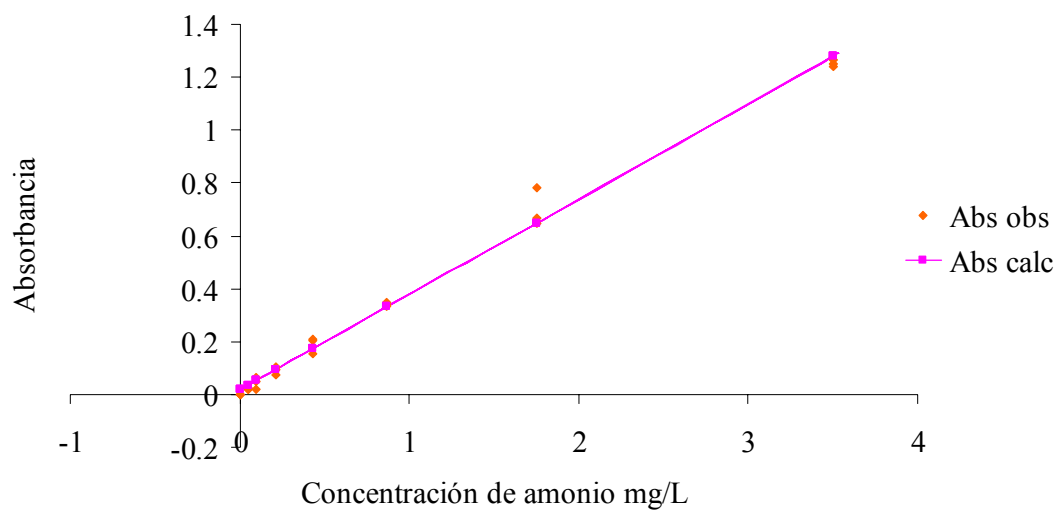


Figura 6. Absorbancia de amonio con la técnica de Solórzano (1969) modificada en este trabajo.

En la figura seis se observa la curva de absorbancia con respecto a la concentración de amonio obtenida con la modificación del método, para agua de mar y agua deionizada en la que se muestra una mejor linealidad con el agua de mar.

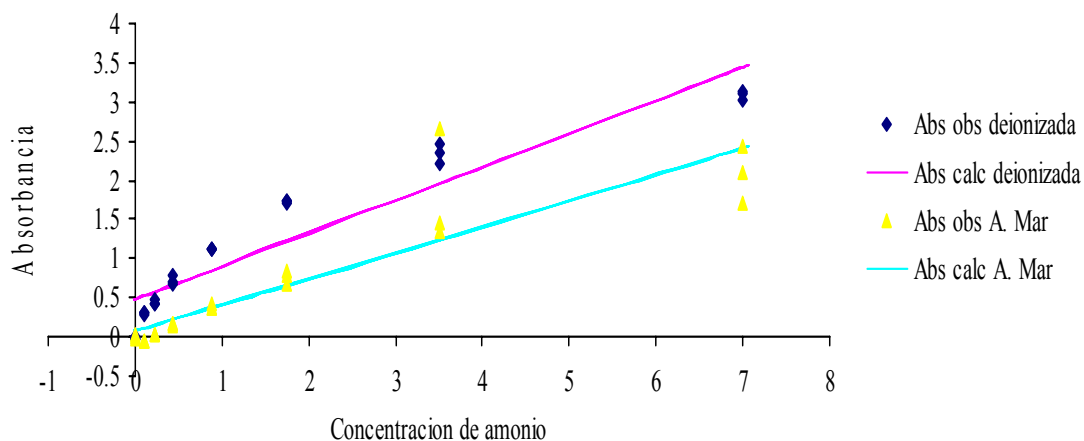


Figura 7. Absorbancia de amonio en agua marina y deionizada.

En las pruebas hechas hubo mayor sensibilidad en las curvas hechas con agua deionizada, ya que es ahí donde se pudo detectar con mayor exactitud la concentración más alta de la curva, y si bien no hubo diferencia entre los valores de la regresión entre las curvas ($R^2=1$), la variación entre las réplicas de cada una de las lecturas con el agua deionizada fue menor que con las de agua marina (Fig.7). La gráfica muestra que la salinidad no afecta la efectividad del método, aunque si la sensibilidad a la concentración del metabolito.

Estandarización del método de digestión simultáneo de NT y PT Valderrama (1981).

Los reactivos para llevar a cabo esta técnica fueron los siguientes:

Solución de hidróxido de sodio 1 M. Se disolvieron 20 gr de NaOH en 500 mL de agua deionizada.

Solución oxidante. 50 g de persulfato de potasio y 30 g de ácido bórico, se disolvieron en 350 mL de la solución de la solución de hidróxido de sodio 1M. Después se aforó a un litro con agua deionizada y se almaceno en botella ambar.

1. En frascos de 50 mL previamente marcados se colocaron 50 mL de muestra sin filtrar.
2. Se añadieron 4 mL de la solución oxidante.
3. Los frascos fueron cerrados con papel aluminio y plástico cleanpack.
4. En la autoclave las muestras se digirieron durante 30 minutos a una temperatura de 121C.
5. Una vez terminado el proceso de digestión se sacaron las muestras y se dejaron enfriar por espacio de 20 minutos
6. Se ajustó el pH de las muestras a 8, con la ayuda de hidróxido de sodio 1 Molar.
7. Cada una de las muestras fueron separadas en dos partes de 5 mL: una para analizar NT (nitratos) y otra para PT (fosfatos).
8. Al frasco correspondiente a NT se le añade 200 μ L de buffer de trabajo $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_3$ al 2.5%.
9. Ambas muestras son analizadas en el analizador de flujo continuo.

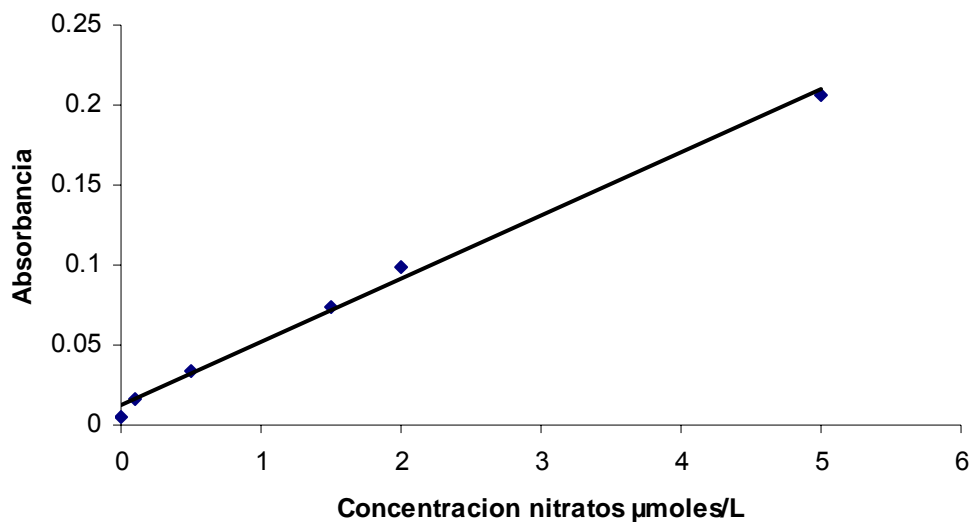


Figura 8. Curva patrón de nitratos de la técnica de determinación simultánea de Nitrógeno y Fósforo Total de Valderrama (19) estandarizada.

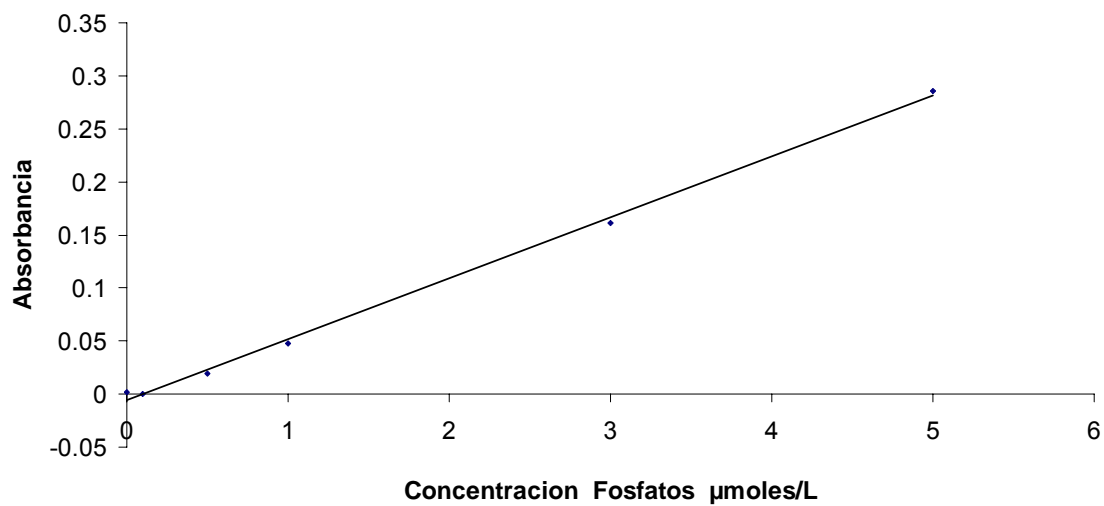


Figura 9. Curva patrón de fosfatos de la técnica de determinación simultánea de Nitrógeno y Fósforo total de Valderrama (19) estandarizada.

Las curvas tanto de nitratos y fosfatos (Fig.9 y 10), para calcular la concentración de nitrógeno y Fósforo total respectivamente, dieron muy valores de correlación elevados (Tabla VI).

b) Diseño y elaboración de alimentos.

La humedad registrada en los alimentos balanceados una vez que fueron terminados (Tabla), presentó valores similares entre sí, lo que sugiere que el secado continuo realizado durante alrededor de 12 horas fue efectivo, si se considera que la dieta de 1 nivel de 25% de proteína contuvo casi un 50% de agua al momento de su elaboración.. Así mismo los porcentajes de lixiviación calculados en la prueba de estabilidad a cada una de las dietas, son semejantes entre sí, con un mayor nivel en la dieta con 25% proteína. Las metodologías utilizadas para obtener estos valores, las cuales fueron descritas anteriormente, indican que los porcentajes mínimos deseables son 15% de lixiviación y 10% de humedad, por lo que los porcentajes obtenidos en estas pruebas son menores que los requeridos, lo que permiten una mayor estabilidad en el agua a partir de la inmersión.

Tabla VII. Datos de las pruebas de lixiviación y humedad hechas a las dietas experimentales.

DIETA	% LIXIVIACIÓN	%HUMEDAD
25% PROTEINA	12.4	7.8
35% PROTEINA	11.96	6.9
45% PROTEINA	12.2	8

El análisis proximal de las dietas permite comprobar grosso modo la composición esperada (Tabla VIII). Como ya se mencionó, aparte de lograr que las dietas contuvieran su respectivo porcentaje proteico, los principales objetivos de las dietas elaboradas eran que éstas fueran isocalóricas e isolipídicas, y como se puede observar en la Tabla, no hay mucha variación en estos aspectos entre las tres dietas.

Tabla VIII. Análisis bromatológico de las dietas experimentales.

Código Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Fibra Cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (cal/g)
Dieta 25%	4.22	26.38	7.19	0.81	9.95	55.68	4382.35
	0.01	0.27	0.11	0.03	0.01		10.23
Dieta 35%	7.29	35.75	7.81	0.71	9.62	46.11	4255.99
	0.33	0.15	0.08	0.13	0.04		12.30
Dieta 45%	6.97	44.36	8.08	0.55	9.18	37.83	4472.19
	0.15	0.13	0.15	0.14	0.01		16.88

c) Bioensayos

Los parámetros ambientales de cada uno de los garrafones en las tres etapas fueron registrados y las condiciones se mantuvieron estables a lo largo del bioensayo (Tabla IX).

Tabla IX. Parámetros ambientales registrados durante el bioensayo.

1 gramo	Hora Inicial			Hora Final		
	Prom	Min	max	prom	min	max
Parámetros						
Oxígeno	5.92	5.89	5.95	5.51	5.08	5.67
Temperatura	30.13	30.1	30.2	30.1	30.1	30.2
pH	8.2	8.2	8.2	8.11	8	8.5
2 gramos						
Oxígeno	5.95	5.91	5.97	5.4	5.16	5.69
Temperatura	30.13	30.1	30.2	31.4	31.3	30.5
pH	8.2	8.2	8.2	8.02	7.9	8.2
3 gramos						
Oxígeno	5.95	5.91	5.97	5.4	5.16	5.69
Temperatura	30.07	30	30.2	30.49	30.4	30.6
pH	8.3	8.3	8.3	8.4	8.25	8.6

Niveles de los diferentes componentes de N y P residuales obtenidos en los bioensayos

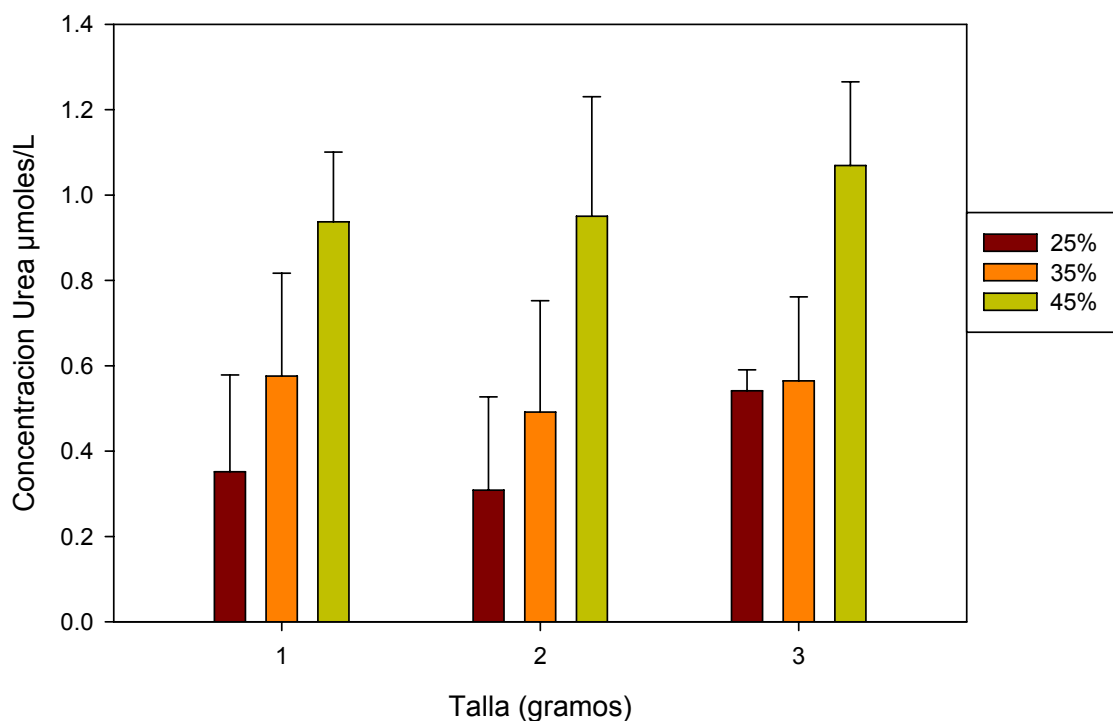


Fig.10 Niveles de urea registrados en agua, con camarones alimentados con distintos alimentos con distintos niveles proteicos

Los niveles de urea detectados en agua en el bioensayo mostraron diferencias significativas ($p=0.000012$), en relación a la proteína contenida en los alimento en cada tratamiento. En cada una las tallas los niveles de urea aumentaron conforme la inclusión de proteína también aumentó.

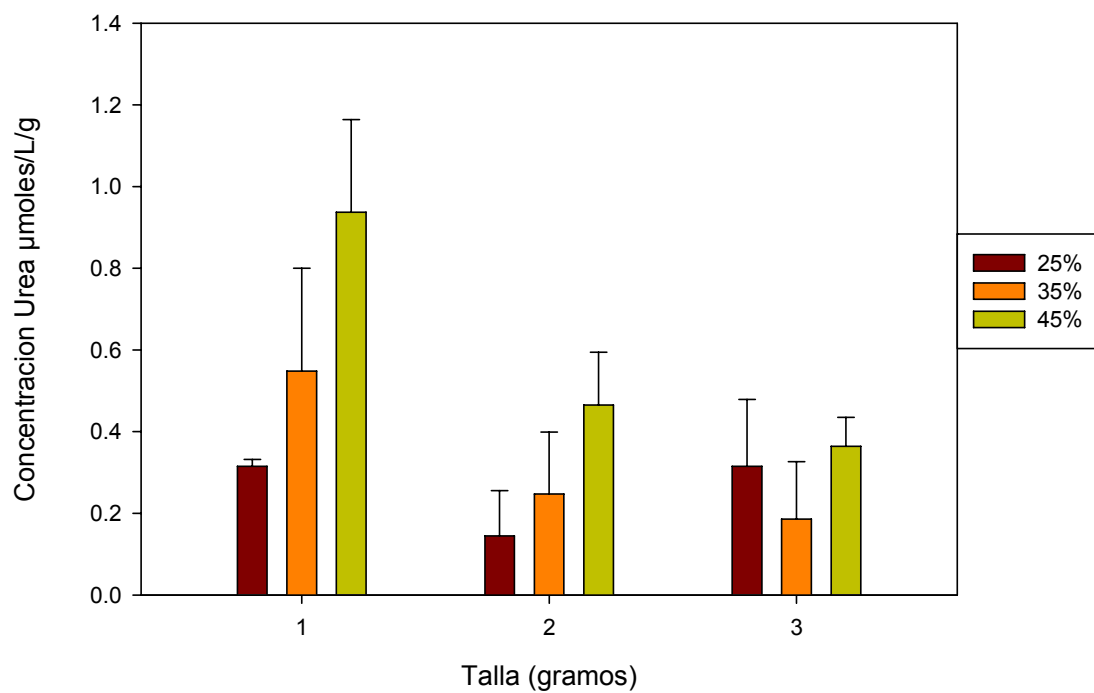


Figura 11. Niveles de urea con los tres niveles de proteína divididos por talla.

Los niveles de urea por gramo de camarón, disminuyeron con el aumento de la talla, disminuye las concentraciones (Fig. 11), con diferencias significativas en relación con el nivel de proteína proteína ya la talla de los organismos ($p= 0.000073$).

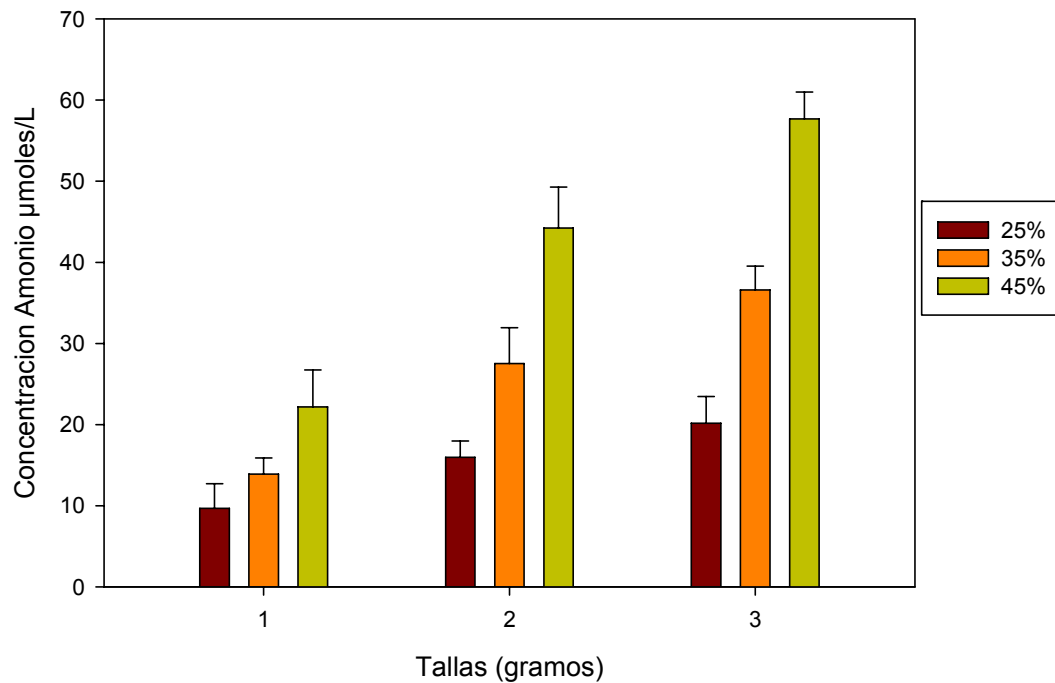


Figura 12. Niveles de amonio registrados en agua, con camarones alimentados con distintos alimentos niveles proteicos.

Se observaron diferencias significativas en las concentraciones de amonio ya que éstas se elevaron conforme se aumentó el nivel de proteína incluida en las dietas, así como con el aumento de la talla de los animales experimentales ($p= 0.0000$)

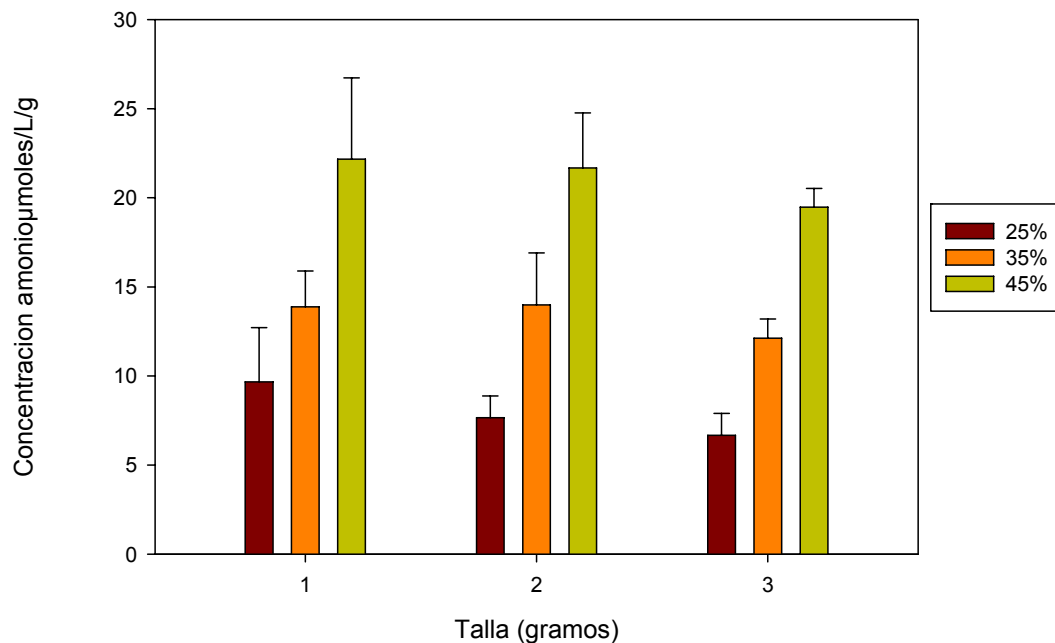


Figura 13. Niveles de amonio por gramo de organismo registrados en agua, con camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.

Las concentraciones de amonio residual por gramo del organismo presentan diferencias significativas entre los tratamientos de niveles proteicos ($p= 0.0001$), mientras que en cada nivel de proteína se observan concentraciones similares con una ligera tendencia no significativa a disminuir con respecto a los tratamientos de talla (Fig. 13).

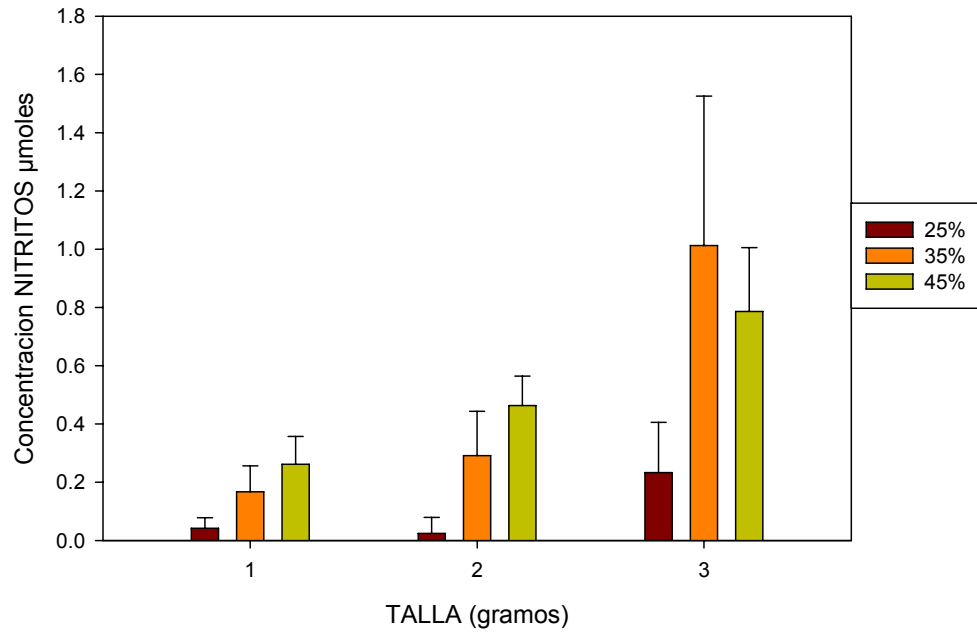


Figura 14. Niveles de nitritos registrados en agua, con camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.

La concentración de nitritos obtenidos a pesar de no haber diferencia significativa, muestran un aumento conforme incrementa el nivel proteico os y la talla de los animales (Fig. 14).

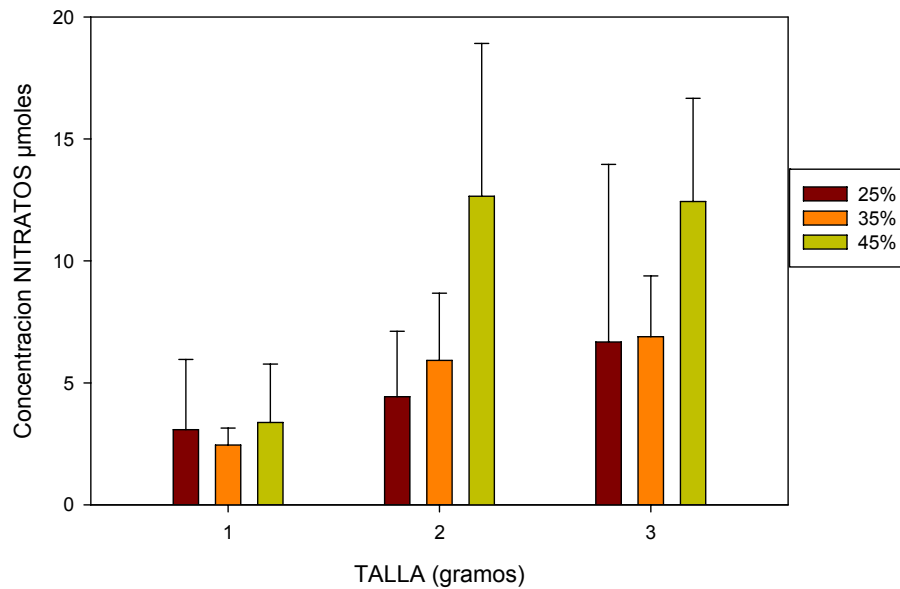


Figura 15. Niveles de nitratos registrados en agua con camarones alimentados con distintos niveles proteicos

Los niveles de nitratos (Fig. 15) aumentaron conforme aumenta la talla de los animales y el nivel proteico tanto, siendo un cambio estadísticamente significativo ($p=0.0003$)

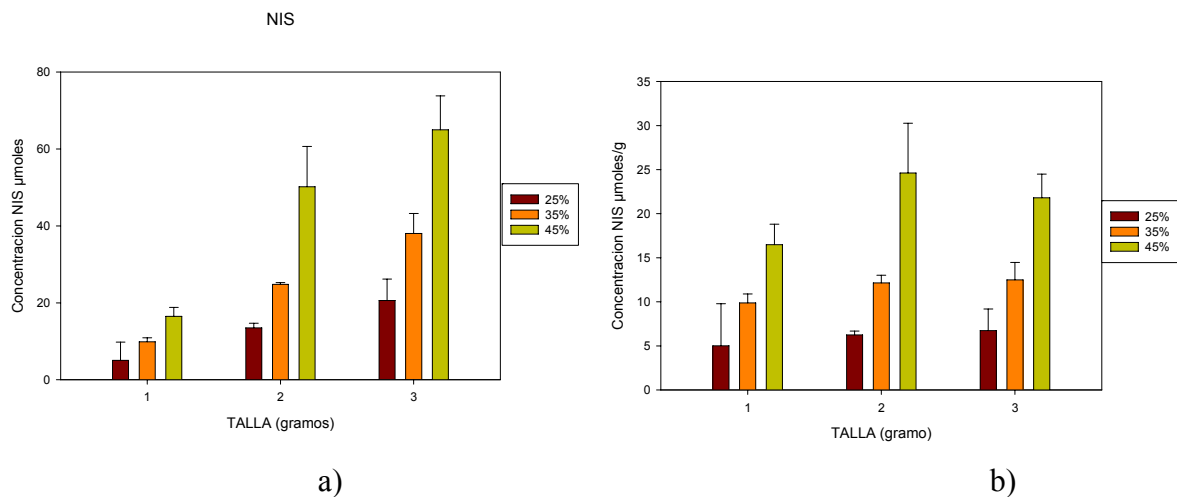


Figura16. Niveles de NIS registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos a) concentración total y b) por gramo de camarón.

Las concentraciones de NIS (Fig. 16) registrados en el bioensayo tuvieron un aumento conforme aumenta la talla y el nivel proteico tanto las concentraciones totales así como las concentraciones por gramo ($p=0.0017$).

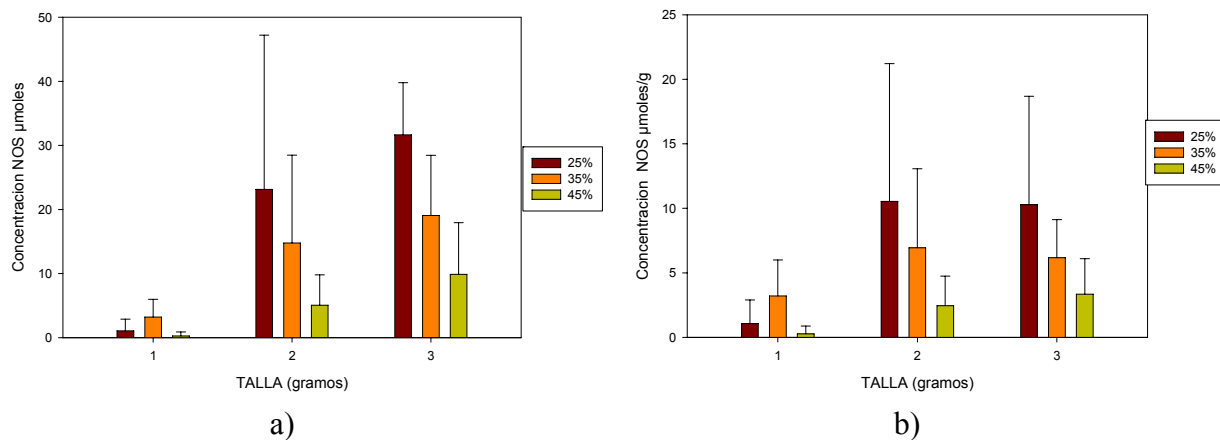


Figura 17 Niveles de NOS registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos a) concentración total y b) por gramo de camarón.

Los niveles de NOS registrados durante el bioensayo (Fig. 17a) muestran una tendencia a disminuir con el aumento de la proteína incluida en la dieta en los tratamientos de 2 y 3 gramos, y los niveles en cada tratamiento proteico aumenta a mayor talla ($p=0.042$). Las diferencias entre tallas disminuyen cuando se obtienen los niveles obtenidos por gramo (Fig.17 b), pero se conservan las diferencias por proteína en cada talla.

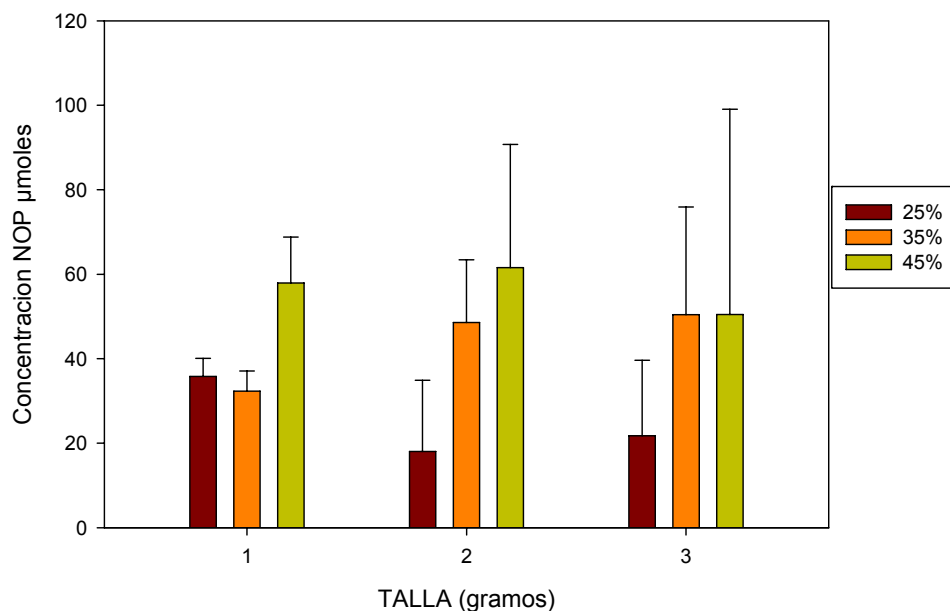


Figura 18. Niveles de NOP registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.

Las concentraciones de NOP (Fig. 1) registrados durante el bioensayo tuvieron una tendencia estadísticamente significativa a aumentar con los tratamientos de nivel proteico ($p=0.012$), no así cuando se comparan por tallas.

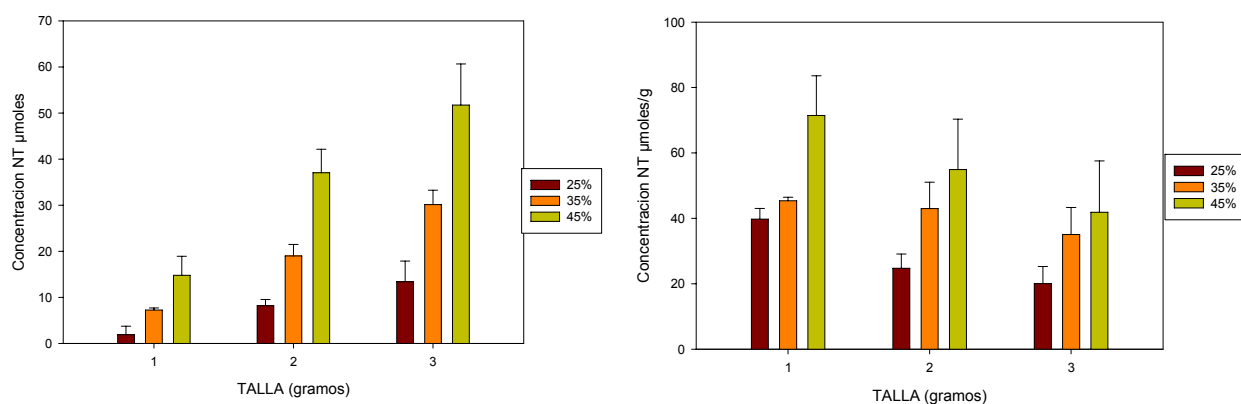


Figura 19. Niveles de NT registrados en agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos a) concentración total y b) por gramo de camarón.

Los niveles de NT registrados durante el bioensayo (Fig. 19) se elevaron significativamente conforme se incrementó la talla y el nivel proteico incluido en el alimento ($p=0.0001$), con valores máximos de mas de 50 μ moles. De manera similar, la concentración de NT por gramo de organismo, presenta una tendencia significativa de aumento conforme se incrementa el nivel de proteína ($p=0.0004$), no así con respecto a los tratamientos de talla, en los cuales disminuye significativamente conforme aumenta la talla ($p=0.0004$).

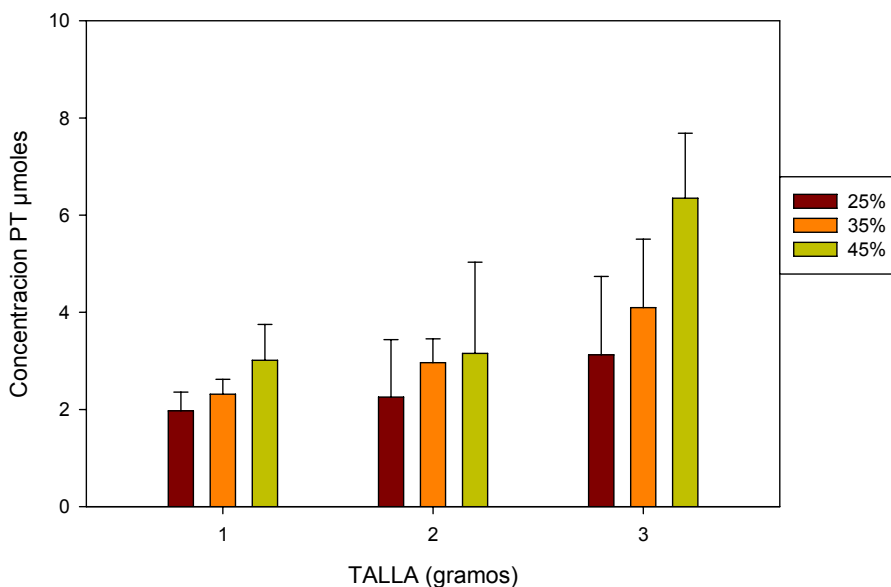


Figura 20. Niveles de PT registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.

Los niveles de PT (Fig. 20) registrados durante el bioensayo muestran una tendencia al aumento conforme aumenta la talla aunque no fue estadísticamente significativa, sin

embargo en cada talla hay una tendencia al aumento conforme incrementa la proteína incluida en los alimentos ($p=0.02$).

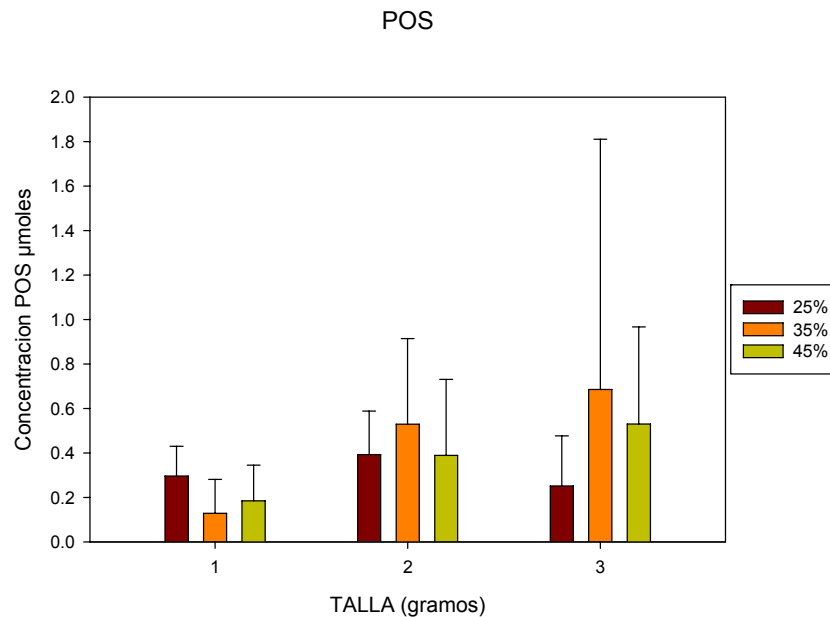


Figura 21. Niveles de POS registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.

Las concentraciones de NOS obtenidas durante el bioensayo (Fig. 21) no muestran una tendencia clara en ninguno de los tratamientos, sin embargo los niveles más altos se encuentran a mayor talla..

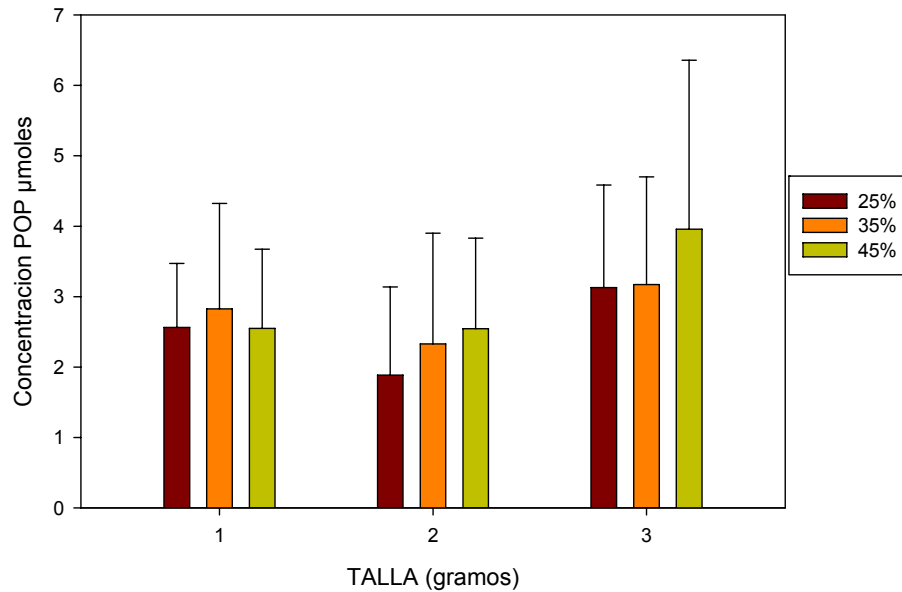


Figura 22. Niveles de POP registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos.

En los niveles de POP registrados durante el bioensayo (Fig. 22) no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, sin embargo se observa una tendencia al aumento de los niveles con el nivel proteico y la talla en los tratamientos de 2 y 3 gramos.

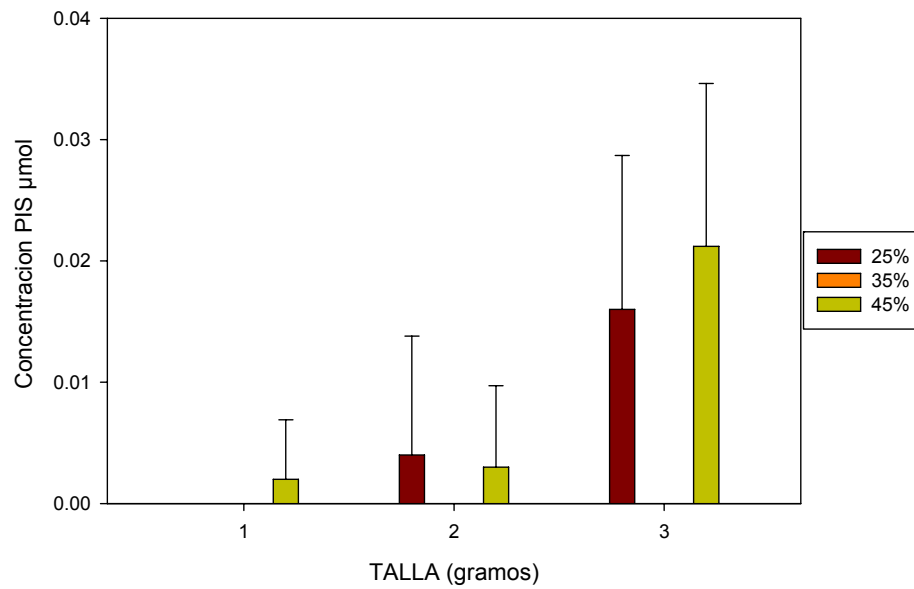


Figura 23. Niveles de PIS registrados en el agua de camarones alimentados con alimentos con distintos niveles proteicos

Los niveles de PIS obtenidos (Fig. 23) no sobrepasan la concentración de $0.1\mu\text{moles}$, y los niveles más altos fueron alcanzados en las tallas más altas, pero no hay una tendencia clara en los tratamientos.

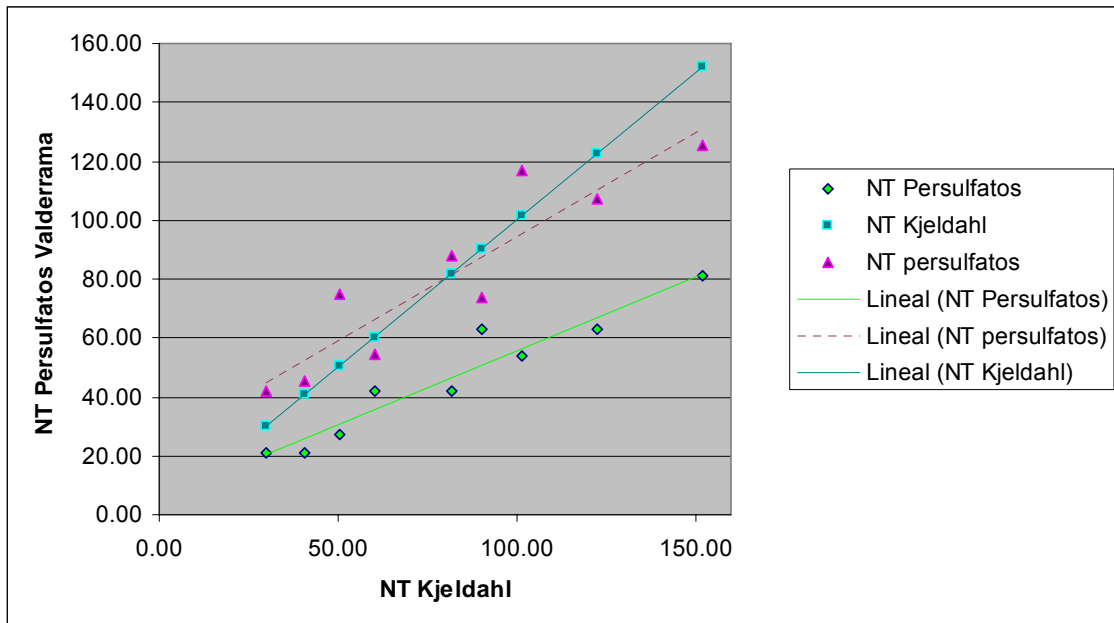


Figura 24. Relaciones entre los valores de nitrógeno total evaluados en los recipientes de bioensayo (triángulos rosas) y los evaluados en los alimentos (rombos verdes) por la técnica de persulfatos (Valderrama) con respecto a los niveles de nitrógeno proteico evaluados por el método de Kjeldahl.

Cuando se relacionan las mediciones de nitrógeno total realizadas con la técnica de Valderrama (Fig. 24) en los recipientes de bioensayo (triángulos rosas) con las evaluaciones del nitrógeno proteico total suministrados y evaluados por el método de Kjeldahl, se observa una tendencia a subevaluar los niveles de nitrógeno total con la técnica de Valderrama en aquellos tratamientos de mayor talla y mayor nivel proteico de inclusión. Además de cuando se comparan las mediciones en los alimentos con ambos métodos del nitrógeno incluido en los alimentos, el de Valderrama se mantiene por debajo de las mediciones de Kheldahl.

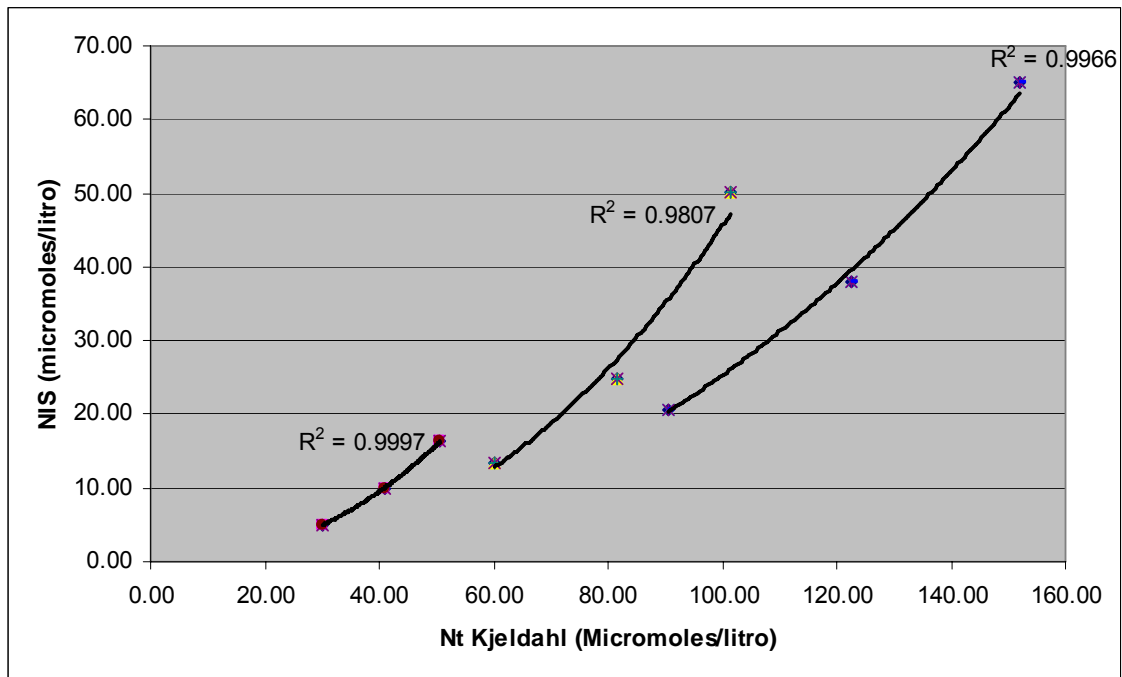


Figura 25. Relación entre los promedios de nitrógeno inorgánico soluble (NIS) y los promedios de nitrógeno proteico total suministrados y evaluados a partir de los datos obtenidos por el método de Kjeldahl para cada una de las tres tallas de camarones juveniles de *L. vannamei*.

Las relaciones obtenidas entre los niveles de NIS y el nitrógeno suministrado muestran un incremento de los niveles de NIS con el nivel de proteína para cada una de las tallas con un coeficiente de correlación mayor a 0.98.

DISCUSIÓN

a) *Técnicas montadas*

Urea

La urea como compuesto de nitrógeno residual ha recibido cada vez más atención en procesos fisiológicos y ecológicos. En las últimas décadas, la producción antropogénica de urea y su aplicación en el ambiente ha aumentado significativamente la entrada de este nutriente a sistemas costeros (Smil, 2001). La urea también se usa directamente en aplicaciones marinas, es usada por ejemplo en el cultivo intensivo del camarón, ya que son fertilizados con urea y superfosfato para iniciar el bloom algal que eventualmente sirve como alimento como recurso comercial pero, se han observado altos niveles de urea también facilitan el desarrollo de blooms de algas nocivas en los estanques de acuicultura (Glibert y Terlizzi, 1999) y en aguas costeras (Glibert *et al.* 2001, 2005). La urea en agua marina es probablemente, como el ion amonio, producido por animales y microorganismos heterotróficos y consumido en su mayor parte por plantas fotosintéticas. En la costa, el abastecimiento más probable sea la excreción animal ya que la urea es la principal forma de nitrógeno excretado por mamíferos, casi la única forma excretada por elasmobranquios marinos, y en un bajo porcentaje de la excreción de los teleósteos marinos. Se necesitan mediciones correctas de urea para determinar su papel en el ciclo marino del nitrógeno (Revilla *et al.*, 2005).

Aunque el método directo persiste como la opción para el análisis de urea en el agua marina, el método enzimático ha sido extensamente usado (McCarthy, 1972; Glibert *et al.*, 1991; Cho y Azam, 1995; Metzle *et al.*, 1997; Bronk *et al.*, 1998; Bode *et al.*, 2004). En un trabajo comparativo de estas técnicas, Price y Harrison (1987)

demonstraron que el método enzimático subestima las concentraciones de urea en agua marina comparadas con el método directo, y el efecto fue atribuido en gran parte a efecto inhibitorio de los iones del agua marina sobre la enzima. Además también se encontró que pH altos y posiblemente metabolitos extracelulares producidos en cultivos unialgales inhiben la actividad de la ureasa y que la enzima no es absolutamente específica para urea.

El método que en el presente trabajo fue estandarizado para microplaca fue el de Koroleff (1983.). Este método en su forma original utiliza grandes volúmenes de muestra y de reactivos, además de que las lecturas se realizan en un espectrofotómetro por lo que el proceso en serie conlleva mucho tiempo y esfuerzo. Los tiempos de reacción y de incubación que marca la metodología original, fueron respetados en su totalidad lo que garantiza lecturas con la misma confiabilidad.

La química que ocurre entre la urea y la diacetil-monoxima es complicada, pero puede ser descrita de la siguiente forma: en soluciones altamente ácidas y en la presencia de un oxidante débil, la urea forma un producto de condensación con diacetil monoxima, el cual interactúa con la semicarbazida y los iones manganesos para producir un complejo molecular magenta. Los iones de cloro son añadidos en abundancia para la sensibilidad de la reacción y la presencia de iones de fosfatos permite una mayor reproducibilidad.

En este trabajo se miniaturizaron todos los reactivos y muestras, además de que se modificaron algunos procesos metodológicos para facilitar la realización de la técnica además de disminuir el margen de error entre réplicas ocasionadas por errores humanos. Ejemplo de esto fue la dilución del cloruro de sodio en una solución acuosa para evitar

el tedioso pesaje del reactivo para cada una de las muestras, el uso innecesario de tubos Eppendorf y por otro lado disminuye el posible error entre réplicas y muestras gracias a una reducción en la manipulación del proceso por parte del analista.

En su trabajo Revilla y colaboradores (2005) encontraron cierta sobrestimación en la utilización del método directo relacionado con la salinidad. Sin embargo estos efectos no fueron reportados en por Price y Harrison (1987) y Mulvenna y Savidge (1992) para técnicas manuales y automatizadas respectivamente. Por otro lado DeManche *et al.*, (1973) observaron un aumento del 5.2% en la reacción al una salinidad de 34% y fue atribuida al autoanalizador. Más recientemente, Cozzi (2004) describió una estimulación de la reacción con la salinidad que es minimizada cuando el reactivo color es preparado con un bajo contenido de diacetimoxima; este autor explica que el efecto salino es resultado de un aumento en la fuerza iónica de la media que debió estabilizar la urea-cromógeno, una molécula supuestamente cargada positivamente (Butler *et al.*, 1981).

Al comparar las muestras analizadas por el método enzimático y aquellas analizadas por el método directo, es evidente la homogeneidad de las réplicas entre cada muestreo en el análisis enzimático a diferencia de las muestras analizadas por el método directo, donde las muestras tienen una mayor variación entre las replicas, lo cual se debe a la mayor manipulación o al error existente por parte del analista. Sin embargo, de acuerdo a Revilla el método enzimático tiene reporta una subestimación del 33% con una salinidad de 34.4 ppm y una ligera sobreestimación (6%), lo cual concuerda con el ejercicio hecho en este trabajo y es una constante en las muestras analizadas.

Amonio

Aunque el término de amonio se aplica al catión monovalente NH_4^+ y el término de amoniaco se aplica al compuesto de nitrógeno e hidrógeno, de fórmula NH_3 , en los manuales y artículos científicos para determinar ambos compuestos cuando están disueltos en una solución acuosa, se aplica el término de amonio para identificar los métodos analíticos que permiten determinar la suma total de ambos compuestos.

Las concentraciones de amonio en fluidos pueden ser medidas por medio de varias técnicas tales como la destilación-titración ácido-base, métodos fluorimétricos (Gardner, 1978), electrodos selectivos (Arnold, 1983), entre otros. La reacción Berthelot ha sido modificada en varias ocasiones (Mantoura y Woodward, 1983) pero sus reacciones químicas son lentas y a tasas de muestreo limitadas (Patton y Crouch, 1977). Otra modificación fue la hecha por Le Corre y Tréguer (1976), con base en Solórzano (1969), la cual se considera el fundamento del método utilizado en el autoanalizador Technicon, el cual requiere grandes cantidades de muestra, lo que lo hace un método no adecuado para pequeñas cantidades de agua de mar o hemolinfa (Hunter y Unglow, 1993). La reacción de indofenol obtenida por la reacción a pH alto de amonio, fenol e hipoclorito ha sido estudiada en varios trabajos. Las aplicaciones de este método a la determinación directa de amonio en agua de mar han fallado debido en parte, a la interferencia de iones de magnesio y calcio, pero Riley (1953) usó la reacción para el análisis de amonio en destilados de agua de mar, y aunque su procedimiento es reproducible y sensible, tiene la gran desventaja de requerir destilación.

Newell *et al.* (1967) desarrolló un método mediante el uso de cloradita T en lugar de hipoclorito para producir azul indofenol con amonio; su método largo e

involucra la extracción de color por n-hexanol. Emmet (1968) produce el azul indofenol después de neutralizar la solución a un pH de 9.5. Este método aunque, reproducible, tiene poca sensibilidad y requiere atención extrema para que tenga éxito. Solórzano (1969) por su parte usa un pH alto, pero elimina la interferencia gracias a la precipitación por el complejo de magnesio y calcio con el citrato, por lo que no se requiere destilación o extracción, la obtención del color se obtiene en una hora y no hay interferencia de otras formas nitrogenadas (Solórzano, 1969).

Sin embargo esta técnica es extremadamente sensible y se debe de poner especial atención para evitar materiales de limpieza de baja calidad o residuos de detergentes en instrumentos de laboratorio. La miniaturización del método a microplaca evita posibles interferencias gracias a que en cada determinación se utiliza una microplaca nueva. De acuerdo a Strickland y Parsons (1972) el punto límite de detección más bajo del método de Solórzano es de $0.9 \mu\text{M}$, mientras que, la modificación a microplaca, tiene un punto bajo ligeramente mayor ($1.5 \mu\text{M}$). En los estanques de cultivo de camarón, la concentración promedio de amonio es de $4.4 \mu\text{M}$ (Martínez Córdoba *et al.*, 1998), lo que asegura que la miniaturización del método es adecuado para una rutina de monitoreo para los estanques de cultivo. Además la capacidad de analizar un total de 96 muestras en la microplaca al mismo tiempo, implica un significativo ahorro de tiempo, reactivos y de muestra (Hernández-López y Vargas-Albores, 2003).

El amonio reacciona en una solución moderadamente alcalina con hipoclorito a monocloramina, la cual en presencia de fenol, cantidades catalíticas de iones de

nitroprusiato e hipoclorito en exceso, da azul de indofenol. La reacción es complicada y no puede ser descrita completamente. La cloramina quinona es posiblemente formada en una de las etapas intermedias; la formación de monocloramina requiere un pH de entre 8 y 11.5. A pH más altos el amonio es oxidado incompletamente a nitrito, como en el método de Richards y Kletsh (1964).

A pH mayores a 9.6, se pueden dar algunas precipitaciones de iones Mg y Ca como hidróxidos y carbonatos en agua de mar, además esta técnica como originalmente se realiza, subestima el la concentración de amonio cuando ésta excede los 7 mg/L. Es por esto que se realizaron las modificaciones descritas anteriormente, con las cuales se evitan complicaciones en las lecturas de este compuesto y la correlación entre las lecturas de las curvas esperadas y las obtenidas aumenta, y con esto la confiabilidad del método. El objetivo de este análisis fue eliminar la interferencia del pH en las determinaciones de amonio por fenol hipoclorito.

Nitrógeno y Fósforo Total

En el Taller de Intercalibración Báltica, llevada a cabo en 1977, fue presentado un trabajo por Koroleff (1977) donde explicaba un oxidación simultánea de persulfato y nitrógeno disueltos en el agua. Este método era una mejora en el propuesto por él mismo en 1972 para el “Nuevo Manual Báltico” y en “Métodos de Análisis en agua de mar” (Koroleff, 1976). Este método mostraba entre otras ventajas, la posibilidad de analizar simultáneamente nitrógeno y fósforo total en la misma muestra, además de permitir el almacenaje de muestras para su posterior análisis.

Para permitir que los compuestos nitrogenados se oxiden, es necesario usar un medio alcalino, de otra forma el nitrato no será producido en cantidades cuantificables. Por otra parte la oxidación de compuestos fosfatados debe ser formada en una muestra ácida. En la oxidación simultánea la reacción empieza a un pH de 9.7 y termina a un pH de 5-6. Estas condiciones son obtenidas por un sistema de ácido bórico/hidróxido de sodio. A temperaturas elevadas (100-120 C), en agua salada se forma un precipitado, que de cualquier forma se disuelve casi por completo conforme la oxidación ocurre. Los productos obtenidos por la oxidación de varios compuestos nitrogenados dependen de la forma de la unión nitrogenada. De esta forma, por ejemplo el nitrato, nitrito, amonio, urea y algunos aminoácidos alifáticos y algunas proteínas abarcan alrededor del 92%. El tiempo de digestión, una función de la autodescomposición del peroxodisulfato, necesita ser no más grande que 30 minutos. De cualquier forma, la determinación del valor del blanco, causado por un oxidante es esencial, ya que el peroxodisulfato siempre contiene trazas de nitrógeno.

El nitrógeno orgánico disuelto (NOD) es el grupo más grande de nitrógeno fijado en muchos sistemas marinos y dulceacuícolas (Sharp, 1983). Pero a pesar de esta dominancia cuantitativa del NOD en muchos ambientes y sistemas, es la fracción acerca de la cual se sabe menos en términos de abundancia y ciclo, y esta falta de información en gran parte, persiste debido a las considerables dificultades metodológicas asociadas a su análisis (Bronk *et al.*, 2000). Para determinar cuantitativamente la dinámica del DON en aguas naturales en las cuales tanto la producción como el consumo se dan en tasas comparables, los estudios basados en técnicas con marcadores de ^{15}N son importantes.

Sin embargo aunque los métodos existentes son robustos y confiables, son laboriosos y consumen mucho tiempo, y limita el número de muestras que se pueden obtener durante una corrida.

Varios métodos para medir nitratos in agua de mar están basados en la reducción de nitratos y la posterior cuantificación colorimétrica de nitritos totales. Esta reducción es realizada exitosamente con alrededor del 95% del rendimiento al pasar la muestra a través de una columna de cadmio activada. Este método está libre de interferencias y es capaz de medir nitratos en agua marina en concentraciones nanomolares.

A la materia orgánica retenida en una membrana filtro se le denomina como particulada, y aunque el tamaño de poro de los filtros usados para su análisis no son muy definidos y el particulado es una categoría pobremente definida, es deseable medir nitrógeno orgánico particulado (Sharp, 1983). La mayoría del fósforo inorgánico en el agua marina está presente como iones ortofosfatos principalmente HPO_2 y PO_3 .

Los análisis químicos están centrados alrededor de la reactividad del fósforo en el molibdato y los cambios en reactividad de las formas complejas de fósforo, durante la hidrólisis enzimática y acídica, según éstas son convertidas a ortofosfato. La mayoría de los datos publicados sobre concentraciones de fósforo en agua dulce es reportada como fósforo total y como fósforo inorgánico soluble. La separación del fósforo total en fracciones inorgánica y orgánica, indica que la mayoría del fósforo total está en la fase orgánica. La disponibilidad de las formas inorgánicas de fósforo para sostener la productividad en orden descendente es: ortofosfatos, pirofosfatos, trifosfatos y aniones polifosfatos mayores.

Sin embargo los trabajos sobre el fósforo orgánico disuelto (POD) y particulado (PP) son relativamente escasos debido a la falta de fiabilidad en las técnicas analíticas y a la creencia de que las contribuciones del POD y del PP son menores comparadas con las del PSR. Orret y Kart (1987) ya habían indicado que el POD puede contribuir significativamente a la fracción de fósforo disuelta total en los estuarios, ya que la mayor parte del transporte de compuestos de fósforo en los ríos, mas del 90% del fósforo total, ocurre principalmente en fase sólida. Como resultado se espera que el PP sea una fracción importante tanto en los estuarios como en las bahías.

En los últimos años se ha reconocido que el fósforo es uno de los factores más determinantes en los florecimientos algales y la eutrofización, lo cual ha aumentado el interés en las descargas en grandes cantidades de este elemento en el ambiente acuático, en la forma de flujo doméstico, industrial y rural, en su forma agrícola y acuícola. Es por esto que cada vez se invierten mayores recursos financieros para la remoción de fósforo en los tratamientos de agua de desecho así como en prácticas que disminuyan la cantidad de emisiones de agua con altas cantidades de fósforo (Benson *et al*, 1996). Los fosfatos orgánicos disueltos (POD), condensados y ortofosfatos junto con el Fósforo orgánico particulado (POP) y los coloidales asociados en las formas bióticas y abióticas son colectivamente definidos como Fósforo Total (PT).

Antes del análisis, el PT debe ser convertido a una forma analizable, como son los ortofosfatos, por disolución, oxidación o hidrólisis. Los tres principales procedimientos en la industria recaen en la digestión a temperaturas elevadas con ácidos

minerales y/o agentes oxidantes. Otra técnica es la basada en la fusión a altas temperatura de la muestra de agua con sulfato de magnesio nitrato para dar ortofosfatos (Toy y Walsh, 1987)

Los métodos de inyección de flujo, han sido propuestos para la determinación de varias fracciones fosfóricas, algunos ejemplos de diferentes procedimientos incluyen digestión termal para fósforo orgánicos totales (POT), oxidación fotoquímica para fósforo orgánico disuelto (POD) y métodos de microonda para POT y PT. Estas técnicas tienen varias ventajas, como es un análisis simultáneo de muchas muestras, bajo consumo de reactivos y alta reproducibilidad, además de mostrar buena recuperación de compuestos modelos fosfóricos fueron exitosamente aplicadas a muestras reales (Strickland y Parsons, 1972; APHA, 1990)

Con los volúmenes de reactivos y de muestra se observó que la absorbancia fue directamente proporcional a la concentración de la muestra (Ley de Lambert-Beer). Con relación a esto se elaboraron curvas de calibración para determinar el intervalo lineal. Para cada caso se seleccionaron intervalos con un coeficiente de regresión mínimo de 0.97.

b)Diseño y Formulación de alimentos balanceados.

La composición dietética es el resultado del contenido y composición relativa de varios compuestos bioquímicos, tales como carbohidratos, lípidos y proteínas, lo que influye en la nutrición, la fisiología y la capacidad de los animales para superar el estrés o cualquier otra situación que requiera aumentar las tasas metabólicas para la producción energética. La composición dietética es un importante aspecto en el éxito de cualquier actividad acuícola, no sólo para asegurar que se alcance la máxima tasa de crecimiento, sino también para controlar los niveles ambientales de amonio y para producir animales que estén bien preparados para enfrentar situaciones estresantes (Kristianssen y Hessen, 1992). En la actualidad existen paquetes computacionales que se usan como herramientas para la formulación de alimentos balanceados tanto en la industria para su uso comercial, así como para alimentos experimentales en proyectos de investigación. Sin embargo muchos de estos programas disminuyen su eficiencia cuando las necesidades del usuario constan de varias especificaciones a obtener. En el presente trabajo se intentó utilizar el programa Mixit para la formulación de los alimentos requeridos en este trabajo, en donde no solo se requería que los alimentos contuvieran los diferentes niveles proteicos, sino que además mantuvieran la misma cantidad de lípidos, calorías y un perfil similar de aminoácidos. Se observó de manera reiterada que con el valor de ciertos ingredientes mayores a incluir, la proporción de otros que se consideraban fijos cambiaba de manera drástica y no había un balance con lo esperado. Debido a estas complicaciones, en este trabajo fue necesario desarrollar algoritmos que pudieran funcionar para que la formulación deseada cumpliera con los

requisitos que se establecieron para cada dieta, como los generales. Por medio de estos algoritmos se pudo lograr obtener el diseño tres dietas que en papel cumplieran con las características específicas a utilizar en el bioensayo. Y una vez hechas, gracias al estudio bromatológico realizado, se pudo comprobar la efectividad de la formulación hecha con los algoritmos diseñados.

Los alimentos con alto contenido proteico pueden tener impactos negativos debido al aumento de los desechos nitrogenados tóxicos tales como el amonio (Molina-Poveda y Civera, 1998). Por ello se considera importante el uso apropiado de la proteína en la dieta con el objetivo de empatar los requerimientos de los organismos cultivados a los costos mas bajos posibles, y esta proporción puede variar de acuerdo con diferentes factores entre los que se consideran el tamaño del camarón, condiciones alimenticias y la disponibilidad de alimento natural en los estanques (Martinez-Córdova *et al.*, 2002).

c) Diseño experimental.

En casi todos los casos, la retención de energía y la deposición de tejido nuevo resulta en el aumento de peso del animal, y el aumento de peso de los peces y crustáceos juveniles es generalmente un indicador confiable del grado de adecuación de la nutrición y del manejo. Desafortunadamente la tasa de crecimiento no es una medida cuantitativa de la retención energética, primero porque la deposición de grasa reduce el contenido de agua en el cuerpo, lo que cambia el valor energético por unidad de peso del animal vivo, y segundo porque el contenido de energía de la grasa y de la proteína por unidad de peso son muy diferentes. Por ello, las comparaciones de ganancia en peso

por unidad de alimento consumido, es decir la eficiencia alimenticia, solamente es útil si el valor energético del alimento y del incremento en peso se conocen. Este problema de interpretación de los datos de productividad se complica todavía más por los diferentes procesos metabólicos que permiten almacenar la energía dietaria, ya sea en forma de grasa o de proteína; la síntesis de lípidos es relativamente más simple, con una eficiencia de entre el 74 y el 90%, que contrasta con la síntesis de la proteína, que es mucho más compleja, con una eficiencia de entre el 44 y el 60% (Cho *et al.*, 1985). Además la obtención de datos por medio de experimentos clásicos de nutrición conlleva mucho tiempo y esfuerzo.

El diseño experimental utilizado en este trabajo permite obtener muestras de las cuales se puedan determinar las concentraciones de compuestos nitrogenados y fosfóricos como resultado de la digestión de alimentos balanceados en un período de 24 horas. Dentro de este período de incubación se obtuvo una supervivencia del 100% así como una completa ingestión del alimento en todos los tratamientos. El uso de ésta metodología puede ser utilizada para variadas tallas de animales e inclusive especies de animales marinos debido a la capacidad los contenedores y la homogeneidad de condiciones ambientales dentro del sistema.

d) Bioensayos

En este trabajo los niveles de amonio registrados en el bioensayo aumentaron conforme aumentaba también la proteína incluida en los alimentos experimentales, subasta un nivel máximo obtenido en la concentración de 51 μ moles a 45% de proteína en los animales más grandes (3g). De la misma forma, en su estudio Martínez-Córdova

et al. (2002) encontraron que en *L. vannamei* las concentraciones de amonio variaron en relación con el nivel de proteína alimenticio (20 y 40%) y las concentraciones de los estanques correspondientes se mantuvieron con concentraciones de 0.21 mg/L para amonio.

Burford y Williams (2001) analizaron la excreción post alimenticia de amonio en *P. monodon* después del suministro de una sola ración de alimento de una dieta con un valor proteico cercano a 35%, y obtuvieron valores cercanos a los 26 μ moles/g con animales de 12 gramos. Ellos calcularon que aproximadamente 85% del nitrógeno consumido fue digerido, mientras que el 15% restante fue liberado vía heces. En este trabajo, la concentración de amonio registrada para este porcentaje proteico fue de 7.3, 8.6 y 9.88 μ moles para 1, 2 y 3 gramos respectivamente.

En su estudio Schmitt y Santos (1998) encontraron que la tasa de excreción de amonio de *P. paulensis* alimentado con dieta del 41% proteína, disminuyó y permaneció así durante días después del cambio de dieta, en un nivel inferior a la tasa de excreción obtenida en camarones alimentados con dieta de un 53% de proteína. Aunque se ha demostrado que la tasa de excreción nitrogenada de algunos crustáceos esta directamente relacionada con el contenido proteico de la dieta, no siempre ocurre así.

Hewitt e Irving (1990) midieron excreción amoniacal en *P. esculentus* alimentados con dietas de 40%; esta fue menor que la medida en camarones alimentados con dietas que contenían 30 y 50% de proteína. Las tasas de excreción de todos los grupos, medidas a los 15 minutos de la transferencia a los contenedores pequeños, fueron más altas que aquellas medidas a 1.5 horas de la aclimatación. Tales

diferencias son probablemente causadas por manejo y/o exposición a un cambio de ambiente. El período post alimenticio en los crustáceos es normalmente caracterizado por un aumento en la tasa de excreción nitrogenada. Todos los grupos presentaron mayores tasas de excreción durante el período de luz que en el oscuro, lo cual se puede atribuir a las actividades del camarón.

Las tablas alimenticias aconsejan alimentar a los camarones por porcentajes determinados de acuerdo al peso del animal. Las tres tallas utilizadas en este bioensayo pertenecen a la categoría marcada por Tacon (1987) como del 10% del peso corporal, por lo que se esperaría que la liberación de los compuestos nitrogenados se comportara de manera similar. Sin embargo, los niveles de $\mu\text{moles/g}$ de amonio van en disminución con el aumento de la talla, por lo que se infiere que ya a partir un peso de 3 gramos se puede disminuir el porcentaje de alimentación dado a esta talla, y no hasta los 5 gramos como lo marca la literatura. El racionamiento del alimento por peso corporal, podría organizarse gramo a gramo y no por intervalos tan grandes donde se agrupan tallas que se comportan completamente distintos ante la misma ración alimenticia. Un racionamiento más ordenado y eficiente, tendría impacto directo sobre el aprovechamiento, el ambiente y la economía.

Aunque en reportes recientes se propone que el camarón puede crecer bien con dietas con 20% de proteína, otros reportes indican que los requerimientos proteicos del camarón son mas altos (27 y 60%) de acuerdo con las especies. Los niveles óptimos de otros componentes de la dieta y su relación con la proporción proteína/energía puede ser

útil para la reducción de los costos de producción de alimentación y su impacto ecológico (Rosas *et al.*, 2000)

La vasta mayoría del amonio excretado tiene su origen del catabolismo de proteínas y aminoácidos, pero hay amonio adicional que se produce por reacciones que involucran bases púricas y pirimídicas (Claybrook, 1983). Sin embargo, el amonio derivado vía la ruta uricolítica es considerada como una contribución pequeña del total excretado comparado con la predominante producción de los aminoácidos (Weihrauch, *et al.*, 2004).

Dietas con bajo contenido proteico, perfil de aminoácidos óptimo, una proporción óptima proteína/energía de la comida han sido propuestos para minimizar los contaminantes de las descargas para el beneficio de los ecosistemas estuarinos y costeros. Aunque se ha propuesto en reportes recientes que el camarón puede crecer bien en estanques de cultivo autotróficos o heterotróficos cuando es alimentado con dietas con un 20% de proteína (Lawrence *et al.*, 1998), otros investigadores han demostrado que en condiciones de laboratorio se requiere un mayor nivel de proteína y una mas alta cantidad de ésta para satisfacer los requerimientos del camarón en condiciones de laboratorio, como se mencionó anteriormente estos niveles pueden variar entre el 27 y 60% según la especie (Schmitt y Santos, 1998).

De acuerdo con Rosas *et al.* (2003) al igual que en la fase de postlarva, los juveniles se camarón tienen requerimientos elevados de proteína dietética, prueba de esto es que la gran mayoría de las especies cultivadas tienen requerimientos proteicos por arriba del 30%. Como consecuencia de este requerimiento se ha observado en

general que los camarones tienen una elevada tasa de excreción de amonio. Sin embargo los valores obtenidos en el presente trabajo muestran que aunque el amonio aumenta conforme a la talla, los niveles de μmoles de amonio aunque tienen un comportamiento ascendente, hay una tendencia hacia la estabilización y posible disminución. Como regla general, los animales de menor tamaño son alimentados con un porcentaje más alto de su peso corporal por día que los animales de mayor tamaño. Esto es debido a que los animales de menor tamaño tienen generalmente una tasa metabólica mayor. La cantidad de alimento que se da por día en cualquier cultivo, se calcula mediante la estimación de la biomasa en el cuerpo de agua, multiplicada por el porcentaje de alimento diario que debe suministrarse de conformidad con la talla de los organismos. Dado que los camarones de pequeña talla, metabolizan su comida más rápidamente que los camarones más grandes el porcentaje de racionamiento diario disminuye con el aumento de la talla (Van Wyk, 1999).

Los estudios sobre requerimientos nutricionales han demostrado que los camarones peneidos y los decápodos en general están muy bien adaptados para el uso de las proteínas como sustrato energético desde los primeros estadios de postlarva, y posiblemente desde larva para utilizar a las proteínas como fuente de energía metabólica y como base para la conformación de tejido nuevo. Como consecuencia del uso de las proteínas, los camarones producen amonio el cual es excretado a través de las branquias, y por esta razón el estudio de la excreción nitrogenada ha sido foco de atención de diversos investigadores.

En este estudio la concentraciones de nitritos y nitratos tuvieron un ascenso relacionado con la proteína y la talla. La concentración de nitritos se mantuvo por debajo de 1 μmol en todos los tratamientos, mientras que la de nitratos supero los 10 μmoles en los tramientos de más alto nivel proteico en las dos tallas superiores. Martínez-Córdova *et al.* (2002) encontraron que las concentraciones de nitritos y nitratos y variaron en relación con el nivel de proteína alimenticio (20 y 40%). Las concentraciones de los estanques correspondientes se mantuvieron con concentraciones de 0.041 mg/L para nitritos y 03.06 mg/L para nitratos.

En el estudio de Gómez-Jiménez *et al.* (2005) la concentración de nitritos permaneció baja en todos los tratamientos durante las dos primeras semanas del experimento e incremento considerablemente desde el día 14, particularmente en el acuario alimentado con la dieta del 35% de proteína, así mismo el acuario alimentado con la dieta del 25% proteico mantuvo el nivel de nitritos a un concentración muy baja (5.91 $\mu\text{mol/L}$) hasta el final del experimento. Por otro lado, la concentración de nitratos aumentó gradualmente a lo largo del experimento, predominantemente en acuarios con alimentación con 35 y 40% de proteína. Al final del bioensayo, el acuario alimentado con la dieta del 25% mostró la concentración de nitratos más baja (52.22 $\mu\text{mol/L}$) entre todos los tratamientos.

En el presente trabajo los niveles registrados de NIS aumentaron a mayor contenido proteico y mayor talla, compuesto en su mayor parte por amonio, seguido de nitratos y nitritos. El nitrógeno inorgánico es una fracción importante del presupuesto del nitrógeno en las granjas camaronícolas. Del 57% del nitrógeno que fue descargado

en los afluentes de una granja semi-intensiva, Jackson *et al.* (2003) mencionan que el nitrógeno amoniacal total en su estudio representó entre el 12 y el 21%. Los nitritos y nitratos estuvieron presentes en concentraciones bajas (0.004 y 0.091 mg/L). González-Félix *et al.*(2006) mencionan que el nitrógeno inorgánico al final de su experimento representó de un 14.5 a un 24.4% . En este trabajo, se obtuvieron altas concentraciones iniciales de nitratos en el agua de mar preparada (55 μ moles). En este trabajo el agua deionizada utilizada contenía más de la mitad del contenido total (38 μ moles); el resto de la concentración inicial pudo haber sido originada por las sales de mar, que si bien son libres de nitratos, pudieran contener nitrógeno en alguna otra forma, y durante el proceso de digestión pudo ser transformado a nitratos. Sin embargo, en algunos casos, el amonio llegó a ser más del 50% del nitrógeno inorgánico soluble, lo que indica un alto catabolismo del nitrógeno proteico

Diversos estudios del presupuesto del nitrógeno muestran que un importante porcentaje del nitrógeno suministrado en el alimento suele permanecer en forma de nitrógeno orgánico dentro del sistema al terminar un ciclo de cultivo. En este sentido Jackson *et al.* (2003) encontraron que la mayor forma de nitrógeno en los estanques de una granja intensiva de camarón, 57% estaba en forma de nitrógeno disuelto, y de esta fracción, de un 37 a un 43% estaba representado por NOD e incluyó que un 14% del nitrógeno entrante permaneció en los sedimentos de los estanques. Thakur y Lin (2003) reportan que la mayor pérdida de este nutriente, 14-53% se observó al verificar su hundimiento y acumulación en los sedimentos del fondo del tanque.

González-Félix *et al.* (2006) reportó que en sistema cerrado los compuestos de nitrógeno orgánico total, en el que se incluye el NOD, el nitrógeno en sólidos suspendidos y sedimentados, varió de 22.5 a 32.8% con las dietas de mayor contenido proteico (35 y 40%). De acuerdo a los autores la mayor parte del ND lixiviado tanto del alimento formulado así como de las heces fue orgánico (Urea, aminos primarios disueltos y otros compuestos de nitrógeno orgánico soluble) mas que en formas inorgánicas (NH_4 , NO_3 , NO_2). En su trabajo además, compararon los procesos *in Vitro* y en estanques, y reportan que la lixiviación de urea fue considerablemente más baja en el estanque lo que sugiere que que pudo haber sido procesada en otras formas. En el caso del alimento formulado, las concentraciones de NOD y las aminos primarios disueltos (APD) fueron más bajas en el agua del estanque después de 8 horas, lo que sugiere que la comunidad microbiana interviene en la transformación de estos compuestos en otras formas.

La mayor parte de la lixiviación por parte de los alimentos formulados y la heces viene en formas orgánicas, tales como urea, aminos primarios disueltos y otros compuestos de NOS, mas que en formas inorgánicas. Burford y Williams (2001) obtuvieron que para el alimentos, aproximadamente 22% fue en forma de aminos primarios disueltos, 2.3 de urea y el 73% restante fue de otros compuestos, mientras que para las heces el panorama fue distinto, 8% como APM, 26% como urea y 61% de otros compuestos de NOS. Ya que en el presente trabajo no se determinó otro compuesto de NOS que no fuera urea, las proporciones de los componentes dentro del NOS para este bioensayo son desconocidas, sin embargo la urea en condiciones donde el contenido

proteico es bajo y la talla de animales pequeña (1 g), puede representar porcentajes elevados de cerca del 80% del NOS. Conforme la talla aumenta esta proporción se pierde, debido a que como ya se mencionó las concentraciones de NOS se disparan en las siguientes tallas inversamente proporcional al contenido proteico. La urea, al tener un comportamiento opuesto al NOS, aumenta su proporción precisamente en los valores más bajos de NOS en cada talla, y disminuye en los altos, es decir a dietas bajas en proteína en las tallas de 2 y 3 gramos.

La urea es sintetizada del amonio y HCO_3 en el hígado vía el ciclo ornitina-urea, aunque también puede ser formada por la degradación de ácido urico o arginina. Los elasmobranquios, anfibios y mamíferos utilizan el ciclo ornitina-urea, mientras que la mayoría de los invertebrados y teleósteos sintetizan urea por uricólisis o argininólisis. Algunas especies de invertebrados pueden sintetizar cantidades significativas de urea en respuesta a condiciones ambientales que limiten su excreción de amonio (Wright, 1995; Calderón, 2004). El amonio es formado por el catabolismo de aminoácidos metabólicos, desaminación de amidas y desaminación de adenilato en el ciclo de purinas nucleotídicas. La excreción amoniaca es afectada por factores intrínsecos como el ciclo de la muda, estatus nutricional y talla, también como por factores extrínsecos como la temperatura, salinidad, los niveles de amonio ambiental y de nitritos (Regnault, 1987). De manera general la excreción de amonio aumenta cuando los animales hiperregulan y disminuyen cuando hiporregulan.

Cambios en la liberación de urea han sido registrados en varias especies tales como *P. chinensis* (Chen y Lin, 1995) *P. japonicus* (Chen y Chen, 1996; Lee y Chen,

2003) y *M. rosenbergii* (Chen y Kou, 1996; Chen y Kou, 1996), cuando ocurren cambios ambientales. En *L. vannamei* se ha encontrado que estos mismos factores ambientales tales como, salinidad (Chen y Lin, 1995), temperatura (Jiang *et al.*, 2000), pH y ejercicio (Calderón, 2004) provocan cambios en la excreción de urea. Los niveles de urea registrados en este trabajo para *L.vannamei* aumentan conforme aumentan también los niveles de proteína incluidos en los alimentos y el mismo comportamiento ocurrió en cada una de las tres tallas (1, 2 y 3 g), con una variación entre los niveles registrados de 0.3 hasta 1 μ moles.

En el estudio de Burford y Williams (2001) hubo diferencias en las proporciones de urea y aminas primarias disueltas lixiviados de los alimentos formulados y las heces de camarones, la lixiviación de urea fue más alta en heces que en el alimento, mientras que el APD fue mayor en el alimento que en las heces, lo cual concuerda el proceso digestivo de los camarones. Es más probable que los aminoácidos libres presentes en los alimentos estén listos para ser asimilados por el camarón, lo cual puede disminuir significativamente la proporción de aminas primarias disueltas en las heces (Dall *et al.*, 1990). La urea es un producto de excreción del camarón, las cuales son excretadas por las branquias, pero también por las heces. Cuando la excreción por gramo fue calculada se observó una clara disminución del compuesto conforme aumenta la talla de los animales pero conserva la proporción de acuerdo al contenido proteico del alimento formulado. Si los niveles de urea fueran reflejo de la lixiviación por parte de los alimentos y/o las heces como se ha mencionado, las proporciones por gramo, no

cambiarían, al contrario, se mantendrían ya que proporcionalmente se metió la misma cantidad de alimento por gramo de animal.

El NOS, que es considerado principalmente aminoácidos libres y urea (Regnault, 1987), es el segundo desecho nitrogenado más importante, el cual aporta entre el 15.4 y el 36.4% del nitrógeno excretado por *L. vannamei* (Jiang *et al.*, 2000). La urea ha sido reconocida como un importante contribuyente a la nutrición del fitoplancton marino y dulceacuícola (Glibert, 2000). La disponibilidad de esta forma de nutriente, en términos tanto de concentración total y relativa a la disponibilidad nitrogenada, es importante para el entendimiento de la dinámica del fitoplancton. Aunque el amonio y el nitrato son las formas más conocidas para el nitrógeno adecuado para el crecimiento del fitoplancton, la habilidad de éste para utilizar y crecer con compuestos orgánicos específicos es bien conocida (Berman y Bronk, 2003). El NOS es ha sido poco caracterizado en sus compuestos, las formas más simples y más fácilmente medidas son la urea y aminas primarias disueltas. Otros compuestos del NOS pueden ser proteínas o fragmentos de éstas, así como peptidoglicanos remanentes (McCarthy *et al.*, 1998).

La excreción diaria de nitrógeno de *Astacus astacus*, alimentado con una dieta paletizada con un 50% de proteína fue mayor que la de aquellos animales alimentados con una dieta de 8.4% de proteína (Kristianssen y Hessen, 1992). Las tasas de excreción de amonio y urea de *Penaeus japonicus*, aumentaron conforme aumentó el contenido proteico de las dietas, pero un período de 24 horas de inanición eliminó tales efectos. Una reducción de la tasa de excreción es normalmente observada dentro de las primeras 24 horas de inanición, pero conforme avanza el ayuno, las tasas de excreción de

nitrógeno pueden aumentar y tornarse aún más altas que las de los animales alimentados. Por lo tanto, las cantidades de alimento ingerido y la naturaleza y composición de la dieta dada a los animales son un factor importante para predecir y controlar los niveles ambientales de nitrógeno y fósforo en la acuicultura. Además de que como enfatizan Kristianssen y Hessen (1992), los productos de desecho originados a partir de las actividades acuícolas pueden generar serios problemas ambientales tanto en ambientes marinos como dulceacuícolas.

En los estanques, el NOD es utilizado por la comunidad, predominantemente en la forma de urea de la lixiviación fecal, y aminos primarios disueltos y urea de la lixiviación de alimento. La biodisponibilidad de NOD varía de manera importante en los sistemas naturales y esta relacionada con las formas de NOD presentes y los procesos bacterianos predominantes. Estudios anteriores en estanques de camarones han mostrado que la urea es rápidamente asimilada por el fitoplancton (Burford y Glibert, 1999). Mientras que el componente de urea del NOD total fue rápidamente utilizado, los otros compuestos del NOD no fueron utilizados tan efectivamente por la comunidad bacteriana, lo cual puede explicar las altas concentraciones de NOD acumulado en la columna de agua de los estanques de camarón. Conforme el ND es utilizado en el estanque, también es producido en la forma de amonio y DPA proveniente de las heces. La acción de la comunidad microbacteriana en las heces puede facilitar la lixiviación de estos compuestos. Alternativamente, la comunidad microbiana puede haber producido estos compuestos mientras procesa el N. El rompimiento de formas complejas de NOD

por las bacterias puede dar a cambio compuestos con menor peso molecular tales como la urea, aminos primarios disueltos o NH_4 (Berman *et al.*, 1999).

El ND originado del alimento formulado y las heces de camarón puede ser contado como una contribución importante para el ND total liberado de la alimentación, y sus niveles pueden alcanzar hasta el 17%. Normalmente el valor que se le da en los modelos de producción para el alimento no consumido es de alrededor del 10%, y esta proporción es por lo regular más alto que esto; sin embargo, los compuestos resultantes de la lixiviación fueron en su mayoría en forma orgánica, en contraste con los compuestos inorgánicos, producidos por la excreción en las branquias de camarón. El nitrógeno orgánico disuelto son compuestos generalmente muy poco caracterizados. Las formas de NOD más simples y más fácilmente medibles son la urea y aminos primarios disueltos (APD). Mucho del NOD lixiviado de los alimentos formulados y heces fecales estuvieron en formas distintas a APD y urea. Ya que los alimentos formulados contienen un alto contenido proteico, es común que sean proteínas o aminoácidos combinados. Además, compuestos de excreción tales como el ácido úrico pueden contribuir al NOD lixiviado de las heces (Dall *et al.*, 1990).

En su experimento Burford y Williams (2001) demostraron que el nitrógeno lixiviado de las heces es utilizado más rápidamente por la comunidad microbiana, cosa que no ocurrió con el nitrógeno de la comida, lo cual sugiere que el nitrógeno de las heces está más biodisponible que aquel de la comida, probablemente debido a las altas concentraciones de urea. Además encontraron que la tasa de excreción acumulativa de amonio después de la alimentación fue tres veces más alta durante las primeras 6 horas

que aquella de los animales en ayuno, lo cual concuerda con estudios hechos con *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* y *P. notialis*, en los cuales encontraron tasas de excreción entre 2.7 y 11.5 veces más altas en animales alimentados que en los que no (Rosas *et al.*, 1996).

La pérdida de energía fecal es principalmente por el almidón, la fibra y algo de proteína no digestible en la dieta, y es influenciada por la calidad de los ingredientes. Los alimentos comerciales más barato tienden a contener niveles más altos de subproductos animales y vegetales no digestibles lo cual diluyen la densidad de nutriente, y aumenta la cantidad de productos de excreción fecal. Los acuicultores deben de conocer el contenido de energía biológicamente disponible de una dieta antes de poder determinar el peso de alimento que debe de ser usado diariamente. Un alimento de baja energía que generalmente contiene un alto nivel de carbohidratos, almidón y fibra, da como resultado un crecimiento y una eficiencia alimenticia bajo, además, un aumento en el consumo de un alimento poco digestible, da como resultado un aumento en la excreción de heces que contamina el sistema acuático (Chol y Bureau, 1996).

En las concentraciones de NOS encontradas en este trabajo, se observa una relación de disminución conforme aumenta el contenido proteico de las dietas experimentales, y ésta tendencia se hace más marcada conforme aumenta la talla del animal. Esto puede tener relación más que con la proteína, con el almidón contenido en las dietas como fuente de carbohidratos (CBH), ya que es inversamente proporcional al porcentaje de inclusión proteica. El estudio de los efectos de la ingesta de carbohidratos

ha sido estudiado en *P. monodon*, donde se observó que la capacidad de degradación de CBH de los camarones es limitada debido a que no cuentan con mecanismos de control fisiológico de la glucosa sanguínea, lo cual provoca que los CBH dietéticos sean liberados lentamente en la sangre para que puedan ser aprovechados (Alava y Pascual, 1987). Por su parte, Rosas *et al.*, (2000) encontraron que la acumulación de glucógeno en la glándula digestiva muestra una saturación conforme aumenta la concentración de CBH dietéticos específicamente de alrededor del 20% para *L. vannamei*, ya que esta saturación podría limitar los sitios de absorción de otros nutrientes importantes para el crecimiento, tales como aminoácidos (Shiau, 1998). En el presente trabajo la concentración más alta de CBH fue incluida en la dieta de 25% de proteína, en un nivel superior al valor reportado por los autores (36%) mencionados, por lo que los niveles de NOS pudieran deberse a la liberación de aminoácidos como resultado de una ineficiente absorción. En su estudio Rosas *et al.* (2001) encontraron una mayor tasas de excreción amoniaca en *L. vannamei* alimentados con dietas con bajos contenidos de CBH que en aquellos animales alimentados con altos contenidos de CBH. Los autores adjudican este fenómeno a que el metabolismo de CBH esta gobernado por el metabolismo proteico debido a que el camarón puede producir suficiente glucosa y glucógeno en la hemolinfa y en la glándula digestiva respectivamente, con casi ningún aporte de CBH en la dieta. De manera contraria, Burford y Williams (2001) encontraron que mucho del NOS obtenido en sus sistemas provenía de la lixiviación de los alimentos formulados y las heces de los animales en forma de APD y urea, atribuidas a los altos contenidos proteicos contenidos. Sin embargo, en el presente trabajo, el sustrato metabólico usado

por *L. vannamei* en dos de las tres tallas (2 y 3 g) pudo haber sido influenciado por los niveles de CBH en la dieta, ya que en las dietas que contienen bajos niveles de CBH, el camarón solo uso proteínas como fuente de energía, por lo que las altas concentraciones de NOS se encuentran en aquellos tratamiento donde la proteína era baja y los carbohidratos altos.

En un modelo conceptual de la dinámica del nitrógeno en estanques camaronícolas (Lorenzen *et al.*, 1997), se asume la entrada de nitrógeno es exclusiva del alimento formulado ya que estudios previos han mostrado que solo una pequeña proporción del nitrógeno que entra, lo hace por medio del agua y de los animales (5-10%) (Briggs y Funge-Smith, 1994; Jackson *et al.*, 2003). En este modelo el desecho de nitrógeno es generado por la alimentación del camarón de alimentos formulados, y el nitrógeno puede entrar a la columna de agua por la excreción nitrogenada o la remineralización de alimento desperdiciado como NOD.

El amonio puede ser transformado por varias vías: asimilado por el fitoplacton, volatilizado como amoniaco, convertido a nitrito/nitrato vía proceso de nitrificación o por medio de recambios de agua. Así mismo, el nitrato puede ser asimilado por el fitoplancton o desechado por recambios de agua. El NOD es producido en cantidades significativas en los estanques de camarón como resultado de la adición de alimento de camarón (Burford y Williams, 2001) sin embargo mucho de él es refractario y no disponible para su utilización por la biota natural.

El modelo de Burford y Lorenzen (2004) muestra que la dinámica del sedimento nitrogenado es un importante factor en los cambios de calidad de agua en el curso de un

ciclo de producción. Una buena estabilidad en el agua es importante en la preparación de los alimentos de camarón, sin importar el proceso de peletizado. Los camarones son comensales lentos y el pellet puede permanecer en el agua de 4 a 5 horas antes de que sea comido (Van Wyk, 1999).

En su modelo Lorenzen *et al.*, (1997), predicen que en sistemas semi-intensivos de cultivo de camarón del 48 al 66% del nitrógeno añadido se asentará en el fondo del estanque como fitoplancton. Los sedimentos son fuente de amonio hacia la columna de agua en los estanques, debido a la regeneración de nitrógeno por la mineralización de materia orgánica de alta calidad asentada en la interface agua-sedimento (Hargreaves, 1998). Los niveles de NOP registrados durante el bioensayo tuvieron una correlación al efecto de la proteína y la talla, con los valores más altos en niveles proteicos a mayores tallas.

Burford *et al.* (2004) trabajaron con tres dietas con diferentes niveles proteicos (30, 35 y 40 %) con *P. monodon* y reportaron que la proporción de nitrógeno más grande encontrada en todos los tratamientos fue nitrógeno particulado (50%) seguido de NOS (34-40%) además de que las concentraciones de NOS en los tanques fueron correlacionados al contenido proteico, por lo que concluyen que la fuente de NOS en la columna de agua fue principalmente alimenticia. Sus niveles de amonio también aumentaron con el contenido proteico de las dietas aunque no significativamente, por lo que se deduce que se debe a mayor consumo de proteína por parte del camarón.

Dietas con bajo contenido proteico, perfil de aminoácidos óptimo, una proporción óptima proteína/energía de la comida han sido propuestos para minimizar

los contaminantes de las descargas para el beneficio de los ecosistemas estuarinos y costeros. Las tasas y cantidades de la excreción amoniacal pueden ser afectadas por varios factores ambientales y fisiológicos, tales como el estado nutricional (Kristianssen y Hessen, 1992). En sus resultado Cruz Suárez (2000) afirma que los resultados para *L.vannamei* siempre fueron mejores con las dietas de proteína animal dominante, los mejores crecimientos y tasas de conversión fueron provistos por las dietas con un nivel de inclusión de proteína igual o mayor al 25%, en una respuesta simétrica para ambas proporciones de proteína vegetal/animal. Lo mismo ocurre en términos de referencia proteica: los animales empiezan a desperdiciar la proteína a partir de un nivel de inclusión de 30%, por lo que concluyen que en juveniles de esta especie con alimentación dos veces por día, el nivel óptimo de proteína dietaria es de 25%, para ambas proporciones de proteína vegetal/animal. Las dietas con proteína animal dominante ofrecieron una mayor aceptación (atractancia y/o palatabilidad).

La baja recepción de nitrógeno en la dieta puede ser causado por varios factores: formulaciones alimenticias subóptimas o calidad de ingredientes, sobrealimentación y poca estabilidad de los alimentos. Mucha de la investigación acerca de la nutrición de camarones ha sido enfocada en la mejora de formulaciones para minimizar la lixiviación de productos disueltos de los alimentos, y mejorar la retención de nutrientes por parte de los camarones. La investigación del reciclamiento de nutrientes en los estanques así como la optimización la formulación de alimentos tiene potencial para mejorar significativamente la retención alimenticia y reducir el desperdicio de nitrógeno (Burford y Williams, 2001).

Aranyakananda *et al.*, (1993), no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *L. vannamei* alimentados con dietas de 25, 35 y 45% de proteína cruda, sin embargo cuando compararon dietas de 10, 15, 20 y 25% de proteína, el crecimiento con la de 10% fue significativamente menor que la de los demás. La mayor fuente de compuestos nitrogenados de los sistemas de cultivo proviene del metabolismo de proteína contenida en los alimentos. El amonio es el principal producto final del catabolismo de proteínas excretados por peces, crustáceos y moluscos (Campbell, 1973). La urea es el otro único producto nitrogenado excretado en cantidades significativas, pero en teoría es rápidamente hidrolizado a amonio y dióxido de carbono, pero bajo ciertas condiciones como pH e hiperamonía puede permanecer en su estado molecular por más tiempo (Calderón, 2004). El amonio es oxidado a nitrato en un proceso lento de dos pasos hecho por dos grupos de bacterias aeróbicas. Consecuentemente, el amonio y urea serán los principales compuestos en los sistemas de flujo continuo. Debido a la baja toxicidad de la urea y su rápida conversión a amonio y CO₂, la urea no es considerada y contabilizada en los diseños de los sistemas de cultivo (Colt y Armstrong, 1981).

Dentro del proceso de excreción nitrogenada hay varios mecanismos fisiológicos en los que se puede descomponer como la excreción de rutina, que es aquella cuando los animales se encuentran en actividad espontánea, la excreción estándar, que es el producto de los procesos fisiológicos basales, y la excreción post-alimentaria, producto de la degradación de las proteínas ingeridas en el alimento (Rosas-Vásquez, 1999).

Los acuicultores siempre usan elevados niveles de proteína para promover el rápido crecimiento de los camarones dentro de sus estanques, pero los desechos de la sobreutilización y lixiviación de los alimentos ricos en proteína pueden degradar la calidad de agua (Beseres *et al.*, 2005). La temperatura tiene un efecto importante sobre el consumo del alimento y por lo tanto del crecimiento. De acuerdo a Van Wyk (1999), el consumo de alimento es óptimo en niveles de temperatura entre 27 y 31°C, disminuye por debajo y por arriba de estas temperaturas, hasta en un 50% cuando la temperatura cae hasta 24°C y cesa cuando la temperatura está por debajo de los 20°C. Debido a estos factores se buscó homogenizar las temperaturas experimentales en todos los tratamientos proteicos y en todas las tallas durante todo el periodo de incubación a 30°C, para evitar el efecto de variaciones de temperatura en el sistema. Por lo que se considera que la temperatura del agua contenida en los garrafones experimentales (30°C) al mantenerse dentro de este rango propició condiciones óptimas para el consumo de la totalidad del alimento suministrado.

La gran mayoría de los estudios que se han hecho de excreción nitrogenada en camarón, se han enfocado casi por completo al amonio, que si bien es el componente más importante del espectro nitrogenado, no es el único. Compuestos del NOD y el NOP no han sido estudiados dentro de una visión integral del ambiente de cultivo, por lo que las cuantificaciones nitrogenadas, en el mejor de los casos han sido analizadas cuantitativamente como NT, no hay un análisis cualitativo que permita saber bajo que compuestos esta integrada la carga de nitrógeno que se vierte en los cuerpos receptores.

Por otro lado, sólo estudios mas recientes han empezado a investigar el comportamiento del nitrógeno y fósforo relacionado con la actividad acuícola (Páez-Osuna y Ruíz-Fernández, 2005; Lacerda, 2006). En estos estudios, tanto del nitrógeno como el fósforo se abordan desde el punto de vista ambiental, como contaminación a los sistemas costeros, sin ninguna caracterización de los componentes de ambos elementos, lo cual representaría información importante sobre la biodisponibilidad del material vertido, así como su impacto sobre el área, lo cual podría prevenir posibles fenómenos que actualmente ocurren en estos cuerpos de agua, tal como la eutrofización, en la cual el nitrógeno y el fósforo están involucrados.

En los distintos sistemas de cultivo se calcula que en promedio, solo 25% del nitrógeno añadido como alimento y otras fuentes de nutriente es recuperado por el organismo objetivo; el resto entra al sistema como nutrientes particulados y disueltos. Burforf *et al.* (2004), reportaron que conforme aumenta el contenido proteico, también aumenta la proporción de nitrógeno que era descargado vía recambios de agua, que iba de un 29 a un 36%, esto como resultado del aumento en la concentraciones de NT y PT en la columna de agua con la proteína de las dietas. Las fuentes proteicas tales como las harinas de pescado y soya son de los componentes más caros en los alimentos formulados y una mejora en la eficiencia en la asimilación y utilización del nitrógeno mejorará la economía de la acuicultura de camarón. La inherente eficiencia en la utilización de nutrientes por el camarón implica que la carga de nitrógeno de los estanques pueda ser limitada por la capacidad de asimilar la excreción nitrogenada, la cual puede tener impactos severos en la calidad del agua y el crecimiento, se considera

que la acumulación del NID constituye el segundo factor que limita la tasa de alimentación en los estanques después del oxígeno (Hargreaves, 1998).

De acuerdo con los experimentos de Martínez-Córdova (2003) con *L. vannamei*, los alimentos con niveles de proteína bajos, resultan en mejores parámetros de producción, mientras que el uso de alimentos con niveles de proteína elevados pueden ser innecesarios si se mantiene una buena productividad en los estanques. La disminución del nivel proteico contenido en las dietas para *L. vannamei* de 40 a 20% en los estanques, no disminuyó la producción de camarón (Techiert-Coddington y Rodríguez, 1995) por lo que algunas granjas de cultivo intensivo de ésta especie han utilizado dietas con menor contenido proteico (McIntosh y Avnimelech, 2001).

González-Félix *et al.* (2006) evaluaron el presupuesto de nitrógeno en *L. vannamei* en sistemas experimentales, mediante el uso de alimentos con 25, 30, 35 y 40% de proteína, encontraron que los animales alimentados con 25% de proteína asimilaron un 42.9% en biomasa, mientras que los alimentados con el de 40% solo asimilaron un 31.5%.

El fósforo total (PT) en este trabajo tuvo un comportamiento relacionado o afectado por el contenido proteico y la talla de los animales, alcanzado una concentración máxima de 6 μ moles. El fósforo orgánico constituye una parte significativa pero variable del fósforo disuelto, presentándose en las capas superiores del océano, éste se origina en las descargas continentales de agua dulce, la excreción de organismos marino y descomposición de materia orgánica. El fósforo orgánico particulado existe en el mar en una gran gama de compuestos orgánicos de fósforo

asociados a la biomasa de los organismos marinos y sus productos de degradación, y gran parte de éste es regenerado como inorgánico (Páez-Osuna y Ruiz-Fernández, 2005). De acuerdo con Follmi *et al.*(1996) el fósforo puede ejercer funciones limitantes en grandes partes de la biosfera, debido a la casi ilimitada disponibilidad del nitrógeno atmosférico, ya que puede desarrollar más rápidamente los cambios en la disponibilidad de los componentes nitrogenados. Algunas de las consecuencias del impacto de altas concentraciones del Fósforo en el ambiente acuático son: limitación a las comunidades marinas en general por el desarrollo de condiciones anaeróbicas en los fondos acuáticos, reducción de cadenas alimenticias, ecosistemas simplificados, cambio a especies fitoplactónicas oportunistas, aumento en intensidad y frecuencia de las mareas rojas, altas tasas de productividad primaria, entre otras.

En este trabajo se obtuvo que los ortofosfatos proveniente del metabolismo de las proteínas contenidas en las dietas, sin importar su porcentaje de inclusión, es menor a 1 μ moles a las 24 de la digestión. Es decir que la parte biodisponible del espectro de fósforo no pasa del 1%, ya que alrededor del 9% se encuentra como PS y necesita procesos químicos que lo transformen en compuestos aprovechables por la comunidad; el resto (80%), es POP el cual es sedimentado. Se ha reportado un tiempo de 24 horas para la digestión completa de *P. semisulatus* (Al-Mohanna y Not, 1987), mientras que para *P. setiferus* se han obtenidos períodos de digestión completa en 8 horas (Rosas *et al.*, 1995). Sin embargo se considera que un período de 24 horas es un tiempo definitivo para la completa digestión en la mayoría de los crustáceos.

Por el contrario Samocha *et al.* (2006) al evaluar alimentos con 21 y 31% de proteína en *L. vannamei*, encontraron que los niveles de fósforo totales del tratamiento de menor inclusión proteica fueron significativamente mas altos.

El fósforo se encuentra en bajas concentraciones de manera natural en el agua marina, por lo que los organismos marinos están limitados para la absorción de compuestos de fósforo contenidos en el agua, por ello el fósforo contenido en las dietas es una fuente necesaria. Debido al poco entendimiento de los requerimientos del fósforo por parte del camarón así como la baja biodisponibilidad de diferentes formas de este compuesto, hay una tendencia a sobreproveer su inclusión lo que da como resultado el incremento en los desechos de compuestos de fósforo residual.

En el Golfo de California, Paez-Osuna *et al.*(1999; 2003) estimaron que la exportación de nitrógeno y fósforo de las granjas locales era alrededor de 112 y 32 kg/ha por año. La cantidad de alimento sin consumir depende del manejo, especie involucrada, condiciones ambientales y el tipo de alimento. En el caso de sistemas extensivos y semi-intensivos, 40.5% del nitrógeno añadido con la comida es recuperado como biomasa de la cosecha, y consecuentemente 59.5% es liberado en el agua del estanque, y un 30.4% del fósforo es recuperado y el resto es liberado. El nitrógeno y fósforo restante es liberado a la columna como descomposición o productos de excreción y eventualmente incorporado en los ciclos naturales de estanque. El nitrógeno es liberado a través del recambio de agua, sedimentos y volatilización y denitrificación a la atmósfera, mientras que el fósforo es liberado del estanque vía el recambio y los sedimentos (Paez-Osuna y Ruíz-Fernández, 2005).

Briggs y Funge-Smith (1994), calculó que en promedio, ciertas granjas intensivas en Tailandia, solo 23% del de nitrógeno y 12% del fósforo introducido al sistema, fue incorporado a la biomasa del camarón (*P. monodon*) en un ciclo de producción. De manera similar Boyd y Teichert-Coddington (1995) calcularon el presupuesto para nitrógeno y fósforo para la producción de *L. vannamei* bajo condiciones semi intensivas de cultivo, y reportaron que las tasas de recuperación fue de 45.3% para nitrógeno y 21.3% para P. Sin embargo, las tasas de recuperación para nutrientes comúnmente usados varían de un 20 a un 40% para nitrógeno y de un 10 a un 25% para fósforo (Burford *et al.*, 2001; McIntosh 2000; Teichert-Coddington *et al.*, 1995).

CONCLUSIONES

- ❖ La metodología de evaluación de nitrógeno y fósforo residual utilizada en este trabajo permitió determinar que el nivel de proteína en alimentos para camarón incrementa en NRT, PRT, NOP, POP, PIS, NIS, amonio, nitritos, nitratos y urea, mientras que disminuye el NOS.
- ❖ La técnica de oxidación con persulfatos subestima los niveles de nitrógeno residual con respecto a la técnica de reducción de Kjeldahl, con el aumento de la concentración de nitrógeno.
- ❖ Los algoritmos desarrollados para la elaboración de alimentos, así como su formulación y preparación lograron cumplir con los objetivos específicos y generales de los alimentos preparados.
- ❖ El diseño experimental permitió realizar los bioensayos con un 100% de supervivencia y una ingestión completa de los alimentos utilizados.

RECOMENDACIONES

- ❖ Cuando las concentraciones de nitrógeno excedan los 40 μmoles se sugiere diluir las muestras antes de digerirlas.
- ❖ Cuando se utilice agua marina artificial, el agua y las sales en conjunto no deben de exceder 7.139 μmoles .
- ❖ Cuando las muestras tengan concentraciones de C orgánico mayores de 150 mg/L debe diluirse la muestra.
- ❖ Se recomienda realizar un análisis del NOS para identificar sus componentes.
- ❖ Se recomienda evaluar esta metodología con organismos de mayor tamaño.
- ❖ Correlacionar estos datos con el estudio clásico de nutrición.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Akiyama, D. M. 1988. Soybean meal utilization by marine shrimps. AOCS World congress on vegetable protein utilization in human food and animal feedstuffs, Singapore, October 2-7. American Soybean Association, Singapore.
- Al-Mohanna, S. Y., J. A. Nott. 1986. B-cells and digestión in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapada): J, Mar. Biol. Assoc. U.K. 66, 403-414.
- Alava, V.R., Pascual, F.P., 1987. Carbohydrate requirements of *P.monodon* (Fabricius) juveniles. Aquaculture 61, 211-217.
- Allen Davis, D., D. O. Jirsa, J. P. Lazo y C. R. Arnold. 1994. Evaluación de dietas nutricionalmente densas en la curvina *Scianus ocellatus* (Red Drum) . In; Mendoza-Alfaro R., L.E. Cruz Suárez, D. Ricque-Marie (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola II-Memorias del Segundo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, Monterrey N. L., 7-10 noviembre de 1994. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, México, ISBN #968-7808-61, 161-180.
- Álvarez-Torres, P., F. Soto, S. Áviles-Quevedo, C. Díaz-Luna y L. M. Treviño-Carrillo. Panorama de la Investigación y su repercusión sobre la producción acuícola en México. Panorama Acuícola III.
- Aminot, A. y R. Kerouel. 1982. Dosage automatique de l'úree dans l'eau de mer: un methode tres sensible a la diacetylmonoxime. Can. J. Fish. Aqua. Sci. 39: 174-183.

- APHA, 1990. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington, D. C.
- Aranyakananda, P. y A.L. Lawrence. 1993. Dietary protein and energy requirements of the white-legged shrimp, *Penaeus vannamei*, and the optimal protein to energy ratio. In: From Discovery to Commercialization. European Aquaculture Soc., Oostende (Belgium), p. 21.
- Aranyakaranda, P. Lawrence, A.L. 1994. Efectos de la tasa de ingestión sobre los requerimientos alimenticios en proteína y energía y la relación óptimo proteína-energía para *Penaeus vannamei*. In; Mendoza-Alfaro R., L.E. Cruz Suárez, D. Ricque-Marie (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola II-Memorias del Segundo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, Monterrey N. L., 7-10 noviembre de 1994. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, México, ISBN #968-7808-61, 157-170.
- Arnold, M. A. 1983. Improved dynamic response of potentiometric ammonia sensors using pure teflón membranas. Analytica Chim. Acta 153: 33-39.
- Benson, B. L., R: J. Mullen y B. B. Dean. 1996. Three new green asparagus cultivars: Apollo, Atlas and Grande and one purple cultivar, Purple passion. Acta Hort. 415: 50-56.
- Berger, C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. Asociación Langostina Peruana (ALPE). 102-110.

- Berman, T., C. Bechemin, y S. Y. Maestrini, 1999. Release of ammonium and urea from dissolved organic nitrogen in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* 16, 295-302.
- Beseres, J. J., A. L. Lawrence y R. J. Feller. 2005. Variation in fiber, protein and lipid content of shrimp feed-effects on gut passage times measured in the field. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 24. No. 1, 301-308.
- Boyd, C. E. y Y. Musig. 1981. Orthophosphate uptake by phytoplankton and sediment. *Aquaculture* 22: 165-173.
- Boyd, C. E. y D. Teichert-Coddington, 1995. Dry matter, ash and elemental composition of pond culture *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society* 26: 88-92.
- Briggs M. y S. Funge-Smith. 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. *Aquaculture and Fisheries Management* 25:789-811.
- Bronk, D. A., M. W. Lomas, P. M. Glibert, K. J. Schukert y M. P. Sanderson. 2000. Total dissolved nitrogen analysis: comparisons between the persulfate, UV and high temperature oxidation methods. *Marine Chemistry* 69: 163-178.
- Brown, P. B. 2002. Soybean Meal in Aquaculture. Soybean Growers for the feed Industry. Special Aquaculture Edition.
- Burford, M. A. y K. C. Williams. 2001. The fate of Nitrogenous waste from shrimp feeding. 2001. *Aquaculture* 198, 79-93.
- Burford, M. A. y K. Lorenzen. 2004. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediment remineralization. *Aquaculture* 229: 129-145.

- Burford, M. A., D.M. Smith, S. J. Tabrett, F. E. Coman, P. J. Thompson, M.C. Barclay y P.J. Toscas. 2004. The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp, *Penaeus monodon* in outdoor tanks. *Aquaculture Nutrition* 10; 15-23.
- Calderón, C. 2004. Evaluación de los componentes moleculares de la excreción nitrogenada de *Litopenaeus vannamei* (Boone) en función de la actividad, pH, niveles de amonio y oxígeno. Tesis de Licenciatura. UABCS. 67 pp.
- Campbell, J. W. (1973). Nitrogen excretion. In *Comparative Animal Physiology*. Third edition (ed. S. L. Prosser), pp. 279-316. Philadelphia:Saunders College Publishing.
- Chen, J.C. y C.Y. Lin. 1995. Responses of oxygen consumption, Ammonia-N excretion and Urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture* 136, 243-255.
- Chen, J. C. y K.W. Chen. 1996. Hemolymph oxyhemocyanin, protein levels, acid-base balance, and ammonia and urea excretions of *Penaeus japonicus* exposed to saponin at different salinity levels. *Aquatic Toxicology* 36, 115-128.
- Cho, C. Y., C. B. Cowey y T. Watanabe. 1985. *Finís Nutrition in Asia. Methodological Approach to Research and Development*. IDRC, Ottawa. 233-e 154 pp.
- Chen, J. C. y CH. T. Kou. 1996. Nitrogenous excretion in *Macrobrachium resenbergi* at different pH levels. *Aquaculture* 144: 155-164.

- Cho, B. C., J. K. Choi, C. S. Cheng, C. H. Hung. 1994. Unwarping of bacteria and phytoplankton during a spring diatom bloom in the mouth of the Yellow Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43: 1-10.
- Cho, B. C. y F. Azam. 1995. Urea decomposition by bacteria in the Southern California Bight and its applications for the mesopelagic nitrogen cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122: 21-26
- Claybrook, D: L. 1983. Nitrogen metabolism. In: Mantel, anatomy and physiological regulation. Academic. Press, New York, p. 163-213.
- Clifford, H. 1999. Manejo de estanques sembrados con camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. *Panorama Acuícola*, 4(3) 12-13.
- Colt, J. E. y D. A. Armstrong. 1981. Nitrification toxicity to crustaceans, fish and mollusks, p. 33-47. In L. J: Allen y E. C. Kennedy (eds). *Proceeding of the American Society (FCS publ.1) Bethesda, Maryland.*
- Colvin, L. B. y C. W. Brand. 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life cycle stages in controlled environment systems. *Proceedings of the World Mariculture Society* 8, 821-840.
- Comoglio L. I., Gaxiola, G., Roque, A., Cuzon, G. y Amin, O. 2004. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 23, No. 1, 243-249.
- Cook, H. L. y H. C. Clifford. 1997. Managing water discharge from semi-intensive shrimp ponds. *Aquaculture Magazine*. Vol. 23, no. 2, pp. 31-39.

- Cortés-Jacinto, E., H. Villarreal-Colmenares, L. E. Cruz-Suárez, R. Civera-Cerecedo, H. Nolasco-Soria y A. Hernández-Llamas. 2005. Effect of dietary protein and lipid levels on growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Nutrition* 11; 283-291.
- Cousin, M., G. Cuzon, E. Blanchet, F. Ruelle, AQUACOP. 1993. Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ratio for *Penaeus vannamei* juveniles. In: Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop; Fish Nutrition in Practice (Kaushik, S. J. y P. Luquet) pp. 599-606. INRA
- Cowey, C. B. 1994. Aminoacid requirement of fish: A critical appraisal of present values. *Aquaculture* 4, 1-11.
- Cozzi, S. 2004. A new application of the diacetyl monoxime method to the automated determination of dissolved urea in seawater. *Mar. Biol.* 145: 843-848.
- Cruz-Suárez, L. E. J. S. Antimo Pérez, N. Luna-Mendoza, M. Tapia-Salazar, C. Guajardo Barbosa, D. Ricque-Marie. 2000. Relaciones proteína/energía y proteína vegetal/animal óptimas en alimentos de engorda para *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*. In: Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22. Noviembre 2000. Mérida, Yucatán.
- Cuzon, G. y G. Ceccaldi. 1973. The effect of starvation on the metabolism of the shrimo *Crangon crangon* (L). *C.R. Séances Soc. Biol. Fil.* 167: 66-69.

- Cuzon, G., C. Cahu, J. F. Aldrin, J.L. Messenger, G. Stephan y M. Mevel. 1980. Starvation effect of metabolism of *Penaeus japonicus*. World Maricultura Society Proceedings 11: LSU, Baton Rouge, LA, pp. 410-430.
- Dall, W. y D. M. Smith. 1986. Oxygen consumption and ammonia excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture* 55: 22-23.
- Dall, W., B. J. Hill, P. C. Rothlisberg y D. J. Staples. 1990. The Biolog of Penaeidae, advances in Marine Biology, vol. 27. Academic Press, New York, 489 pp.
- Davis, D. A. y C. R. Arnold. 1994. Estimation of inorganic phosphorus availability from inorganic phosphorus sources for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, Vol. 127. No 2-3. 245-254.
- Decamp, O., J. Cody, L. Conquest, G. Delanoy y A. G. J. Tacon. 2003. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water Exchange culture systems. *Aquaculture Research*, 34, 345-355.
- DeManche, J. M, H. Curl Jr., y D. D. Coughenower. 1973. An automated analysis for the urea in seawater. *Limnol. Ocenogr.* 18: 686-689.
- Escutia, S. (1998). El alimento balanceado para camarón en México desde el punto de vista del Acuicultor. *Avances en Nutrición Acuícola* III.
- Föllmi., K. B., Weissert, H., Bisping, M y Funk, H. (1994) Phosphogenesis, carbon isotopic stratigraphy and carbonate platform evolution along the Lower Cretaceous northern Tethyan margin: *Geol. Soc. Am Bull.*, Vol.106, pp. 729-746.

- Gardner, W. S. 1978. Microfluorometric method to measure ammonia in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 23: 1069-1072.
- Gaxiola, G., P. Gallardo, R. Ravallec, C. Durruty, T. García, G. Cuzon, A. Van Wormhoundt, R. Pedroza. 2002. Avances del uso de alimentos artificiales en la larvicultura de camarón. In: Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Gaxiola-Cortés, N. Simoes. (Eds). Avances de Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Glibert, P. M. y D. E. Terlizzi. 1999. Co-occurrence of elevated urea levels and dinoflagellate blooms in temperate estuarine aquaculture ponds. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5594-5596.
- Glibert, P. M., R. Magnien, M.W. Lomas, J. Alexander, C. Fan, E. Haramoto, M. Trice y M. Kana. 2001. Harmful algal blooms in the Chesapeake and coastal bays of Maryland, USA: Comparison of 1997, 1998 and 1999 events. *Estuarios* 24: 875-883.
- Glibert, P. M., T. M. Trice, B. Michael y L. Lane. 2005. Urea in tributaries of the Chesapeake and coastal bays of Maryland. *Water Air Soil Pollut.* 160: 229-243.
- Goeyens, L., N. Kindermans, M. A. Yusuf y M. Elskens. 1998. A room temperature procedure for the manual determination of urea in seawater. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 47: 415-418.
- Gómez-Jiménez S., M. L. González-Félix, M. Pérez-Velásquez, D. A. Trujillo-Villalba, I. R. Ezquerro-Braue y R. Barraza-Guardado. 2005. Effect of dietary protein

- level on growth, survival and ammonia efflux rate of *Litopenaeus vannamei* (Boone) raised in a zero water Exchange culture system. *Aquaculture Research*, 36, 834-840.
- González-Félix, M. L. y M. Pérez.-Velásquez. 2006. Un Panorama de los Presupuestos de Nitrógeno para Cultivo de Camarón. *Avances de Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Mazatlán, Sinaloa, México.*
- Hardy, R. W. y D. Gatlin. 2002. Nutritional strategies to reduce nutrient losses in intensive aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés y N. Simoes.(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.*
- Hargreaves, J. A. 1998. Nitrogen biochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166, 181-212.
- He, H. y A. L. Lawrence. 1993. Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 114: 305-316.
- Hernández-López, J. y F. Vargas-Albores. 2003. A microplate technique to quantify nutrients (NO₂, NO₃, NH₄ y PO₃₄) in seawater. *Aquaculture Research* 34, 1201-1204.
- Hewitt, D. R. y M. G. Irving. 1990. Oxygen consumption and ammonia excretion of the brown tiger prawn *Penaeus esculentus* fed with diets of varying protein content. *Comparative Biochemistry and Physiology* 96A, 373-378.

- Hunter, D. A. y R. F. Unglow. 1993. A technique for the measurement of total Amónio in small volumes of seawater and haemolymph. *OPHELIA* 37 (1): 31-40.
- Jackson, C. y N. Preston, P. J. Thompson, M. Burford. 2003. Nitrogen Budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture* 218, 397-411.
- Jiang D. H., L.L. Addison, W. H. Neill y H. Gong. 2000. Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 253, 193-209.
- Jory, D., T. Cabrera, D. Dugger, D. Fegan, C. Berger, J. Orrantia, A. Wainberg, H. Perez, J. Castañeda, R. McIntosh, M. Moya, C. Jackson, W. Vargas and L. Evans. 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. *Aquaculture 2001, The Annual International Conference and Exhibition of the World Aquaculture Society, Book of Abstracts*, Jan 21-25, 2001. Orlando, Florida, USA, p.318.
- King, F. D., T. L. Cucci y R. R. Bidigare. 1984. A pathway of nitrogen metabolism in marine decapod crabs. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 80B, No. 3, 401-403.
- Koroleff, F. 1976. Total and organic nitrogen. En: K. Grasshoff, *Methods of Seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 167-173.
- Koroleff, F. 1978. On the peroxodisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate. *Water Res.*, 12: 1123-1130.
- Koroleff, F. 1983. Determination of ammonia en: Grasshoff, K., M. Erhardt y K. Kremling, eds. *Methods of Seawater analysis*. 2nd Edition, p: 150:157.

- Koshio, S., J. D. Castell y R. K. O'Dor. 1992. The effect of different dietary energy levels in crab-protein-based diets on digestibility, oxygen consumption, and ammonia excretion of bilaterally eyestalk-ablated and intact juvenile lobsters, *Homarus americanus*. *Aquaculture*, 108: 285-297.
- Kristianssen, G. y D. O. Hessen. 1992. Nitrogen and phosphorus excretion from the noble crayfish, *Atacus astacus* L., in relation to food type and temperature. *Aquaculture*
- Kureshy, N. y D.A. Davis. 2000. Metabolic requirements for protein by pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. In: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Sálazar, M. A. Olvera-Novoa, R. Civera-Cerecedo (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Lacerda, L. D. 2006. Inputs of Nitrogen and Phosphorus to estuaries of Northeastern Brazil from intensive shrimp farming. *Braz. J. Aqual. Technol.* 10(2) 13-27.
- Lee, W. C. y J. C. Chen. 2003. Hemolymph ammonia, urea and uric acid levels and nitrogenous excretion of *Marsupenaeus japonicus* at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 288: 39-49.
- Le Corre, P. y P. Treguer. 1976. Contribution a l'étude de la matiere organique dissoute et des sels nutritifs dans l'eau de mer. Caracteristiques chimiques du Golfe de Gascogne et des upwellings cotiers de l'Afrique de Nord-Ouest. *These Doct. Etat. Univ. Bretagne Occidentale (Oceanographie)* 490 pp.

- Lemos, D y V. N. Phan. 2001. Energy partitioning into growth, respiration, excretion and exuvia during larval development in the shrimp *Farfatepenaeus paulensis*. *Aquaculture* 199: 131-143.
- Liu, Y. J., D. H. Liu, J. FENA, L. X. Tian. 2000. Soy protein concentrate can efficiently replace fish meal in tigre shrimp feeds. Research report Fish Nutrition Laboratory, Zhongshan University, P. R. China.
- Lorenzen, K., J. Struve, V. J. Cowan. 1997. Impact of farming intensity and water management in nitrogen dynamics in intensive pond culture: a mathematical model applied to Thai commercial shrimp farms. *Aquaculture Research* 28, 493-507-
- Magallón-Barajas, F. J. 2005. Capacidad de carga, capacidad ambiental, y eficiencia en el uso del nitrógeno, en la acuicultura del camarón de la zona costera del Golfo de California. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Martínez-Córdova, L. R., A. Campana-Torres y M. A. Porchas-Cornejo. 2003. Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition* 9: 155-160.
- Mantoura, R.F.C. y E. M. S. Woodward. 1983. Optimization of the indophenol blue method for automated determination of ammonia in estuarine waters. *Estuar. Cstl. Mar. Sci.* 17: 219-224.

- Mente, E., P. Coutteau, D. Houlihan, I. Davidson y P. Sorgeloos. 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *The Journal of Experimental Biology* 205, 3107-3122.
- McCarthy, J. J. 1970. A urease method for urea in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 15: 309-313.
- McIntosh, R.P., Avnimelech, Y., 2001. New production technologies. *Global Aquaculture Advocate* 4 (4), 54-56.
- Mente, E., P. Coutteau, D. Houlihan, I. Davidson y P. Sorgeloos. 2002. Protein turnover, aminoacid profile and aminoacid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source *The Journal of Experimental Biology* 205, 3107-3122.
- Molina-Póveda, C y R. Civera. 1998. Disminución de la proteína en el alimento del camarón como una estrategia para reducir el impacto ambiental. In IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola vol. 2 (Eds. Roberto Civera Cerecedo, Claudia J. Pérez Estrada, L. D. Ricque Marie y L. E. Cruz Suárez). La Paz, B. C. S. México: Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste.
- Montoya, R. A., A. L. Lawrence, W. E. Grant, M. Velasco. 2002. Simulation of inorganic nitrogen dynamics and shrimp survival in an intensive shrimp culture system. *Aquaculture Research* 33; 81-94.

- Mulvenna, P. F. y G. Savidge. 1992. A modified manual method for the determination of urea in seawater using diacetylmonoxima reagent. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 34: 429-438.
- Needham, J. 1931. *Chemical Embriology*. Part 3, Chap 9. Cambridge University Press.
- Newell, B. S., B. Morgan y J. Cundy. 1967. The determination of urea in seawater. *J. Mar. Res.* 25: 201-202.
- Páez-Osuna, F. y A.C. Ruiz-Fernández. 2005. Environmental load of nitrogen and fosforus from extensive, semiintensive and intensive shrimp faros in the Gulf of California Ecoregion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74: 681-688.
- Patton, G. B. y S. R. Crouch, 1977. Spectrophotometric and kinetic investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Analyt. Chem.* 49: 464-469.
- Peisker, M. 2001. Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition. *Cahiers Options Mediterraneennes.* 54, 103-107.
- Pillai, B. R. y A. D. Diwan. 2002. Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia ecretion rates of the marine shrimp *Metapenaeus cenoceros*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(1): 45-52.
- Price, N. M. y P. J. Harrison. 1987. Comparison of methods for the analysis of dissolved urea in seawater. *J. Mar. Res.* 25: 201-202.
- Rahmatullah, M. y T. R. C. Boyde. 1980. Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxima; methods with and without deproteinisation. *Clinica Chimica Acta*, 107, 3-9.

- Regnault, M. 1987. Nitrogen excretion in marine and freshwater crustaceans. *Biol. Rev.* 62: 1-24.
- Revilla, M., J. Alexander y P. M. Glibert. 2005. Urea análisis in coastal waters: comparison of enzymatic and direct methods. *Limnol. Oceanogr. Methods* 3, 290-299.
- Robertson, L., A. Lawrence, y F. L. Castille. 1993 Effect of feeding frequency and feeding time in growth of the *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquacult. Fish. Manage.* 24, 1-6.
- Rosas, C., A. Sánchez, E. Díaz, L.A. Soto, G. Gaxiola y R. Brito. 1996. Effect of dietary protein level on apparent heart increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* y *P. notialis* postlarvae. *J. World Aquaculture. Soc.* 27, 92-102.
- Rosas, C. G. Cuzon, G. Tabeada, C. Pascual, G. Gaxiola y A. Van Wormhoundt. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research*, 32, 531-547.
- Rosas, C., R. Brito, A. Sánchez y G. Gaxiola. 2003. Bioenergética de crustáceos decápodos con énfasis en camarones peneidos. *Jornadas Iberoamericanas de Nutrición en Acuicultura. Avances de la Nutrición de camarones Peneidos: Hacia la optimización de alimentos y estrategias de Alimentación para una Camaronicultura Sustentable.* Colombia

- Samocha, T. M., S. Patnaik y R. L. Gandy. 2006 Heterotrophic intensification of Pond Shrimp Production. The Film International Conference of Recirculating Aquaculture.
- Schmitt, A. S. C. y E. A. Santos. 1998. Ammonia-N efflux rate and nutritional state of juvenile pink shrimp, *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante), in relation to food type. *Aquaculture Research*, 1998, 29, 495-502.
- Sharma, M. L. y M. C. Neveu. 1969 Studies on the role of ornithine cycle and purine catabolism in urea biosynthesis in the fresh-water crayfish, *Orconectes rusticus*. Pergamon Press. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 40B, pp 863 a 870
- Sharp, J. H. 1983. The distribution of inorganic nitrogen and dissolved and particulate organic nitrogen in the sea. In: Carpenter, E.J., Capone, D. G. *Nitrogen in the Marine Environment*. Plenum, pp. 124-138.
- Shiau, S. Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture*, 164, 77-93.
- Smil, V. 2001. *Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch and the transformation of the world food*. The MIT Press
- Smith, L. P. Lee, A. L. Lawrence y K. Strawn. 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: Effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture* 46; 85-96.
- Solórzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 12, 799-801.

- Spaargaren, D. H. 1982. The ammonium excretion of the Shore Crab, *Carcinus maenas*, in relation to environmental osmotic conditions. Netherlands Journal of Sea Research 15: 273-283.
- Strickland J. D. y T. R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of seawater analysis. 2nd ed. Fisheries Research Board. Canada.
- Stuck, K. C., S. A. Watts y S. Y. Wang. 1996. Biochemical responses during starvation and subsequent recovery in postlarval Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Mar. Biol.*, 125: 33-45.
- Swick, R. A., D. A. Akiyama, M. Boonyaratpalin, D.C.Creswell. 1995. Use of soybean meal and synthetic methionine in shrimp feed. American Soybean Association, Technical Bulletin.
- Taboada, G., G. Gaxiola, T. García, R. Pedroza, A. Sánchez, L.A. Soto y C. Rosas. 1998. Oxygen consumption and ammonia-N excretion related to protein requirements for growth of white shrimp. *Penaeus setiferus* (L), juveniles. *Aquaculture Research*, 29: 822-833.
- Tacon, A. G. J. y C. B. Cowey. 1985. Protein and aminoacids requeriments. En: *Fish Energetics: New Perspectives* (Editado por Tyler, P. y P. Calow), pp 155-183. Croom Helm, Sidney.
- Tacon, A. G. J. 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and a shrimp: a training manual. FAO, GCP/RLA/075/ITA. FAO-FIELD Doc. 2 and 5. Brasilia, DF.
- a) Tacon, A.G. J., J. J. Cody, L.D. Conquest, S. Divakaran, I. P. Forster y O. E. Decamp. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of

Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8; 121-137.

b) Tacon, A.G.J. 2002. Thematic review of Feeds and Feed Management Practices in Shrimp Aquaculture. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium.

Teichert-Coddington, D. and R. Rodriguez. 1995. Inorganic fertilization and feed reduction in commercial production of *Penaeus vannamei* during wet and dry seasons in Honduras," in H. Egna, J. Bowman, B. Goetze, N. Weidner, (eds.), *Pond Dynamics/Aquaculture Collaborative Research Support Program, Twelfth Annual Technical Report*. PD/A CRSP, Office of International Research and Development, Oregon State University, 400 Snell Hall, Corvallis, OR, 97331-1641, USA. pp. 136-146.

Thakur, D. P. y C. K. Lin. 2003. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquacultural Engineering* 27, 159-176.

Toy, A. D. F. y E. N. Walsh. 1987. *Phosphorous Chemistry in Everyday Living*. Segunda Edición. American Chemical Society, Washington, D. C.

Valderrama, J. C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10; 109-122.

Van Wyk, 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. En: Van Wyl P., M. Davis-Hodgkins, R. Laramores, K. L. Main, J.

- Mountain y J. Scarpa. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems, pp 125-139. Harbor Branch Oceanographic Institution.
- Velasco, M. A. L. Laurence, F. L. Castille, L. G. Obaldo. 2000. Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D. Tapia-Salazar, M. Olvera-Novoa, M. y R. Civera-Cerecedo. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Weihrauch, D., S. Morris y D. W. Towle. 2004. Ammonia Excretion in aquatic and terrestrial crabs. *The Journal of Experimental Biology* 207, 4491-4504.
- Whitledge, T. E., S. C. Malloy, C. J. Patton y C. D. Wirick. 1981. Automated nutrient analysis in seawater. Department of energy and environment (Brookhaven National Laboratory Formal Report No. 51398).
- Wright, P. A., C. Wood y D. J. Randall. 1988. AN in vitro and in vivo study of the distribution of ammonia between plasma and red cells of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. exp. Biol.* 134, 423-428.
- Wright, P. 1995. Nitrogen Excretion: Three end products, many physiological roles. *The Journal of Experimental Biology* 198, 273-281.
- Young-Cho C. y D. P. Bureau. 1996. Bioenergética en la formulación de dietas y estándares de alimentación para la acuicultura del salmón: principios, métodos y aplicaciones en: Avances de Nutrición Acuícola III.
- Zendejas-Hernández, J. 1994. La camaronicultura en México. In: Memorias del Seminario internacional de Camaronicultura, Camarón. pp 1-12.

APÉNDICE I

Estadísticos.

Tabla 1. ANOVA para amonio

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	18023.96	1	18023.96	939.1457	0.000000
Proteina	3920.06	2	1960.03	102.1280	0.000000
Talla	5269.80	2	2634.90	137.2925	0.000000
Talla*Proteina	770.79	4	192.70	10.0406	0.000015
Error	690.91	36	19.19		

Tabla 2. ANOVA para amonio/g

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	3597.028	1	3597.028	639.1483	0.000000
Proteina	26.196	2	13.098	2.3274	0.113359
Talla	1173.364	2	586.682	104.2463	0.000000
Talla*Proteina	11.069	4	2.767	0.4917	0.741791
Error	185.719	33	5.628		

Tabla 3. ANOVA para nitritos.

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	37.39519	1	37.39519	14.22392	0.000584
Proteina	25.05541	2	12.52771	4.76513	0.014590
Talla	14.83071	2	7.41536	2.82056	0.072785
Talla*Proteina	57.97808	4	14.49452	5.51325	0.001441
Error	94.64527	36	2.62904		

Tabla 4. ANOVA para nitratos.

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
	1796.945	1	1796.945	105.9049	0.000000
	251.935	2	125.968	7.4240	0.001998
	217.708	2	108.854	6.4154	0.004139
	90.059	4	22.515	1.3269	0.278669
	610.831	36	16.968		

Tabla 5. ANOVA para Nitrógeno Inorgánico Soluble

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	26142.4668	1	26142.4668	609.855013	0
Proteina	5629.36977	2	2814.68489	65.661351	1.7074E-11
Talla	6259.74801	2	3129.87401	73.0141256	4.7831E-12
Talla*Proteina	1291.05657	4	322.764141	7.52948569	0.00027444
Error	1243.13406	29	42.8666916		

Tabla 6. ANOVA para Nitrógeno Inorgánico Soluble/g

	SS	Degree from freedom	MS	F
5874.004	1	5874.004	580.3088	0.000000
95.024	2	47.512	4.6938	0.017139
1470.047	2	735.024	72.6150	0.000000
61.159	4	15.290	1.5105	0.225066
293.544	29	10.122		

Tabla 7. ANOVA para Nitrógeno Orgánico Soluble

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	5152.096	1	5152.096	31.63975	0.000004
Proteina	2105.499	2	1052.749	6.46508	0.004766
Talla	1146.821	2	573.410	3.52139	0.042747
Talla*Proteina	505.259	4	126.315	0.77572	0.550003
Error	4722.250	29	162.836		

Tabla 8. ANOVA para Nitrógeno Orgánico Soluble/g

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	863.6844	1	863.6844	37.53770	0.000001
Proteina	192.7564	2	96.3782	4.18882	0.025229
Talla	183.9078	2	91.9539	3.99653	0.029311
Talla*Proteina	67.9188	4	16.9797	0.73798	0.573731
Error	667.2451	29	23.0085		

Tabla 9. ANOVA para Urea

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	15.75328	1	15.75328	139.4825	0.000000
Proteina	0.61477	2	0.30738	2.7216	0.081477
Talla	0.04971	2	0.02485	0.2201	0.803716
Talla*Proteina	1.30617	4	0.32654	2.8913	0.038259
Error	3.50117	31	0.11294		

Tabla 10. ANOVA para Urea/g

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	7.183389	1	7.183389	71.29201	0.000000
Proteina	1.881431	2	0.940715	9.33619	0.000612
Talla	0.150059	2	0.075029	0.74463	0.482719
Talla*Proteina	0.379126	4	0.094782	0.94067	0.452710
Error	3.325083	33	0.100760		

Tabla 11. ANOVA para Nitrógeno Orgánico Particulado

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	62658.30	1	62658.30	95.41528	0.000000
Proteina	22.77	2	11.39	0.01734	0.982822
Talla	6005.89	2	3002.94	4.57284	0.018785
Talla*Proteina	1502.34	4	375.58	0.57193	0.685111
Error	19044.02	29	656.69		

Tabla 12. ANOVA para Nitrógeno Total.

	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	1	218128.7	314.5761	0.000000
Proteina	2	6263.3	9.0327	0.000892
Talla	2	8181.4	11.7989	0.000178
Talla*Proteina	4	462.2	0.6666	0.620350
Error	29	693.4		

Tabla 13. ANOVA para Nitrógeno Total/g

	SS	Degree from freedom	MS	F	p
Intercept	62393.61	1	62393.61	536.0523	0.000000
Proteina	2345.38	2	1172.69	10.0751	0.000476
Talla	4867.79	2	2433.89	20.9107	0.000002
Talla*Proteina	452.49	4	113.12	0.9719	0.437950
Error	3375.44	29	116.39		

Tabla 14. ANOVA para Fósforo Total

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
INTERCEPT	347.2938	1	347.2938	175.1310	0.000000
TALLA	16.4128	2	8.2064	4.1383	0.023661
PROTEINA	1.8528	2	0.9264	0.4671	0.630338
T + P	1.2607	4	0.3152	0.1589	0.957718
Error	75.3560	38	1.9831		

Tabla 15. ANOVA para Fósforo Orgánico Soluble.

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
INTERCEPT	7.019452	1	7.019452	32.26019	0.000001
TALLA	0.779586	2	0.389793	1.79142	0.179527
PROTEINA	0.153497	2	0.076749	0.35272	0.704883
T + P	0.546994	4	0.136748	0.62847	0.644933
Error	8.921135	41	0.217589		

Tabla 16. ANOVA para Fósforo Orgánico Particulado

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
INTERCEPT	380.9301	1	380.9301	172.4683	0.000000
TALLA	11.6250	2	5.8125	2.6316	0.084086
PROTEINA	1.9764	2	0.9882	0.4474	0.642369
T + P	1.9505	4	0.4876	0.2208	0.925311
Error	90.5565	41	2.2087		

Tabla 17. ANOVA para Fósforo Inorgánico Soluble.

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
INTERCEPT	0.003395	1	0.003395	41.43618	0.000000
TALLA	0.002499	2	0.001250	15.25196	0.000011
PROTEINA	0.000069	2	0.000035	0.42224	0.658397
T + P	0.000339	4	0.000085	1.03534	0.400671
Error	0.003359	41	0.000082		

APÉNDICE II

TÉCNICAS DE COMPUESTOS NITROGENADOS

Amonio (Solórzano, 1969) modificada

Recomendaciones: La incubación de las microplacas se debe realizar en un lugar oscuro a temperatura ambiente en lugar de ser calentada. Método ajustado para un volumen de muestra de 150 μ L.

La formación del azul de indofenol puede ser acelerada:

- a) incrementando la concentración de reactivos como ha sido hecho en la mayoría de los procedimientos recientes.
- b) aumentando el pH de la reacción a más de 12.
- c) aumentando la temperatura de reacción hasta 80°C como en la mayoría de las determinaciones automáticas, por medio de microondas.

Equipo

El procedimiento principal se lleva a cabo en microplacas de poliestireno de 96 pozos. De preferencia todos los materiales que se utilicen para hacer la primera determinación, tales como micropipetas, pipetas de repetición, microplacas y distintos recipientes deben ser nuevos o limpiados con ácido previamente, bien enjuagados con agua estéril para evitar residuos de amonio y una vez utilizados mantenerlos cerrados y seguirlos utilizando en futuras determinaciones. Las determinaciones se realizan en un lector de microplaca a 415 nm?

La técnica puede manchar el fondo de los pozos de la microplaca cambiando futuras lecturas. Pueden quedar residuos de amonio.

Reactivos

A) Agua libre amonio. El agua utilizada para, tanto desionizada como marina, debe estar libre de amonio. Debe ser tratada antes del proceso; el agua desionizada es pasada por un proceso de autoclaveado durante 1 hora.

B) Agua Marina Natural. El agua marina debe de ser filtrada y hervida durante 5 minutos, posteriormente, se medir la salinidad y se ajustar al nivel marino (38 ppm). Comprobar corriendo una placa de blancos tanto marinos como desionizados.

C) Solución de Fenol (Sol. A).

- Disolver 10 gr de fenol (C_6H_5OH) grado reactivo en 100 mL de etanol al 95%.

Recomendaciones: Almacenar en refrigeración en botella ámbar fuertemente cerrada. Es estable por meses.

D) Solución de Nitroprusiato (Sol. B).

- Disolver 0.5 g de Nitroprusiato de sodio [$Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$] en 100 mL de agua deionizada.

E) Mezcla Oxidante al 150% (Sol. C).

- Mezclar 10 mL de **solución alcalina** (15 g de citrato de sodio + 0.75 g de hidróxido de sodio en 50 mL de agua deionizada) c/ 2.5 mL de hipoclorito de sodio comercial.

Recomendaciones: Prepararse en el momento de su uso y mantenerse tapada mientras no se esté utilizando.

F) Solución Estándar de Amonio. Pesar 3.82 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) y añadirle 996.18 mL de agua destilada o marina según sea el caso, para crear una solución 1 mg/mL. Mantener en refrigeración en botella ámbar fuertemente cerrada.

Muestreo y Preservación

Centrifugar la muestra para eliminar posible interferencia por sólidos. Utilizar congelación como método de preservación si las determinaciones no se realizan inmediatamente después del muestreo y aún una vez hechas, es recomendable mantenerlas estables para posibles verificaciones. Bajo estas condiciones las muestras son estables y confiables durante 1 mes. Aunque Degobbis (1973) obtuvo buenos resultados utilizando fenol como método de conservación (0.4 g/cm^3), aunque su uso no es muy recomendable, ya que la cantidad empleada de este compuesto varía de acuerdo a la muestra, sobre todo si se realiza en campo, alterando los resultados de las determinaciones.

Calibración

- Diluir 1.75 mL de solución estándar en 982.5 mL agua libre de amonio (marina o desionizada), para crear una solución de 1.75 mg/L de amonio.
- Tomar 2 mL de la dilución y poner en tubo Eppendorf 2 mL.
- Agregar 1 mL de agua.
- Ordenar en fila a partir del frasco que contiene la concentración de amonio de 1.5 mg/L.
- Tomar 1 mL del tubo de 1.5 mg/L y depositar en el frasco siguiente inmediato. Mezclar bien.
- Repetir el paso anterior hasta llegar al frasco número 7, el cual contendrá la menor concentración de amonio

Colocar el blanco en el frasco número 8. Recomendaciones: Todos los frascos deben estar etiquetados con las concentraciones de amonio obtenidas por las diluciones. La curva patrón se corre por triplicado en las determinaciones de mínimo error, en la misma microplaca en la que se realizan las determinaciones de la muestra. Las microplacas tendrán una lectura inicial cuando estén vacías para determinar la absorbancia del fondo.

Blancos

Si los blancos tienen alta variación puede deberse a cambios en la absorbancia de la microplaca, contaminación del agua de referencia, ionizada o agua de mar o en los reactivos (estos cuidados son determinantes para mantener la calidad de los blancos).

Pretratamiento de las Muestras

Si una muestra presenta turbidez, debe ser centrifugada, se debe de evitar la filtración.

Análisis de las Muestras

Por ser muestras provenientes de sistemas de cultivo es recomendable hacer una dilución en la microplaca de la siguiente manera:

1. Poner 20 μ l de solución A.
2. Poner 100 μ l de agua destilada.
3. Poner 150 μ l de muestra.
4. Poner 20 μ l de solución B.
5. Poner 30 μ l de solución C.

Incubar microplaca en completa oscuridad (cámara oscura) durante una hora, leer a 655 nm. Utilizar curva patrón diluida en proporciones secuenciales de $\frac{1}{2}$. Es recomendable que las determinaciones se realicen por intervalos reducidos, donde la curva patrón se diluya en proporciones secuenciales de 1/1.1. Si se realizan determinaciones con una curva patrón que tenga diluciones de $\frac{1}{2}$ se sobreestiman las concentraciones de menos de 1 mg, se subestiman aquellas entre 2 y 5, y se sobreestiman las mayores a 7. Aunque haya linealidad y el coeficiente de correlación sea mayor a 0.99.

Urea

(Koroleff miniaturizado)

Reactivo A

- 7 gr de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$
- 6 mL de H_2O desionizada
- 100 mL de H_2SO_4

Reactivo B

- 8 gr de $\text{MnClO}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 - 0.16 gr de KNO_3
 - 20 mL de agua desionizada.
- * Dura activo 1 semana (en botella ámbar).

Reactivo C

- 0.6 gr de $\text{CH}_3\text{-COC(NOH)-CH}_3$ (2,3 Butanediona oxima Diacetilmonoxima).
- 7 mg de $\text{NH}_2\text{-CONH-NH}_2\text{-HCl}$ (Semicarbacido hidrocloreto)
- 10 mL de etanol 50%
- 10 mL de reactivo B (añadir inmediatamente).

Solución estándar de urea

- 60.1 mg de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$
- 100mL de agua desionizada.
- 1 gota de cloroformo (conc. Total 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$)
- Guardar en refrigeración.

Análisis de muestras

- Colocar en un tubo Eppendorf 330 μL de muestra*(puede diluirse con el agua de la solución salina 100 mL).
- Disolver 0.366 gr de NaCl (Solución salina).
- Mezclar 7 mL de reactivo A.
- Enfriar a menos de 30°C durante 15 min.
- Mezclar 1.5 mL de reactivo C y calentar a 75°C.
- Incubar durante 2 h.
- Enfriar rápidamente en baño de hielo (máximo 30 min).
- Agitar suavemente (recuperar vapores).
- Leer absorbancia a 520 nm (en los 10 min post-enfriamiento).

Procedimiento para medir simultáneamente nitrógeno total y fósforo total en agua de mar

Con base en Valderrama (1981)

Introducción

Oxidación simultánea de compuestos de nitrógeno y fósforo por medio de digestión con persulfato de potasio (peroxidisulfato de potasio $K_2O_8S_2$) en autoclave.

El método permite el procesamiento de las muestras para ser analizadas después y permite una buena precisión y confianza. La oxidación de compuestos de nitrógeno requiere un medio alcalino para formar nitratos. La oxidación de compuestos de fósforo requiere un medio ácido para formar fosfatos.

El uso de una mezcla de ácido bórico (H_3BO_3) con hidróxido de sodio (NaOH) permite una oxidación simultánea que inicia con un pH de 9.7 y termina con un pH de 5-6. A una temperatura de 110-120°C se forma un precipitado, sin embargo, éste se disuelve a medida que la oxidación progresa, después de esta oxidación el remanente se disuelve por agitación suave.

El cloro libre que se forma en muestras de agua de mar se reduce añadiendo ácido ascórbico antes del molibdato. La digestión de compuestos de nitrógeno rinde hasta 92% de nitratos excepto para compuestos muy ricos en enlaces nitrógeno-nitrógeno.

El tiempo de digestión en autoclave (110-120°C) no debe ser mayor a 30 minutos.

1. Preparación de la solución estándar S1

Pesar 1 g. de glicina y 0.5 g de fosfato dihidrogenado de potasio

Secar por separado a 110°C por 24 horas

Sacar de la estufa y poner inmediatamente en una caja de deshidratación con silica gel.

Pesar inmediatamente

0.4504 g. de glicina deshidratada (N1)

0.1361 g de fosfato dihidrogenado de potasio (P1)

Disolver N1 y P1 en 100 mL con agua deionizada grado farmacéutico para obtener una solución donde:

(1mL = 60.0 μ M-N y 10.0 μ M-P)

2. Preparación de la solución estándar S2

Aforar a 100mL con 1.0 mL de S1 donde tenemos 60.0 μ M-N + 10.0 μ M-P)

De esta manera tenemos en S2

$$N \rightarrow 60.0 \mu\text{M-N} / 100\text{mL} = 0.6 \mu\text{M-N/mL}$$

$$P \rightarrow 10.0 \mu\text{M-P} / 100\text{mL} = 0.1 \mu\text{M-P/mL}$$

$$0.6 \mu\text{M-N/mL} * 1\text{mL}/50 \text{ mL} \times 1000 \text{ mL} = 12 \mu\text{M-N/mL}$$

$$0.1 \mu\text{M-P/mL} * 1\text{mL}/50 \text{ mL} \times 1000 \text{ mL} = 2 \mu\text{M-P/mL}$$

$$1.0 \text{ mL} = 12 \mu\text{M-N/mL}$$

$$1.0 \text{ mL} = 2 \mu\text{M-P/mL}$$

S2	N	P
0.0	0.0	0.0
0.5	6.0	1.0
1.5	18.0	3.0
2.5	30.0	5.0
3.5	42.0	7.0
4.5	54.0	9.0
7	84.0	14.0

3. Preparación del agente oxidante (OR)

Pesar

50 g peroxidisulfato de potasio

30 g Acido bórico

Disolver con 350 mL de NaOH 1M

Aforar a 1000 mL con agua deionizada grado farmacéutico

Guardar en frascos ámbar protegidos de la luz a temperatura del laboratorio

4. Procedimiento para la digestión de las muestras

Preparar frascos de 100 mL con rosca y tapa de teflón, previamente lavados para eliminar cualquier residuo de nitrógeno y fósforo.

Preparar 50 mL de muestra en un frasco con tapa de 50 mL

Añadir 4 mL de solución OR

Cerrar el frasco enroscando la tapa

Digerir ~ 30 minutos en autoclave (110-120°C)

Sacar de la autoclave

Aflojar tapones

Dejar enfriar

5. Procedimiento para medir nitratos y fosfatos

Una vez que se enfría a temperatura ambiente, se neutraliza el pH de la muestra con NaOH 1M.

Separar la muestra en dos partes

Una parte de 15mL para medir nitratos

Una parte de 15 mL para medir fosfatos

5.1 Nitratos

A la muestra de 10 mL añadir 1 mL del buffer de trabajo de $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_3$ al 2.5%