

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



*“Efecto de un alimento artificial microencapsulado enriquecido con hidrolizado de krill sobre la nutrición, consumo de oxígeno y la actividad de enzimas digestivas en larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)”*

Trabajo para titulación en la modalidad de

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGIA

Presenta

GEMMA LETICIA MARTINEZ MORENO

Las Agujas Zapopan, Jalisco. Febrero 2002



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

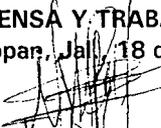
**C. GEMA LETICIA MARTINEZ MORENO
P R E S E N T E .**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "EFECTO DE UN ALIMENTO ARTIFICIAL MICROENCAPSULADO ENRIQUECIDO CON HIDROLIZADO DE KRILL SOBRE LA NUTRICIÓN, CONSUMO DE OXÍGENO Y LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS EN LARVAS DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el M.C. PEDRO PABLO GALLARDO ESPINOSA y como Asesor el DR. EDUARDO RÍOS JARA.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 18 de febrero del 2002


**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**


**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. M.C. PEDRO PABLO GALLARDO ESPINOSA.-DIRECTOR DEL TRABAJO.

c.c.p. DR. EDUARDO RÍOS JARA.-ASESOR DEL TRABAJO

c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E

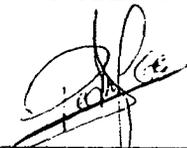
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizo la pasante **Gemma Leticia Martínez Moreno** con el título *"Efecto de un alimento artificial microencapsulado enriquecido con hidrolizado de Krill sobre la nutrición, consumo de oxígeno y la actividad de enzimas digestivas en larvas del camarón blanco Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)"* consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo

A T E N T A M E N T E

Las Aguas, Zapopan, Jal., a 19 de Febrero de 2002.

EL DIRECTOR DE TESIS



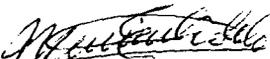
M. C. PEDRO PABLO GALLARDO ESPINOZA

EL ASESOR



DR. EDUARDO RÍOS JARA

SINODALES


M. C. ELBA GUADALUPE ROBLES JARERO
M. C. MARTÍN PÉREZ PEÑA
BIOL. MAURILIO SOTO ESPINOSA

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

El presente trabajo fué realizado en las instalaciones de la Facultad de Ciencias de la UNAM con sede en Ciudad del Carmen, Campeche bajo la dirección del M. C. Pedro Pablo Gallardo Espinoza con el financiamiento del proyecto CONACyT SISIERRA 19990706019 y UNAM-PAPIIT-IN231599 ambos bajo la responsabilidad de la Doctora Martha Gabriela Gaxiola Cortés.

A mis papás José Manuel y Gemma Leticia

y mis hermanos José Manuel, Luis Enrique y Laura Amparo.

*“Una meta más en mi vida se ha cumplido,
mil palabras no bastarían para agradecerles
su apoyo y comprensión a cada instante;
Gracias por haber fomentado en mi el deseo
de superación y anhelo de triunfo en la vida
por compartir mis penas y alegrías,
mis pequeñas victorias e inevitables tropiezos,
siempre recibiendo de ustedes la palabra de
aliento que me da fuerza para seguir luchando”*

Gracias!!

OFICINA

SECRETARÍA

15

INSTITUCIÓN EDUCATIVA

Agradecimientos

*A Dios, por todo lo bueno en la vida de Ti he recibido; por la vida misma.

*A mis papas por ser ejemplo de honestidad, fortaleza y amor, gracias por ser el ejemplo a seguir en mi vida.

*A mis hermanos José Manuel y Luis su apoyo y sus consejos, gracias por siempre preocuparse por mi bienestar y a Laurita (che menor) gracias además por ser mi mejor amiga.

*A la Universidad de Guadalajara por brindarme la oportunidad de conocer esta hermosa carrera. La maravillosa ciencia de la vida en todas sus formas.

*Gracias de corazón a todos y cada uno de mis profesores, compañeros y amigos de la carrera de quienes no solamente recibí formación académica, sino que además invaluable ejemplos y enseñanzas de vida.

*A los directores de esta tesis Pedro y Gabi, muchas gracias por su valiosa asesoría antes, durante y después del trabajo, pero sobre todo gracias por el apoyo y la amistad recibidos.

*De manera especial al Dr. Carlos Rosas por recibirme aquel verano en el que además de compartir conmigo sus conocimientos, desde entonces me ha brindado su confianza, amistad y apoyo.

*Al Dr. Eduardo Ríos Jara, y a los sinodales de esta tesis, Biol. Maurilio Soto, Guadalupe Robles y Martín Pérez por las correcciones y comentarios hechos al trabajo.

*Agradezco a Ma. Eugenia González la valiosa ayuda que me brindó al leer mi escrito.

*A todos y cada uno de los amigos y compañeros del laboratorio de Biología Marina, muchas gracias por compartir conmigo sus conocimientos, pero sobre todo su apoyo, cariño y amistad en aquella Isla del Carmen. En especial al súper equipo de larveros del 2001.

*A las familias Martínez Bravo, Martínez Solís y Moreno Avilés que de una u otra manera me apoyaron a lo largo de estos años de estudio. De manera especial a mis tías Mago y Carmen Moreno por todo el apoyo y cariño recibido de ustedes.

* A mis amigochas Esmeralda, Akiko, Rocío y Erika. Gracias por su amistad.

INDICE

1- INTRODUCCIÓN.....	1
2- OBJETIVO GENERAL	5
3- OBJETIVOS PARTICULARES	5
4- HIPÓTESIS.....	6
5- ANTECEDENTES	6
6- MATERIALES Y METODOS.....	11
6.1- Origen de las larvas y condiciones de siembra.....	11
6.2- Diseño experimental.....	11
6.3- Dietas suministradas	13
6.4- Ajuste de alimento y frecuencia de alimentación.....	14
6.5- Dispositivos experimentales.....	14
6.6- Parámetros fisicoquímicos.....	15
7- INDICADORES EVALUADOS.....	15
7.1- Crecimiento.....	15
7.2- Índice de Desarrollo (ID).....	16
7.3- Supervivencia.....	16
7.4- Índice de Rendimiento (IR)	16
7.5- Índice de Calidad (IC).....	16
7.6- Consumo de oxígeno.....	17
7.7- Actividad enzimática.....	17
8- ANALISIS ESTADÍSTICO.....	19
9- RESULTADOS.....	20
9.1- Parámetros fisicoquímicos.....	21
9.2- Crecimiento.....	21
9.3- Índice de Desarrollo.....	23
9.4- Supervivencia.....	24
9.5- Índice de Calidad.....	25
9.6- Índice de Rendimiento.....	26
9.7- Consumo de oxígeno.....	28

9.8- Metabolitos.....	29
a) Triacilglicerol.....	29
b) Colesterol.....	30
c) Razón TAG/Colesterol.....	31
9.9- Actividad enzimática.....	32
9.9.1- Enzimas proteasas.....	32
a) Proteasas totales.....	32
b) Tripsina.....	33
c) Quimotripsina.....	34
9.9.2- Enzimas carbohidrasas.....	35
a) α -amilasa.....	35
b) α -glucosidasa.....	36
10- DISCUSIÓN.....	37
11- CONCLUSIONES.....	50
12- ANEXOS.....	51
13- LITERATURA CITADA.....	55

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

RESUMEN

Durante el desarrollo larval de los camarones peneidos el aparato digestivo presenta una serie de cambios graduales. Al mismo tiempo que estos cambios se presentan, los hábitos alimenticios de las larvas se modifican. En el estadio de protozoa, las larvas son filtradoras de microalgas y la digestión es llevada a cabo por una serie de enzimas proteolíticas, en tanto que en el estadio de mysis con el desarrollo del aparato digestivo, los organismos adquieren hábitos cada vez más carnívoros, alimentándose de organismos zooplanctónicos. En los sistemas de crianza de camarones peneidos se emplea el uso de nauplios de *Artemia* para alimentar a las mysis, sin embargo, su empleo presenta varias desventajas ya que complica el nivel técnico requerido en la operación y encarece de manera significativa los costos de producción. Con el fin de evaluar la respuesta zootécnica, fisiológica y bioquímica de los organismos, en el presente estudio se probó la sustitución total de los nauplios de *Artemia* en las mysis del camarón blanco *L. vannamei*, por dos alimentos artificiales microencapsulados enriquecidos con harina de calamar (Ggax Cal, CM Cal) y dos enriquecidos con hidrolizado proteico de krill (Ggax Krill, CM Krill).

Los resultados obtenidos de los indicadores zootécnicos evaluados no mostraron diferencias significativas de los tratamientos con respecto al Control. Presentándose incluso tendencias hacia mejores resultados, como el caso del tratamiento Ggax Krill, en donde se presentaron valores cercanos al control (crecimiento en peso, Índice de rendimiento) iguales al control (Índice de desarrollo) o incluso por encima de este (sobrevivencia). El Índice de calidad tampoco mostró diferencias significativas con respecto al Control, lo cual indica una óptima condición fisiológica de las mysis de este estudio resultante del alimento consumido. En tanto que, el costo metabólico derivado del proceso digestivo de estos alimentos fue mayor que el mismo proceso derivado del consumo de los nauplios de *Artemia*, lo cual se observa en un mayor consumo de oxígeno a lo largo del desarrollo de las mysis del presente estudio. De manera general, tanto la harina de calamar como el hidrolizado proteico de krill contenidos en las dietas, estimularon la producción de todas las enzimas evaluadas, presentándose así mismo, picos de actividad específicos en cada una de ellas.

1- INTRODUCCION

En muchos países, incluyendo México, una de las actividades que ha adquirido mayor importancia en los últimos años es la acuicultura, actividad que ha arrojado importantes beneficios económicos, los cuales a su vez se traducen en una importante fuente de alimentación con un elevado valor nutricional para las poblaciones que de ella se sustentan (Álvarez-Torres,1999).

En nuestro país, el camarón constituye uno de los mayores recursos pesqueros por su volumen de captura y su alto valor económico tanto en el mercado nacional como internacional (Sáenz, 1987). Actualmente la camaronicultura en México aporta alrededor del 20 % de la producción nacional y contribuye a atender tanto las demandas del mercado nacional como el mercado de exportación; siendo EUA el país que capta mas del 90 % de las exportaciones totales de camarón (con 38 000 ton en 1998), seguido por España (514 ton) y por Japón (68 ton en el mismo año), el resto se exporta a Europa y otros países. Para el año 2000, México contaba con aproximadamente 20,000 hectáreas en cultivo predominando los sistema extensivos o semi intensivos (De la Rocha, 2000)

El desarrollo de la camaronicultura a nivel mundial se ha fortalecido por el conocimiento cada vez mas profundo de la biología de las especies sujetas a cultivo; en este sentido, un aspecto esencial es el conocimiento básico de los requerimientos nutricionales de los animales (Tacon, 1990).

Uno de los puntos críticos de la camaronicultura es el suministro adecuado de postlarvas de alta calidad, las cuales se producen en laboratorios especializados. Dentro de los factores biotécnicos que intervienen en la cría de larvas de especies acuáticas de importancia comercial, la alimentación y las enfermedades son los mas importantes, ya que ello afecta la sobrevivencia. Una alternativa para esta problemática, la constituye el uso de alimentos de alta calidad que mantengan un ambiente saludable, reduzcan el riesgo de enfermedades y que permitan disminuir los costos del alimento vivo (Pedroza, 2000)

Las larvas de camarones peneidos obtienen su alimento filtrando las microalgas suspendidas en la columna de agua en los estadios de protozoa y posteriormente capturan zooplancton en los estadios de Mysis y Postlarva (Kumlu, 1995). Para la producción de postlarvas se utiliza de manera general la combinación de una diatomea y un flagelado (*Chaetoceros sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis sp.*, etc) durante las primeras fases larvales, complementando su alimentación con el uso de una fuente nutricional de origen animal a partir del subestadio de protozoa III. Esta combinación de alimentos favorece la obtención de postlarvas de alta calidad al final de la cría larvaria (Gallardo, 1994, 2000; Alfonso *et al.*, 1993). Entre de las principales fuentes de origen animal se han probado el uso de rotíferos, nemátodos, yema de huevo hervida y nauplios, así como quistes descapsulados de *Artemia*.

La utilización de *Artemia sp.* juega un papel muy importante en la nutrición de numerosas especies marinas. En la alimentación de larvas de peces y crustáceos es utilizada como alimento complementario aunque a menudo se emplea como dieta única y exclusiva cubriendo principalmente los requerimientos proteicos de los organismos (Kinne, 1976). Sin embargo, el uso de estos alimentos vivos presenta varias desventajas, entre las más importantes se puede destacar el hecho de que su producción es muy cara, además de que su composición bioquímica es impredecible y muchas veces insatisfactoria por lo que en muchos de los casos no cumple con los requerimientos nutricionales de los organismos (Planas, 1990).

Bautista (1989) menciona que el reemplazo del alimento vivo en el cultivo de larvas de camarón por dietas artificiales puede, en gran medida, ayudar a resolver los problemas que limitan la producción de postlarvas de alta calidad. En este sentido, el uso de dietas artificiales simplifica el nivel técnico requerido en la operación y manejo del cultivo; asegura que los requerimientos nutricionales de las larvas sean satisfechos al poder utilizar dietas que contengan los niveles de los nutrientes según los requerimientos de cada especie; así como también, reduce los niveles de contaminación y enfermedades de los organismos. Estos elementos en su conjunto disminuyen los costos de producción.

En los últimos años, numerosas investigaciones se han realizado en la búsqueda de dietas que satisfagan los requerimientos nutrimentales de un gran número de especies de camarones peneidos durante el desarrollo larval (Bautista, 1989). La investigación tecnológica para la elaboración de alimentos balanceados de alta calidad para la larvicultura, ha dado como resultado la aparición de dietas artificiales, microparticuladas, microligadas y microencapsuladas, todas con un gran potencial de uso, siempre y cuando cumplan con las características de aceptabilidad, digestibilidad, adecuado tamaño de partícula y con buena estabilidad en el sistema acuoso (Pedroza, 2000). En este sentido, se ha comprobado que las dietas microencapsuladas creadas y perfeccionadas a lo largo de los años, cubren con estos requisitos necesarios que permiten lograr la sustitución parcial y en algunos casos total del alimento vivo de un gran número de organismos acuáticos.

En el caso particular del cultivo de camarones peneidos, han sido formuladas dietas artificiales especialmente para alimentar estas especies durante el desarrollo larval. En muchos casos, estas dietas se encuentran enriquecidas con ingredientes que mejoran no solo la calidad nutritiva del alimento, sino también en gran medida, la palatabilidad del mismo lo que incrementa el grado de aceptación por los organismos. Tal es el caso de la harina de calamar, la cual, se ha comprobado es una fuente protéica óptima en la alimentación de numerosas especies de peneidos tales como *Litopenaeus vannamei*, *L. setiferus*, *Penaeus japonicus* y *P. stylirostris* entre otros, para las cuales se ha comprobado que, la inclusión de este componente en la dieta, incrementa las tasas de crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de los organismos de manera significativa (Cruz Rique, 1987, Gallardo, 2000)

Otro elemento que ha resultado útil en la alimentación de peneidos es el krill. Krill es el nombre genérico de varias especies de pequeños crustáceos encontrados en grandes cantidades en los océanos del mundo. Las especies mas utilizadas son *Euphausia pacifica* y *E. superba*. La primera se cosecha mayormente en las costas de Japón y en la costa oeste de Canadá, mientras que *E. superba*, la especie mas utilizada, se cosecha en el hemisferio sur principalmente alrededor de las costas del continente Antártico y cerca de las Islas Malvinas (Forster, 2000). Estos organismos de manera natural poseen un fuerte sabor y una alta calidad nutritiva por lo que son parte importante de la dieta de numerosas especies

marinas como son: salmones arenques, focas, pingüinos, calamares y de manera especial grandes ballenas.(House, 1997)

En los últimos años, se ha extendido el uso del Krill y sus productos entre los acuicultores de todo el mundo en la alimentación de numerosas especies de cultivo como son: tilapia, trucha, bagre, rodaballo, salmón, camarones peneidos, entre otros, esto debido a que son una fuente muy importante de proteínas, lípidos, pigmentos y vitaminas, además de que aumentan en gran medida la palatabilidad de los alimentos (Forster, 2000); así como también gracias a su fuerte olor que funciona como poderoso atrayente, elemento muy importante cuando se trata de iniciar larvas y juveniles de peces o crustáceos al alimento artificial, o de suministrar alimentos medicados y/o dietas que contengan proteínas de fuente vegetal (Oikawa, 1996). De las diferentes presentaciones en que se suministra el krill a los organismos en cultivo, los hidrolizados han demostrado ser los que mejores resultados presentan; este producto se obtiene a partir del rompimiento controlado de las cadenas proteínicas largas del krill fresco en cadenas más cortas y aún aminoácidos, en un proceso en el cual las proteínas son desdobladas por medio de una serie de enzimas específicas utilizadas para este fin, proceso que aumenta al máximo el potencial digestivo del krill.

Se ha comprobado que los hidrolizados de krill poseen entre 60 y 65% de proteína en peso seco, conteniendo un óptimo balance de los aminoácidos esenciales que los organismos requieren, además de cantidades óptimas de acidos grasos (en especial de la fracción n-3), pigmentos (astaxantina y otros carotenoides) y minerales (sodio, potasio, calcio, etc) (Forster, 2000).

Con base a todo lo anteriormente descrito se plantea como objetivo del presente trabajo, observar los efectos que produce la sustitución total de la fuente de proteína animal, es decir, los nauplios de *Artemia*, en la alimentación de las mysis de *L. vannamei*, por dos tipos de dietas artificiales microencapsuladas, enriquecidas con harina de calamar y con hidrolizados proteicos de Krill.

2- OBJETIVO GENERAL

Determinar la posibilidad de la sustitución de los nauplios de *Artemia*, mediante la utilización de alimentos microencapsulados que contienen estimulantes de las enzimas digestivas (harina de calamar e hidrolizados de krill) para la alimentación de las mysis de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

3- OBJETIVOS PARTICULARES

*Determinar el Crecimiento en longitud y peso, Índice de Desarrollo, Supervivencia e Índice de Rendimiento en las mysis del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas experimentales enriquecidas con harina de calamar y con hidrolizados proteicos de krill.

*Determinar el Consumo de oxígeno e Índice de Calidad en las mysis de camarón blanco *L. vannamei* alimentadas con estas mismas dietas.

*Determinar la evolución de las reservas energéticas lipídicas (triacilglicéridos y colesterol) en las mysis de *L. vannamei* alimentadas con estas mismas dietas.

*Determinar la actividad de las enzimas digestivas (proteasas y carbohidrasas) en las mysis de *L. vannamei* como resultado de la exposición a estas mismas dietas.

4- HIPOTESIS

Tanto el harina de calamar como el hidrolizado de Krill utilizados como alimento producen un incremento en la actividad enzimática y por lo tanto una mejoría en la asimilación, el crecimiento, el desarrollo y la sobrevivencia de las larvas de *Litopenaeus vannamei*, por lo cual las dietas artificiales con inclusión de estos elementos pueden ser un buen sustituto de los nauplios de *Artemia*.

5- ANTECEDENTES

El conocimiento y la relación de los cambios ontogénicos del sistema digestivo de los camarones peneidos con respecto a los requerimientos nutritivos permiten dilucidar los regímenes de alimentación más adecuados para las larvas de cada especie. Las bases científicas trazadas a través de una metodología de estudio adecuada de los factores bióticos y abióticos inherentes al cultivo larvario, permiten la obtención de esquemas de alimentación confiables que pueden resultar muy útiles en el sector productivo (Gallardo, 2000)

El desarrollo larval es muy similar en todas las especies de camarones peneidos. Los huevecillos expulsados por la hembra eclosionan entre 14 y 24 horas después de haber sido fecundados, dando lugar a la larva nauplio de nado libre. La duración de este estadio es entre 2 y 3 días dependiendo de la especie, presentando cinco subestadios. Su fuente de alimento en este momento es a través de las reservas del vitelo (larvas lecitotróficas).

Posteriormente la larva nauplio se desarrolla en Protozoa, estadio que dura de 3 a 4 días pasando por tres subestadios; la alimentación la obtiene del plancton, principalmente fitoplancton, teniendo hábitos filtradores en su totalidad. En los siguientes 3 días se desarrolla la larva Mysis con tres subestadios; en donde el plancton continua siendo su fuente de alimento, siendo en este caso el zooplancton la más importante (Sandoval, 1996);

es en este momento cuando los apéndices bucales son funcionales y los organismos pasan a tener hábitos raptorales y carnívoros.

Se ha determinado que durante el desarrollo larval de los camarones peneidos, el aparato digestivo presenta una serie de cambios graduales conforme pasa de un subestadio a otro (Lovett y Felder, 1989). Al mismo tiempo que estos cambios se van presentando, los hábitos alimenticios de las larvas se van modificando. Durante el estadio de protozoa (PI-PIII), cuando las larvas son filtradoras de microalgas, la digestión es llevada a cabo por una serie de enzimas proteolíticas sintetizadas en su mayoría por el divertículo anterior del intestino medio (AMD); posteriormente, durante los subestadios de mysis (MI-MIII), cuando los dientes del molino gástrico están bien desarrollados, los organismos adquieren hábitos cada vez más carnívoros (raptorales), reteniendo por más tiempo el alimento y asimilando un mayor porcentaje de energía de su presa (Kumlu *et al.*, 1995; Lovett, y Felder, 1990).

Es en este momento cuando las larvas requieren de una fuente de proteína de origen animal, por lo que es común en los sistemas de crianza el empleo de diferentes especies de rotíferos y nematodos, pero principalmente las especies del género *Artemia*, además de levaduras y aún yema de huevo hervida; Sin embargo, en los últimos años se ha puesto particular énfasis en el empleo de suplementos dietéticos que han demostrado poseer, entre muchas otras ventajas, altos contenidos proteicos como son los alimentos microparticulados, microencapsulados y microligados

De entre un gran número de dietas artificiales desarrolladas para reemplazar al alimento vivo, las microcápsulas han demostrado ser las más exitosas, logrando reemplazarlo parcial o totalmente en la cría de larvas de camarones peneidos (Kumlu *et al.*, 1995). Se ha observado que el microencapsular alimentos provee a la fase interna ciertas ventajas como son: protección contra el deterioro por efecto del oxígeno y otros gases, menor adsorción y absorción de la humedad, permite el manejo de materiales líquidos y sólidos, el control sobre la liberación del material microencapsulado y protección contra la contaminación bacteriana entre otras (Pedroza, 2000).

Varios métodos se han utilizado para microencapsular dietas formuladas para la alimentación de organismos marinos de interés comercial, en especial los camarones peneidos, con el objetivo de simplificar la operación de la cría larvaria, mejorar la calidad nutritiva de las mismas y reducir los costos de producción.

Desde que en 1966 se desarrolló la primer microcápsula de nylon-proteína por Chang *et al* (Tomado de Amjad, 1992), muchas variantes de este tipo han surgido a través de los años. A partir de 1974, Jones *et al.* realizaron una serie de modificaciones a la propuesta original con diferentes especies de crustáceos (*Artemia*, peneidos y langostinos) utilizando dietas microencapsuladas con cubiertas de nylon-proteína. Así mismo demostraron la factibilidad de realizar el cultivo de larvas de *Marsupenaeus japonicus*, tanto en condiciones de laboratorio como a escala comercial en sustitución total de alimento vivo, estableciendo el tamaño correcto de partícula de 10 y 28 μm micrómetros para Protozoa y Mysis respectivamente así como la concentración óptima de las mismas, logrando sobrevivencias de 68% (Jones, 1979).

Jones *et al.* (1987) sustituyeron la composición de la envoltura de las microcápsulas anteriormente utilizadas, por una pared biodegradable; realizaron una serie de pruebas en laboratorios a escala comercial con *L. vannamei* y *L. stylirostris* en Ecuador y con *P. monodon* en Taiwan sustituyendo totalmente la *Artemia*, mientras que en Filipinas probaron la sustitución total de alimento vivo (microalgas y *Artemia*) en la alimentación de *P. monodon*, estableciendo la posibilidad de realizar el cultivo de estas especies a escala comercial con alimento microencapsulado, tanto como suplemento como en sustitución total de las algas y/o de *Artemia*.

Se demostró además la posibilidad de cultivar larvas de *L. vannamei* con microcápsulas de pared lipídica (a diferencia de las microcápsulas de pared proteica, éstas pueden retener moléculas solubles y de bajo peso molecular como tiamina, rivotflavina y glucosa) denominadas CXMs. Estas micropartículas resultaron ser muy eficientes en la nutrición larvaria, ya que la pared lipídica se rompe fácilmente dentro del lumen liberando

así las partículas alimenticias; además, su forma irregular resultó de fácil manipulación por los organismos (Wilammar, 1993).

Otros trabajos en este sentido son los realizados por Kumlu *et al.* (1995) quienes lograron sobrevivencias e Índices de crecimiento similares a los controles de alimento vivo sustituyendo el uso de *Artemia* en la alimentación de *Fenneropenaeus indicus* con alimento comercial microencapsulado, complementando en este caso con el uso de pequeñas cantidades de microalgas (15 cel/ μ L: *Tetraselmis* y *Skeletonema*), encontrando además un incremento significativo en la actividad de las enzimas digestivas, especialmente la tripsina, entre los estadios de PIII-MI.

Gallardo (2000) determinó la ración óptima de alimento microencapsulado (ARGENT) en 8 mg/día a partir del subestadio de MI en la alimentación de larvas del camarón blanco del Golfo *Litopenaeus setiferus*. De la misma manera, propone un esquema de alimentación basado en el uso de microalgas (*Chaetoceros ceratosporum* y *Tetraselmis chuii*) (Gallardo, 1994) en combinación con el alimento microparticulado como una alternativa viable de nutrición larvaria para esta especie.

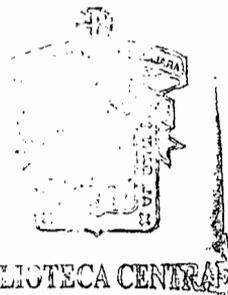
Asimismo, Pedroza (2000) diseña varios tipos de microencapsulados cuya pared esta compuesta por 3 polisacáridos (goma arábica GA, goma de mezquite GM y maltodextrina MD en diferentes mezclas) evaluando de manera especial las características de cinética de disolución y la sedimentación. Estos microencapsulados fueron ensayados en la alimentación del camarón blanco *L. vannamei* en sustitución parcial y total de microalgas y en sustitución total de *Artemia* logrando los mejores resultados (mayor longitud y peso) con una microcápsula formulada con una proporción de 66:17:17 de GA, GM y MD respectivamente.

En la elaboración de la dietas artificiales especiales para alimentar larvas de camarón se han utilizado ingredientes con altas cualidades nutrimentales como son harinas (elaboradas a base de pescado, de calamar, de ostión), levaduras, aceites, mezclas de vitaminas y minerales entre otros. Un elemento que se ha venido utilizando en los últimos

años es el krill en diferentes presentaciones (crudo, hidrolizados....) . En el caso de los hidrolizados de krill muchos trabajos se han realizado a fin de probar su efectividad principalmente en peces y en menor medida en crustáceos.

Estudios llevados a cabo por la compañía Specialty Marine Products Ltd han demostrado la efectividad del hidrolizado de krill elaborado a base de la especie *E. superba* en tres presentaciones: en forma líquida, de spray y en polvo, tanto en estadios larvales como en juveniles de diferentes especies de peces tales como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), corbina (*Dicentrarchus labrax*), besugo (*Sparus aurata*), salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*), anguila (*Anguilla anguilla L*), bagre (*Clarius gariepinus*) y carpa (*Cyprinus carpio L*). En la mayoría de los casos se obtuvieron incrementos importantes en el consumo del alimento y por lo tanto mayores crecimientos y sobrevivencias; menores índices de mortalidad y una reducción significativa de canibalismo.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

6- MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Marina Experimental en las instalaciones de la Facultad de Ciencias de la UNAM con sede en Ciudad del Carmen, Campeche.

6.1- Origen de las larvas y condiciones de siembra.

Las larvas que se utilizaron en este estudio fueron donadas por la granja Sisal de Industrias Pecis (Mérida, Yucatán) las cuales llegaron en el subestadio de Nauplio II. Estos nauplios se mantuvieron en tanques de fondo cónico con un volumen inicial de 200 litros (a una densidad de 25,000 nauplios por tanque); al arribar al subestadio de Protozoa I (PI) fueron alimentadas bajo el esquema propuesto para esta especie a base de las microalgas marinas *Chaetoceros ceratosporum* y *Tetraselmis chuii*. Una vez que llegaron al subestadio de Protozoa III (PIII), las larvas fueron colocadas en los dispositivos experimentales a fin continuar con este mismo esquema de alimentación además del planteado como objetivo del presente estudio .

6.2- Diseño experimental

Los tratamientos se referirán de la siguiente manera:

GGax Cal y GGax Krill (dieta de Gabriela Gaxiola con harina de calamar y Gabriela Gaxiola con hidrolizado de Krill)

CM Cal y CM Krill (dieta de Carlos Medina con harina de calamar y Carlos Medina con hidrolizado de Krill).

Se empleó un diseño completamente aleatorizado de cuatro tratamientos con tres repeticiones cada uno. Los tratamientos Ggax Cal y CM Cal presentaron la composición basal de cada una de las dietas microencapsuladas diseñadas por Gabriela Gaxiola (1991) y Carlos Medina (1998), con harina de calamar en tanto que las dietas GGax Krill y CM Krill presentaron en la composición basal de cada una de estas dietas microencapsuladas la

sustitución de la harina de calamar por el hidrolizado comercial de krill en el mismo nivel de inclusión. En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de inclusión de estos ingredientes en cada una de las dietas formuladas.

El tratamiento Control se alimento con el esquema propuesto para *L. vannamei* (Tabla 1) a base de microalgas marinas en el estadio de protozoa y microalgas marinas y nauplios de *Artemia* durante el estadio de Mysis hasta la primera postlarva (PL 1). Cabe hacer mención que aunque en los 4 tratamientos se sustituyó por completo el uso de nauplios de *Artemia*, si se continuó suministrando las microalgas en las concentraciones establecidas para esta especie durante todo el estadio de Mysis y primera postlarva (PL 1). Los indicadores evaluados en cada uno de los tratamientos se presentan en la Tabla 2 .

Tabla 1. Esquema de alimentación propuesto para *L. vannamei* a base de las microalgas marinas *Chaetoceros sp.* y *Tetraselmis sp.* y del crustáceo *Artemia sp*

	NV	PI	PII	PIII	MI	MII	MIII	PL1
<i>Chaetoceros</i> (X 10 ³ cel/ml)	10	40	75	85	60	50		
<i>Tetraselmis</i> (X 10 ⁶ cel/ml)	5	10		25		20		15
<i>Artemia</i> (n/ml)				0.2	1.0	1.5	2.0	3.0

Donde: NV=Nauplio; PI=Protozoa 1; PII=Protozoa 2; PIII=Protozoa 3; MI=Mysis 1; MII=Mysis 2; MIII=Mysis 3 y PL1=Postlarva 1

Tabla 2. Indicadores evaluados en el estadio de mysis de *L. vannamei* alimentadas con dietas artificiales microencapsuladas enriquecidas con harina de calamar e hidrolizado de krill.

	Ggax Cal	CM Cal	Ggax Krill	CM Krill	Control
Respuesta Nutricional	Crecimiento, Índice de desarrollo, Sobrevivencia, Índice de Rendimiento				
Respuesta Fisiológica	Consumo de oxígeno e Índice de Calidad				
Respuesta Bioquímica	Actividad enzimática de Proteasas y Carbohidrasas y Concentración de metabolitos (Triglicéridos y Colesterol)				

6.3- Dietas suministradas

Las dietas suministradas a las mysis de *L. vannamei* del presente estudio fueron elaboradas por Gabriela Gaxiola (1991) y por Carlos Medina (1998); en ambas incluyó el hidrolizado proteico comercial de krill sustituyendo para dos tratamientos (Ggax Krill y CM Krill) el harina de calamar de las composiciones originales (Tabla 3). Esta formulación se encuentra cubierta por una microcápsula elaborada por Pedroza (2000) a base de goma arábica (GA), goma de mezquite (GM) y una Maltodextrina comercial "Amidex 10" (MD) en una proporción de 66:17:17 respectivamente (relación 3:1 microcápsula-dieta y pH 8).

Tabla 3. Formulación de las dietas artificiales microencapsuladas elaboradas por A) Gabriela Gaxiola (1991) y B) Carlos Medina (1998).

A)		B)	
Ingredientes	g/kg de alimento	Ingredientes	g/kg de alimento
Harina de pescado	270	Pulpa de ostion	370
<i>Harina de Calamar o</i>	<i>170</i>	<i>Harina de Calamar o</i>	<i>170</i>
<i>Hidrolizado de Krill</i>	<i>170</i>	<i>Hidrolizado de Krill</i>	<i>170</i>
Harina de camarón	170	Carne de atún amarillo	118.4
Levadura de cerveza	150	Pulpa de jaiba azul	92.8
Harina de soya desgrasada	140	Manto de calamar	183.6
Almidón	15	Aceite de girasol	15.2
Aceite de hígado de bacalao	20	Aceite de hígado de bacalao	52.8
Aceite de girasol	20	Almidón de maiz	107
Colesterol	5	Colesterol	5
Premezcla de vitaminas	10	Vitaminas	1
Premezcla de minerales	15	Minerales	2
Vitamina C	5	ROVIMIX C	2
Lecitina de soya	10	Lecitina de soya	10

6.4- Ajuste de alimento y frecuencia de alimentación

El alimento microencapsulado (16 mg/l) se suministró a las larvas en el momento en que éstas alcanzaron el subestadio de Mysis I cada 4 horas en 6 raciones (2:00, 6:00, 10:00, 14:00, 18:00 y 22:00 h).

Para ajustar el alimento vivo se realizaron conteos del residuo de las microalgas marinas con la ayuda de una cámara de Neubauer lo que permitió hacer los ajustes necesarios para mantener el alimento constante; el suministro de microalgas se realizó 2 veces al día (8:00 y 20:00 horas) en todo el dispositivo experimental (matraces, conos y tinas). Asimismo, para determinar los residuos de nauplios de *Artemia* en el tratamiento control se tomaron muestras por medio de 1 pipeta de 10 ml cada 12 horas, determinando así la concentración residual por ml para posteriormente ajustar a la concentración deseada según lo marca el esquema de alimentación de *L. vannamei*.

6.5- Dispositivos experimentales

A fin de evaluar el Crecimiento (longitud y peso) y el Índice de desarrollo las larvas se sembraron en tanques de 10 litros de capacidad de fondo cónico a partir del subestadio de Protozoa III avanzado. El volumen inicial del agua en los tanques fue de 4 l con una densidad de 50 organismos/litro. Para mantener una buena calidad del agua se realizaron recambios parciales del 50% diariamente.

Para evaluar la sobrevivencia se utilizó un dispositivo en el cual se colocaron matraces de 1 l de capacidad de la misma manera con tres repeticiones por tratamiento, y con una densidad de 50 larvas/litro. Asimismo, para proveer de las larvas necesarias para las pruebas respirométricas y de evaluación de enzimas digestivas, se colocaron 5 tanques circulares de 100 litros de capacidad (4 tratamientos y 1 control), en este caso el volumen inicial fue de 40 litros y una densidad de 100 larvas por litro.

El agua de mar que se usada fue filtrada con filtros de arena, de cartucho de 1 y 5 μm , esterilizada con luz ultravioleta y provista de aireación continua.

6.6- Parámetros fisicoquímicos

Las mediciones fisicoquímicas se realizaron dos veces al día (8:00 y 20:00 horas). La temperatura se midió con ayuda de un termómetro de mercurio, la salinidad con un espectofotómetro American optical en tanto que el oxígeno con un oxímetro digital marca YSI-55

7- INDICADORES EVALUADOS

7.1- Crecimiento

El crecimiento en longitud se determinó midiendo directamente al microscopio 15 larvas por tratamiento diariamente. Tanto el pool de protozoas iniciales (PIII) como las mysis (MI, MII, y MIII) y las postlarvas (PL1), se midieron desde la escotadura postorbital hasta el extremo posterior del telson sin incluir las espinas. Las tasa de crecimiento se expresa en $\mu\text{m}/\text{día}$ y se calculó mediante la siguiente fórmula :

$$\text{TASA DE CRECIMIENTO} = (\text{longitud final} - \text{longitud inicial}) / \text{tiempo}$$

Para el crecimiento en peso, las mismas larvas que se usaron en las mediciones fueron secadas a 40°C y posteriormente pesadas, mediante una microbalanza marca CAHN C-33 (de 0.0001 mg de precisión). Igual que en el caso anterior, se determinó el crecimiento en peso diario calculado para conocer el porcentaje de incremento en peso por día el cual se expresa como Coeficiente de Crecimiento Diario (DGC por sus siglas en inglés) (Bureau, 2000) calculado mediante la fórmula:

$$\text{DGC} = [(\text{Peso PL final}^{1/3} - \text{Peso PIII inicial}^{1/3}) / \text{tiempo}] 100$$

7.2- Índice de desarrollo (ID)

Se determinó mediante observaciones directas al microscopio de 15 ejemplares colectados al azar de los conos de cada tratamiento una vez al día. Para determinar este índice se utilizó la fórmula propuesta por Villegas y Kanazawa (1979):

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

Donde A es igual al número de organismos de cada subestadio por el número asignado a cada subestadio, y N es igual al número total de organismos colectados. El número asignado a cada subestadio es PI=1, PII=2, PIII=3, MI=4, MII=5, MIII=6 y PL=7.

7.3- Supervivencia

Esta se calculó en base al número de larvas que llegaron al subestadio de Postlarva 1 (PL1) en relación al número estimado de Protozoos III sembradas en cada uno de los matraces al finalizar la prueba experimental. Los resultados se expresan en porcentaje (%)

7.4- Índice de Rendimiento (IR)

Este índice se calculó a partir de los resultados que se obtuvieron tanto del crecimiento en longitud como en peso, la supervivencia y el Índice de Calidad y permite resumir en un solo valor las características de las postlarvas al finalizar el tratamiento. Se calcula mediante la fórmula:

$$IR = [(Crecimiento) (Supervivencia) (IC)]$$

7.5- Índice de Calidad (IC)

Se estableció al finalizar el desarrollo larval sujeto a tratamiento (de MI - PL 1) tras someter a cierto número de postlarvas (PL1) de cada uno de los tratamientos a un cambio brusco de salinidad (De la Cruz, 1992), colocándolas en un recipiente con agua de mar en

una salinidad menor que la de los tratamientos (de 35 ppm a 25 ppm). Las larvas se sometieron a este cambio durante una hora, transcurrido este tiempo, se evaluó el número de postlarvas vivas y muertas y se calculó el IC en base al número de postlarvas que sobrevivieron a esta condición de estrés salino.

7.6- Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno ($\mu\text{gO}_2 \mu\text{g peso seco larva}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) de las larvas se midió con un electrodo polarográfico el cual es sensible a la tensión de oxígeno en agua de mar. El decremento en la tensión de oxígeno, producto de la respiración de las larvas se determinó en un respirómetro cerrado con 500 microlitros de volumen de agua de mar del medio de cultivo, con ayuda de un electrodo conectado a un registrador Stratkelvin RC 200. La temperatura en la cámara se mantuvo a la misma temperatura de los estanques con un baño termostático y las mediciones se registraron con un rango de saturación de aire de 80 a 100%, durante 5 min. El consumo de oxígeno para cada estadio se determinó en 20 larvas de cada tratamiento, y se corrigió con respecto al consumo de oxígeno del electrodo utilizando una cámara control sin organismos.

7.7- Actividad enzimática

Para la medición de la actividad enzimática se colectaron 3 muestras de 100 larvas por cada subestadio (de PIII a PL 1) y por cada tratamiento, estas se mantuvieron en nitrógeno líquido a -70°C en microtubos eppendorff hasta el momento de la determinación.

Para ésta determinación se prepararon los extractos adicionando a las larvas 500 μl de agua desionizada y se homogeneizaron en hielo 1 min a velocidad máxima. Se centrifugó por espacio de 6 minutos a 16 000 rpm a 4°C . Se separó el sobrenadante por decantación. Parte de este sobrenadante se diluyó en agua ionizada a una razón 1/10 (10 μl de extracto homogeneizado y 100 μl de agua estéril) Los homogenizados (tanto en crudo y

como diluido) fueron usados inmediatamente para determinar el análisis de las enzimas. Todos los valores resultantes de la actividad enzimática se expresan como $\text{mU } \mu\text{g peso húmedo}^{-1} \text{ larva}^{-1}$ en tanto que las concentraciones de Triacilglicéridos y colesterol se expresan como mg/ml .

Para la determinación de la concentración de triacilglicéridos se colocaron $10 \mu\text{l}$ de extracto crudo en una microplaca y se adicionan $200 \mu\text{l}$ de solución reactiva del kit comercial Sera-Pak, Cat. 6684. La reacción se incubó a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 540 nm . La concentración de triacilglicéridos (mg/ml) se calcula a partir del estándar comercial obtenido con el kit.

En el caso del colesterol se colocan $10 \mu\text{l}$ de extracto crudo en una microplaca y se adicionan $200 \mu\text{l}$ de solución reactiva del kit comercial Sera-Pak, Cat.6670. Las muestras se incuban a temperatura ambiente por 15 min y se registra la absorbancia a 540 nm . La concentración de colesterol (mg/ml) fué calculada con base en el estándar comercial obtenido con el kit.

La actividad de las proteasas totales se estimó por la hidrólisis de la caseína amarilla en los homogenados diluidos usando Azucoll (sigma A4341) como sustrato y amortiguador Tampón Fosfato, a $\text{pH } 7$) a 37°C durante una hora. La reacción es bloqueada por ácido tricloroacético (TCA) al 5% para precipitar las proteínas solubles. Después de la centrifugación a $10,000 \text{ rpm}$ por un lapso de 10 min , el sobrenadante es recuperado y mezclado a partes iguales con una solución de $\text{NaOH } 0.5 \text{ M}$. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Spectronic modelo 21D a 520 nm .

Las evaluaciones de la tripsina y quimotripsina se realizaron a partir de los extractos crudos y de manera directa en los viales o celdas del espectrofotómetro debido a que son reacciones rápidas. Se colocaron para cada muestra $460 \mu\text{l}$ de amortiguador y $10 \mu\text{l}$ de sustrato (BAPNA para la tripsina y SAPNA para la quimotripsina), se mezcló y calibró el espectrofotómetro, posteriormente se adicionaron $50 \mu\text{l}$ de extracto puro y se leyó la absorbancia a 540 nm .

La actividad amidasílica de la tripsina es medida por la hidrólisis del sustrato L-benzoil-Arginina-p-nitroanilida (BAPNA) 1 mM en un amortiguador TRIS 0.1 M pH 8. Una unidad de actividad de esta enzima corresponde a 1 μ mol de p-nitroanilide liberado por minuto. La actividad amidasílica de la quimotripsina es estimada por ácido láctico (HPLA) por la hidrólisis del Succini-Alanina-2-Prolina-fenialanina p-nitroanilida (SAPNA) 1 nM en un amortiguador TRIS .1 M oH 8 a 405 nm. Una unidad de actividad de esta enzima corresponde a un μ mol de p-nitroanilida liberado por minuto.

La actividad de la enzima α -amilasa se determinó al adicionar 125 μ l de amortiguador glicógeno Fosfato (10 mM, pH 7), 500 μ l de DSA (ácido 3,5 dinitrosalicílico) y 50 μ l de enzima. Una unidad de actividad de esta enzima se define como un mg de maltosa liberada por minuto a 37° C por mg de proteína.

En el caso de la actividad de la enzima α -glucosidasa, esta es medida utilizando p-nitrofenil á-D glucopyranosida en un tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y se lee a 410 nm. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que hidroliza un μ M de sustrato por minuto.

8- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los parámetros e indicadores evaluados se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA) de una sola vía para determinar la posible existencia de diferencias significativas entre los tratamientos en los resultados de todos los experimentos, utilizando un intervalo de confianza de 95%. La ponderación de las diferencias se realizó por medio de una prueba de rangos múltiples de Duncan (Zar, 1974).



9- RESULTADOS

9.1- Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos promedios registrados en los tanques experimentales se presentan en la Tabla 4:

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos registrados en el experimento realizado con larvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas enriquecidas con hidrolizados de Krill (Promedio \pm Error estandar)

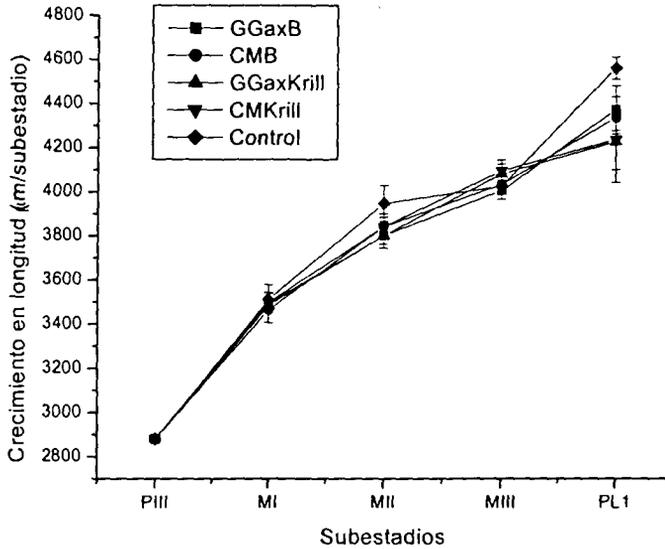
	Temperatura (°C)	Salinidad (g· L ⁻¹)	Oxígeno disuelto (mgO ₂ · L ⁻¹)
Promedio \pm ES	28.98 \pm 0.046	35 \pm 0.011	6.07 \pm 0.042

9.2- Crecimiento

La Tabla 5 presenta los valores promedio finales de crecimiento en longitud ($\mu\text{m}/\text{día} \pm \text{ES}$) de las larvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas. Se observa una mayor tasa de crecimiento en las larvas del Control con un valor de 334.36 $\mu\text{m}/\text{día}$ seguida por los tratamientos CM Cal y Ggax Cal (289.5 y 281.91 $\mu\text{m}/\text{día}$ respectivamente) en tanto que la tasa mas baja la presentó la dieta Ggax Krill con un valor de 255.01 $\mu\text{m}/\text{día}$. Sin embargo, el análisis estadístico aplicado (ANDEVA) a la tasa de crecimiento en longitud obtenida en el experimento no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) La Gráfica 1 muestra el crecimiento de los organismos a través del desarrollo larval.

Tabla 5. Tasa de crecimiento en longitud ($\mu\text{m}/\text{día} \pm \text{ES}$) de larvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas.

	Ggax Cal	CM Cal	GGax Krill	CM Krill	Control
PIII - PL1 (n)	281.91 \pm 33.65 (3)	289.5 \pm 11.32 (3)	255.01 \pm 35.73 (3)	258.30 \pm 48.31 (3)	334.36 \pm 10.00 (3)

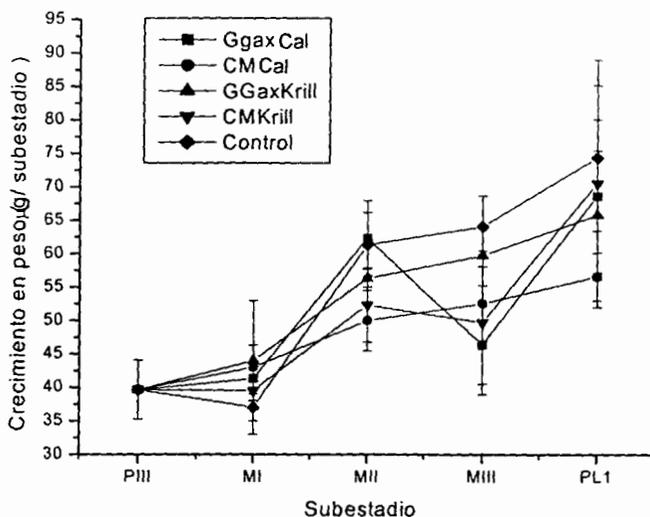


Grafica 1. Crecimiento en longitud ($\mu\text{m}/\text{subestadio} \pm \text{ES}$) en larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas

El análisis de varianza aplicado al Coeficiente de crecimiento diario, para conocer porcentaje de incremento en peso por día de las larvas alimentadas con dietas microencapsuladas no señaló diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$); de la misma manera que en el caso anterior, fue el tratamiento Control el que presentó el valor mas alto con un DGC de 22.19, seguido por el tratamiento Ggax Krill con un DGC de 17.95 en tanto que el tratamiento CM Cal fue el que presentó la menor ganancia en peso (13.72) (Tabla 6). La Grafica 2 muestra la ganancia en peso que presentaron las larvas a través del desarrollo de PIII a MI.

Tabla 6. Coeficiente de Crecimiento diario ($\mu\text{g}/\text{día} \pm \text{ES}$) de larvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas

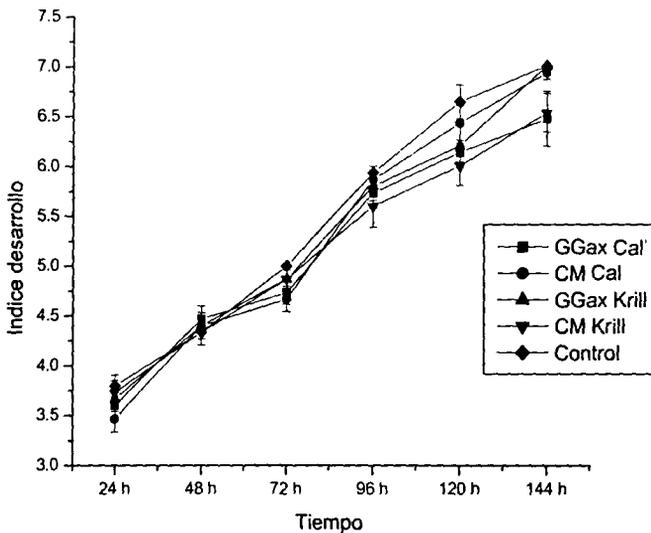
	GGax Cal	CM BCal	GGax Krill	CM Krill	Control
PIII – PL1 (n)	16.62 ± 3.55 (3)	13.72 ± 1.90 (3)	17.95 ± 4.06 (3)	16.66 ± 5.58 (3)	22.19 ± 3.90 (3)



Grafica 2. Crecimiento en peso ($\mu\text{g} / \text{subestadio} \pm \text{ES}$) de larvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas

9.3- Índice de desarrollo

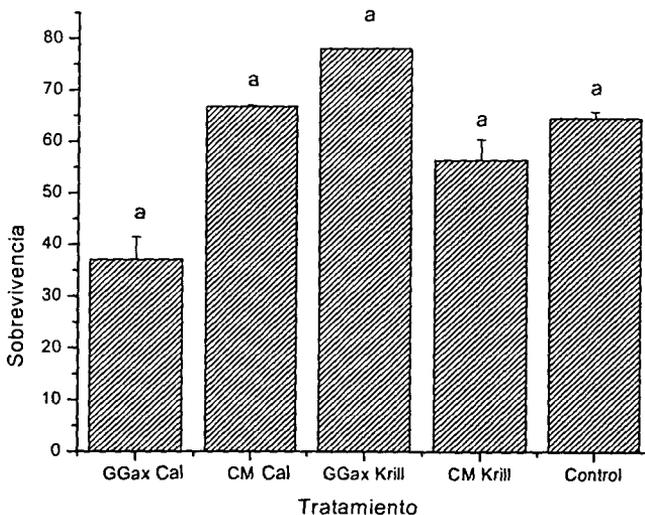
El ANDEVA para el Índice de Desarrollo no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas ($P > 0.05$). Sin embargo, a las 144 horas se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) observándose al final del tratamiento un retraso significativo del desarrollo en los tratamientos de Ggax Cal y CM Krill (ID 6.47 y 6.53 respectivamente) (Tabla 7).



Grafica 3. Índice de desarrollo en larvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

9.4- Supervivencia

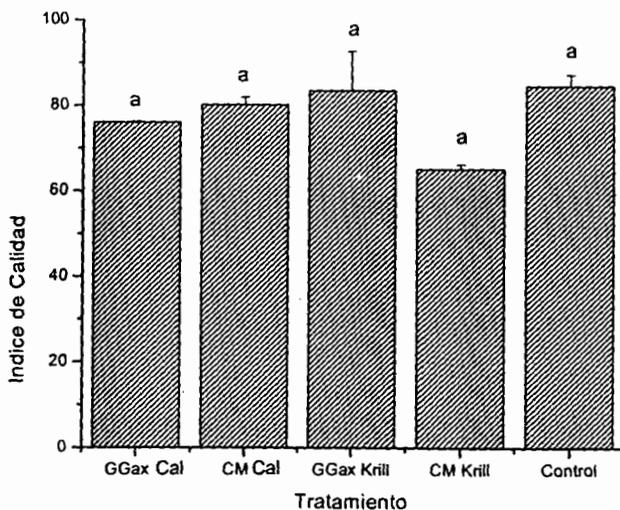
La Gráfica 4 muestra la supervivencia obtenida al final del experimento para cada uno de los tratamientos. El ANDEVA no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) Sin embargo, el menor porcentaje de supervivencia se obtuvo con el tratamiento Ggax Cal con un valor de 37.12 %; aunque esta misma dieta con hidrolizado de Krill presentó una clara tendencia al incremento en la supervivencia en los organismos mantenidos con el tratamiento Ggax Krill (78.02%), la cual resultó ser 14% más elevada que el Control de alimento vivo (64.38%).



Gráfica 4. Supervivencia de larvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

9.5- Índice de Calidad

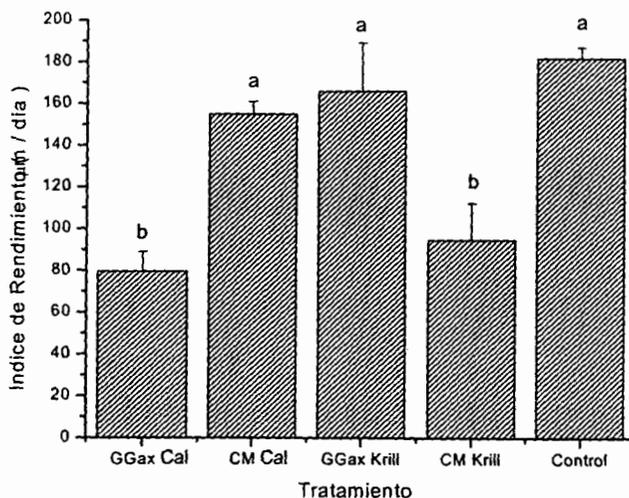
Como resultado de la prueba de estrés salino a la cual se sometieron las postlarvas (PL 1) de cada tratamiento al finalizar el periodo experimental, se determinó el Índice de Calidad. Nuevamente, la prueba estadística (ANDEVA) en este caso no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) presentándose el IC muy similar en los tratamientos Control y Ggax Krill (84.25 y 83.34 % respectivamente) en tanto que el tratamiento CM Krill fué el que presentó el menor IC (64.93%).



Gráfica 5. Índice de Calidad en larvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas artificiales microencapsuladas (Promedio ± ES)

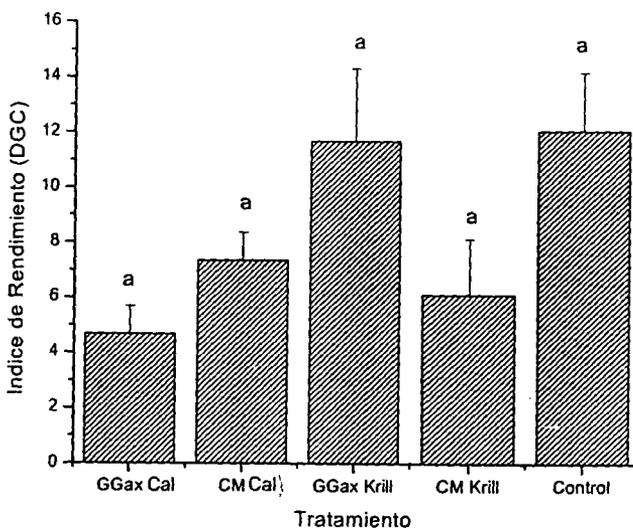
9.6- Índice de Rendimiento

Los resultados obtenidos del Índice de Rendimiento en longitud dados con base a la tasa de crecimiento, la sobrevivencia y el Índice de calidad se presentan en la Gráfica 6. La prueba estadística en este caso mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) siendo significativamente menores los tratamientos Ggax Cal y CM Krill con un rendimiento de 79.41 y 94.38 $\mu\text{m} / \text{día}$ respectivamente. En este caso nuevamente fue el tratamiento Control el que presentó el mejor IR seguido por los tratamientos Ggax Krill y CM Cal con 181.25 y 165.71 $\mu\text{m} / \text{día}$ respectivamente. En este caso, para ponderar las diferencias significativas señaladas por el ANDEVA entre los tratamientos se utilizó la prueba *a posteriori* de Duncan.



Gráfica 6. Índice de Rendimiento ($\mu\text{m} / \text{día} \pm \text{ES}$) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas

De la misma manera, se aplicó el análisis estadístico (ANDEVA) al Rendimiento en peso en este caso en particular derivado del Coeficiente de Crecimiento diario (DGC), la sobrevivencia y el Índice de calidad de las larvas alimentadas con las dietas microencapsuladas experimentales; no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). Nuevamente fue el tratamiento Control el que presentó un mayor Índice seguido por el tratamiento Ggax Krill (12.03 y 11.67 respectivamente). En tanto que el tratamiento que presentó un menor IR fue el GGax Cal con un valor de 4.68. (Gráfica 7).

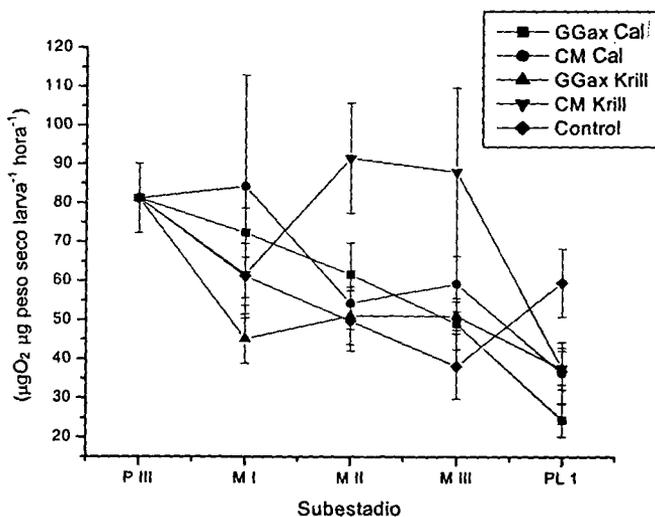


Gráfica 7 Índice de Rendimiento en peso (DGC \pm ES) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas

9.7- Consumo de oxígeno

En el Anexo 1 se presentan los valores del consumo de O_2 ($\mu\text{g } O_2 \mu\text{g peso seco larva}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) de los organismos alimentados con dietas artificiales microencapsuladas. Se observa que en el subestadio de MI no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) En tanto que en el resto de los subestadios el ANDEVA señaló diferencias significativas entre estos ($P < 0.05$).

De manera general se puede observar un decremento gradual en cuanto al consumo de O_2 en todos los tratamientos conforme avanza el desarrollo larval, el valor promedio de consumo de oxígeno de PIII ($81.17 \mu\text{g } O_2 \mu\text{g peso seco larva}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) medido a partir de un pool de larvas en este subestadio disminuye gradualmente en cada subestadio siguiente; sin embargo, se presentó un pico de consumo de oxígeno en los subestadios de MII y MIII registrándose los valores mas altos registrados (91.44 y $87.91 \mu\text{g } O_2 / \mu\text{g peso seco / larva}$) en el tratamiento CM Krill, volviendo a disminuir en el siguiente subestadio; en tanto que, en el tratamiento control, se presentó un incremento significativo de consumo de O_2 del subestadio de MIII a PL 1 registrándose al final un valor de $59.43 (\mu\text{g } O_2 \mu\text{g peso seco larva}^{-1} \text{ hora}^{-1})$ (Gráfica 8).

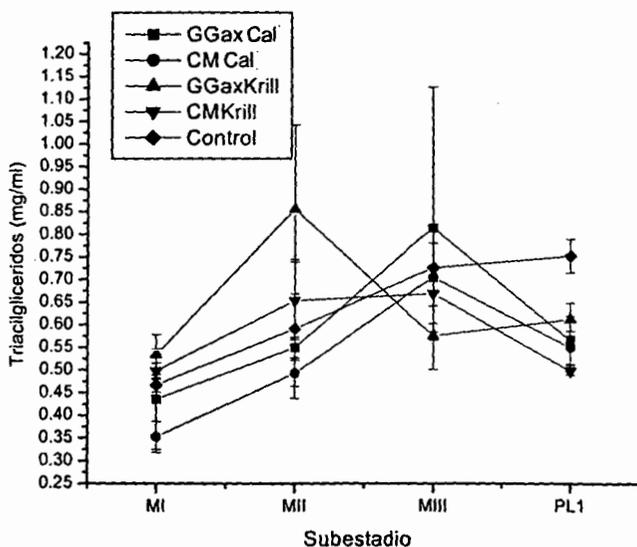


Gráfica 8. Consumo de Oxígeno ($\mu\text{g } O_2 \mu\text{g peso seco larva}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

9.8- Metabolitos

a) Triacilgliceridos

En el caso de los Triacilglicéridos el ANDEVA aplicado no produjo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos para MI, MII y MIII, en tanto que en el subestadio de PL 1 si se produjeron diferencias significativas ($P < 0.05$), siendo, en este subestadio el Control el que presentó un valor (0.7516 mg/ml) significativamente diferente al resto de los tratamientos. Los valores mas altos que se registraron corresponden a las dietas Ggax Krill (en MII) y Ggax Cal (en MIII) con 0.8553 y 0.8138 mg/ml respectivamente, mientras que el valor mas bajo (0.3525 mg/ml) correspondió al tratamiento CM Cal que se registró en el subestadio de MI (Gráfica 9). De manera general en todos los tratamientos se observa una tendencia al incremento en la concentración de este metabolito del subestadio de MI a MIII. Sin embargo, esta concentración disminuye al pasar al subestadio de PL1, excepto en los tratamientos GGax Krill y Control en los cuales se observa un aumento en la concentración de MIII a PL.



Gráfica 9. Concentración de Triacilglicéridos (mg/ml) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

b) Colesterol

Para el colesterol el ANDEVA calculado arrojó diferencias significativas entre los tratamientos de los subestadios de MI y PL1 ($P < 0.05$) (Anexo 2) en tanto que para los subestadios de MII y MIII no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$). De manera general se pudo observar que en todos los tratamientos la concentración de este metabolito aumentó del subestadio de MI a MII (o MIII en el caso del tratamiento CM Cal) y posteriormente presentó una disminución de MII a PL1, excepto en el tratamiento Control en donde se registró el pico de actividad de esta enzima en MI (0.1916 mg/ml) para posteriormente disminuir significativamente hasta MIII y volver a incrementarse en PL1. Por otro lado, la concentración mas baja registrada fue de 0.0622 mg/ml en el tratamiento CM Cal en los subestadios de MI y PL1 y en el tratamiento CM Krill en PL1.

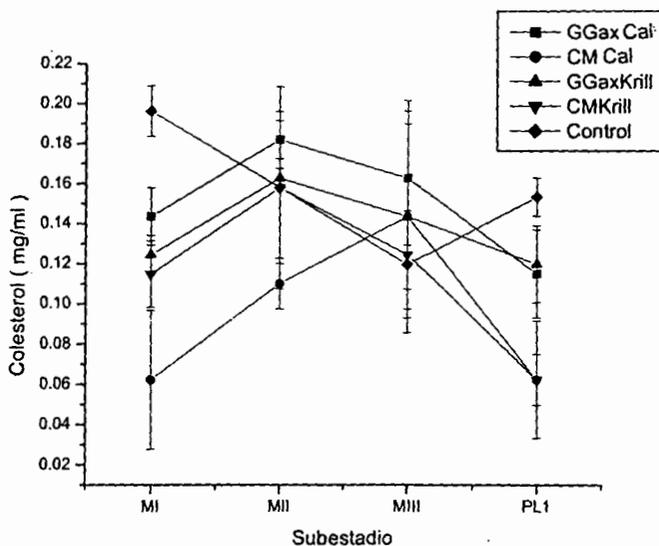


Tabla 10. Colesterol (mg/ml) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

c) Razón TAG/Colesterol

La razón TAG/Colesterol (Tabla 11) se mantuvo constante a lo largo del estadio de mysis de las larvas de *L. vannamei* del presente estudio observándose un incremento paulatino de MIII a PL1. Exceptuando la dieta CM Cal, en el resto de los tratamientos se presentó una tendencia al incremento de esta razón de MI a MIII. En tanto que en el tratamiento CM Cal la razón disminuyó considerablemente en estos mismos subestadios para volver a incrementarse significativamente de MIII a PL1. De manera particular se puede observar que, los tratamientos Ggax Krill y CM Krill presentan una razón TAG/Colesterol mayor que la registrada en el control de MI a PL1. Los valores resultantes de esta razón se presentan en el anexo 2^a.

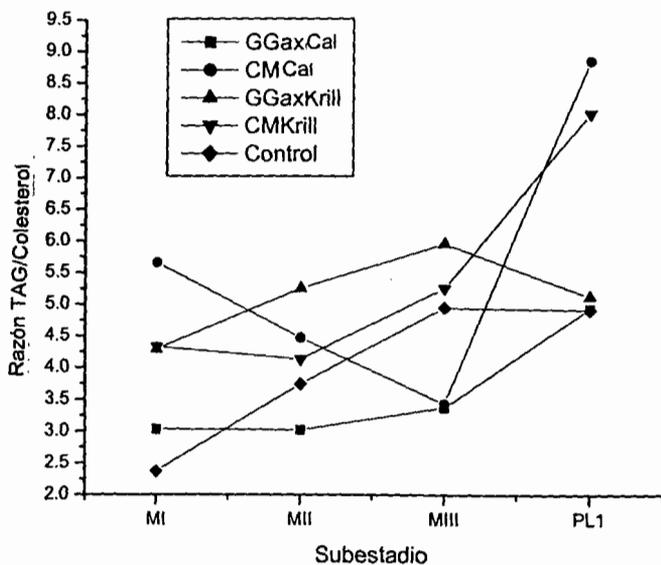


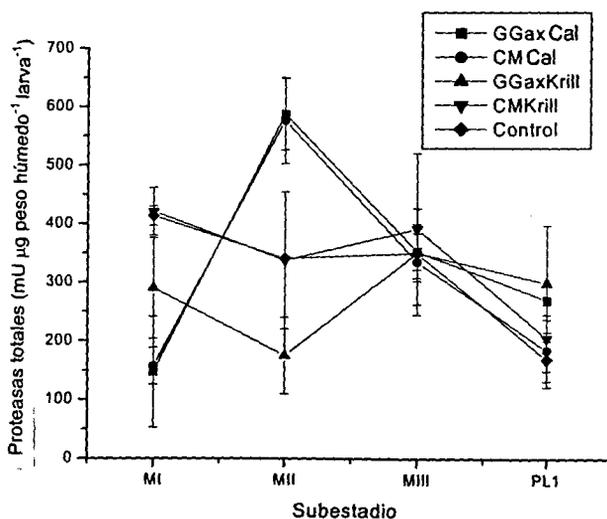
Tabla 11. Razón TAG/Colesterol de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas

9.9- Actividad enzimática

9.9.1- Enzimas Proteasas

a) Proteasas totales

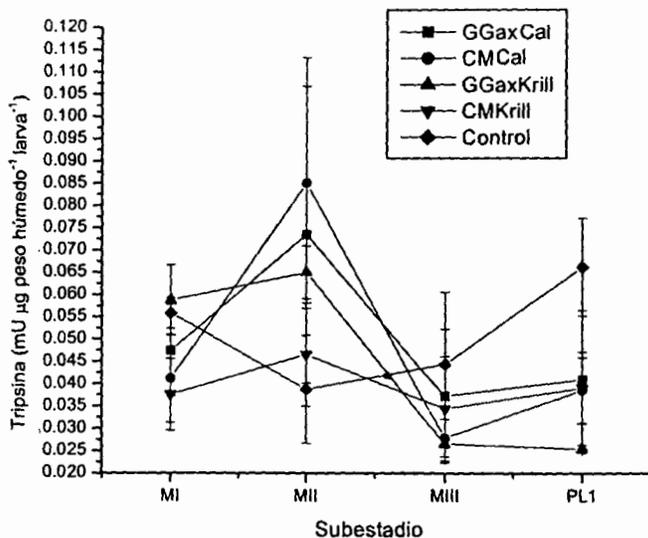
En el caso de las proteasas totales el ANDEVA señaló diferencias significativas solo entre los tratamientos de los subestadios MI y MII ($P < 0.05$). En el subestadio de MI se registró alta actividad de esta enzima en los tratamientos CM Krill y Control (420.52 y 413.22 mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹ respectivamente), en tanto que los valores mas bajos de todo el experimento se registraron en este mismo subestadio en los tratamientos CM B Cal y GGax Cal (156.98 y 146.84 mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹). Sin embargo, fue en estos mismos tratamientos en los que se presenta el pico de actividad de las proteasas en el siguiente subestadio de MII (GGax Cal, 586.81 y CM Cal, 575.88 mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹ respectivamente) en el Anexo 2 se señalan las diferencias significativas entre los tratamientos de estos subestadios. De manera general a partir del subestadio de MII la actividad de esta enzima disminuyó conforme avanzaban los subestadios larvales alcanzando los niveles inferiores en PL 1.



Grafica 12. Proteasas totales (mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

b) Tripsina

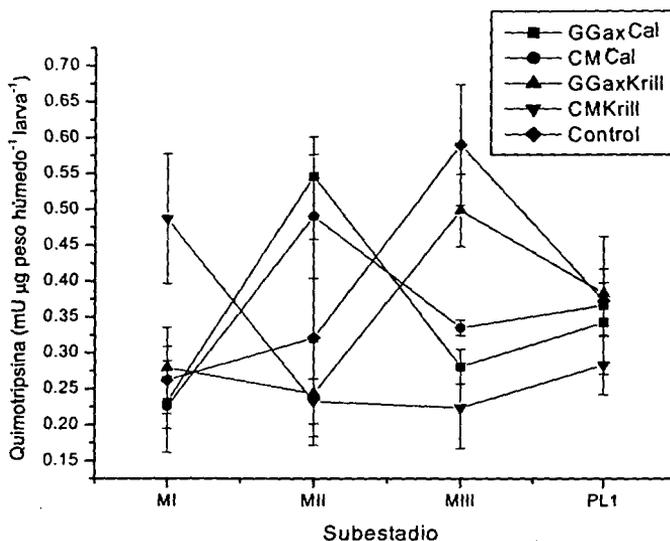
El ANDEVA resultante para la Tripsina aplicado entre tratamientos no arrojó diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$) en ninguno de los subestadios. En todos los tratamientos (excepto el Control) la actividad de esta enzima se incrementó del subestadio de MI a MII para después disminuir paulatinamente en los subestadios siguientes. En el caso del Control la actividad de la enzima disminuyó de MI a MII para después mostrar un incremento paulatino de su actividad alcanzando su nivel mas alto en PL1 (0.0660 mU/ μg peso húmedo/larva) La mayor actividad registrada para esta enzima fue en el subestadio de MII en los tratamientos CM Cal, GGax Cal y Ggax Krill (0.0849, 0.0734 y 0.0649 mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹).



Grafica 13. Tripsina (mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

c) Quimotripsina

El análisis estadístico para la Quimotripsina aplicado entre los tratamientos de cada subestadio no arrojó diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$) excepto en el subestadio MIII. Se presentaron dos picos de actividad de esta enzima, el primero de ellos en los tratamientos Ggax Cal y CM Cal en MII (0.5448 y 0.4891 mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹ respectivamente) y el segundo en los tratamientos GGax Krill y Control en MIII (0.4970 y 0.5881 mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹ respectivamente) las diferencias significativas entre los tratamientos de este subestadio se presentan en el Anexo 2.

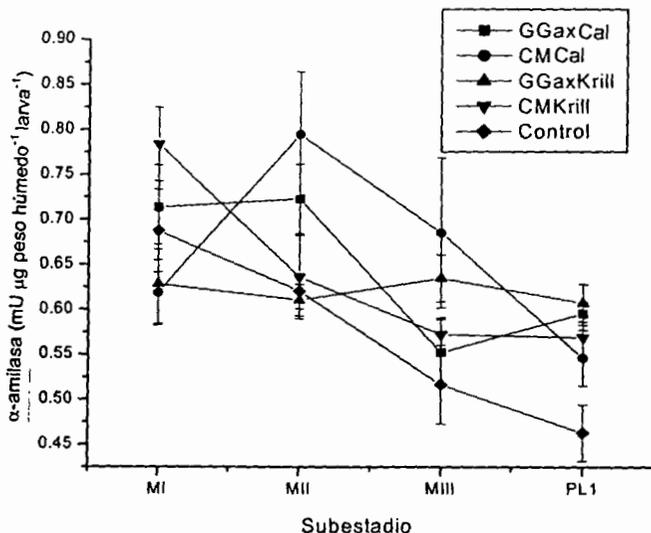


Grafica 14. Quimotripsina (mU μg peso húmedo⁻¹ larva⁻¹) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

9.9.2- Enzimas carbohidrasas

a) α -amilasa

El ANDEVA aplicado a la concentración de la α -amilasa no señaló diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los subestadios ($P > 0.05$). Los valores de actividad más altos registrados para esta enzima fueron en los tratamientos CM Krill y CM Cal en los subestadios de MI y MII respectivamente (0.7836 y 0.7939 $\text{mU } \mu\text{g peso húmedo}^{-1} \text{ larva}^{-1}$). En la Gráfica 15 se observa que la actividad de esta enzima disminuye paulatinamente a lo largo del desarrollo larval alcanzando los niveles más bajos en el subestadio de PL 1 particularmente en el tratamiento Control con una actividad de $0.4626 \text{ mU } \mu\text{g peso húmedo}^{-1} \text{ larva}^{-1}$.



Gráfica 15. α -amilasa ($\text{mU } \mu\text{g peso húmedo}^{-1} \text{ larva}^{-1}$) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

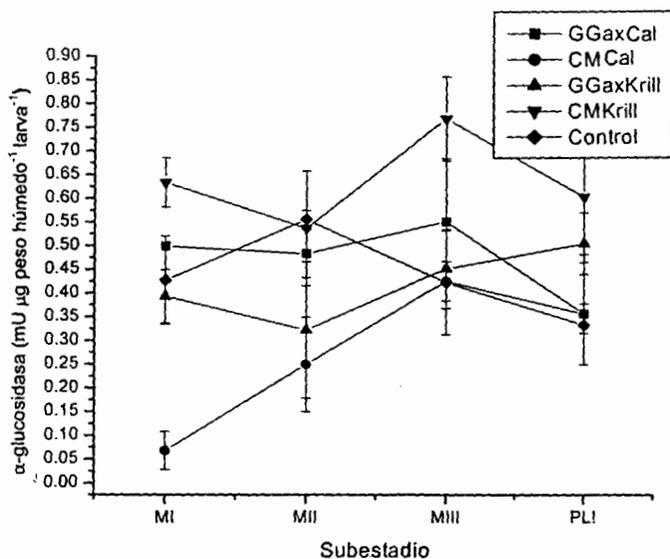
CINCOBA



BIBLIOTECA CENTRAL

b) α -glucosidasa

Para la α -glucosidasa, el ANDEVA solamente arrojó diferencias significativas entre los tratamientos del subestadio MI ($P < 0.05$), registrándose en este caso, el el valor mas bajo en el tratamiento CM Cal ($0.0679 \text{ mU } \mu\text{g peso húmedo}^{-1} \text{ larva}^{-1}$) el cual es significativamente diferente al resto de los tratamientos en este subestadio (Anexo 2). En MIII se registró un pico de actividad de esta enzima en el tratamiento CM Krill registrándose el valor mas alto ($0.7667 \text{ mU } \mu\text{g peso húmedo}^{-1} \text{ larva}^{-1}$) de todo el experimento.



Grafica 16. α -glucosidasa ($\text{mU } \mu\text{g peso húmedo}^{-1} \text{ larva}^{-1}$) de larvas *L. vannamei* alimentadas con dietas microencapsuladas (Promedio \pm ES)

10- DISCUSIÓN

Los valores promedio de las mediciones fisicoquímicas registrados en el presente trabajo se encontraron dentro del rango óptimo requerido para el cultivo de larvas de peneidos en general (Smith *et al.* 1993) y en particular para las especies *Litopenaeus schmitti* y *Farfantepenaeus notialis* (Alfonso *et al.* 1993; De la Cruz, 1992) y de *L. setiferus* (Gallardo, 1994; Rosas, 1995).

La temperatura es el principal factor que influye en el crecimiento y desarrollo de larvas de peneidos, en este sentido, Alfonso (1988) señaló que las temperaturas mayores de 28° C aceleran el desarrollo de larvas de *L. schmitti* y que niveles por debajo de esta, producen un retraso en el desarrollo larval. Alfonso también mencionó que cuando las larvas de esta especie son tratadas con temperaturas distintas al rango óptimo, se produce una mortalidad significativa en los tanques de cría. Gallardo *et al.* (1995) encontró que cuando las larvas de *L. setiferus* son mantenidas con concentraciones bajas de alimento vivo y bajas temperaturas se retrasa de manera significativa el proceso de metamorfosis. El rango de temperatura al cual se mantuvieron las larvas de *L. vannamei* del presente estudio resultó ser óptimo para su crecimiento y desarrollo.

Uno de los indicadores más utilizados para evaluar el efecto nutricional de una dieta es el crecimiento. Este indicador evalúa los resultados en términos de tasa de crecimiento más que como la longitud o el peso total alcanzados, ya que dichas tasas muestran la influencia del tiempo en que tardan las larvas en alcanzar tales longitudes o pesos como resultado del alimento suministrado (Gallardo, 1994). En este sentido, se observa que, las larvas alimentadas con las dietas artificiales en las cuales se incluyó harina de calamar o hidrolizado de krill presentaron tasas de crecimiento en longitud ($\mu\text{m}/\text{día}$) sin diferencias significativas con respecto al control de alimento vivo; en este caso fueron las dietas elaboradas con harina de calamar (tratamientos CM Cal y Ggax Cal) las que presentaron una tendencia hacia mayores tasas de crecimiento durante todo el estadio de mysis.

En el caso del crecimiento en peso, los valores se presentan como DGC (Coeficiente de Crecimiento diario), el cual, de la misma manera que la tasa de crecimiento, muestra el incremento en peso por día (expresado en porcentaje). Al igual que el caso anterior, fueron las larvas del Control las que presentaron un DGC más elevado que el resto, sin embargo, el análisis estadístico en este caso tampoco mostró diferencias significativas entre el control y el resto de los tratamientos, sin embargo, la dieta Ggax Krill fue la que presentó un DGC mas alto que el resto de los tratamientos.

Es importante señalar la importancia de este indicador al evaluar el estado fisiológico de las larvas sometidas a una dieta en particular, de esta manera, al analizar el crecimiento, se evalúa la calidad de la dieta *per se*. Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que las dietas suministradas a las larvas de *L. vannamei* cubren de manera óptima los requerimientos proteicos necesarios que les permiten crecer a ritmos semejantes a aquellas larvas a las cuales se les suministró de manera normal los nauplios de *Artemia*. Resultados obtenidos en otros estudios demuestran la calidad nutritiva de alimentos formulados a base de harina de calamar en *L. vannamei*, *Penaeus stylirostris*, *P. monodon* y *P. indicus* (Cruz-Rique, 1987) y en *L. setiferus* (Gallardo, 2000) en tanto que el presente estudio muestra las dietas como el hidrolizado de krill cubren también de manera óptima con los requerimientos proteicos en la alimentación de las larvas de *L. vannamei*, lo cual se comprueba al evaluar los demás indicadores tales como el Índice de desarrollo, la Sobrevivencia, el Índice de Calidad y el Índice de Rendimiento.

Una manera de medir la tasa de metamorfosis de las larvas es a través del Índice de desarrollo (Villegas y Kanazawa, 1979), el cual, además de estar condicionado por la temperatura, se encuentra altamente influenciado por el tipo de alimento suministrado a las larvas. En este sentido, el análisis estadístico aplicado al Índice de desarrollo de las larvas de *L. vannamei* del presente estudio permite observar que la tasa de metamorfosis a las 24, 48 72, 92 y 120 horas se presentaron a ritmos similares en cada uno de los tratamientos, es decir, no se presentaron diferencias significativas en cuanto al desarrollo entre los tratamientos a estas horas. Solamente a las 144 (6° día) ocurre un retraso significativo en los tratamientos Ggax Cal y CM Krill, en donde solamente un 47 y un 53 %

respectivamente de las larvas de estos tratamientos alcanzaron el estadio de PL1; en tanto que los tratamientos CM Cal, Ggax Krill y Control pasaron a PL1 (en un 93% para el tratamiento CM Cal y en un 100% para los dos últimos).

Resultados obtenidos en otros estudios con dietas artificiales de alimento microencapsulado y microparticulado muestran Índices de desarrollo de *L. setiferus* de MI a PL1 de 96 y 120 horas respectivamente (Gallardo, 2000) y para *L. vannamei* y *L. setiferus* de 120 y 72 h respectivamente, alimentadas con dietas microparticuladas purificadas (Durruty, 2001). Los resultados de los trabajos señalados indican que el suministro de dietas artificiales a larvas de camarón blanco permiten a las larvas desarrollarse a ritmos similares que cuando se les suministra de manera normal los nauplios de *Artemia*.

De la misma manera que en el crecimiento, la sobrevivencia de larvas de camarón se encuentra influenciada en gran medida por la cantidad y sobre todo por la calidad del alimento suministrado. Esto se puede observar en los resultados obtenidos en las larvas alimentadas con la dieta Ggax Cal en donde se registró un bajo porcentaje de sobrevivencia (37 %) en este tratamiento; sin embargo, la inclusión del hidrolizado de krill en sustitución del harina de calamar en esta misma dieta (Ggax Krill) incrementó su calidad nutritiva dando como resultado un importante incremento en la sobrevivencia de las larvas con un porcentaje de 78 % aún por encima del control en donde se obtuvo un 64 % de sobrevivencia.

Exactamente lo contrario ocurrió en el caso de las dietas CM Cal (66 %) y CM krill (56 %), en donde la sobrevivencia se vio ligeramente mermada (en aproximadamente un 10 %) al sustituir la harina de calamar en la formulación por hidrolizado de krill por lo cual es probable que en esta última dieta en particular, sea el harina de calamar la principal fuente proteica para las larvas y que al ser sustituida no se cubrieron los mismos requerimientos.

Sin embargo, cabe destacar el hecho de que, a pesar de las diferencias en los resultados, el análisis estadístico no señaló diferencias significativas entre los tratamientos con dietas artificiales y el control de alimento vivo; lo cual corrobora el hecho de que las

larvas de *L. vannamei* pueden crecer, desarrollarse y presentar buenos porcentajes de sobrevivencia, con alimento artificial en sustituyendo a los nauplios de *Artemia*, tal como se ha comprobado en otros estudios de sustitución de alimento vivo por alimento microparticulado y microencapsulado en la especie *L. setiferus* (Gallardo, 2000).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el Índice de Calidad permite evaluar la calidad y resistencia de las postlarvas obtenidas al finalizar el desarrollo larval. Mediante un cambio brusco en la salinidad durante un tiempo determinado se cuantifican el número de Postlarvas que sobreviven al shock osmótico al que son sometidas. Este método ha sido empleado por diversos autores para probar la resistencia de las postlarvas de diferentes especies de peneidos alimentadas tanto con alimento vivo: *L. schmitti* (De la Cruz, 1992), *P. monodon* (Rees *et al.* 1994) como con alimento artificial: *L. setiferus* (Gallardo, 1994, 2000) y *L. setiferus* y *L. vannamei* (Durruty, 2001) El análisis estadístico aplicado al Índice de calidad obtenido en el presente estudio, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, sí se presentan algunas diferencias en cuanto a los porcentajes de sobrevivencia ante el reto salino derivados de la condición fisiológica general de las larvas.

Tal es el caso de las larvas alimentadas con la dieta Ggax Krill, las cuales resistieron mejor la prueba con una sobrevivencia de 83 % (muy parecida a la obtenida al control con 84%). Esto indica que las postlarvas de este tratamiento se encontraban en una condición fisiológica tal que les permitió resistir bien el cambio de salinidad al que fueron sometidas (larvas con buen Índice de desarrollo, el DGC y la sobrevivencia mas altas) condición derivada de las condiciones de cultivo y de manera importante del alimento consumido. Por otro lado, fueron las larvas de los tratamientos que presentaron bajos porcentajes de sobrevivencia (tratamientos Ggax Cal y CM Krill) las que resistieron menos la prueba de estrés salino, aún cuando estas larvas presentaron buenas tasas de crecimiento esto no es un indicativo de que fueran larvas fuertes con buena condición fisiológica lo cual se reflejó en la menor resistencia que mostraron ante el reto al que fueron sometidas.

El Índice de rendimiento permite resumir en un solo valor las características de las postlarvas de cada tratamiento. Este se calcula tanto para el crecimiento en longitud como para el peso. El crecimiento (en ambos casos) es corregido en base a la sobrevivencia y el Índice de calidad. Este índice por lo tanto, proporciona una integración general de la condición fisiológica de las larvas ante las diferentes dietas suministradas, integrando tres de los parámetros más importantes cuando se trata de evaluar el efecto de una dieta sobre el desarrollo larval. Los resultados muestran diferencias significativas solo en el caso del Índice de Rendimiento en longitud en los tratamientos Ggax Cal y CM Krill con respecto al Control. En el caso del Índice de rendimiento en peso, aunque no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos y el control, sí se registraron los valores más pequeños de rendimiento en estos mismos tratamientos. (Anexo 1).

En este sentido, el Índice de Rendimiento más bajo en ambos tratamientos (Ggax Cal y CM Krill), fue principalmente el resultado de menores porcentajes de Sobrevivencia (principalmente) y de Índice de Calidad. Como ya se analizó anteriormente, las larvas de estos tratamientos presentaron buenas tasas de crecimiento, sin embargo, esta condición no fue suficiente para garantizarles la mejor sobrevivencia ni la mejor respuesta ante los cambios de su entorno (en ambos casos se registraron los porcentajes más bajos), es decir, que aunque con buena talla, pocas fueron las larvas que completaron el desarrollo y sobrevivieron al shock osmótico, lo cual se vio reflejado al integrar el Índice de rendimiento en estos dos tratamientos.

Por otro lado, como resultado de un buen crecimiento, buenos porcentajes de Sobrevivencia e Índice de Calidad, fueron las larvas del tratamiento Ggax Krill las que presentaron Índices de Rendimiento tanto en longitud como en peso (165.71 $\mu\text{m}/\text{día}$ y 11.67 $\mu\text{g}/\text{día}$ respectivamente) más cercanos al Control aunque sin diferencias significativas con respecto a éste.

El consumo de oxígeno medido durante el desarrollo larval bajo condiciones controladas puede ser usado como un indicador de la condición fisiológica de las postlarvas obtenidas en cultivo. Considerando que el consumo de oxígeno en larvas es la

suma del Incremento del Calor Aparente y la actividad, éste puede ser usado como un reflejo del costo metabólico asociado con la ingestión y asimilación de cada tipo de alimento (Rosas, 1995). Kurnaly *et al.* (1989) señala que la magnitud de este indicador depende del tipo y la cantidad de alimento ingerido, la calidad nutricional del alimento y la condición fisiológica de las larvas.

En este sentido, la tasa respiratoria medida a través del consumo de oxígeno durante el desarrollo larvario de *L. vannamei* con las dietas artificiales microencapsuladas, presentó una disminución gradual de PIII a PL1. El valor inicial registrado a partir de un pool de larvas en estadio de protozoa III ($81.17 \mu\text{g O}_2 \mu\text{g peso seco larva}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) disminuyó a través de los subestadios subsiguientes en todos los tratamientos, presentándose solamente un incremento significativo en el tratamiento CM Krill en los subestadios de MII y MIII para posteriormente disminuir en PL 1. No se presentaron diferencias significativas en el subestadio de MI en tanto que en los subestadios de MII, MIII y PL1 si se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo 1).

De acuerdo con Kurnaly (1989) y Rosas (1995) un aumento en el consumo de oxígeno está asociado a la acumulación de energía necesaria para los procesos involucrados en los cambios morfológicos y conductuales que sufren las larvas durante el desarrollo. En el presente estudio se observa como los organismos presentan un alto consumo de O_2 en el subestadio de PIII lo cual indica que las larvas en este momento requieren de una gran cantidad de energía para llevar a cabo el paso de PIII a PL1 el cual es considerado como el cambio más crítico del desarrollo larval que es cuando las larvas sufren la mayor parte de cambios morfológicos (desarrollo de apéndices bucales, desarrollo del aparato digestivo, etc), bioquímicos (cambios en la actividad de enzimas digestivas) y conductuales (paso de hábitos totalmente filtradores a raptorales).

De manera general, se puede observar que, las larvas alimentadas con las dietas microencapsuladas presentan un consumo de oxígeno mayor que el control de alimento vivo en el estadio de mysis. En este sentido se puede señalar que en estos organismos el costo metabólico derivado del proceso de ingestión, asimilación y absorción de estas

dietas es mayor que el mismo proceso digestivo derivado del consumo de nauplios de *Artemia* lo cual se ve reflejado en una mayor tasa respiratoria.

Los resultados obtenidos en la actividad enzimática de las larvas de *L. vannamei* muestran que estas dietas promovieron la inducción de dicha actividad, sobre todo aquellas dietas en las cuales el hidrolizado de krill fue incluido; esta inducción, por lo tanto, aumentó la capacidad digestiva de las larvas, de tal manera que el proceso de asimilación y absorción del alimento artificial consumido se vio favorecido. Todo este proceso digestivo derivado del aumento en la capacidad digestiva por inducción de la actividad enzimática requiere de energía metabólica la cual es obtenida por los organismos a partir del alimento y es registrada del proceso de respiración (energía generada por la producción de moléculas de ATP).

En crustáceos, durante las fases naupliares y los primeros estadios larvales, la energía requerida depende de las reservas endógenas, invariablemente mucha de esta energía endógena se encuentra en la forma de triacilglicéridos (TAG) los cuales son considerados como el mayor depósito o almacenamiento de lípidos en las células animales. Durante estos estadios tempranos de desarrollo, los triacilglicéridos continúan siendo consumidos hasta que las demandas energéticas del crecimiento y metabolismo son cubiertas por fuentes exógenas, es decir, por el alimento. Cuando la energía derivada de estas fuentes excede las demandas metabólicas basales de las larvas, este exceso de energía se almacena como TAG, por el contrario, cuando la energía derivada del alimento es insuficiente para mantener el metabolismo basal de las larvas, entonces el TAG endógeno es catabolizado (Fraser, 1989).

En este sentido se observa que, las larvas de *L. vannamei* alimentadas con nauplios de *Artemia* presentan una concentración de TAG que aumenta progresivamente conforme avanza el desarrollo larval, es decir que, el aporte lipídico del alimento vivo provee a las larvas con la energía suficiente para mantener las tasas de crecimiento y desarrollo más altas. Sin embargo, aunque no se presentan diferencias significativas en la concentración de TAG entre tratamientos con dietas artificiales con respecto al control en los subestadios

de MI, MII y MIII, si se registraron mayores concentraciones de este metabolito en MI y MII en los tratamientos CM Krill y Ggax Krill con respecto al control.

Lo anterior nos indica que estas dietas poseen en su formulación los elementos necesarios que brindan a las larvas energía suficiente no solo para realizar sus funciones metabólicas basales. En ambas dietas se encuentran ingredientes tales como el aceite de hígado de bacalao, aceites de almidón o maíz los cuales son una fuente importante de ácidos grasos linoléicos los cuales son indispensables para el crecimiento y desarrollo de los organismos. Aunado a esto, el hidrolizado de krill aportó niveles extras de lípidos; se sabe que, los niveles de estos elementos en el hidrolizado de krill van de un 10 a un 20 % del peso seco del hidrolizado, además de ser rico en ácidos grasos insaturados, particularmente los de la fracción n-3 (fuente de energía indispensable para el crecimiento de larvas de peneidos) (Forster, 2000).

Los crustáceos son incapaces de sintetizar esteroides de novo, por lo que, estos elementos se consideran como nutrientes esenciales para estos organismos. El colesterol, es un esteroide precursor de muchos esteroides y también un componente importante de las membranas del plasma, precursor de hormonas esteroides y hormonas de la muda. Al no poderlo sintetizar, debe ser aportado obligadamente por la dieta ya que una deficiencia en este inhibe el crecimiento y retarda el desarrollo de los organismos. En este sentido, las dietas suministradas proveyeron a las mysis del presente estudio, un aporte de colesterol en un nivel óptimo (ambas dietas poseen en su formulación un 5 % de este ingrediente). Si se toma en cuenta que, la concentración de este metabolito se mantuvo constante en los subestadios de MII y MII en todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos y con respecto al control de alimento vivo. Solamente se presentaron diferencias significativas en el subestadio de MI en donde el tratamiento CM Cal presentó la concentración más baja (0.0622 mg/ml).

Generalmente la concentración absoluta de triacilglicéridos no se utiliza como indicador directo de la condición bioquímica de las larvas; por lo cual se utiliza un método para relativizar este contenido de TAG en las larvas en relación a otro lípido el cual es

fácilmente correlacionado con el tamaño de las larvas como ocurre con los esteroides (se sabe que estos representan una proporción bastante constante del peso húmedo de los organismos) (Fraser, 1989) por lo cual son utilizados para expresar el contenido de TAG. En este estudio se utiliza el colesterol para expresar la función de estos elementos en la condición de las larvas de *L. vannamei* en lo que se conoce como la razón TAG/Colesterol.

Los resultados muestran en el Control una razón TAG /Colesterol que se incrementa conforme avanzó el desarrollo larval, lo cual garantizó a estas larvas un aporte de energía tal que les permitió crecer con las mejores tasas y además completar el desarrollo. De manera particular al analizar esta razón se puede comprobar como el hidrolizado de krill proveyó a las larvas de estos tratamientos un importante aporte de lípidos durante todo el estadio de mysis, lo cual les brindó un aporte de energía metabólica tal que se reflejó en el crecimiento, sobrevivencia y desarrollo de las larvas. En este sentido, se puede señalar como la dieta Ggax cubrió de manera óptima con los requerimientos de triacilglicéridos y colesterol *per se*, como se puede observar en la razón TAG/colesterol del tratamiento (Ggax Cal) la cual aunque por debajo del control muestra un comportamiento constante a lo largo de los subestadios. Sin embargo, la inclusión del hidrolizado de Krill aumenta la razón de tal manera (Anexo 2^a), que fueron las larvas del tratamiento Ggax Krill las que presentaron tasas de crecimiento, Índice de desarrollo, Sobrevivencia, Índice de Calidad e Índice de Rendimiento altas y sin diferencias significativas con respecto al Control, como ya se analizó anteriormente.

Los camarones peneidos pasan, después de la eclosión, por 5 estadios de nauplio, en los cuales los organismos se nutren de las reservas vitelogenéticas, tres estadios de protozoa durante los cuales son básicamente filtradores de microalgas y tres estadios de mysis que requieren, al igual que las protozoas de microalgas aunque en menor cantidad y de mayor contenido de proteína animal, cambiando sus hábitos de herbívoros a omnívoros (Kumlu, 1995).

Durante este cambio en hábitos alimenticios, no solo se presentan diferencias en cuanto a la morfología sino también en el funcionamiento del aparato digestivo. En las

protozoéas, la digestión se lleva a cabo en el divertículo anterior del intestino medio y el hepatopáncreas a través de enzimas (Lovett y Felder, 1989). Estas larvas, presentan una baja eficiencia de asimilación y un corto tiempo de gastroevacuación (alrededor de 15 min) por lo que necesitan una buena producción de enzimas (Jones *et al.* 1997 tomado de Durruty, 2001). Las mysis en cambio, desarrollan fuertes dientes en la porción gástrica, lo que les permite ser más carnívoras; en comparación con las protozoéas, retienen mucho alimento y asimilan un alto porcentaje de energía de sus presas (Kumlu *et al.*, 1995). Según Lovett y Felder (1990) estos cambios morfológicos coinciden con variaciones en la actividad de las enzimas digestivas que se acomodan a un cambio en los hábitos y permiten que los camarones puedan digerir y asimilar eficientemente los nutrientes de su dieta.

Los cambios en la actividad de las enzimas digestivas durante el desarrollo han sido estudiados en varias especies: *Farfantepenaeus pauliensis* (Lemos, 1999), *Penaeus indicus* (Kumlu, 1995), *P. monodon* (Lee-Shing, 1992) *Litopenaeus setiferus* (Lovett y Felder, 1989, 1990) y *L. vannamei* (Le Moullac, 1994) entre otros. La función principal de las enzimas digestivas es la de hidrolizar las proteínas, péptidos, carbohidratos y lípidos del alimento, por lo cual su análisis resulta una herramienta en los estudios de nutrición.

Se sabe que la sobrevivencia de larvas de peneidos con dietas artificiales es atribuida a la alta actividad de las enzimas digestivas durante los primeros estadios larvales. Sin embargo, el crecimiento de las mismas con dietas artificiales es generalmente menor al óptimo, por lo cual es necesario utilizar en estas dietas elementos altamente digeribles y/o que estimulen la secreción de enzimas digestivas. Por este motivo, comúnmente se emplea el uso de dietas artificiales en combinación de microalgas ya que se sabe que éstas, poseen sustancias que estimulan la actividad enzimática y/o incrementan la digestión mejorando, de esta manera, la sobrevivencia y crecimiento de las larvas alimentadas con dietas artificiales (Lee-Shing, 1992).

En este sentido, el estudio del comportamiento de la actividad de las principales enzimas digestivas en larvas del camarón blanco *L. vannamei* alimentadas con dietas

artificiales permitió conocer la respuesta de las larvas ante un régimen alimenticio que se pretendía fuera inductor de dicha actividad durante el estadio de Mysis cuando se suprimía en la alimentación el suministro de nauplios de *Artemia*.

La actividad de las proteasas totales registrada en las larvas del Control alimentadas con nauplios de *Artemia* muestran el comportamiento típico de las enzimas proteolíticas registrado en otras especies de peneidos, tales como *P. monodon* (Lee-shing, 1992) y *L. setiferus* (Lovett y Felder, 1990) en donde se presenta una disminución gradual de su actividad a través del estadio de mysis y primeras postlarvas después de que esta actividad alcanzó su máximo en los subestadios de P3-MI. En el caso de los tratamientos con dietas artificiales aquellos que contaban con harina de Calamar en su composición (Ggax Cal y CM Cal) fueron los que presentaron una inducción mayor de las Proteasas totales presentando un pico de actividad en el estadio de MII (586.81 y 575.88 mU μg de peso húmedo⁻¹ larva⁻¹, respectivamente), lo cual supone, para estos organismos un aporte de proteína tal, que se vio reflejado en las buenas tasas de crecimiento principalmente en longitud registradas en estos tratamientos.

La tripsina es la enzima que se encuentra relacionada de manera mas importante con la actividad proteolítica en la digestión de larvas de peneidos (Jones, 1993). En numerosos trabajos se ha determinado que esta enzima representa alrededor del 80 % de las enzimas digestivas de numerosas especies tales como *L. setiferus* (Lovett y Felder, 1990) *P. monodon* (Kurmaly, 1989, Jones, 1993), *P japonicus* (Le vay, 1993, Kamarudin, 1992) entre otros. Asimismo, se ha observado que la actividad proteolítica de la tripsina está íntimamente relacionada con el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de los organismos; se conoce que la actividad de esta enzima registra un incremento paulatino a través de los subestadios de protozoa alcanzando su máxima actividad en mysis I (MI) para posteriormente declinar hasta sus niveles mas bajos en las primeras postlarvas (Lee-Shing, 1992, Kumlu 1995). Es importante señalar que la actividad de la tripsina en los cuatro tratamientos con dietas artificiales en el presente estudio no presentó diferencias significativas con respecto al control en ningunos de los subestadios, registrándose además un pico de inducción en el subestadio de MII en los tratamientos GGax Cal, CM Cal y

GGax Krill (0.0734, 0.0849 y 0.0649 mU μg de peso húmedo⁻¹ larva⁻¹, respectivamente), en este sentido se puede señalar que la actividad de esta enzima a través de estadio de mysis incrementó la capacidad digestiva de las larvas alimentadas las dietas artificiales suministradas de tal manera que, en estos organismos los requerimientos proteicos derivados del proceso de ingestión fueron cubiertos de manera óptima lo cual se vio reflejado en el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia registrados.

En el caso de la quimotripsina, se pueden observar dos picos de inducción de actividad derivados del suministro de las dietas artificiales. El primero de ellos en el subestadio de MII en los tratamientos basales con harina de calamar (GGax Cal y CM Cal con 0.5448 y 0.4891 mU μg de peso húmedo⁻¹ larva⁻¹, respectivamente), en tanto que, en el subestadio de MIII fue en el tratamiento GGax Krill en donde se registró una mayor actividad (0.4970 mU μg de peso húmedo⁻¹ larva⁻¹). Exceptuando el subestadio de MIII, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al Control en el resto de los subestadios.

El hecho de encontrar una actividad enzimática tanto de la Tripsina como de la quimotripsina en niveles similares a aquellos registrados en el Control, además con picos de inducción específicos durante el estadio de mysis, indica que en los organismos se estimuló la producción de estas enzimas en respuesta a un sustrato alimenticio el cual resulta ser menos digerible que los nauplios de *Artemia*, es decir, como respuesta al alimento suministrado, se produce un incremento en la actividad de estas enzimas para facilitar la digestión de la dieta formulada. Por otro lado se ha comprobado que, las microalgas suministradas en las dietas de peneidos, estimulan en buena medida la producción de estas enzimas en particular (Kumlu, 1995) y a su vez, la actividad de estas enzimas, principalmente la tripsina se encuentra altamente correlacionada con mejores tasas de crecimiento y sobrevivencia (Jones, 1993, Kumlu, 1995), por lo tanto, al ser suministradas siguiendo el esquema normal de alimentación junto al alimento microencapsulado, garantizaron a los organismos buenas tasas de crecimiento tanto el longitud (Ggax Cal, CM Cal), peso (Ggax Cal, CM Krill) y de manera particular los mejores resultados de crecimiento, desarrollo, calidad y sobrevivencia en el tratamiento Ggax Krill.

Las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa son las que se encargan de desdoblar los carbohidratos del alimento durante el proceso digestivo de los organismos. En el caso de la α -amilasa, de manera general en todos los tratamientos a lo largo del estadio de mysis se registró una mayor actividad de esta enzima con respecto al Control, sin embargo no se presentaron diferencias significativas con respecto a este. La alta actividad de esta enzima registrada en todos los tratamientos, pudo estar relacionada con el contenido de almidón en la formulación de ambas dietas basales (GGax Cal con un contenido de 1.5 y CM B con con 10.7).

Lo mismo sucede en el caso de la enzima α -glucosidasa, de manera general tampoco en este caso se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control; solamente el tratamiento CM Cal en el subestadio de MI se registró poca actividad ($0.0679 \text{ mU } \mu\text{g de peso húmedo}^{-1} \text{ larva}^{-1}$) siendo significativamente diferente al resto de los tratamientos). La inducción de la actividad de esta enzima por el alimento suministrado garantizó que, como resultado del proceso digestivo del mismo, las larvas tuvieran la energía suficiente (derivada de la producción de glucosa por la enzima), no solo para continuar el desarrollo durante el estadio de Mysis, sino también para llevar a cabo el proceso de metamorfosis a Postlarva.

CUCEBA



BIBLIOTECA CENTRAL

11- CONCLUSIONES

1- En base a los resultados obtenidos de los diferentes indicadores nutrimentales, fisiológicos y bioquímicos se demuestra la posibilidad de la sustitución total de los nauplios de *Artemia* por los alimentos microencapsulados durante el estadio de mysis del camarón blanco *Litopenaeus. vannamei*

2- La dieta Ggax Krill presentó las mejores tendencias de crecimiento en peso, desarrollo, Índice de calidad, e Índice de rendimiento además de un porcentaje de sobrevivencia mayor que el control.

3- De manera general, las cuatro dietas artificiales aportaron a las mysis de *L. vannamei* la calidad nutrimental mínima, la cual se ve reflejada en la resistencia a la prueba de estrés salino a la cual fueron sometidas El Índice de calidad resultante no arrojó diferencias significativas con respecto al control de alimento vivo.

4- En las mysis de *L. vanammei* alimentadas con dietas microencapsuladas el costo metabólico derivado del proceso de ingestión, asimilación y absorción de estos alimentos es mayor que el mismo proceso digestivo derivado del consumo de nauplios de *Artemia*, lo cual se ve reflejado en un mayor consumo de oxígeno registrado a lo largo del desarrollo del estadio de mysis.

5- Las reservas lipídicas evaluadas a través de la razón TAG/Colesterol en aquellas dietas con hidrolizado de krill cubren de manera óptima los requerimientos energéticos de las mysis al presentar una concentración por encima del control en este estadio, en tanto que ambas dietas con harina de calamar presentan un incremento significativo al pasar de M1 a PL1.

6- De manera general, tanto el hidrolizado de krill como el harina de calamar contenidos en ambas dietas estimularon la producción de todas las enzimas digestivas evaluadas, presentándose así mismo, picos de actividad específicos en cada una de ellas.

Anexo I Resumen de promedios (\pm ES) de Indicadores zootécnicos y fisiológicos de las mysis de *L. vannamei* alimentadas con dietas artificiales microencapsuladas.

	Ggax Cal	CM Cal	Ggax Krill	CM Krill	Control
Crecimiento (long)					
PIII - PLI (n)	281.91 \pm 33.65 (3)a	289.5 \pm 11.32 (3)a	255.01 \pm 35.73 (3)a	258.30 \pm 48.31 (3)a	334.36 \pm 10.03 (3)a
Crecimiento (peso)					
PIII - PLI (n)	16.62 \pm 3.55 (3)a	13.72 \pm 1.90 (3)a	17.95 \pm 4.06 (3)a	16.66 \pm 5.58 (3)a	22.19 \pm 3.90 (3)a
Indice de desarrollo					
24 H	3.60 \pm 0.13(15)a	3.47 \pm 0.013(15)a	3.67 \pm 0.12(15)a	3.73 \pm 0.11(15)a	3.80 \pm 0.10(15)a
48 H	4.47 \pm 0.13(15)a	4.40 \pm 0.13 (15)a	4.40 \pm 0.13(15)a	4.33 \pm 0.12(15)a	4.33 \pm 0.12(15)a
72 H	4.73 \pm 0.11(15)a	4.67 \pm 0.12(15)a	4.86 \pm 0.09(15)a	4.86 \pm 0.09(15)a	5.00 \pm 0.00(15)a
96 H	5.73 \pm 0.15(15)a	5.87 \pm 0.13(15)a	5.80 \pm 0.14(15)a	5.60 \pm 0.21(15)a	5.93 \pm 0.66(15)a
120 H	6.13 \pm 0.09(15)ab	6.43 \pm 0.17(15)ab	6.20 \pm 0.22(15)ab	6.00 \pm 0.19(15)b	6.64 \pm 0.16(15)a
144 H	6.46 \pm 0.27(15)c	6.93 \pm 0.06(15)ab	7.00 \pm 0.00(15)ab	6.53 \pm 0.19(15)abc	7.00 \pm 0.00(15)a
Sobrevivencia					
% PIII-PLI (n)	37.12 \pm 4.37 (3)a	66.80 \pm 0.33 (3)a	78.02 \pm 0.03 (3)a	56.34 \pm 4.02 (3)a	64.38 \pm 1.30 (3)a
Indice de calidad					
% (n)	75.99 \pm 0.247 (2)a	80.11 \pm 1.78 (2)a	83.34 \pm 9.20 (3)a	64.93 \pm 1.43 (3)a	84.25 \pm 2.69 (3)a
IR (long)					
$\mu\text{m} / \text{día}(n)$ PIII-PLI	79.41 \pm 9.49 (3)b	154.90 \pm 6.06 (3)a	165.71 \pm 23.22 (3)a	94.38 \pm 17.65 (3)b	181.25 \pm 5.42 (3)a
IR (peso)					
$\mu\text{g} / \text{día}(n)$ PIII-PLI	4.68 \pm 1.00 (3)a	7.34 \pm 1.02 (3)a	11.67 \pm 2.64 (3)a	6.09 \pm 2.04 (3)a	12.03 \pm 2.12 (3)a
Consumo de O₂					
P III	81.171 \pm 8.90(9)	81.17 \pm 8.90(9)	81.17 \pm 8.90(9)	81.17 \pm 8.90(9)	81.17 \pm 8.90(9)
M I(n)	72.29 \pm 6.31(10)a	82.20 \pm 28.57(8)a	45.12 \pm 6.35(9)a	61.59 \pm 7.91 (10)a	61.17 \pm 10.75(10)a
M II(n)	61.61 \pm 8.10(10)b	54.27 \pm 6.63(9)b	51.08 \pm 7.37(9)b	91.44 \pm 14.13(10)a	49.76 \pm 7.69(10)b
M III(n)	48.94 \pm 6.59(8)ab	59.20 \pm 7.08(10)a	50.94 \pm 3.63(10)a	87.91 \pm 21.60 (9)a	38.07 \pm 8.32(8)b
PL I(n)	24.45 \pm 4.28(10)b	36.36 \pm 7.90(9)ab	37.49 \pm 5.28(9)ab	37.70 \pm 4.29 (8)ab	59.43 \pm 8.72(9)a

Anexo 2 Resumen de promedios (\pm ES) de Indicadores bioquímicos: Concentración de metabolitos y actividad de enzimas digestivas de las mysis de *L. vannamei* alimentadas con dietas artificiales microencapsuladas.

		Ggax Cal	CM Cal	Ggax Krill	CM Krill	Control
TRIACILGLICERIDOS	M I(n)	0.4354 \pm 0.110 (3)a	0.3525 \pm 0.033 (3)a	0.5339 \pm 0.044 (3)a	0.4976 \pm 0.017 (3)a	0.4665 \pm 0.015 (3)a
	M II(n)	0.5495 \pm 0.022 (3)a	0.4924 \pm 0.028 (3)a	0.8553 \pm 0.186 (3)a	0.6531 \pm 0.085 (3)a	0.5909 \pm 0.153 (3)a
	M III(n)	0.8138 \pm 0.312 (3)a	0.7050 \pm 0.102 (3)a	0.5754 \pm 0.008 (3)a	0.6687 \pm 0.026 (3)a	0.7257 \pm 0.054 (3)a
	PL I(n)	0.5650 \pm 0.054 (3)b	0.5495 \pm 0.036 (3)b	0.6117 \pm 0.036 (3)b	0.4976 \pm 0.008 (3)b	0.7516 \pm 0.037 (3)a
COLESTEROL	M I(n)	0.1435 \pm 0.014 (2)ab	0.0622 \pm 0.034 (3)bc	0.1244 \pm 0.009 (3)b	0.1148 \pm 0.016 (3)b	0.1916 \pm 0.012 (3)a
	M II(n)	0.1818 \pm 0.009 (3)a	0.1100 \pm 0.012 (3)a	0.1626 \pm 0.004 (3)a	0.1579 \pm 0.037 (3)a	0.1579 \pm 0.050 (3)a
	M III(n)	0.1626 \pm 0.033 (3)a	0.1435 \pm 0.058 (3)a	0.1435 \pm 0.046 (3)a	0.1244 \pm 0.017 (3)a	0.1196 \pm 0.026 (3)a
	PL I(n)	0.1148 \pm 0.021 (3)ab	0.0622 \pm 0.029 (3)b	0.1196 \pm 0.019 (3)ab	0.0622 \pm 0.012 (3)b	0.1531 \pm 0.009 (3)a
PROTEASAS TOTALES	M I(n)	146.84 \pm 94.45 (3)b	156.98 \pm 31.41 (3)b	289.94 \pm 86.17 (3)ab	420.52 \pm 40.77 (3)a	413.22 \pm 16.35 (3)a
	M II(n)	586.81 \pm 61.13 (3)a	575.88 \pm 73.61 (3)a	174.84 \pm 65.05 (3)b	337.08 \pm 116.80 (3)ab	340.49 \pm 3.70 (2)ab
	M III(n)	352.41 \pm 30.97 (3)a	334.76 \pm 90.73 (3)a	350.28 \pm 48.48 (3)a	391.25 \pm 128.95 (3)a	349.54 \pm 42.64 (3)a
	PL I(n)	269.62 \pm 24.89 (3)a	183.85 \pm 54.54 (3)a	298.34 \pm 98.54 (3)a	205.01 \pm 56.61 (3)a	168.36 \pm 46.95 (3)a
TRIPSINA	M I(n)	0.0474 \pm 0.010 (3)a	0.0412 \pm 0.009 (3)a	0.0587 \pm 0.007 (3)a	0.0376 \pm 0.008 (3)a	0.0558 \pm 0.003 (3)a
	M II(n)	0.0734 \pm 0.033 (3)a	0.0849 \pm 0.028 (3)a	0.0649 \pm 0.005 (3)a	0.0465 \pm 0.011 (3)a	0.0387 \pm 0.012 (2)a
	M III(n)	0.0372 \pm 0.014 (2)a	0.0278 \pm 0.004 (2)a	0.0265 \pm 0.0008 (3)a	0.0343 \pm 0.011 (2)a	0.0442 \pm 0.016 (3)a
	PL I(n)	0.0408 \pm 0.015 (3)a	0.0384 \pm 0.007 (3)a	0.0254 \pm 0.0008 (3)a	0.0390 \pm 0.008 (3)a	0.0660 \pm 0.010 (3)a
QUIMOTRIPSINA	M I(n)	0.2307 \pm 0.036 (3)a	0.2250 \pm 0.063 (3)a	0.2793 \pm 0.055 (3)a	0.4868 \pm 0.090 (3)a	0.2620 \pm 0.046 (3)a
	M II(n)	0.5448 \pm 0.055 (3)a	0.4891 \pm 0.085 (a)	0.2429 \pm 0.071 (3)a	0.2322 \pm 0.031 (3)a	0.3202 \pm 0.137 (3)a
	M III(n)	0.2801 \pm 0.024 (3)bc	0.3341 \pm 0.010 (3)b	0.4970 \pm 0.050 (3)ab	0.2231 \pm 0.056 (3)bc	0.5881 \pm 0.083 (3)a
	PL I(n)	0.3413 \pm 0.018 (3)a	0.3652 \pm 0.095 (2)a	0.3817 \pm 0.034 (3)a	0.2826 \pm 0.041 (3)a	0.3717 \pm 0.024 (3)a
AMILASA	M I(n)	0.7135 \pm 0.046 (3)a	0.6185 \pm 0.036 (3)a	0.6281 \pm 0.044 (3)a	0.7836 \pm 0.041 (3)a	0.6874 \pm 0.046 (3)a
	M II(n)	0.7223 \pm 0.038 (3)a	0.7939 \pm 0.069 (3)a	0.6099 \pm 0.017 (3)a	0.6354 \pm 0.046 (3)a	0.6199 \pm 0.019 (3)a
	M III(n)	0.5518 \pm 0.036 (3)a	0.6846 \pm 0.083 (3)a	0.6341 \pm 0.025 (3)a	0.5715 \pm 0.018 (3)a	0.5161 \pm 0.043 (3)a
	PL I(n)	0.5949 \pm 0.012 (3)a	0.5456 \pm 0.030 (3)a	0.6067 \pm 0.020 (3)a	0.5686 \pm 0.024 (3)a	0.4626 \pm 0.031 (3)b
GLUCOSIDASA	M I(n)	0.4985 \pm 0 (1)a	0.0679 \pm 0.040 (2)b	0.3927 \pm 0.056 (3)a	0.6330 \pm 0.052 (2)a	0.4269 \pm 0.092 (3)a
	M II(n)	0.4824 \pm 0.050 (3)a	0.2491 \pm 0.099 (3)a	0.3212 \pm 0.143 (3)a	0.5355 \pm 0.121 (3)a	0.5546 \pm 0.018 (2)a
	M III(n)	0.5498 \pm 0.133 (3)a	0.4244 \pm 0.041 (3)a	0.4505 \pm 0.083 (3)a	0.7667 \pm 0.088 (3)a	0.4215 \pm 0.109 (3)a
	PL I(n)	0.3557 \pm 0.107 (3)a	0.3552 \pm 0.021 (3)a	0.5033 \pm 0.064 (3)a	0.6014 \pm 0.121 (3)a	0.3316 \pm 0.016 (3)a

Anexo 2a Razón Triacilgliceridos/Colestero de las mysis de *L. vannamei* alimentadas con dietas artificiales microencapsuladas

MI	Triacilgliceridos	Colesterol	Razón TAG/Col	MII	Triacilgliceridos	Colesterol	Razón TAG/Col
A	0.4354	0.1435	3.0334	A	0.5495	0.1818	3.022
B	0.3525	0.0622	5.6668	B	0.4924	0.1100	4.474
C	0.5339	0.1244	4.2917	C	0.8553	0.1626	5.257
D	0.4976	0.1148	4.3334	D	0.6531	0.1579	4.136
E	0.4665	0.1961	2.3781	E	0.5909	0.1579	3.742
MIII	Triacilgliceridos	Colesterol	Razón TAG/Col	PLI	Triacilgliceridos	Colesterol	Razón TAG/Col
A	0.8138	0.1626	5.0025	A	0.5650	0.1148	4.920
B	0.7050	0.1435	4.9112	B	0.5495	0.0622	8.833
C	0.5754	0.1435	4.0084	C	0.6117	0.1196	5.113
D	0.6687	0.1244	5.3751	D	0.4976	0.0622	8.000
E	0.7257	0.1196	6.0668	E	0.7516	0.1531	4.908

Anexo 3. Porcentajes de Incrementos con respecto al control de la actividad enzimas digestivas de las mysis de *Liopenaeus vannamei* alimentadas con dietas artificiales microencapsuladas

		Control	Ggax B	CM B	Ggax Krill	CM Krill
P R O T O T O	MI	413.22	146.85	156.98	289.95	420.52
	MII	340.50	586.81	575.89	174.84	337.08
	MIII	349.55	352.42	334.76	350.29	391.25
	PL1	169.37	269.63	183.86	298.35	207.17
			60.1	9.2	77.2	23.0

		Control	Ggax B	CM B	Ggax Krill	CM Krill
T R I P S I N A	MI	0.0558	0.0475	0.0412	0.0587	0.0376
	MII	0.0387	0.0734	0.0850	0.0649	0.0465
	MIII	0.0443	0.0372	0.0279	0.0266	0.0344
	PL1	0.0660	0.0409	0.0385	0.0254	0.0329

		Control	Ggax B	CM B	Ggax Krill	CM Krill
Q T R I P	MI	0.2621	0.2307	0.2250	0.2793	0.4868
	MII	0.3203	0.5449	0.4891	0.2429	0.2322
	MIII	0.5882	0.2802	0.3341	0.4970	0.2232
	PL1	0.3717	0.3413	0.3652	0.3818	0.3085
					2.7	

		Control	Ggax B	CM B	Ggax Krill	CM Krill
A M I L A S A	MI	0.6874	0.7135	0.6185	0.6281	0.7837
	MII	0.6199	0.7223	0.7939	0.6100	0.6355
	MIII	0.5161	0.5519	0.6847	0.6341	0.5715
	PL1	0.4626	0.5949	0.5457	0.6067	0.5466
			28.6	17.9	31.1	18.2

		Control	Ggax B	CM B	Ggax Krill	CM Krill
G L U C O S I D	MI	0.4269	0.4986	0.0679	0.3928	0.6331
	MII	0.5546	0.4824	0.2491	0.3212	0.5356
	MIII	0.4216	0.5498	0.4244	0.4505	0.7668
	PL1	0.3317	0.3557	0.3552	0.5034	0.4805
			7.2	7.1	51.8	44.9

13- LITERATURA CITADA

*Alfonso, E., L. Ramos, E. Días-Iglesia., T. García, C. Rosas. (1993) *Manual del segundo curso internacional de producción de postlarvas de camarones peneidos del Atlántico de América*. Campeche, México. 132 p.

*Alfonso, E., L. Martínez, R. Gelabert y S. Leal (1988) *Alimentación de larvas de camarón Penaeus schmitti (Diatomeas y Flajelados)* Rev. de Inv. Marinas 9 (1): 47-57.

*Álvarez-Torres, P. F. Soto, S. A. Quevedo, C. D, Luna, L. M. Treviño. (1999). *Panorama de la Investigación y su repercusión sobre la producción acuícola en México*. Avances en nutrición acuícola. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 673 pp.

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

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

*Bureau, B. P., P. A. Azevedo, M. Tapia-Salazar, G. Cuzon (2000) *Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: Potential implications and applications*. Avances en nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán.

*De la Cruz, S. A. (1992) *La selección del tamaño de partículas alimenticias por larvas del camarón blanco Penaeus schmitti*. Centro de Investigaciones Marinas 10 (2): 163-174

*De la Rocha, J. G. (2000) *Las exportaciones de camarón mexicano*. Panorama Acuícola. Vol 5 No. 2 22-24.

*Durruty, L. C. V (2001) *Requerimientos nutrimentales de proteína en larvas de L. setiferus y L. vannamei*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 37 pp.

*Forster, I., A. Kenney. (2000) *Uso de Hidrolizados de Krill en alimentos para acuicultura*. Panorama Acuícola. Vol. 4 No. 1. 6-8.

*Fraser, A. J. (1989) *Triacilglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae*. Can J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1868-1873.

- *Gallardo, E. P. (1994) *Alimentación de larvas de Penaeus setiferus (Linneo, 1967): Chaetoceros ceratosporum, Tetraselmis chuii y Artemia franciscana (CRUSTACEA: PENEIDAE)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. 55 p.
- *Gallardo, E. P., (2000) *Aspectos nutrimentales y fisiológicos de larvas de camarón blanco Litopenaeus setiferus (LINNEO, 1767): esquema de alimentación*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias UNAM. 53 p.
- *Gallardo, P. P., E. Alfonso, G. Gaxiola, Soto L. A., C. Rosas (1995) *Feeding schedule of Penaeus setiferus larvae based on diatoms (Chaetoceros ceratosporum) flajellates (Tetraselmis chuii) and Artemia nauplii*. Rev. Invest. Marinas. Vol 15 No. 3 263-268.
- *González, R., V. Fraga, O. Carrillo. (1994?) *Cambios ontogénicos en las principales enzimas digestivas de Penaeus schmitti*. Revista de Investigaciones Marinas. Vol 15 No. 3 262-268.
- *House, C. (1997) *Krill entering the mainstream aquaculture market*. Fedd stuffs. 271-274.
- *Jones, D. A. A. Kanazawa, K. Ono (1979) *Studies on the nutritional requirements of the larval stages of Penaeus japonicus using microparticulate diets*. Mar. Biol. 54: 261-267
- *Jones, D. A., K. Kurmaly, A. Arshad (1987) *Peneid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets*. Aquaculture 64:133-146.
- *Jones, D.A., M. S. Kamarudin, L. LeVay (1993) *The potential for replacement of live feeds in larval culture*. Journal of the World Aquaculture Society 24(2): 199-210.
- *Jones, D. A., Mumford J. G., Gabbot P. G. (1974) *Microencapsulates as artificial food particles for aquatic filter feeders*. Nature (London) 247 233-235.
- *Kamarudin, M. S. (1992) *Studies on the digestive physiology of crustacean larvae*. Doctoral thesis. University of Wales, Bangor, United Kindom.
- *Kinne, (1976). *Cultivation of marine organisms. Water management and techonoly*. Marine Ecology Vol. 1 (2). 79-300.
- *Kumlu, M., D. A. Jones. (1995) *The effect of live and artificial diets on growth, survival, and tripsin activity in larval of Penaeus indicus*. Journal of the world aquaculture society, Vol. 26, No. 4: 406-415.
- *Kurmaly, K., Yule A. B., Jones D. A. (1989) *An energy budget for the larvae of Penaeus monodon (Fabricius)*. Acuaculture, 81: 13-25.

- *Lemos, D., M. P. Hernandez-Cortéz, A. Navarrete, F. L. Garcia Carreño, V. N. Phan (1999) *Ontogenic variation in digestive protease activity of larvae and postlarvae of the pink shrimp Farfantepenaeus pauliensis (Crustacea: Decapoda: Penaeidae)* Marine Biology 135: 653-662.
- *Le Moullac G., Van Wormhoudt A., (1994) *Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in Penaeus vannamei larvae (Crustacea, Decapoda)* Aquat. Living Resour., 7 203-210.
- *Lee-Shing, F., L. Bon-Ning. (1992) *Ontogenic change of digestive enzymes in Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. Vol 103, No. 4: 1033-1037.
- *Le Vay, L, M, Rodriguez, M. S. Kamarudin, D. A. Jones (1993) *Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in Penaeus japonicus larvae*. Aquaculture 118: 287-297
- *Lovett, D. L., Felder D. L. (1989) *Ontogenic of gut morphology in the white shrimp Penaeus setiferus (Decapoda, Penaeidae)*. Journal of morphology. 201: 253-272
- *Lovett, D. L., Felder D. L. (1990) *Ontogenic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of Penaeus setiferus (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)* Biol. Bull 178 160-174.
- *Medina, C. E., (1998) *Diseño y evaluación de un alimento nebulizado para la larvicultura del camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 66 pp.
- *Cruz-Rique, L. E., J. Guillaume, G. Cuzón (1987). *Squid Protein effect on growth of four penaeid shrimp*. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 18 No. 4.
- *Oikawa, C. K., B. E. March. (1996) *A method for assessment of the effectiveness of feeding stimulants for salmonid fish*. Bull. Aquacul. Assoc. 3: 29-31.
- *Pedroza, I. R. (2000) *Estudios de difusión de nutrientes en alimentos microencapsulados para larvas de crustáceos*. Tesis de doctorado. UNAM.
- *Planas, M., M. J. Fernández-Reiriz, M. J. Ferreiro & U. Labarta. (1990) *Effect of selected variables on the preparation of Gelatin-Acacia microcapsules for aquaculture*. Aquacultural engineering 9, 329-341.
- *Rees, J. F., Cure K., Piyatiratitivorakul S., Menasveta P., and Sorgeloos P. (1994) *Osmotic stress resistance as a quality diagnostic of penaeid postlarvae*. The third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society. Philippines. 1025-1028.
- *Rosas, C., A. Sanchez, P. Gallardo, J. Quiroz, G Gaxiola, E. Díaz Iglesia y L. A. Soto (1995) *Oxygen consumption and Ingestion rate of Penaeus setiferus larvae fed Chaetoceros certosporum, Tetraselmis chuii and Artemia nauplii*. Aquaculture Nutrition 1: 13-20

- *Sandoval, Q., (1996) *Madurez gonadal y patrón reproductivo de hembras del camarón rojo Penaeus brasiliensis* (LATREILLE 1817) en Contoy, Quintana Roo. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.80 p.
- *Sáenz, M.P.G. (1987). *El cultivo de camarón en México*. Los recursos del Mar I la Investigación. Tomo I I.N.P., 35-43.
- *Smith, L., J.M. Fox, G. D. Treece, J. P. McVey (1993) *Intensive larviculture techniques*. Handbook of Mariculture. Florida 153-172.
- *Tacon, A.G. (1990). *The Nutrition and feeding of farmed fish and shrimps*. A training Manual Argent Press. 100 pp.
- *Villegas, C. T., A. Kanazawa (1979) *Relationship between diet composition and growth rate of zoeal and mysis stages of Penaeus japonicus Bate*. Fisheries Reserch Journal of Philipines. 4: 34-40.
- *Wilammar, D. F., C. J Langdon. (1993) *Delivery of dietary components to larval shrimp Penaeus vannamei by means of complex microcapsules*. Marine Biology, 115: 635-642
- *Zar, J. H. (1974) *Bioestatistical análisis*. Prentice Hall. New York. 620 p.