



**Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas
Instituto Politécnico Nacional**

Calidad de *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas protozoa de *Litopenaeus vannamei*

Tesis

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Con especialidad en

Manejo de Recursos Marinos

Presenta

IBQ. Francisco Eduardo Hernández Sandoval

La Paz, B.C.S. Marzo de 2004



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 15 del mes de Marzo del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"CALIDAD DE *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) CULTIVADA EN DOS FUENTES DE NITRÓGENO Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE LARVAS PROTOZOEAS DE *Litopenaeus vannamei*"

Presentada por el alumno:

HERNÁNDEZ
Apellido paterno

SANDOVAL
materno

FRANCISCO EDUARDO
nombre(s)

Con registro:

A	9	8	0	1	0	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

MC. DAVID JAVIER LOPEZ CORTES

PRESIDENTE

DRA. SILVIE DUMAS

SECRETARIO

MC. TANOS GRAYEB DEL ALAMO

SEGUNDO VOCAL

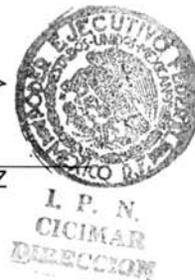
MC. JOSE RICARDO PALOMARES GARCIA

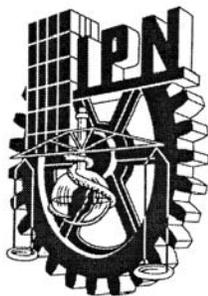
TERCER VOCAL

DRA. BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. FRANCISCO ARREGUIN SANCHEZ





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 01 del mes Abril del año 2004, el (la) que suscribe FRANCISCO EDUARDO HERNÁNDEZ SANDOVAL alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A980103 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. DAVID JAVIER LÓPEZ COTES y cede los derechos del trabajo titulado: **"CALIDAD DE *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) CULTIVADA EN DOS FUENTES DE NITRÓGENO Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE LARVAS PROTOZOEAS DE *Litopenaeus vannamei*"** al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: fhernan@cibnor.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


FRANCISCO EDUARDO HERNÁNDEZ SANDOVAL
nombre y firma

Comité tutorial

Director de tesis

MC. David J. López Cortés

Co-Directora

Dra. Silvie Dumas

Co-tutor

Dra. Bertha O. Arredondo Vega

Co-tutor

MC. Ricardo Palomares García

Co-tutor

MC. Tanos Grayeb del Alamo

Comité revisor de tesis

Director de tesis

MC. David J. López Cortés

Co-Directora

Dra. Silvie Dumas

Co-tutor

Dra. Bertha O. Arredondo Vega

Co-tutor

MC. Ricardo Palomares García

Co-tutor

MC. Tanos Grayeb del Alamo

Sinodales

Presidente

Dra. Silvie Dumas

Secretario

MC. Tanos Grayeb del Alamo

Primer Vocal

MC. David J. López Cortés

Segundo Vocal

MC. Ricardo Palomares García

Tercer Vocal

Dra. Bertha O. Arredondo Vega

Suplente

MC. Dora Esther Hernández C.

DEDICATORIA

Este documento se dedica con todo mi amor a mi esposa Kiry y a mi hija Michelle.

Con mucho cariño y admiración para mis papás Juan y Antonia a quienes les debo todo.

Y en especial a las grandes guerreras de la familia. Maria de Jesús zumaya, Yolanda Sandoval y Erica Xiomara Sandoval (q.e.p.d.).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por los proyectos institucionales del CIBNOR, S.C. PC 3.1 y PC 3.4, y el proyecto CONACyT 33684-5.

Agradezco el apoyo otorgado por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT 126348).

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo brindado por la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, en las recomendaciones y la utilización del Laboratorio de cultivo de Microalgas y la colaboración de Acuicultores de La Paz S.A., quienes donaron el material biológico (larvas en estadio nauplio IV). En particular a J. Malagamba, R. Dubost y F. Malagamba.

Al Instituto Politécnico Nacional, al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por la oportunidad de finalizar mis estudios, al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y a su director el Dr. Mario Martínez M. por las facilidades prestadas para el buen desarrollo de esta investigación.

A mi comité revisor MC. David López, Dra. Silvie Dumas, Dra. Bertha Olivia Arredondo, MC. Tanos Grayeb y MC. Ricardo Palomares, por su asesoría, por sus acertados comentarios críticos y por la atención prestada a este escrito.

El trabajo de esta investigación fue posible gracias a la ayuda y apoyo de muchas personas. Agradezco al grupo de Miguel Robles Murugay por la facilidad de las instalaciones de acuicultura, material y espacio para la realización de los experimentos de cultivos larvarios. Al Laboratorio de fitotecnia en especial a la Biol. Mayra Vargas M. por el apoyo en los cultivos de microalgas. Al laboratorio de lípidos: M.C. Laura Palau por sus asesorías en el uso y manejo del cromatógrafo de gases, y en la extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos. Al Dr. Alfonso Alvarez por su apoyo y asesorías. Al M.C. Jorge del Angel y Biol. Manuel Legorreta por las asesorías en estadística. Al M.C. Ernesto Goytortua y Biol. Guillermo Portillo, por el material bibliográfico recomendado y facilitado. A Ing. Edgar Yuen por el apoyo en la edición de fotos, en la biblioteca del centro. A Luis Alberto Romero (huella de gato) por el apoyo durante los muestreos. Y a todas las personas que pusieron su granito de arena para la culminación de este trabajo.

A mis hermanos Janet, Martha, Adrián, Héctor, Juan, Perla y Mario, por su apoyo en todo momento.

A toda la palomilla, por ser amigos(as). Gracias.

INDICE

INDICE	i
GLOSARIO	ii
ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- ANTECEDENTES	11
3.- OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos particulares	16
4.- HIPÓTESIS	17
5.- JUSTIFICACIÓN	18
6.- METODOLOGÍA	19
6.1 Diseño experimental para el cultivo de microalgas	19
6.1.1 Cultivo de microalgas	19

6.1.2 Seguimiento de los cultivos	21
6.1.2.1 Cuantificación de peso seco	22
6.1.2.2 Cuantificación de proteínas	22
6.1.2.3 Cuantificación de carbohidratos	23
6.1.2.4 Extracción y cuantificación de clorofila <u>a</u>	24
6.1.2.5 Extracción de lípidos totales	25
6.1.2.6 Cuantificación de lípidos totales	26
6.1.2.7 Extracción de ácidos grasos	26
6.1.2.8 Identificación y cuantificación de ácidos grasos ...	26
6.2 Experimento de alimentación de larvas	29
6.2.1 Diseño experimental para el cultivo larvario	29
6.3 Análisis estadístico	34
7.- RESULTADOS	35
7.1 Evaluación cuantitativa del cultivo de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	35
7.1.1 Densidad celular	35
7.1.2 Peso seco	37
7.1.3 Clorofila <u>a</u> (Chl <u>a</u>)	39
7.1.4 Composición química de <i>T. fluviatilis</i>	41
7.2 Cultivo larvario de <i>Litopenaeus vannamei</i>	52
7.2.1 Alimento	52
7.2.2 Parámetros físico-químicos de los cultivos larvarios	52
7.2.3 Porcentaje de metamorfosis	52
7.2.4 Supervivencia	55
7.2.5 Composición química de las larvas de <i>L. vannamei</i>	56
7.2.6 Composición de ácidos grasos de larvas de <i>L. vannamei</i> ...	60

8.- DISCUSIÓN	67
8.1 Microalgas	67
8.1.1 Densidad celular, crecimiento y asimilación de nitrógeno	67
8.1.2 Contenido de Clorofila <u>a</u> (chl <u>a</u>) de <i>T. fluviatilis</i>	71
8.1.3 Composición química de <i>T. fluviatilis</i>	72
8.2 Cultivo larvario de <i>L. vannamei</i>	79
8.2.1 Porcentaje de metamorfosis	79
8.2.2 Longitud de la larva	81
8.2.3 Porcentaje de supervivencia	82
8.2.4 Composición química de <i>L. vannamei</i>	84
9.- CONCLUSIONES	90
9.1 Cultivo de <i>T. fluviatilis</i>	90
9.2 Cultivo larvario de <i>L. vannamei</i>	90
10.- RECOMENDACIONES	92
11.- BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXO 1	114

ii.- GLOSARIO

Acuicultura: Toda actividad cuya finalidad es la producción, crecimiento y comercialización de organismos acuáticos animales o vegetales de agua dulce, salobre o salada (Aran, 1997)

α -Amilasa: Enzima que actúa en la degradación del almidón en enlaces 1 \rightarrow 4 a lo largo de la cadena

ATP: Molécula que interviene en los intercambio de energía que se llevan a cabo en la célula, está formado por ribosa, adenina y tres grupos fosfatos

Biosíntesis: Procesos celulares que requieren de energía libre, en estos procesos se requiere de energía química (Lehninger, 1981)

Biotecnología: Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos

Coenzima A: Coenzima que contiene ácido pantoténico y que actúa como grupo transportador de acilo en ciertas reacciones enzimáticas

Cromatografía: Método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través de la fase estacionaria (Yuan *et al.*, 2002)

Cultivo batch: Sistema mas simple y mas utilizado, consiste en añadir una pequeña cantidad de microalgas en un volumen determinado de medio de cultivo que se agita o se ventila para suspender las células, reabastecer el CO₂ y mantener un cultivo homogéneo (Castrejon *et al.*, 1994)

Desaturasa: Enzimas que catalizan la introducción de dobles enlaces en la parte hidrocarbonada de los ácidos grasos

Deshidrogenasa: Enzimas que catalizan la eliminación de pares de átomos de hidrógeno de sus sustratos

Diatomea: Grupo de algas unicelulares pertenecientes a la Clase Bacillariophyceae, con los órdenes Centrales o Biddulphiales (simetría radial, la mayoría marinas) y Pennales o Bacillariales (simetría bilateral, la mayoría de aguas continentales)

Estrés: Es el estado de agotamiento, desajuste, debilitamiento, presión, choque o alteración fisiológica que presenta un organismo como consecuencia de las condiciones ambientales

FAD: Flavina adenina dinucleótido Coenzima de algunas enzimas de óxido-reducción, que contiene riboflavina

Fitoplancton: Corresponde a la parte vegetal del plancton, organismo con nulo o escaso poder de desplazamiento. Está constituido por organismos foto autotróficos, los que corresponden en su mayoría a los productores primarios de la cadena trófica

Fotosíntesis: Es el proceso por el cual la energía solar es absorbida por los pigmentos fotosintéticos de las plantas, algas y algunas bacterias, y transformada a energía química resultando en carbohidratos (glucosa) y O₂ (Jeffrey *et al*, 1997)

Metamorfosis: Procesos de transformación de la larva hasta alcanzar la forma adulta

NAD: Coenzimas que contienen nicotinamida y que funcionan como transportadores de átomos de hidrógeno y como electrones en algunas reacciones de óxido-reducción

Nauplio: Término utilizado para designar al estadio recién eclosionado de algunos crustáceos incluyendo al camarón recién eclosionado

Nutrición: Proceso químico y fisiológico que proveen de nutrientes al animal para la realización de sus funciones normales, de mantenimiento y crecimiento (Akiyama *et al.*, 1993)

iii.- ABREVIATURAS

Unidades de Medición

g	gramos
mg	miligramos
m	metro
mm	milímetros
μm	micras
μl	microlitros
μmol	micromol
°C	grados centígrados
Uma	unidad de masa atómica
ups	unidad práctica de salinidad

Abreviaturas

ARA ácido araquidónico	PC	pastilla celular
ATP adenosín trifosfato	PS	peso seco
BSA albúmina bovina	PZI	protozoa I
DHA ácido docosahexaenoico	PZII	protozoa II
EPA ácido eicosapentaenoico	PZIII	protozoa III
FE frascos experimentales	PUFAs	ácidos grasos altamente poliinsaturados (siglas en inglés)
GC-MS cromatógrafo de gases espectrómetro de masas	SAT	saturados
HPLC cromatografo de líquidos de alta resolución	MONO	monoinsaturados
NiR nitrito reductasa	POLIINSAT	poliinsaturados
NR nitrato reductasa		

iv.- LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Escalamiento del cultivo de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	20
2	Diagrama de flujo del trabajo experimental: Obtención de muestras para la determinación de la composición química de <i>T. fluviatilis</i>	28
3	Representación general del diseño experimental con larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentada con la microalga <i>T. fluviatilis</i>	31
4	Representación de los frascos experimentales y procedimiento para la obtención de muestras durante el experimento de alimentación en larvas de protozoa de camarón sometidas a cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4)	33
5	Curva de crecimiento de <i>T. fluviatilis</i> cultivada con nitrato de sodio (NaNO ₃) a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)	36
6	Curva de crecimiento de <i>T. fluviatilis</i> cultivada con cloruro de amonio (NH ₄ Cl) a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)	36
7	Variación del peso seco de <i>T. fluviatilis</i> cultivada con 2 fuentes de nitrógeno: A) nitrato de sodio (NaNO ₃) y B) cloruro de amonio (NH ₄ Cl), a cuatro concentraciones 111.25 (N1, C1), 222.5 (N2, C2), 445 (N3, C3) y 890 μmol (N4, C4)	38
8	Variación de la clorofila <u>a</u> en <i>T. fluviatilis</i> cultivada con nitrato de sodio (NaNO ₃), a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)	40
9	Variación de la clorofila <u>a</u> en <i>T. fluviatilis</i> cultivada con cloruro de amonio (NH ₄ Cl) a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)	40
10	Valores promedio (para toda la fase logarítmica) de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de <i>T. fluviatilis</i> crecida con nitrato de sodio a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)	42

<u>Figura</u>	<u>Página</u>	
11	Valores promedio (para toda la fase estacionaria) de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de <i>T. fluviatilis</i> crecida con nitrato de sodio a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)	42
12	Valores promedio (para toda la fase logarítmica) de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de <i>T. fluviatilis</i> crecida con cloruro de amonio a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)	43
13	Valores promedio (para toda la fase estacionaria) de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de <i>T. fluviatilis</i> crecida con cloruro de amonio a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)	44
14	Porcentaje relativo de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) de <i>T. fluviatilis</i> cultivada con nitrato de sodio (NaNO_3) a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)	47
15	Porcentaje relativo de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) de <i>T. fluviatilis</i> cultivada con cloruro de amonio (NH_4Cl) a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)	48
16	Variación de la composición de PUFAs de <i>T. fluviatilis</i> cultivada con nitrato de sodio (NaNO_3) a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)	51
17	Variación de la composición de ácidos PUFAs de <i>T. fluviatilis</i> cultivada con cloruro de amonio (NH_4Cl) a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)	51
18	Porcentaje de metamorfosis en larvas de <i>L. vannamei</i> alimentadas con: A) <i>T. fluviatilis</i> cultivada con 445 μmol de NaNO_3 (T1), B) <i>T. fluviatilis</i> cultivada con 222.5 μmol de NH_4Cl (T2), C) Control (T3) y D) Sin alimento (T4)	54
19	Supervivencia de larvas de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>T. fluviatilis</i> . T1) microalga cultivada a 445 μmol de NaNO_3 , T2)	56

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
	microalga cultivada a 222.5 μmol de NH_4Cl , T3) medio f/2 y T4) larvas testigo sin alimento	
20	Composición química (proteínas, carbohidratos y lípidos) de larvas de camarón blanco <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>T. fluviatilis</i> . A) T1 microalga cultivada a 445 μmol de NaNO_3 , B) T2 cultivada a 222.25 μmol de NH_4Cl , C) T3 cultivada con medio f/2	59
21	Contenido de ácidos grasos saturados (sat); monoinsaturados (mono) y poliinsaturados (poliinsat) en larvas de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>T. fluviatilis</i> cultivada con 445 μmol de NaNO_3 (A); con 222.25 μmol de NH_4Cl (B) y en el medio f/2 (C).	61
22	Contenido de ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosohexaenoico (DHA) en larvas de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>T. fluviatilis</i> cultivada en un medio con 445 μmol de NaNO_3 (A); 222.25 μmol de NH_4Cl (B) y en el medio f/2 control (C)	63
23	Composición de ácidos grasos de larvas de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>T. fluviatilis</i> cultivada con 445 μmol de NaNO_3 (A), con 222.25 μmol de NH_4Cl (B) y con el medio f/2 (C)	66

RESUMEN

Calidad de *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas zoea de *Litopenaeus vannamei*

Con la finalidad de evaluar el contenido químico de la microalga *Thalassiosira fluviatilis* y conocer su efecto como alimento suministrado a larvas zoea del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se realizaron dos bioensayos; en el primero, esta diatomea fue crecida en un cultivo estático o batch en el medio f/2 modificado, utilizando como fuente de nitrógeno nitrato de sodio (NaNO_3) y cloruro de amonio (NH_4Cl) a cuatro concentraciones cada una. Se observó que la fuente y concentración de nitrógeno tiene un efecto directo en la composición química de la microalga. Se le dió seguimiento a su cinética de crecimiento para conocer la fase donde *T. fluviatilis* presentaba cantidades altas de PUFAs. Se determinó que las microalgas con mayor contenido de estos ácidos grasos crecieron en un medio con $445 \mu\text{mol}$ de NaNO_3 y con $222.25 \mu\text{mol}$ de NH_4Cl . Posteriormente se realizó el segundo bioensayo, suministrando como alimento a larvas de protozoa de *L. vannamei* las microalgas con alto contenido en PUFAs. Durante el ensayo de alimentación de larvas, su medio de cultivo se mantuvo a una temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y una salinidad de 35 ups, realizando recambios del 100 % de agua en cada subestadio. La mayor supervivencia fue obtenida con la microalga cultivada con nitrato de sodio a $445 \mu\text{mol}$ (T1) con 53.09 %, seguida del testigo con (48.05 %) T3 y de la microalga crecida con la fuente de cloruro de amonio a $222.25 \mu\text{mol}$ (22.48 %) T2. En el T1 también se determinaron mayores porcentajes de metamorfosis al finalizar el ensayo (95 %), así como la mayor longitud total (1.786 mm) y la mejor acumulación de lípidos ($12.92 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$), carbohidratos ($10.29 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$) y PUFAs ($173.60 \text{ ng}\cdot\text{larva}^{-1}$), ácidos monoinsaturados ($133.94 \text{ ng}\cdot\text{larva}^{-1}$) y saturados ($117.96 \text{ ng}\cdot\text{larva}^{-1}$). De los PUFAs el C18:2 se registró con mayor concentración (134.23 ng/larva), estos resultados nos indican que probablemente las larvas son capaces de convertir el C18:2 exógeno en ácidos altamente poliinsaturados como EPA y DHA. Por lo cual concluimos que el tratamiento T1 fue la mejor dieta para las larvas de *L. vannamei* bajo estas condiciones experimentales.

The effect of chemical composition of the microalgae *Thalassiosira fluviatilis* on growth and survival of protozoa larvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* was evaluated. A batch culture of the algae was cultivated in Guillard's f/2 modified media, with four different levels of sodium nitrate (NaNO_3) or ammonium chloride (NH_4Cl) as nitrogen sources. Both nitrogen source and concentration directly affected biochemical composition of the microalgae. Study of *T. fluviatilis* growth kinetics showed that the phase with highest PUFA production occurred in a medium with 445 μmol of NaNO_3 and 222.25 μmol of NH_4Cl . These PUFA-rich microalgae were used in a second bioassay to feed *L. vannamei* protozoa larvae. During this assay, the culture media was kept at 28°C temperature and 35 ups salinity, and 100 % of the water was changed for each sub-stage. Microalgae growing on a medium with sodium nitrate 445 μmol (T1) had the highest survival (53.09 %), followed by the control (48.05 %) grown in Guillard's f/2 media (T3). The lowest survival (22.48 %) was observed for microalgae cultured with ammonium chloride 222.25 μmol as nitrogen source (T2). Larvae fed in bioassay T1 also showed highest metamorphosis at the end of the assay (95 %), as well as greatest total length (1.786 mm) and the best accumulations of lipids (12.92 $\mu\text{g}\cdot\text{larvae}^{-1}$), carbohydrates (10.29 $\mu\text{g}\cdot\text{larvae}^{-1}$), PUFAs (173.60 $\text{ng}\cdot\text{larvae}^{-1}$), monounsaturated fatty acids (133.94 $\text{ng}\cdot\text{larvae}^{-1}$) and saturated fatty acids (117.96 $\text{ng}\cdot\text{larvae}^{-1}$). Linoleic acid (C18:2) was the most abundant PUFA recorded (134.23 $\text{ng}\cdot\text{larvae}^{-1}$). The results indicate that protozoa larvae probably can transform the exogenous C18:2 in highly unsaturated fatty acids (HUFAs) such as EPA and DHA. Under our experimental conditions, treatment T1 was the best diet for protozoa larvae of *L. vannamei*.

1.- INTRODUCCION

Calidad de *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas zoea de *Litopenaeus vannamei*

Actualmente la acuicultura es una actividad económica de gran importancia en todo el mundo. En los últimos años la contribución a la producción mundial en lo que respecta a organismos acuáticos va en aumento, registrando una producción de 10 millones de toneladas en 1984 y de más de 15 millones en 1990, esto representa más del 25 % de la producción mundial de organismos acuáticos (FAO, 2000).

Desde hace siglos la acuicultura se practica en algunas zonas del mundo (Bardach *et al.*, 1972). Las áreas de mayor crecimiento de esta actividad son la salmonicultura, cuya producción está aumentando rápidamente en los países con clima templado-frío, como los estados septentrionales de Estados Unidos, además de Canadá y Chile (Alceste-Oliviero y Martínez-Espinoza, 2000) y la camaronicultura (Darryl *et al.*, 2000; Stern, 2002)

En particular el cultivo de camarón ha tenido un crecimiento explosivo en los últimos años en países con distintos climas que van desde el templado a tropical, desarrollándose más rápidamente en latitudes tropicales y subtropicales debido a factores climáticos favorables para su cultivo (Villa, 1998). La demanda de los mercados nacionales e internacionales de la mayoría de las especies de peneidos se ha incrementado en los últimos años, provocando un rápido crecimiento de la camaronicultura (Lucien, 1997). Por tales circunstancias, esta actividad debiera estar diseñada para satisfacer las necesidades del hombre, incluyendo la de establecer comunidades económicamente activas y viables, especialmente en áreas rurales donde se da la mayor parte de la producción (Castillo, 1998). La acuicultura puede jugar un papel social importante creando

nuevas oportunidades económicas de inversión en una región, fuentes de empleos, promoviendo la utilización adecuada de los recursos locales y proveyendo al mismo tiempo de fuente de alimentos de alta calidad para la población (Castillo, 1998).

En sus inicios el cultivo de camarón se sustentaba solamente en la captura de reproductores o de juveniles silvestres (Sorgeloos, 1992). La disponibilidad de postlarvas se presenta como un problema para el cultivo de camarón tanto en el hemisferio Este donde, se ubica el 95 % de los 5000 laboratorios registrados hasta 1995, como en el hemisferio Oeste, donde su número es muy reducido (Valdenebro, 1998). Su rápido desarrollo en los últimos años ha generado el establecimiento de laboratorios para la producción de larvas en condiciones controladas, siendo esta etapa, el eslabón más frágil del ciclo de producción del camarón en cautiverio (Sorgeloos, 1992; Arellano, 1993). La creación de los laboratorios productores de larvas viene en cierta medida a solucionar el problema del abastecimiento de larvas y a la vez no afecta la dinámica de las poblaciones naturales, por lo cual este tipo de estrategia puede garantizar que esta actividad sea sustentable (Alceste-Oliviero y Martínez-Espinoza, 2000). Una de las primeras especies de camarón peneido manipuladas en el laboratorio para observar el desarrollo larvario fue *Marsupenaeus japonicus* en el cual se determinaron los requerimientos nutricionales y ambientales de las larvas (Hudinaga, 1942; Hudinaga y Kittaka, 1967; Stickney, 1979). Posteriormente los métodos desarrollados por Hudinaga (1942) fueron aprovechados a principios y mediados de los años 60 en laboratorios del Este de E.U. para algunas especies del golfo de

México como *Farfantepenaeus duorarum*, *F. aztecus* y *F. setiferus* (Webber, 1970). Sin embargo en la actualidad uno de los principales problemas que presentan los laboratorios productores de postlarvas es el de definir y controlar las variables ambientales del cultivo entre las que se encuentran, la calidad del agua, la cantidad y calidad del alimento que se proporcionan a las larvas, los cuales son factores críticos para la supervivencia y crecimiento (Alfonso *et al.*, 1993).

En los camarones peneidos, después de la eclosión del huevo, las larvas presentan tres estadios sucesivos de desarrollo conocidos como nauplio, zoea y mysis, caracterizados por importantes cambios morfológicos y fisiológicos (Hiroshi, 1985). La larva nauplio no presenta partes bucales, por tanto no se alimenta de fuentes externas, sobrevive y se desarrolla mediante sus reservas vitelinas acumuladas durante la formación del huevo (Mourente *et al.*, 1990; Martínez-Córdova, 1999). Se han reconocido 5 subestadios naupliares para *Litopenaeus vannamei* y 6 para *P. stylirostris* (Hiroshi, 1985; Martínez-Córdova, 1999). Durante la metamorfosis, cuando la larva alcanza el estadio de zoea, el cual presenta 3 subestadios, se observa el cuerpo dividido en una región cefalotóraxica y en una región abdominal donde claramente se puede observar un tracto digestivo que va desde la boca hasta el ano, el cual es funcional aunque no está completamente maduro (Hiroshi, 1985). Posteriormente le siguen los subestadios de mysis y postlarvas siendo su morfología similar a la de los camarones adultos con todos sus apéndices desarrollados, a excepción de las estructuras sexuales (Hiroshi, 1985; Martínez-Córdova, 1999).

Los camarones, al igual que todos los animales, requieren de sustancias nutritivas en proporciones adecuadas para su crecimiento, reproducción y en general para la realización de todas las actividades fisiológicas (Salaices, 1992). Muchas especies de organismos, incluyendo a los peneidos, en una etapa de su vida son planctónicos y su principal fuente alimenticia es el fitoplancton (microalgas), por esta razón diversos laboratorios que se dedican a la producción intensiva de postlarvas se han enfocado también al cultivo masivo de las microalgas.

Tener cultivos masivos de microalgas que cumplan con los requerimientos nutricionales adecuados, es uno de los mayores retos en la acuicultura, y representa un “cuello de botella” para la alimentación de los estadios larvales de las especies de interés en acuicultura (Persoone y Claus, 1980). La disponibilidad continua del alimento de buena calidad y su costo de producción, es la clave para el éxito comercial de estas empresas.

Se han realizado investigaciones en los laboratorios de acuicultura acerca de la sustitución del alimento natural (microalgas) por microencapsulados, sin embargo los resultados no han sido satisfactorios (Jones *et al.*, 1987), por esta razón las microalgas continúan siendo la principal dieta de las larvas en cultivo (De Pauw *et al.*, 1984; Malcolm, 2002).

Las microalgas son el punto de partida del flujo de energía a través de los ecosistemas acuáticos y son la base de la cadena alimenticia (Bardach *et al.*, 1972; Fábregas *et al.*, 1985; Sukenik *et al.*, 1993). El cultivo de microalgas es una parte fundamental para la alimentación de especies marinas como moluscos,

crustáceos y peces de importancia comercial (De Pauw *et al.*, 1984). También son importantes para el cultivo de algunos organismos del zooplancton como: rotíferos, cladóceros, artemia y copépodos, los cuales son usados posteriormente como alimento vivo para crustáceos y larvas de peces (Herrero *et al.*, 1991; Sukenik *et al.*, 1993; Payan-Aguirre, 1994; Osorio-Galindo, 1998).

La importancia de las microalgas como alimento para muchos organismos acuáticos es ampliamente conocida y su calidad puede afectar la supervivencia y desarrollo óptimo de los organismos en cultivo (De Pauw *et al.*, 1984; Arellano *et al.*, 1987). Su rápido crecimiento, la posibilidad de incrementar el valor nutricional, su tolerancia a los cultivos intensivos y su fácil digestión son algunas de las ventajas que presentan (Castrejon *et al.*, 1994), por lo que hace del cultivo de microalgas un elemento indispensable para la alimentación de los estadios zoea del camarón, debido a que son básicamente fitoplanctófagas (Martínez-Córdova, 1999)

Se han utilizado varias especies de microalgas como alimento en la acuicultura, pero no todas son adecuadas para mantener el crecimiento de un organismo (Abalde *et al.*, 1997). Esto se debe a que existen diferencias en la forma, la digestibilidad, el tamaño y su valor nutricional, el cual depende principalmente de la composición química de la microalga (Webb y Chu, 1983) y la calidad del alimento se ve reflejado en las necesidades nutricionales específicas del organismo a cultivar (Brown *et al.*, 1989). Las especies de microalgas más utilizadas en la acuicultura son las diatomeas: *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira sp.*, *Phaeodactylum sp.*, *Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans* y los

flagelados: *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana*, *I. galbana* var. "Tahiti", *Tetraselmis chuii*, *T. suecica* (Arce, 1989; Le Borge, 1990).

La calidad nutricional de las microalgas es un reflejo de su composición química (Webb y Chu, 1983; Brown *et al.*, 1989), enfocándose principalmente en el contenido de carbohidratos (Whyte *et al.*, 1989, 1990), proteínas (Kreeger y Langdon, 1993) y lípidos. En el caso de los lípidos, los ácidos grasos saturados como el C14:0 y el C16:0 (Thompson *et al.*, 1993) y la abundancia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs por sus siglas en inglés) como el ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω -3) EPA y el ácido docosahexaenoico (C22:6 ω -3) DHA (Langdon y Waldock, 1981; Viso y Marty, 1993). Se ha demostrado que la composición química de la microalga puede ser modificada cambiando las condiciones de cultivo (Chamberlin y Addison, 1980).

Algunos experimentos se han enfocado a modificar la intensidad de radiación y tiempo de fotoperíodo, observando cambios en el contenido de PUFAs (Malcolm *et al.*, 1996); por ejemplo, una variación relativamente menor en la calidad de la luz puede causar cambios sustanciales en la composición proximal de la microalga *Chaetoceros sp.*, la cual al cultivarse con luz azul, presenta un aumento en el contenido de proteínas de 2 pg/cel, sin presentar cambios en el contenido de lípidos y carbohidratos (Dring, 1987).

Por otra parte se sabe que la temperatura juega también un papel muy importante sobre la composición química de las microalgas. Sato y Murata (1980) encontraron que la temperatura es uno de los principales factores que influye en la síntesis de lípidos y por consiguiente en la composición de ácidos grasos de la

cianobacteria *Anabaena variabilis*. Si bien la luz, al igual que la temperatura, pueden tener una influencia positiva sobre la composición química de las microalgas, también ejercen un efecto positivo en el metabolismo y en la tasa de crecimiento, de tal manera que existen límites mínimos y máximos en los cuales los organismos pueden crecer, estos límites pueden ser diferentes para cada especie, según el concepto de la ventana óptima ambiental (Cury y Roy, 1989).

Variaciones en la concentración de nutrientes del medio de cultivo también causa cambios en la composición química de la microalga (Langdon y Waldock, 1981; Fábregas *et al.*, 1986; Richmond, 1986; Viso y Marty, 1993). Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, el contenido de proteínas y el número de células microalgales decrece, mientras que la concentración de carbohidratos, lípidos y ácidos grasos se incrementa (Utting, 1985; Sukenik y Livne, 1991). Por lo que después del carbono, el nitrógeno es cuantitativamente el elemento más importante que contribuye al peso seco de las algas.

Muchos estudios sobre larvas de peces y crustáceos son concluyentes al señalar que la carencia de ácidos grasos causa baja supervivencia y en algunos casos mortalidad masiva, fenómeno conocido como "síndrome de deficiencia de ácidos grasos esenciales" (Kawahigashi , 1992; Inst. de Acuicultura, Son. 1995) Los animales marinos son incapaces de sintetizar los ácidos grasos como el EPA y el DHA, y una deficiencia de estos en la dieta puede limitar el crecimiento de los organismos en cultivo, por lo que deben ser adquiridos de fuentes externas, principalmente vegetales. Tal es el caso de las microalgas (Langdon y Waldock, 1981; Leonardos y Lucas, 2000).

Considerando lo anterior, en el presente trabajo se analizó los cambios en la composición química (principalmente en el contenido de PUFAs) de la microalga *T. fluviatilis*, cultivada con dos fuentes de nitrógeno y cuatro concentraciones de nitrógeno. Posteriormente la calidad del alimento producido se probó en las larvas de camarón para evaluar la respuestas en términos de supervivencia, longitud y composición química de larvas zoea de camarón blanco *L. vannamei*.

2.- ANTECEDENTES

Calidad de *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas zoea de *Litopenaeus vannamei*

El estudio de las microalgas inició a finales del siglo XIX, cuando el microbiólogo holandés Beijerinck (1890) dio el nombre de *Chlorella vulgaris* a una diminuta alga verde de forma esférica, estableciendo de esta forma los cultivos puros y las técnicas para el cultivo de microalgas en tubo y en placa con medio sólido (citado en Arredondo, 1995).

Las microalgas han sido empleadas para su consumo como fuente de alimento: proteínas (Malcolm, 2002) y lípidos (Cohen,1986), también en el tratamiento de aguas residuales y la producción de compuestos químicos de interés biotecnológico: pigmentos, antioxidantes, ácidos grasos. (citado en Arredondo, 1995; Fidalgo, 1995)

Para obtener un cultivo de microalga en crecimiento activo es necesario un inóculo viable de un tamaño mínimo, suministro de nutrientes, condiciones físico-químicas adecuadas (pH, temperatura, salinidad) y luz como fuente de energía (Fidalgo, 1995). Las ventajas que presenta la producción de microalgas son: Pueden duplicar su biomasa en 24 horas; la transformación de nitrato a proteína es del 100 %; se puede variar la composición química de las microalgas cambiando las condiciones de cultivo, su facilidad de cultivo a nivel industrial (citado en Arredondo, 1995)

La utilización de cultivos microalgales para diferentes objetivos ha concentrado el esfuerzo de los investigadores durante las últimas décadas en mejorar su producción y composición química. Este control puede ser ejercido mediante la manipulación de factores físicos y químicos como: temperatura, luz, salinidad, composición del medio de cultivo, pH, (Fidalgo, 1995; Malcolm, 2002).

La velocidad de síntesis de los metabolitos celulares se ve influenciada por la temperatura; así tenemos que el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 y 25 °C (Fidalgo, 1995). Un decremento de la temperatura se ve reflejado en una acumulación de lípidos totales (James *et al.*, 1989; López, 2002); por otro lado, niveles de irradiancia provocan una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados y una baja proporción de los saturados y monoinsaturados (Sukenik y Carmeli, 1989; Malcolm *et al.*, 1996). La concentración de nutrientes es fundamental y debe suministrarse al medio de cultivo en cantidades específicas para su adecuada absorción, lo cual se lleva a cabo por sistemas enzimáticos, mediado por energía (ATP) y limitados por la membrana celular (Abalde *et al.*, 1997). El nitrógeno después del carbono, es cuantitativamente el elemento más importante ya que ocupa el segundo lugar como constituyente de la materia orgánica de las células microalgales (López, 1995). Los cultivos estáticos a gran escala dependen en gran medida de la limitación de N, C, P y Si principalmente en diatomeas (Harrison *et al.*, 1990). Los elementos que conforman el medio de cultivo también afectan la composición química de las microalgas; por ejemplo la fuente y concentración de nitrógeno provoca un efecto directo sobre el crecimiento celular y la producción de proteínas (Herrero *et al.*, 1991, 1994; Flynn *et al.*, 1992).

Algunas de las variaciones en la composición química publicadas para diferentes microalgas y revisadas por Brown *et al.* (1989) pone en evidencia que bajo el efecto de limitación o deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo, los niveles de carbohidratos y/o lípidos tienden a aumentar, mientras los niveles de proteínas decrecen.

El desarrollo de la acuicultura de moluscos y crustáceos ha motivado la intensificación de las investigaciones sobre la producción masiva de microalgas marinas, para su utilización como alimento en los sistemas de acuicultura. El principal problema asociado con el uso de microalgas en acuicultura es la falta de conocimiento sobre el valor nutricional de las algas y los requerimientos nutricionales de los consumidores de éstas (Malcolm, 1991).

El agua del cultivo es el medio donde los organismos se van a desarrollar y su calidad tiene un efecto directo en la supervivencia, por esta razón para el éxito de los cultivos larvarios las variables como la temperatura, la salinidad, el pH y el oxígeno disuelto deben ser correctamente controlados. La importancia de mantener estas variables en los rangos óptimos sugeridos para la especie en cultivo, es fundamental para el crecimiento y supervivencia, así tenemos por ejemplo que la temperatura es un factor importante que determina la velocidad de las reacciones metabólicas de los organismos lo cual se ve reflejado en los procesos de muda, crecimiento y supervivencia (Martínez-Córdova, 1999); otro factor importante es la salinidad ya que los organismos en cultivo deben de mantener su intercambio iónico entre el interior y el exterior del cuerpo. Cuando este intercambio no está en equilibrio, el organismo tiene que realizar ciertas estrategias para equilibrar la concentración de iones, lo cual implica un gasto de energía. El pH es importante en las reacciones metabólicas ya que las enzimas de los organismos funcionan adecuadamente dentro de un rango de pH determinado, un cambio puede alterar el funcionamiento de la hemolinfa, la respiración y las reacciones enzimáticas del organismo (Arellano, 1990). El oxígeno también es un parámetro muy importante en el desarrollo del camarón en sus diferentes estadios,

el bajo nivel de oxígeno disuelto es una de las causas más comunes de mortalidad y reducción de crecimiento en estanques intensivos (Seidman y Lawrence, 1985). Ocampo (1994) experimentando con postlarvas, juveniles y adultos del camarón café *P. californiensis*, sometidos a 5 temperaturas y una salinidad de 35 ups, encontró que el consumo de oxígeno por parte de los camarones se incrementa con la temperatura y es inversamente proporcional al peso.

Arellano (1990) reportó que la temperatura óptima para el cultivo de *L. vannamei* debe mantenerse en 28 ± 0.5 °C, la salinidad entre 28-35 ups y el pH entre 7.5- 8.2. Mientras que Martínez-Córdova (1999) reportó que las condiciones fisicoquímicas óptimas para el cultivo de *L. vannamei* son entre 28-29 °C, salinidad de 37-38 ups, oxígeno disuelto de 5-8 mgO₂/lt y pH entre 7.5-8.5.

La alimentación inicial en los primeros estadios larvarios del camarón (protozoa) es a base de microalgas, las cuales proveen de los requerimientos nutricionales, energéticos que la larva necesita para su actividad metabólica (Hudinaga, 1942; Kurmaly *et al.*, 1989; Fidalgo *et al.*, 1994; Malcolm, 1991, 2002). Por esta razón es importante investigar cuantitativamente los aspectos relacionados con la alimentación larvaria ya que el desarrollo y crecimiento dependen principalmente del origen, calidad y cantidad del alimento consumido (Emmerson, 1980; Martínez-Córdova, 1999).

Uno de los factores que influye en la supervivencia de las larvas de camarón es el origen y el contenido del alimento principalmente en proteínas, carbohidratos y lípidos. Algunos autores ponderan la calidad del alimento en función de la composición química, así tenemos que Quintio y Villegas (1982)

utilizando dos dietas una de *Chaetoceros calcitrans* y la otra de *Tetraselmis chuii* en la alimentación de *Penaeus monodon*, determinaron una supervivencia de 68 % y 64 % respectivamente, encontrando una mayor concentración de carbohidratos en las larvas alimentadas con *C. calcitrans* asociándolo con la supervivencia.

Naranjo *et al.*, (1999) al evaluar el efecto de tres microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Dunaliella sp.*) en la supervivencia de *Penaeus californiensis*, determinaron que la supervivencia del 55 % correspondió a larvas alimentadas con la diatomea *Chaetoceros gracilis* la cual presentó una cantidad considerable de proteínas y lípidos.

Por otro lado López (2002) registró supervivencias de 59.2 % en larvas de *L. vannamei* alimentadas con *T. weissflogii* asociándola a la composición química de la dieta principalmente en su contenido de proteínas.

Kureshy y Davis (2000) mencionan que los requerimientos de proteínas en camarones peneidos es una consideración nutricional muy importante ya que es el mayor nutriente limitante para el crecimiento y uno de los componentes más costosos en dietas artificiales.

3.- OBJETIVOS

Calidad de *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas zoea de *Litopenaeus vannamei*

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la diatomea *Thalassiosira fluviatilis* cultivada con dos fuentes de nitrógeno en la supervivencia, crecimiento y composición química de larvas protozoa del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

3.2 Objetivos particulares

Conocer las variaciones de la composición química de la diatomea *T. fluviatilis* cultivada con dos fuentes de nitrógeno y cuatro concentraciones.

Determinar en que fase de crecimiento celular *T. fluviatilis* produce la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (ARA, EPA y DHA).

Determinar la tasa de supervivencia en tres estadios de desarrollo (protozoa I, II y III) de larvas de camarón blanco *L. vannamei* alimentadas con la diatomea *T. fluviatilis*.

4.- HIPOTESIS

La diatomea *T. fluviatilis* al ser cultivada en condiciones de estrés (deficiencia de nitrógeno) presentará cambios en la composición química, principalmente un incremento de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

T. fluviatilis modificada en el contenido de PUFAs, al ser utilizada como alimento en larvas zoea del camarón *L. vannamei* tendrá un efecto positivo en el incremento de la supervivencia, desarrollo y crecimiento de este crustáceo.

5.- JUSTIFICACION

Calidad de *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas zoea de *Litopenaeus vannamei*

El cultivo de camarón es una actividad con un rápido desarrollo en la industria de producción acuícola mundial (Stern, 2002). Se sabe que juega un papel social importante en la generación de empleos, además de ser considerada una fuente de alimento de alta calidad (Castillo, 1998). En la actualidad, uno de los principales problemas que presentan las granjas es el controlar las variables ambientales del cultivo entre las que se encuentran, la calidad del agua, la cantidad y calidad del alimento, los cuales son factores críticos para la supervivencia y crecimiento de las larvas (Alfonso *et al.*, 1993). En el cultivo de camarón, el estadio más crítico de la supervivencia es el de las larvas y esto depende en gran medida de la disponibilidad y de la calidad del alimento (Persoone y Claus, 1980). Las microalgas son la base de la alimentación en acuicultura durante los estadios larvales de peces, moluscos, crustáceos y organismos del zooplancton (De Pauw *et al.*, 1984; Arellano *et al.*, 1987, Malcolm, 2002). Dado que el cultivo de microalga es considerado de importancia vital es necesario mejorar la composición química de estas, manipulando las condiciones de cultivo, para mejorar la producción y concentración de lípidos, ácidos grasos poliinsaturados, necesarios para el buen desarrollo, crecimiento y supervivencia de los organismos en cultivo.

En el presente trabajo se probó el efecto de *T. fluviatilis* como alimento vivo, modificado en su contenido químico y principalmente en los ácidos grasos poliinsaturados (ARA, EPA y DHA) en la supervivencia, velocidad de metamorfosis y crecimiento de larvas zoea de camarón *L. vannamei*.

6.- METODOLOGIA

6.1 Diseño experimental para el cultivo de microalgas

6.1.1 Cultivo de microalgas

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de “Cultivo de microalgas” del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La cepa de *T. fluviatilis* fue donada por la Delegación Provincial de la Ciudad de La Habana del Ministerio de Ciencia y Tecnología y Medio Ambiente de Cuba, a la Colección de Microalgas del CIBNOR, en donde se le puso la clave THF-1. La diatomea *T. fluviatilis* se cultivó en el medio f /2 (Guillard, 1975) en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad a una temperatura de 22 °C con agitación, enseguida se escaló en matraces Feirnbach de 2.5 l. Posteriormente se realizaron dos bioensayos de cultivos de microalgas en matraces Feirnbach de 2.5 litros de capacidad para determinar con que fuente y concentración de nitrógeno, la producción de PUFAs fuera elevada; así mismo, se determinó la fase de crecimiento de la microalga en donde se obtuviera la máxima concentración de PUFAs. Para tal fin, se utilizó como fuente de nitrógeno el NaNO_3 y NH_4Cl , cada una a cuatro diferentes concentraciones siguiendo un orden de progresión geométrica de 2 (111.25, 222.50, 445 y 890 μmol). Los tratamientos para NaNO_3 se identificaron como N1, N2, N3 y N4 respectivamente y para NH_4Cl se identificaron como (C1, C2, C3 y C4) respectivamente. Los cultivos, con las respectivas concentraciones de nitrógeno antes citadas, se iniciaron agregando el 10 % del volumen del inóculo de *T. fluviatilis* con una densidad aproximada de 236,500 cel/ml. Las condiciones del cultivo fueron: sistema estático o batch (termino en inglés), manteniendo constante la temperatura (22 °C), la iluminación (120 $\mu\text{mol}/\text{Einstein}/\text{m}^2/\text{s}$), fotoperíodo de

12/12 (luz/oscuridad) y pulsos de CO₂ 1min/h controlado por un sistema de cómputo, el pH se midió con un potenciómetro Beckman 34 pH Meter calibrado con Buffer a 7 y 10 unidades de pH, con la finalidad de verificar las condiciones de estabilidad de los cultivos en los diferentes tratamientos. La duración de los cultivos de *T. fluviatilis* fue de 18 días y se tomaron muestra cada 48 horas. Para determinar su densidad y fase de crecimiento se utilizó una tabla de números aleatorios para ubicar la posición de los matraces Feirnbach. El experimento contó con ocho tratamientos y 4 réplicas, por lo que el diseño constó de 32 unidades experimentales (Figura 1).



Figura 1. Escalamiento del cultivo de *Thalassiosira fluviatilis*

Para la preparación del medio de cultivo se usó agua de mar filtrada a través de un cartucho de carbón activado y de una membrana Whatman de fibra de vidrio GF/F de 0.7 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro con la finalidad de eliminar las partículas en suspensión (Coll, 1991). El agua de mar filtrada se colocó en matraces Feirnbach de 2.5 litros de capacidad cubriendo su entrada con tapones de plástico de 7 cm de diámetro, el tapón se perforó 2 veces para colocar un tubo de vidrio en cada perforación, para la entrada de aire y CO_2 al cultivo. Inmediatamente se esterilizó con calor húmedo a 120 °C durante 15 minutos (Torretera y Tanco, 1979). Se dejó enfriar a temperatura ambiente para después proceder a la preparación de los medios de cultivos para diatomeas f/2 según la técnica sugerida por Guillard (1975). Las soluciones con macro y micro nutrientes se esterilizan bajo las mismas condiciones que el agua de mar.

6.1.2 Seguimiento de los cultivos

Después de hacer el sembrado de la microalga, se le dió seguimiento a la cinética de crecimiento y obtención de muestras para la determinación de la densidad celular y composición química (Figura 2). Los conteos de microalgas (siete por muestra) se realizaron con una cámara de Neubauer de acuerdo al método propuesto por Schoen (1988).

6.1.2.1 Cuantificación de peso seco (PS)

Para la determinación del PS se utilizaron filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F previamente prequemados en mufla a 450 °C 4 h y calibrados en una balanza analítica Mettler AE 163. El PS de las microalgas se realizó filtrando 10 ml del cultivo a través de los filtros GF/F los cuales se lavaron con formato de amonio 0.5 M para eliminar las sales y posteriormente se mantuvieron a 60 °C en una estufa BLUE M durante 24 h. Posteriormente se pasó a un desecador durante 30 min, tiempo que alcanzó la temperatura ambiente. Se realizaron las pesadas en la balanza analítica hasta que el peso del filtro fuera constante; la cuantificación se realizó por diferencia de peso del filtro vacío y el filtro con muestra.

Para la determinación de la composición química durante la cinética de crecimiento, se extrajeron 100 ml del cultivo, al cual se le eliminó el exceso de agua centrifugando a 5000 rpm durante 12 min a 10 °C en una centrífuga Beckman GPR con control de temperatura. La microalga concentrada (pastilla celular; PC) se lavó con una solución de formato de amonio al 3 % para eliminar las sales (Zhu y Lee, 1997) y evitar interferencias durante los análisis bioquímicos. La PC se llevó a congelación a -40 °C y posteriormente se liofilizó (Liofilizadora Virtis, Freezemobile 5), manteniéndose a -20°C hasta su análisis.

6.1.2.2 Cuantificación de proteínas

Para la determinación de proteínas, se pesó 5 mg de microalga liofilizada y se sometió a hidrólisis alcalina con 2 ml de NaOH 1N en baño María a 100 °C

(Hernández-Saavedra, 1991). Posteriormente el hidrolizado se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 20 °C. Del hidrolizado se tomó una alícuota conocida para aplicar la metodología descrita por Lowry *et al.*, (1951). Dicho método utiliza el reactivo de Folin, que es reducido por los fenoles a “azul de molibdeno”. Las proteínas presentes reducen el reactivo de fenol, produciendo color azul el cual puede ser medido por espectrofotometría. La cantidad de color producido es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Para la cuantificación se preparó una curva estándar con albúmina-bovina (BSA, Sigma, Lot. 093H6158), en el siguiente rango de concentración: 0, 125, 250, 500, 1000 µg/ml. Una vez construida la curva se ajustó por regresión lineal para conocer la ecuación de la recta. La lectura de absorbencia se realizó a 750 nm con un espectrofotómetro Beckman DU 640.

6.1.2.3 Cuantificación de carbohidratos

Para la determinación de los carbohidratos se pesaron 5 mg de microalga liofilizada, se sometió a hidrólisis con H₂SO₄ al 65 % en baño María a 100 °C (Hernández-Saavedra, 1991). Del hidrolizado se tomó una alícuota y se siguió el método descrito por Dubois *et al.* (1956). Dicho método usa el ácido sulfúrico y el fenol, que al reaccionar produce un color muy estable y no sufre interferencias con proteínas. La cuantificación se realiza construyendo una curva estándar con glucosa (Dextrosa, Sigma), en el siguiente rango de concentración: 0, 25, 50, 100, 200, 400 µg/ml. Una vez construida la curva se ajustó por regresión lineal para

conocer la ecuación de la recta. La lectura de absorbencia se realizó a 489 nm con un espectrofotómetro Beckman DU 640.

6.1.2.4 Extracción y cuantificación de clorofila a (Chl a)

Para la extracción de clorofila a, se pesaron 2 mg de microalga liofilizada y se sometió a extracción con acetona grado HPLC al 100 %. Las muestras se incubaron 24 h a -20°C , cubiertas con papel aluminio para protegerlas de la luz. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm 15 min a 5°C . El extracto se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio de $0.45\ \mu\text{m}$ de poro. El volumen se recuperó en viales eppendorf y se almacenaron a -20°C ; posteriormente se extrajeron 20 μl y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, modelo 1100, Hewlett Packard).

Para la separación de la clorofila a, se siguió el método descrito por Vidussi *et al.* (1996), utilizando una fase móvil conjugando dos soluciones, la solución A fue una mezcla de metanol : acetato de amonio 1N en una proporción 70:30 v/v, y la solución B metanol grado HPLC al 100%. La fase estacionaria utilizada fue una columna Hypersil C8, de 10 cm de longitud, de 0.45 cm de diámetro y rellena de partículas de sílice de $5\ \mu\text{m}$. El detector utilizado fue un arreglo de diodos con un rango de longitud de onda de 190-900 nm y capacidad para determinar 5 longitudes de onda fijas. La identificación se realizó tomando en cuenta dos criterios: a) tiempo de retención del estándar de clorofila a (SIGMA- Lot. 17K7060) y b) espectro de absorción luminosa (350-750 nm) obtenidos con el detector de

arreglo de diodos. La cuantificación se realizó construyendo una curva de calibración con concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ng/ml del estándar de clorofila a.

6.1.2.5 Extracción de lípidos totales

La extracción de los lípidos totales se efectuó con base al método descrito por Bligh y Dyer (1959). Se pesaron 5 mg de microalga liofilizada y se colocaron en un tubo de ensayo con tapa de rosca y se le añadió 2 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) grado HPLC. En esta etapa se le adicionó el estándar interno C17:0 (ácido heptadecanoico). Para larvas se le agregó el C23:0 (ácido tricosanoico) incubándose por 24h a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm 20 min a 5 °C recuperándose el extracto cloroformo:metanol. La pastilla celular se lavó de dos a tres veces con la mezcla, una vez recuperado el extracto se le agregó agua destilada para romper el equilibrio entre el cloroformo:metanol, formándose dos fases; la cloroformica que contiene los lípidos la cual se recuperó con ayuda de una pipeta pasteur. La fase metanol-agua se desechó. Los lípidos recuperados en la fase cloroformica se llevaron a sequedad en una atmósfera de gas nitrógeno y posteriormente se resuspendieron en 1 ml de cloroformo grado HPLC separándolos en dos fracciones; la primera de 200 µl se destinó para lípidos totales y la segunda de 800 µl para la determinación y cuantificación de ácidos grasos.

6.1.2.6 Cuantificación de lípidos totales

Los 200 μ l del extracto lipídico se llevaron a sequedad con una corriente de gas nitrógeno. Para el análisis de lípidos totales se utilizó el método descrito por Marsh y Weinstein (1966), el cual consiste en la carbonización de la materia orgánica (lípidos totales) con ácido sulfúrico. La cuantificación se realizó construyendo una curva estándar con triestearina, utilizando las siguientes concentraciones 50, 100, 150 y 200 μ g/ml . La lectura de absorbencia se realizó a 375 nm con un espectrofotómetro Beckman DU 640.

6.1.2.7 Extracción de ácidos grasos

Los 800 μ l provenientes de la extracción de los lípidos totales se llevaron a sequedad con una corriente de gas nitrógeno. La extracción se realizó por el método descrito por Sato y Murata (1988), que se basa en la esterificación de los ácidos grasos mediante una metanólisis con HCl:CH₃OH (5:95) v/v. Los ácidos grasos metil esterificados se extraen realizando de 2 a 3 lavados con hexano grado HPLC. El extracto de hexano se seca con gas nitrógeno resuspendiéndose en 200 μ l de hexano que se colocan en los insertos para viales de 2 ml.

6.1.2.8 Identificación y cuantificación de ácidos grasos

Se utilizó 1 μ l del extracto de hexano para la inyección al cromatógrafo de gases (GCD Plus Hewlett Packard, Modelo G1800B). La fase estacionaria consiste de una columna Omega wax, Supelco de 30 m de longitud x 0.25 mm de

diámetro. Las condiciones del cromatógrafo fueron: temperatura inicial de 110 °C, temperatura máxima de la columna de 280 °C, puerto de inyección 250 °C y la temperatura del detector de 260 °C. Se utilizó helio de alta pureza como gas acarreador a un flujo de 0.9 ml/min y el rango de masas que el equipo detecta está entre 10-450 uma (unidades de masa atómica). La identificación de los ácidos grasos se realizó por 2 criterios: a) mediante la comparación de los espectros de masas contenidos en la base de datos WIST/NBS de estándares comerciales y b) comparación de los tiempos de retención de los picos de la muestra con los de patrones comerciales metil esterificados. Para la cuantificación de los ácidos grasos se construyó una curva de calibración con una mezcla de estándares de ácidos grasos (C13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 16:1, 16:2, 17:0, 16:3, 18:0, 18:1, 18:2, 19:0, 18:3, 18:4, 20:0, 20:1 cis-11, 20:1 cis-13, 20:2, 20:3, 21:0, 20:4, 20:5, 22:0, 22:1, 22:2, 23:0, 22:4, 22:5, 24:0, 22:6, 24:1) en un rango de concentración de 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml. Inyectados los estándares se calculó la pendiente de las curvas y los factores de corrección para cada estándar.

Obtención de la muestra de *Thalassiosira fluviatilis*
Cultivo en matraces feirnbach

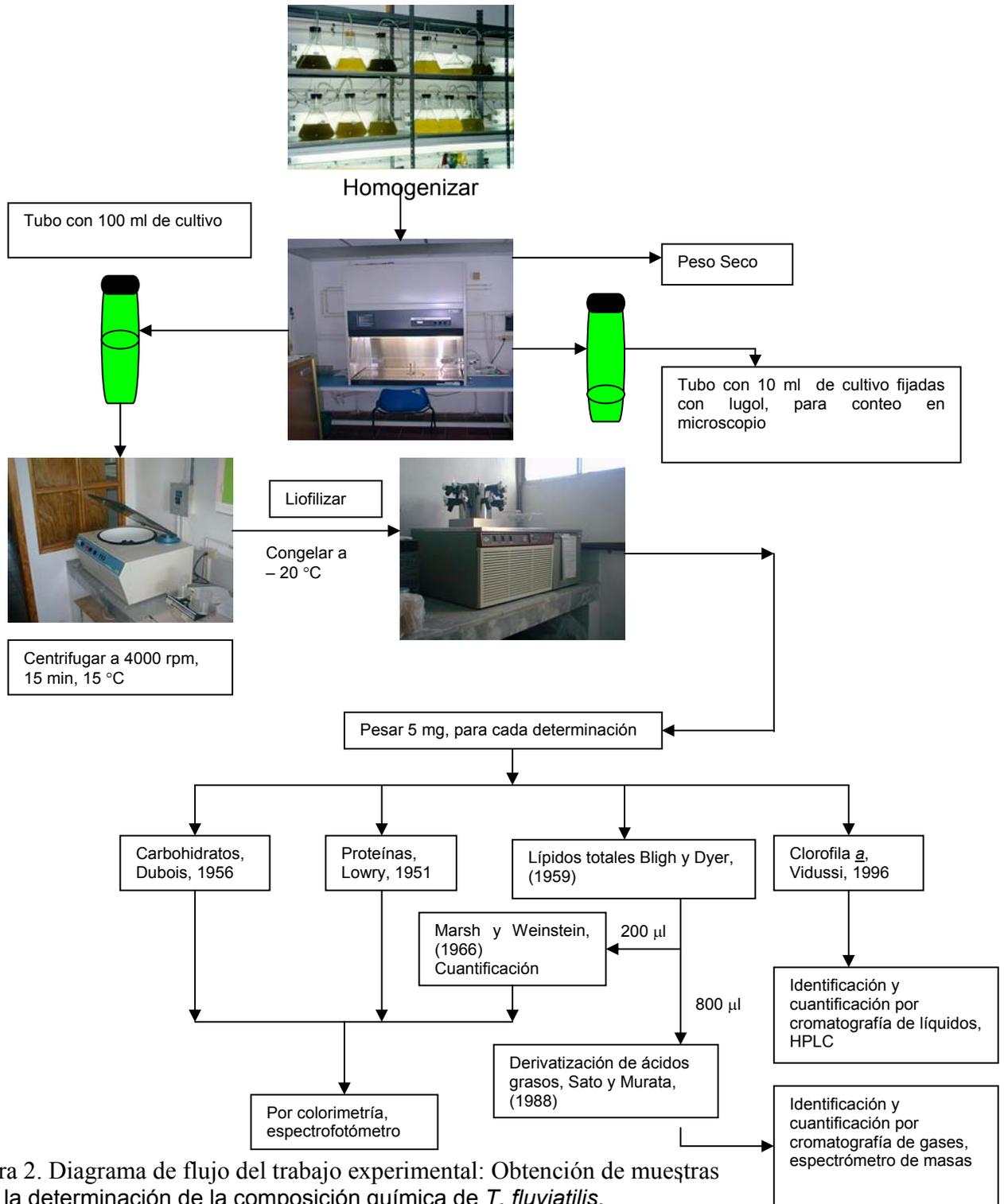


Figura 2. Diagrama de flujo del trabajo experimental: Obtención de muestras para la determinación de la composición química de *T. fluviatilis*.

6.2 Experimento de alimentación de larvas

Las larvas de camarón blanco *L. vannamei* se obtuvieron de la compañía Acuacultores de La Paz, S.A. de C.V. (APSA), en estadio de nauplio III. La temperatura del agua en la que se proporcionaron fue de 22 °C. Una vez en el laboratorio del CIBNOR, se aclimataron a 28 °C, para este fin, se colocaron en una cubeta (20 litros de capacidad) con 10 litros de agua de mar filtrada, a la cual cada 2 horas se le hacían recambios parciales de aproximadamente el 10 % del volumen, hasta alcanzar la temperatura de 28 °C así se les mantuvo hasta el estadio de nauplio V. Posteriormente se estimó el número total de larvas, tomando 10 alícuotas de 100 ml y fijándolas con lugol. Estas muestras se depositaron en recipientes de plástico con fondo cuadrulado y se contaron las larvas. Una vez conocida la concentración total de larvas se realizó la extracción de una alícuota de un volumen de 40 ml conteniendo un total de 150 larvas que fueron depositadas en los frascos experimentales.

6.2.1 Diseño experimental para el cultivo larvario

Con el fin de evaluar el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con la diatomea *T. fluviatilis* enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados, se realizó un bioensayo con tres réplicas y cuatro tratamientos (Figura 3).

Los tratamientos de *T. fluviatilis* seleccionados para el ensayo de alimentación de larvas fueron: El tratamiento N3 con 445 μmol de NaNO_3 identificado como (T1) y el tratamiento C2 con 222.25 μmol de NH_4Cl como (T2) los cuales presentaron mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, también se realizó el tratamiento testigo (T3) utilizando microalga cultivada bajo las condiciones del medio f/2 (Guillard, 1975) y el cuarto tratamiento que fue sin alimento, únicamente con larvas (T4). Cada tratamiento se realizó por triplicado y 2 réplicas de microalga testigo para cada tratamiento. El ensayo consistió en trabajar solamente con larvas en estadio de protozoa I, II y III. Los recipientes utilizados en el experimento fueron de 4 litros de capacidad, con un volumen útil de 2 litros. En estos frascos (FE) se llevó a cabo la “siembra” de los individuos; primeramente se les añadió las microalgas a una concentración de 1×10^5 cel/ml, mientras que las larvas se mantuvieron a una concentración de 150 larvas/l.

Los muestreos se iniciaron cuando más del 80 % de las larvas en estadio de nauplio V habían mudado a protozoa I (previa revisión de una alícuota de larvas, bajo un microscopio estereoscópico). Las muestras para cada estadio se tomaron al tiempo inicial identificado como PZI t0 inicio de estadio y PZI t1 al final del estadio. Para los siguientes estadios de protozoa (PZII Y PZIII), se realizó el mismo procedimiento de muestreo. El experimento tuvo una duración de 6 días.

Experimento # 2

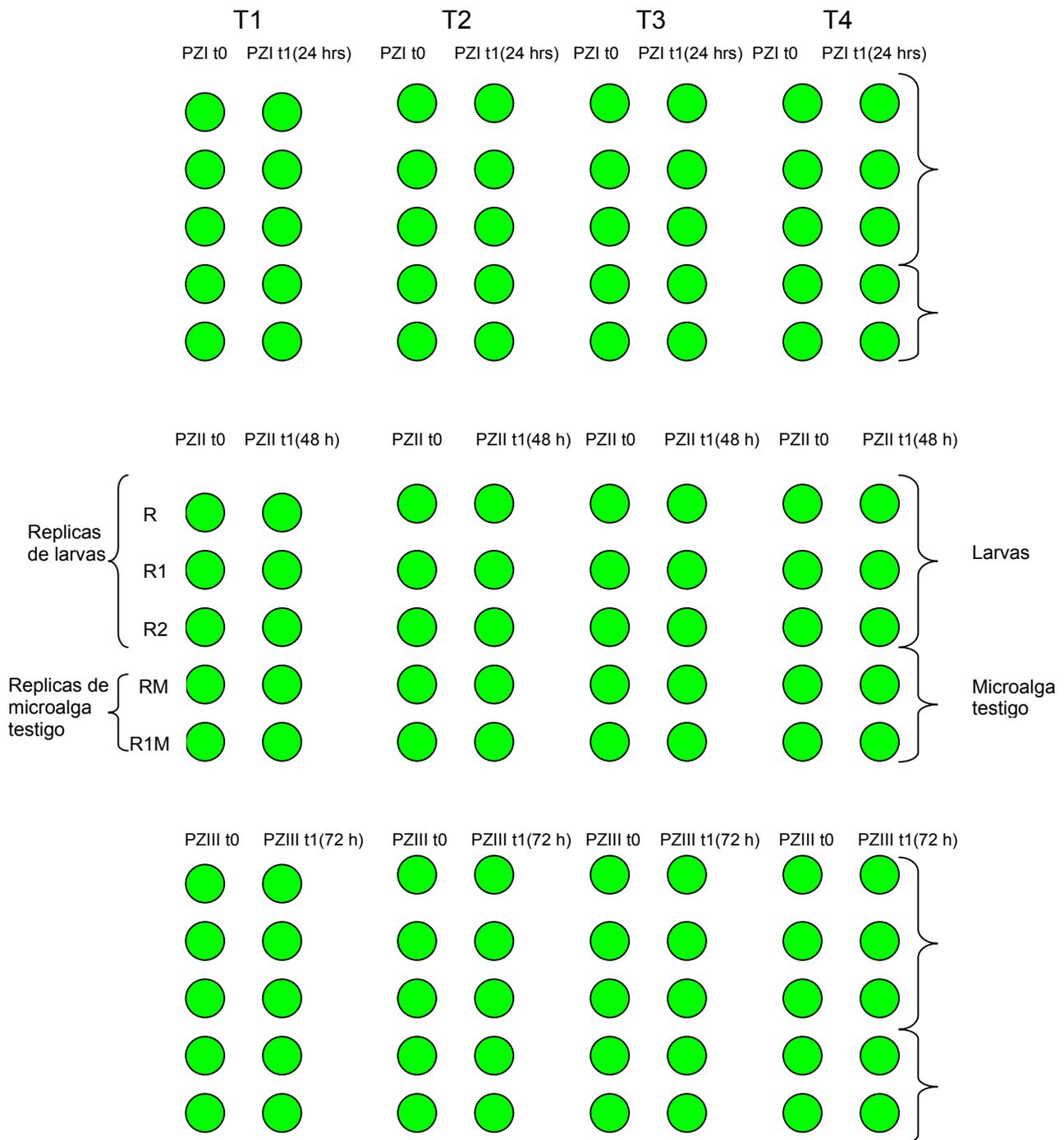


Figura 3. Representación general del diseño experimental con larvas de *L. vannamei* alimentadas con la microalga *T. fluviatilis*

La supervivencia de las larvas se evaluó después de homogenizar los FE, realizando los conteos de organismos vivos en una alícuota de un volumen conocido. Los conteos de las larvas se realizaron con ayuda de una caja de plástico cuadriculada del fondo y un microscopio estereoscópico. Posteriormente, el contenido de cada FE se filtró a través de dos tamices uno debajo de otro, de 50 y 22 μm . En el de 50 μm se recuperaban las larvas y en el de 22 μm las heces fecales, el contenido de estos tamices se concentraron en filtros de fibra de vidrio GF/C de 1.2 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, con la ayuda de un sistema de filtración Kitashato y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las microalgas que pasaron a través de los tamices antes mencionados, se recuperaron en un vaso de precipitado de 4 litros de capacidad, del cual se tomaron alícuotas de 100 ml, la biomasa se concentró en filtros de fibra de vidrio (GF/F) previamente incinerados a $430\text{ }^{\circ}\text{C}$, los cuales inmediatamente se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron destinados para determinar la composición química (proteínas, carbohidratos, lípidos totales, ácidos grasos y clorofila a) (Figura 4).

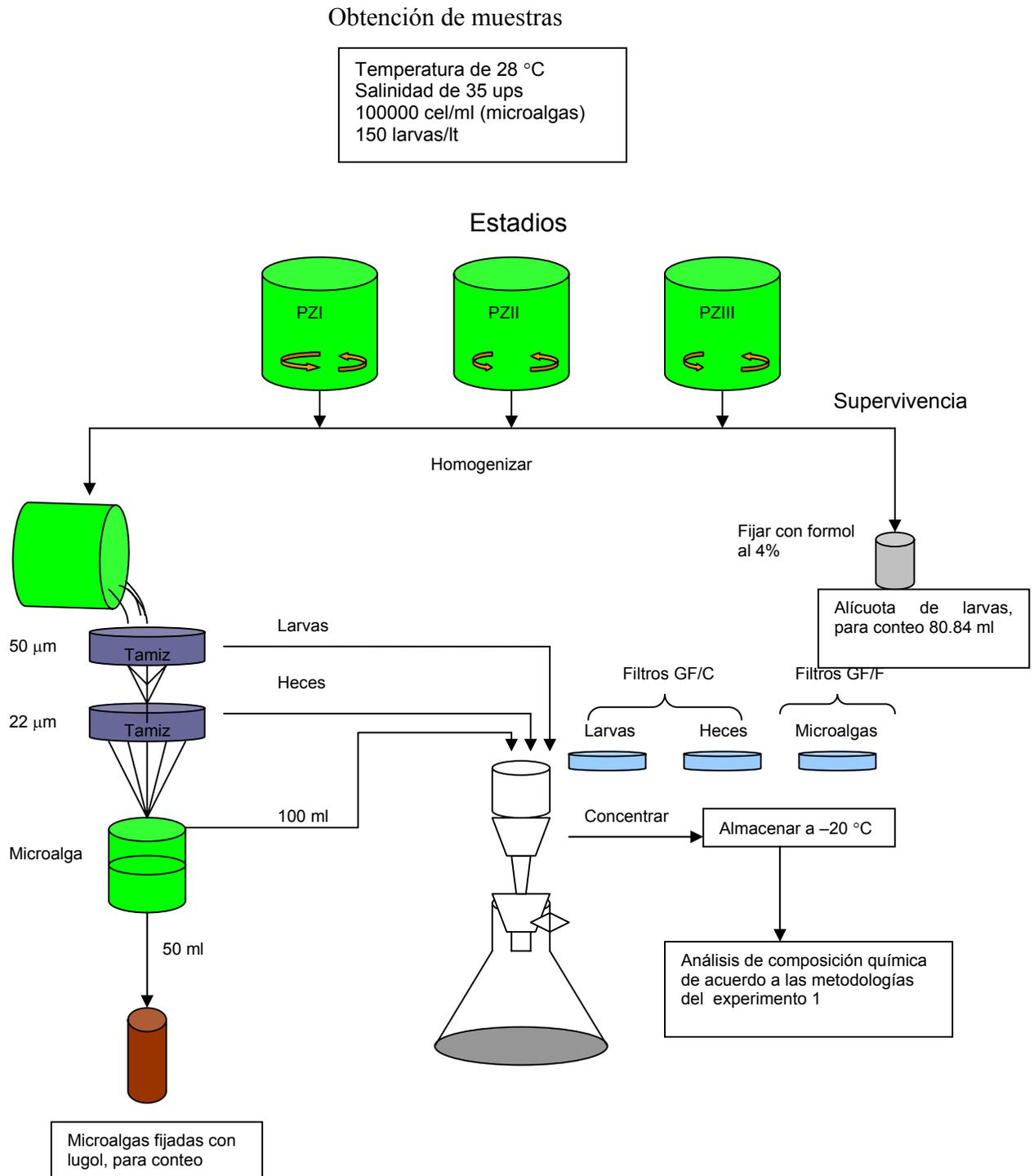


Figura 4. Representación de los frascos experimentales y procedimiento para la obtención de muestras durante el experimento de alimentación en larvas protozoa del camarón blanco *L. vannamei* sometidas a cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4)

6.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos que se aplicaron fueron: Estadística descriptiva: En todas las variables (densidad celular, peso seco, clorofila a, proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos). Pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (Levene's).

Análisis de varianza (MULTIFACTORIAL) de tres vías efectos fijos, en el programa Statistica 6.0 (Statsoft, USA), para observar el efecto de los tratamientos con las siguientes variables: fuente de nitrógeno, concentración de nitrógeno y tiempo de cultivo.

7.- RESULTADOS

7.1.- Evaluación cuantitativa del cultivo de *Thalassiosira fluviatilis*

7.1.1.- Densidad celular

La fuente de nitrógeno suministrada al medio de cultivo no afectó el crecimiento celular ($p > 0.1$) y se observó la interacción fuente x concentración fue significativa ($p < 0.05$). Por otro lado, la densidad celular incrementó conforme se aumentó la concentración de nitrógeno en el medio (NaNO_3 y NH_4Cl). En las Figuras 5 y 6 se representan las curvas de crecimiento con las dos fuentes de nitrógeno y las cuatro concentraciones probadas. Los valores promedio máximos de crecimiento celular en los tratamientos con 111.25 μmol de nitrógeno N1 (para la fuente de NaNO_3) y C1 (para la fuente de NH_4Cl) fueron en el día 12 con $5.75 \times 10^6 \pm 10.0 \times 10^5$ cel/ml y $6.00 \times 10^6 \pm 5.0 \times 10^5$ cel/ml respectivamente, no registrando diferencias significativas entre ellos ($p > 0.46$). Los tratamientos con 222.5 μmol N2 y C2 también registraron valores promedios máximos en el día 12 de $8.58 \times 10^6 \pm 7.2 \times 10^5$ cel/ml y $8.50 \times 10^6 \pm 2.5 \times 10^5$ cel/ml respectivamente, no registrando diferencia significativa ($p > 0.05$). Los tratamientos con 445 μmol N3 y C3 también registraron los valores promedio máximos en el día 12 con $10.62 \times 10^6 \pm 3.7 \times 10^5$ cel/ml y $8.75 \times 10^6 \pm 2.25 \times 10^5$ cel/ml respectivamente, registrando diferencia significativa entre ellos ($p < 0.001$). Por otro lado los tratamientos con 890 μmol de nitrógeno N4 y C4 fueron donde se registraron las máximas densidades celulares, registraron valores promedio máximos de $14.12 \times 10^6 \pm 1.30 \times 10^5$ cel/ml y $14.50 \times 10^6 \pm 2.5 \times 10^5$ cel/ml en el día 15, no registrando diferencias significativas entre si ($p > 0.95$).

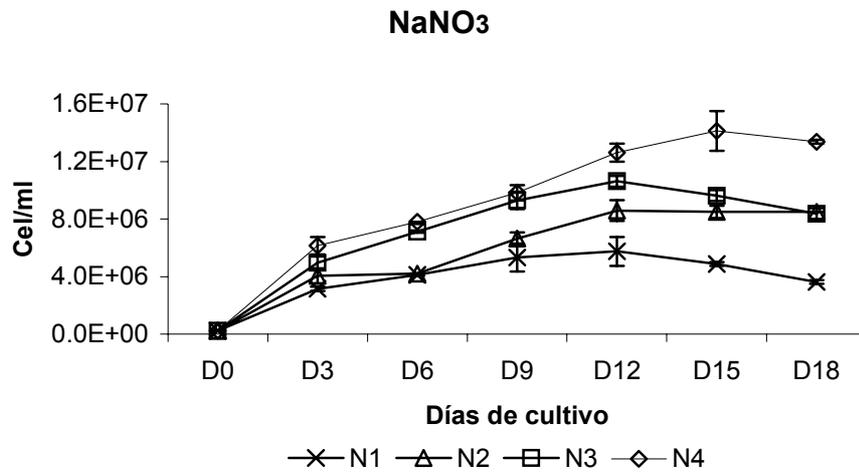


Figura 5. Curva de crecimiento de *T. fluviatilis* cultivada con NaNO₃ a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4).

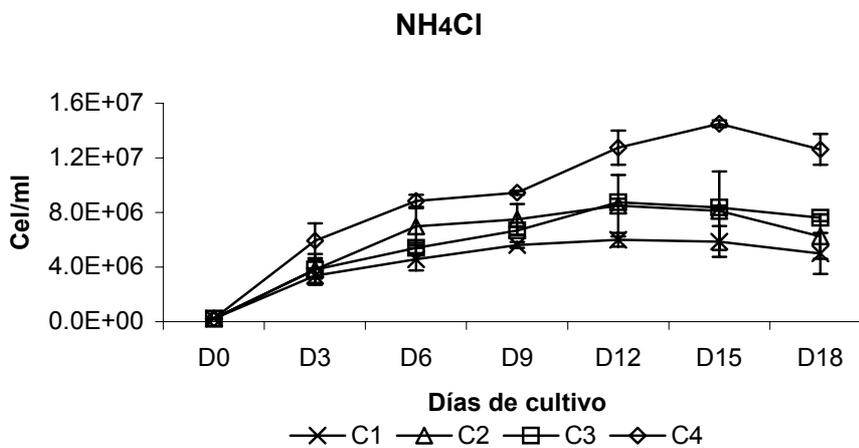


Figura 6. Curva de crecimiento de *T. fluviatilis* cultivada con NH₄Cl a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4).

El pH y la temperatura son dos variables fundamentales durante el cultivo de microalgas por lo que éstas se mantuvieron constantes entre 8.0-8.4 y 22 °C respectivamente.

7.1.2.- Peso seco

El peso seco celular no se ve afectado por la fuente de nitrógeno ($p > 0.24$), pero si por la concentración de nitrógeno ($p < 0.001$) y el tiempo de cultivo ($p < 0.001$), registrando interacción entre tiempo x concentración ($p < 0.001$) y entre fuente x concentración ($p < 0.001$). No se registraron diferencias significativas en los tratamientos N1-C1 ($p > 0.97$), N3-C3 ($p > 0.9$), N4-C4 ($p > 0.9$), pero si en N2-C2 ($p < 0.01$).

El peso seco presentó la misma tendencia que en la densidad celular, incrementándose a mayor concentración de nitrógeno con valores promedio máximos de 0.416 ± 0.04 mg/ml y 0.410 ± 0.004 mg/ml en los tratamientos N4 y C4, respectivamente. El resto de los tratamientos no rebasaron los 0.2 mg/ml (Figuras 7 A, B).

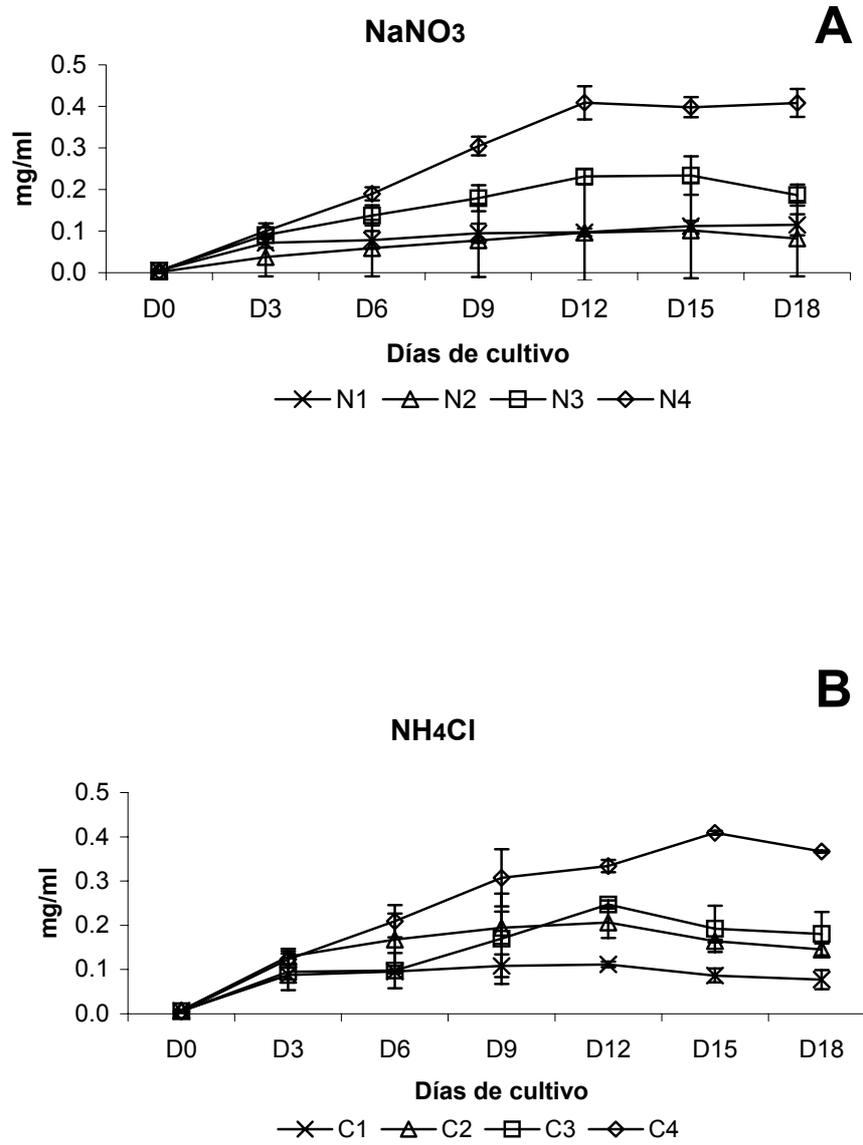


Figura 7. Variación del peso seco de *T. fluviatilis* cultivada con 2 fuentes de nitrógeno: A) NaNO₃ y B) NH₄Cl a cuatro concentraciones 111.25 (N1, C1), 222.5 (N2, C2), 445 (N3, C3) y 890 μmol (N4, C4).

7. 1.3.- Clorofila a (Chl a)

El contenido celular de clorofila a (Chl a) en *T. fluviatilis* presenta variaciones significativas en función de la fuente, concentración y tiempo de cultivo ($p < 0.001$), también presentó diferencia significativa entre las interacciones fuente x concentración, fuente x tiempo y concentración tiempo ($p < 0.05$). El contenido de clorofila a se incrementa al aumentar la concentración de nitrógeno, alcanzando valores diarios máximos en el tratamiento N1 y C1 de 2500.65 ± 523.47 ng/mg peso seco y 3475.97 ± 417.95 ng/mg, respectivamente en el día 12 de cultivo, no registrando diferencia significativa entre ellos ($p > 0.95$). Por otro lado, N2 y C2 registraron valores máximos de 3920.08 ± 292.20 ng/mg en el día 12 y 5259.66 ± 1431.51 ng/mg al día 18, no hubo diferencia significativa ($p > 0.95$). El tratamiento N3 alcanzó sus valores máximos al día 6 con 4117.37 ± 679.53 ng/mg y C3 en el 18 con 5976.44 ± 841.78 ng/mg, no registrando diferencias significativas ($p > 0.95$). Mientras que los tratamientos N4 y C4 registraron sus valores máximos con 7141.59 ± 57.41 ng/mg para el día 18 y de 7844.73 ± 845.84 ng/mg para el día 15 (Figuras 8, 9), registrando diferencias significativas ($p < 0.001$)

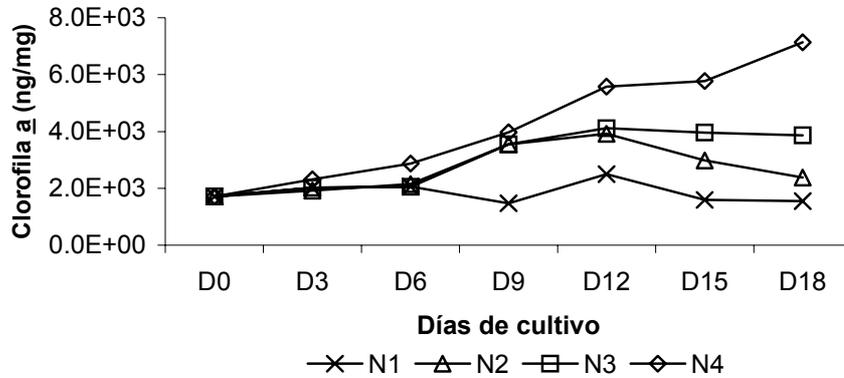


Figura 8. Variación de clorofila a en *T. fluviatilis* cultivada con NaNO_3 a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)

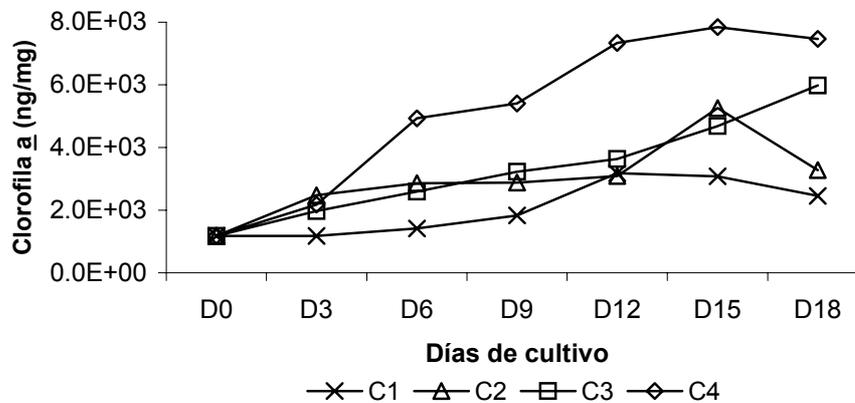


Figura 9. Variación de clorofila a en *T. fluviatilis* cultivada con NH_4Cl a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)

7.1.4.- Composición química de *T. fluviatilis*

Proteínas, carbohidratos y lípidos

El contenido celular de proteínas durante las fases de crecimiento logarítmica y estacionaria, disminuyó a bajas concentraciones de nitrógeno. Con NaNO_3 , en la fase logarítmica se registraron valores promedios de 107.35 ± 34.67 $\mu\text{g-PRO/mg}$ de peso seco, 149.90 ± 23.87 $\mu\text{g-PRO/mg}$, 223.77 ± 68.33 $\mu\text{g-PRO/mg}$ y 260.90 ± 82.21 $\mu\text{g-PRO/mg}$ en los tratamientos N1, N2, N3 y N4 respectivamente (Figura 10). Por otro lado, el contenido celular de carbohidratos y lípidos en la fase logarítmica se comporta en forma inversa al contenido de proteínas, incrementándose cuando disminuye la concentración de nitrógeno con ambas fuentes. Los máximos valores registrados con la fuente de nitrato, fue en el tratamiento N1, con valores promedio de 252.70 ± 152.72 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y 308.04 ± 103.57 $\mu\text{g-LIP/mg}$ en N1 (Figura 10).

En la fase estacionaria los valores promedio del contenido celular de proteínas fueron de 74.18 ± 0.09 $\mu\text{g-PRO/mg}$, 112.61 ± 2.43 $\mu\text{g-PRO/mg}$, 177.06 ± 10.84 $\mu\text{g-PRO/mg}$ y 210.70 ± 33.16 $\mu\text{g-PRO/mg}$ en los tratamientos N1, N2, N3 y N4 respectivamente (Figura 11), mientras que los máximos valores promedio del contenido celular de carbohidratos y lípidos se registraron con el tratamiento N1, con 288.52 ± 134.37 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y de 368.57 ± 95.97 $\mu\text{g-LIP/mg}$, para esta fuente de nitrógeno se registró un valor promedio máximo de lípidos en el tratamiento N3 con 376.48 ± 29.00 $\mu\text{g-LIP/mg}$ (Figura 11).

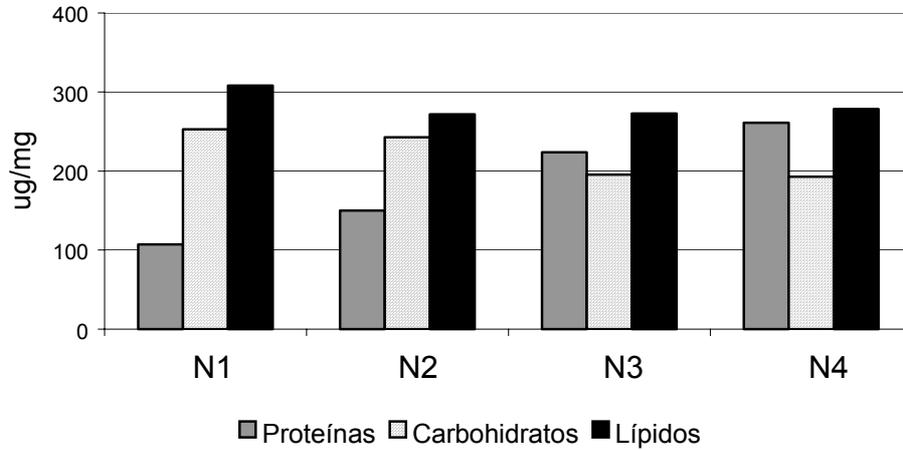


Figura 10. Valores promedios (para toda la fase logarítmica) de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de *T. fluviatilis* crecida con NaNO_3 a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)

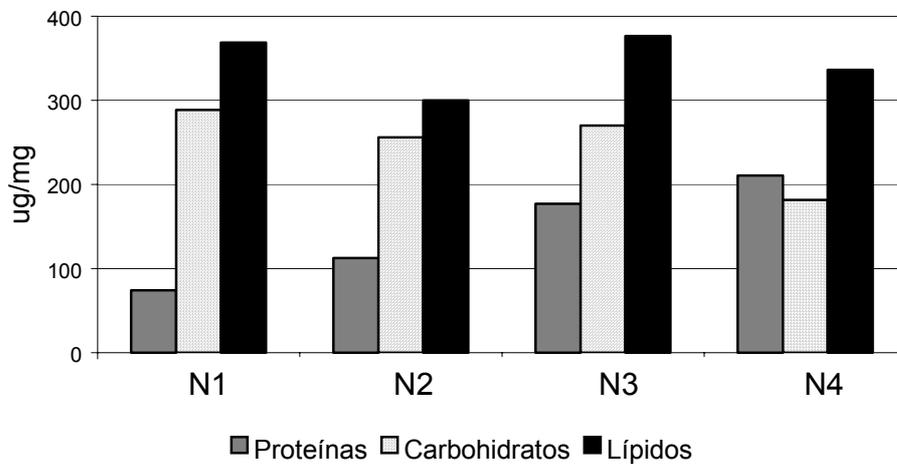


Figura 11. Valores promedios (para toda la fase estacionaria) de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de *T. fluviatilis* crecida con NaNO_3 a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4)

El contenido celular de proteínas con la fuente de NH_4Cl fue ligeramente más elevado que con la fuente de nitrato, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.001$) entre ambas fuentes. Los valores promedios del contenido celular de proteínas registrados en la fase logarítmica fueron de $124.07 \pm 76.10 \mu\text{g-PRO/mg}$, $156.89 \pm 27.17 \mu\text{g-PRO/mg}$, $201.43 \pm 35.96 \mu\text{g-PRO/mg}$ y $274.13 \pm 81.93 \mu\text{g-PRO/mg}$ en C1, C2, C3 y C4 respectivamente, encontrando los máximos valores en el tratamiento con mayor concentración de nitrógeno. Por otro lado, también para esta fase de crecimiento se registró en los tratamientos con menor concentración de nitrógeno un elevado contenido de carbohidratos en C2 y de lípidos en C3 con valores promedios de $267.98 \pm 126.57 \mu\text{g-CHO/mg}$ y de $305.98 \pm 94.65 \mu\text{g-LIP/mg}$, respectivamente (Figura 12).

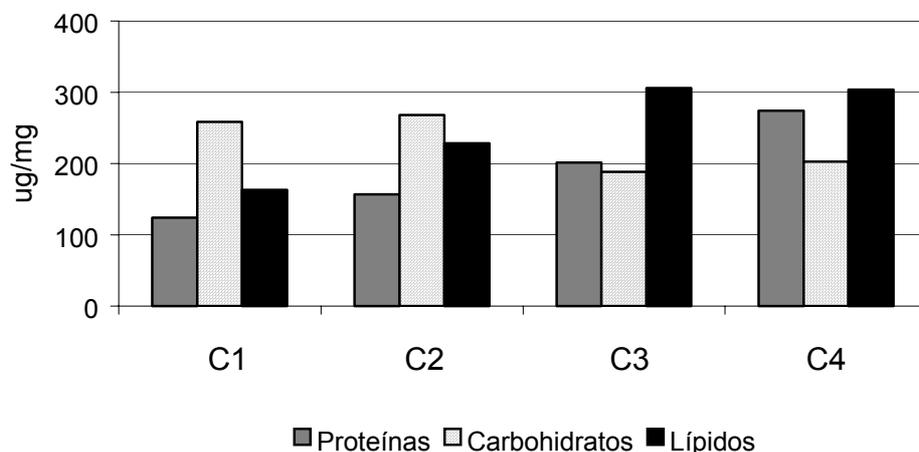


Figura 12. Valores promedios (para toda la fase logarítmica) de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de *T. fluviatilis* crecida con NH_4Cl a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)

El contenido celular de proteínas registrado en la fase estacionaria fue de $115.66 \pm 14.88 \mu\text{g-PRO/mg}$, $144.34 \pm 30.97 \mu\text{g-PRO/mg}$, $190.73 \pm 17.07 \mu\text{g-PRO/mg}$ y $213.48 \pm 13.05 \mu\text{g-PRO/mg}$ en C1, C2, C3 y C4 respectivamente, al igual que en la fase logarítmica los tratamientos con mayor concentración de nitrógeno fueron los que registraron el mayor contenido de proteínas. Por otro lado los valores promedios máximos del contenido celular de carbohidratos se registraron en el tratamiento C2 con $302.99 \pm 111.13 \mu\text{g-CHO/mg}$ mientras que para los lípidos se registraron en el C4 con $398.84 \pm 21.13 \mu\text{g-LIP/mg}$ (Figura 13).

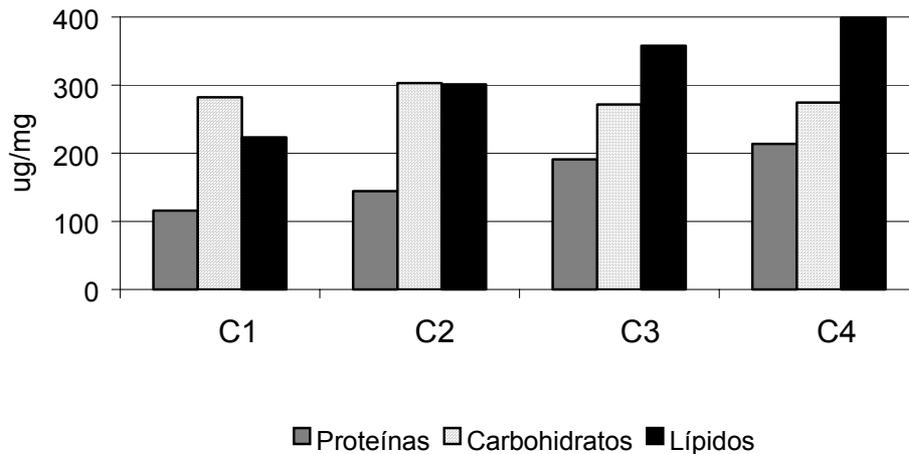


Figura 13. Valores promedios (para toda la fase estacionaria) de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de *T. fluviatilis* crecida con NH_4Cl a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4)

Durante la cinética de crecimiento, los cultivos con ambas fuentes de nitrógeno presentaron diferencias en su composición química celular. Para la fuente de NaNO_3 , el tratamiento N1 registró los mayores promedios de proteínas, carbohidratos y lípidos en los días 12, 15 y 9 respectivamente, con 102.3 ± 20.3 $\mu\text{g-PRO/mg}$, 399.40 ± 50.3 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y 494.50 ± 10.5 $\mu\text{g-LIP/mg}$ (Anexo 1, Tabla 1).

Para el N2 registró los mayores promedios de proteínas al día 3 con 158.9 ± 12.0 $\mu\text{g-PRO/mg}$; carbohidratos al día 18 con 436.60 ± 5.3 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y lípidos al día 9 con 460.40 ± 51.1 $\mu\text{g-LIP/mg}$ (Anexo 1, Tabla 2).

Para N3 los mayores promedios de proteínas, carbohidratos y lípidos se registraron en los días 3, 15 y 12 respectivamente, con 325.10 ± 63.4 $\mu\text{g-PRO/mg}$, 334.10 ± 43.0 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y 360.90 ± 9.29 $\mu\text{g-LIP/mg}$ (Anexo 1, Tabla 3).

El tratamiento N4 registra el mayor contenido de proteínas en el día 3 con 351.40 ± 22.8 $\mu\text{g-PRO/mg}$, de carbohidratos al día 9 con 253.70 ± 10.0 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y lípidos al día 15 con 335.6 ± 12.5 $\mu\text{g-LIP/mg}$ (Anexo 1, Tabla 4).

El tratamiento C1 con la fuente de cloruro de amonio presenta valor su máximo de proteínas en el día 6 con 166.60 ± 36.6 $\mu\text{g-PRO/mg}$, de carbohidratos al día 9 con 354.3 ± 22.2 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y de lípidos al día 12 con 501.9 ± 17.2 $\mu\text{g-LIP/mg}$ (Anexo 1, Tabla 5).

El C2 registra las mayores producciones de proteínas, carbohidratos y lípidos en los días 6, 9 y 12 respectivamente, con 181.1 ± 12.2 $\mu\text{g-PRO/mg}$, 385.6 ± 13.6 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y 457.8 ± 21.6 $\mu\text{g-LIP/mg}$ (Anexo 1, Tabla 6).

Mientras que C3 registró los valores de 251.9 ± 39.8 $\mu\text{g-PRO/mg}$ en el día 6, 348.6 ± 20.3 $\mu\text{g-CHO/mg}$ al día 9 y 414.20 ± 12.0 $\mu\text{g-LIP/mg}$ al día 15 (Anexo 1, Tabla 7).

El tratamiento C4 presenta los valores máximos de proteínas en el día 3 con 393.1 ± 68.5 $\mu\text{g-PRO/mg}$, de carbohidratos al día 9 con 348.6 ± 20.3 $\mu\text{g-CHO/mg}$ y de lípidos al día 15 con 414.2 ± 12.0 $\mu\text{g-LIP/mg}$ (Anexo 1, Tabla 8).

La fuente de nitrógeno, concentración y tiempo afectaron el contenido celular de proteínas ($p < 0.005$) y solo la interacción fuente x tiempo no fue significativa ($p > 0.08$). La diferencia significativa en los tratamientos N1-C1 ($p < 0.005$), mientras que en N2-C2 no se registró diferencia significativa ($p > 0.1$); N3-C3 no registró diferencia ($p > 0.8$) y N4-C4 no registró diferencia significativa ($p > 0.3$).

Los resultados obtenidos nos muestran que la concentración de carbohidratos se ve afectada por la concentración de nitrógeno ($p < 0.005$) y por el tiempo de cultivo ($p < 0.005$) y no por la fuente de nitrógeno ($p > 0.05$) y solo la interacción fuente x tiempo es significativa ($p < 0.005$). En el contenido celular de carbohidratos no hubo diferencias significativas en los tratamientos N1-C1 ($p > 0.46$), N2-C2 ($p > 0.24$), N3-C3 ($p > 0.9$) y N4-C4 ($p > 0.9$).

Los resultados obtenidos nos muestran que la concentración de lípidos se ve afectada por la concentración de nitrógeno ($p < 0.005$) y por el tiempo de cultivo ($p < 0.005$) y no por la fuente de nitrógeno ($p > 0.05$) y solo la interacción concentración tiempo es significativa ($p < 0.005$). En el contenido celular de lípidos

no hubo diferencias significativas en los tratamientos N1-C1 ($p > 0.90$), N2-C2 ($p > 0.24$) y N4-C4 ($p > 0.50$), pero si en N3-C3 ($p < 0.05$).

Ácidos grasos

Las diferentes clases lipídicas que conforman los lípidos totales no tuvieron grandes diferencias en su contenido porcentual relativo entre los tratamientos. Con NaNO_3 , los ácidos grasos saturados constituyeron el 53.52 %, seguido de los poliinsaturados con 44.78 % y en menor proporción, los monoinsaturados con 1.69 %. Para cada concentración de cada fuente de nitrógeno, los porcentajes variaron, siendo más elevados los ácidos grasos saturados con el tratamiento N3 (56.03 %), seguido de los monoinsaturados (1.5 %) y poliinsaturados (42.07 %). Con N4 fueron de 50.27 %, 3.42 % y 46.31%, respectivamente (Figura 14).

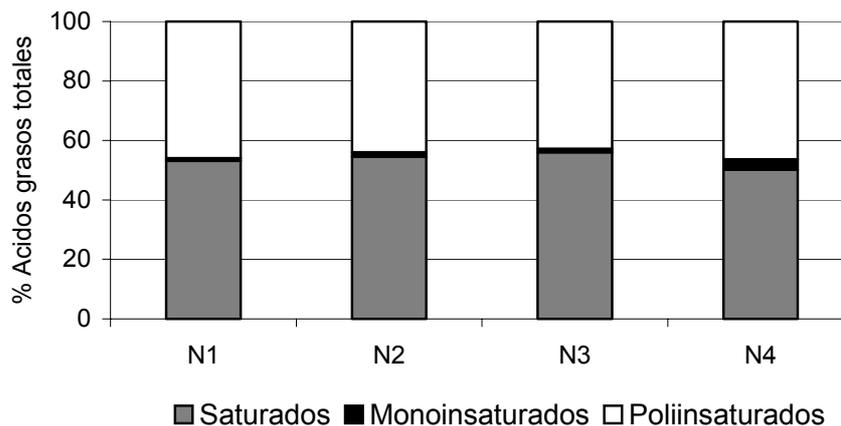


Figura 14. Porcentaje relativo de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) de *T. fluviatilis* cultivada con NaNO_3 a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4), (para toda la fase logarítmica).

El cultivo con NH_4Cl presentó porcentajes relativos similares con la fuente de NaNO_3 ($p > 0.005$), constituidos por el 50.16 % de ácidos grasos saturados, 48.60 % de poliinsaturados y en menor proporción los monoinsaturados 1.22 %. Aunque también presento diferencia entre las concentraciones con la fuente de (NH_4Cl), los valores máximos de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados se registraron en C4 con 58.90 %, C3 1.44 % y C2 54.82 % respectivamente (Figura 15).

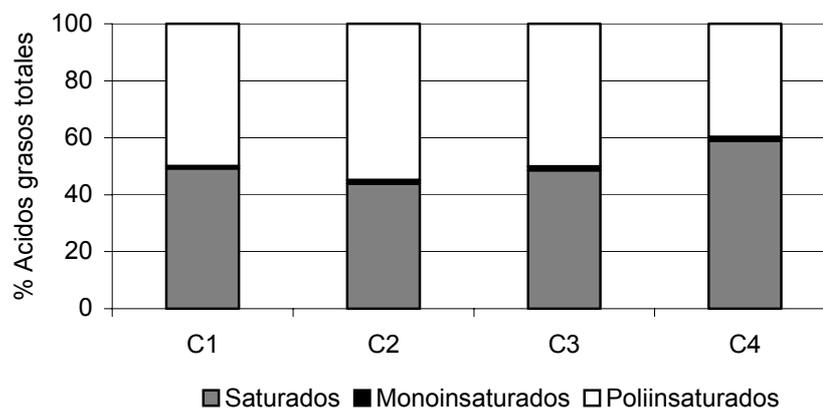


Figura 15. Porcentaje relativo de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) de *T. fluviatilis* cultivada con NH_4Cl a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4), (para toda la fase logarítmica).

La concentración de los diferentes ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) mostró diferencias con las dos fuentes de nitrógeno. Para el tratamiento N1 con NaNO_3 , se obtuvieron valores promedios de los siguientes ácidos grasos: C18:2= 1.20 ± 0.53 pg/cel, C18:3= 3.03 ± 1.13 pg/cel, C18:4= 3.11 ± 1.05 pg/cel, C20:4= 0.014 ± 0.04 pg/cel, C20:5= 16.67 ± 4.35 pg/cel y C22:6= 7.22 ± 1.45 pg/cel

(Figura 16). Por otro lado, con NH_4Cl el tratamiento C1 registró los siguientes valores promedios C18:2= 0.63 ± 0.21 pg/cel, C18:3= 1.33 ± 0.29 pg/cel, C18:4= 3.61 ± 1.43 pg/cel, C20:4= 0.01 ± 0.009 pg/cel, C20:5= 11.94 ± 9.47 pg/cel y C22:6= 4.82 ± 2.06 pg/cel (Figura 17), obteniendo una mayor concentración de estos ácidos grasos con la fuente de NaNO_3 que con la fuente de NH_4Cl , no registrando diferencias significativas en los ácidos grasos C18:4 ($p > 0.90$) y C20:4 ($p > 0.05$), para ambas fuentes de nitrógeno.

En el tratamiento N2, los ácidos grasos poliinsaturados (C18:2, C18:3, C18:4 y C20:4), considerados individualmente, tienden a alcanzar las concentraciones máximas con NaNO_3 , el C18:2 registró 1.59 ± 0.46 pg/cel, mientras que el C18:3 2.82 ± 1.17 pg/cel. El C18:4 alcanzó un máximo de 4.86 ± 1.82 pg/cel y el C20:4 0.026 ± 0.01 pg/cel. Por otro lado en el tratamiento C2, los ácidos grasos poliinsaturados (C20:5 y C22:6), considerados individualmente, tienden a alcanzar las concentraciones máximas con NH_4Cl , con valores promedios del C20:5 de 16.91 ± 4.73 pg/cel. El C22:6 registró valores de 8.38 ± 2.01 pg/cel (Figuras 16, 17). Entre los tratamientos N2-C2, hubo diferencias significativas en los ácidos grasos C18:2, C18:4, C20:4, C20:5 y C22:6 ($p < 0.05$) y no se registró en el ácido graso C18:3 ($p > 0.90$).

Para el tratamiento N3 con NaNO_3 , se obtuvieron los máximos valores promedios de los ácidos grasos: C18:2= 1.32 ± 0.31 pg/cel, C18:3= 2.58 ± 1.91 pg/cel, C20:4= 0.059 ± 0.041 pg/cel, C20:5= 14.12 ± 3.09 pg/cel y C22:6= 6.45 ± 2.76 pg/cel (Figura 16). Con NH_4Cl el tratamiento C3 registró el valor máximo del C18:3= 3.53 ± 1.29 pg/cel (Figura 17). Los ácidos grasos poliinsaturados,

considerados individualmente, tienden a alcanzar las concentraciones máximas con la fuente de NaNO_3 . Entre los tratamientos N3-C3 hubo diferencias significativas en los ácidos grasos C18:4 ($p < 0.05$) y C20:5 ($p < 0.05$).

En el tratamiento N4, los ácidos grasos poliinsaturados (C18:2, C18:4, C20:4, C20:5 y C22:6), considerados individualmente, tienden a alcanzar las concentraciones máximas con la fuente de NaNO_3 , para el C18:2 alcanzó 2.96 ± 0.83 pg/cel, mientras que el C18:4 registró 5.95 ± 4.67 pg/cel. El C20:4 alcanzó un máximo de 0.043 ± 0.02 pg/cel, el C20:5 7.29 ± 1.14 pg/cel y el C22:6 alcanzó los 9.24 ± 3.69 pg/cel. Por otro lado en el tratamiento C4, el ácido graso poliinsaturado C18:3, considerados individualmente, tienden a alcanzar las concentraciones máximas con la fuente NH_4Cl , registrando 4.08 ± 2.69 pg/cel (Figuras 16, 17). Entre los tratamientos N4-C4, hubo diferencias significativas en los ácidos grasos C18:2, C18:4, C20:4, C20:5 y C22:6 ($p < 0.05$) y no se registró en el ácido graso C18:3 ($p > 0.90$).

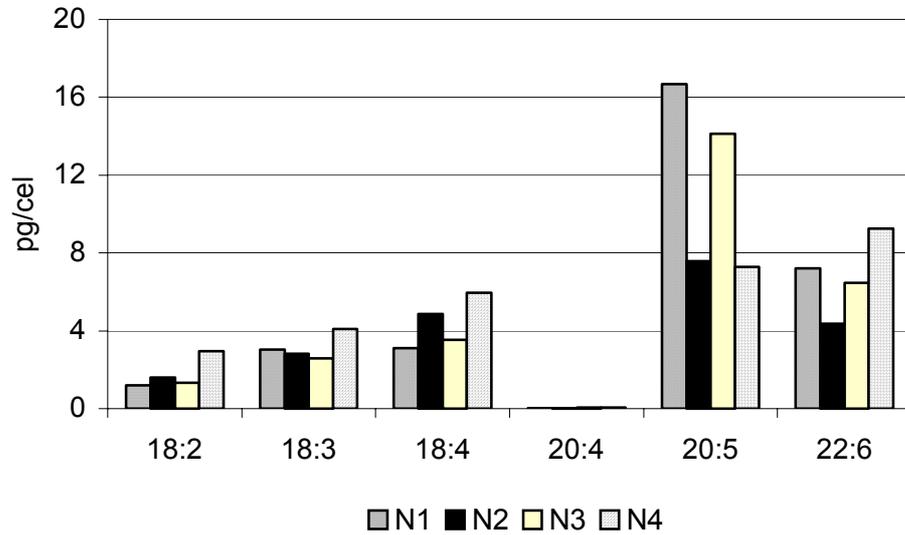


Figura 16. Variación de la composición de PUFAs de *T. fluviatilis* cultivada con NaNO_3 a cuatro concentraciones 111.25 (N1), 222.5 (N2), 445 (N3) y 890 μmol (N4).

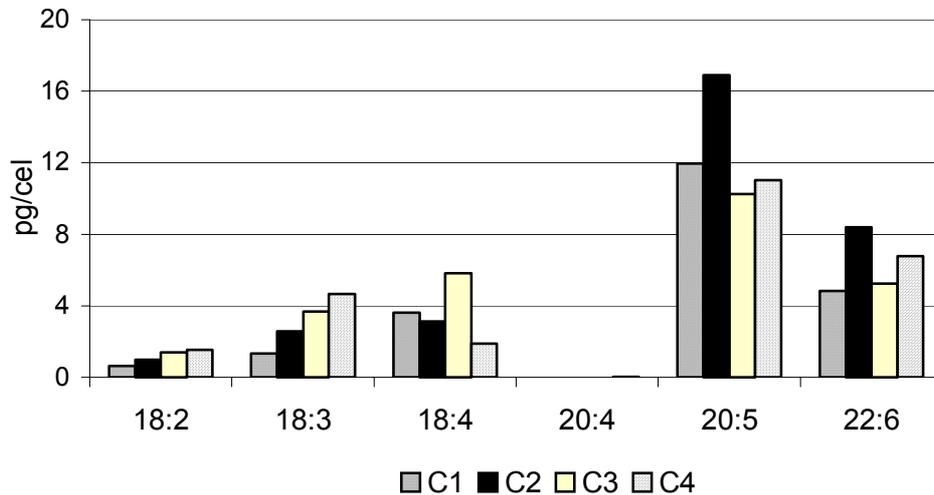


Figura 17. Variación de la composición de PUFAs de *T. fluviatilis* cultivada con NH_4Cl a cuatro concentraciones 111.25 (C1), 222.5 (C2), 445 (C3) y 890 μmol (C4).

7.2 Cultivo larvario de *L. vannamei*

7.2.1 Alimento

La microalga utilizada en los bioensayos de alimentación con larvas de camarón blanco, fue la que presentó mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, de esta manera los tratamientos fueron los siguientes: tratamiento T1 corresponde a la microalga *T. fluviatilis* cultivada con 445 μmol de NaNO_3 (N3), el T2 con 222.25 μmol de NH_4Cl (C2), el testigo T3 se cultivó con el medio f/2 (Guillard, 1975) y tratamiento T4 corresponde a larvas sin alimento.

7.2.2 Parámetros físico-químicos de los cultivos larvarios

Durante el desarrollo de los cultivos larvarios la temperatura fue de 28.2 ± 0.36 °C, la salinidad se mantuvo en un rango de 35-35.4 ups, el oxígeno entre 5.0 - 5.8 ppm y el pH de 7.9 a 8.2 (Anexo 1, Tabla 9).

7.2.3 Porcentaje de metamorfosis

El porcentaje de metamorfosis presentado en los ensayos muestra que para el tratamiento T1 en el segundo día de cultivo, el 15 % de las larvas se encontraban en nauplio V y el 85 % habían mudado a PZI. Para el tercer día, el 95 % llegó a PZI y el 5 % se encontraba en PZII. En el cuarto día se registró el 82 % en PZII y el 18 % en PZIII; mientras que en el quinto día el 5 % se encontraba en PZII y el 95 % de las larvas habían mudado a PZIII (Figura 18 A).

En el tratamiento T2 se registró para el segundo día de cultivo un 28 % de larvas en nauplio V y un 72 % en PZI; mientras que para el tercer día el 12 % se

encontraba en nauplio V, el 83 % en PZI y el 5 % en PZII; en el quinto día el 2 % de las larvas estaba en PZI, el 58 % en PZII y el 40 % en PZIII; en el sexto día el 12 % se encontraba en PZII y el 88 % en PZIII (Figura 18 B).

En T3 para el segundo día de cultivo se registraron 19 % y 81 % en nauplio V y PZI respectivamente; en el tercer día el 92 % de las larvas se encontraban en PZI y el 8 % en PZII; para el cuarto día se registraron 2%, 90 % y 8 % para PZI, PZII y PZIII respectivamente; mientras que para el quinto día el 7 % estaba en PZII y el 93 % en PZIII (Figura 18 C).

En el tratamiento T4 las larvas en inanición, murieron sin llegar a alcanzar la PZII.

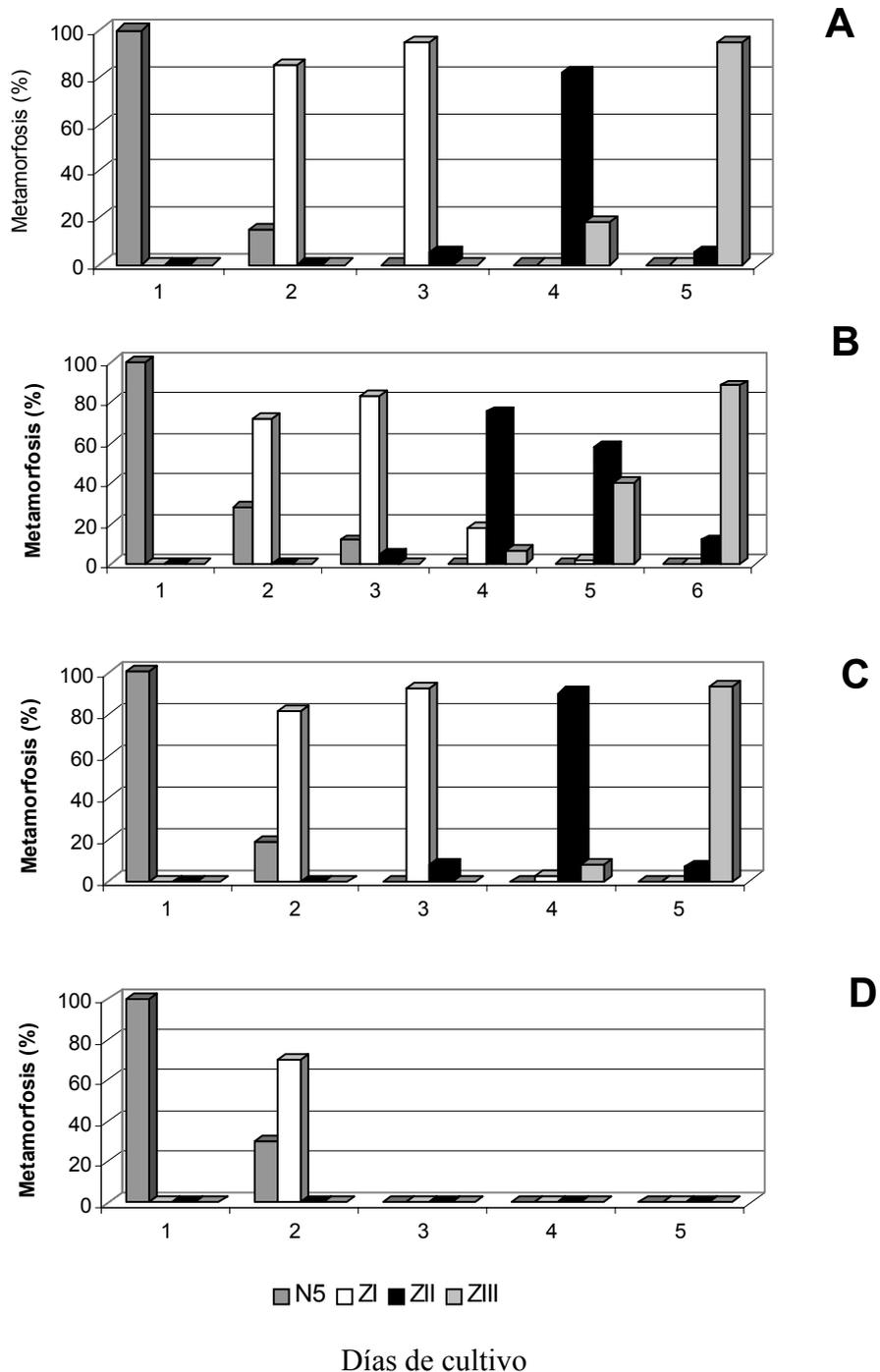


Figura 18. Porcentaje de metamorfosis en larvas de *L. vannamei* alimentadas con: A) *T. fluviatilis* cultivada con 445 μmol de NaNO_3 (T1), B) *T. fluviatilis* cultivada con 222.5 μmol de NH_4Cl (T2), C) *T. fluviatilis* cultivada con medio f/2 control (T3) y D) Sin alimento (T4).

El aumento en longitud de las larvas fue similar con los tratamientos T1 y T3 iniciando con una talla promedio de 0.73 mm para PZI, mientras que el tratamiento T4 inició con una longitud promedio de 0.74 mm para el mismo estadio. La longitud promedio total de las larvas al finalizar el estadio de PZIII fue similar entre los tratamientos T1 y T3 con 1.786 ± 0.04 y 1.70 ± 0.14 mm respectivamente, no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$), mientras que T2 presentó una longitud promedio de 1.49 ± 0.06 mm, registrando diferencia significativa con los tratamientos T1 y T3 ($p < 0.05$). Las larvas presentaron una tasa promedio de crecimiento diario de $0.2 \text{ mm} \cdot \text{dia}^{-1}$.

7.2.4 Supervivencia

La tasa de supervivencia se mantuvo al 100 % cuando alcanzaron el estadio de PZI, sin embargo en los estadios siguientes disminuyó, siendo los tratamientos T1 y T3 donde mayor supervivencia alcanzó al finalizar el ensayo (Figura 19). Las diferencias entre los tratamientos se presentó de la manera siguiente: para el T1 ($445 \mu\text{mol NaNO}_3$) fue de 81.34% para la PZI, para la PZII fue de 73.73% y de 53.09% para PZIII, para el tratamiento T2 ($222.5 \mu\text{mol NH}_4\text{Cl}$) el porcentaje de supervivencia fue de 78.34% para PZI, del 47.35% para la PZII y del 22.48% para la PZIII. Por otro lado en el T3 en el cual se utilizó el medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975), se obtuvieron supervivencias de 77.63 % para PZI, 59.72 % para PZII y 48.05 % para PZIII. El tratamiento T4 identificado como el testigo (sin alimento) este presentó una supervivencia para PZI de 12.38%, y en la

fase PZII y PZIII de 0%. La supervivencia obtenida al final del experimento fue de 53.09% T1, 22.48% T2, 48.05% T3 y 0% T4.

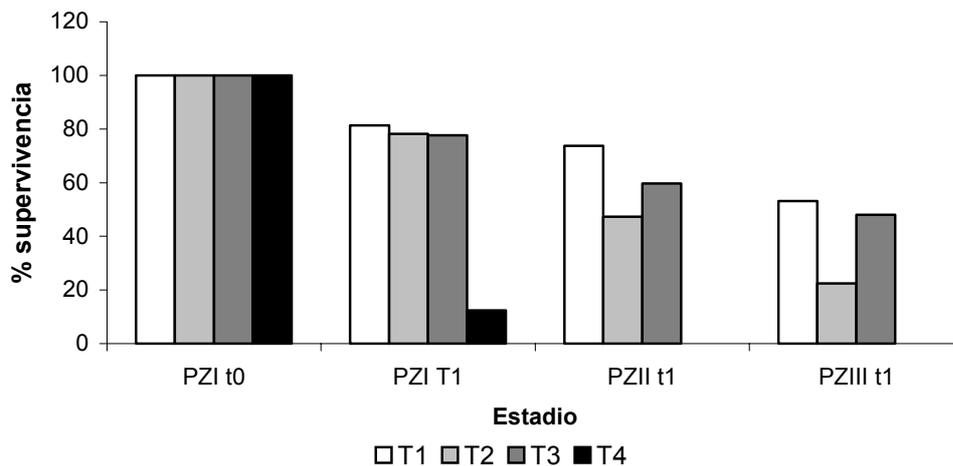


Figura 19. Supervivencia de larvas de *L. vannamei* alimentadas con *T. fluviatilis*, al finalizar el experimento. T1) microalga cultivada a 445 μmol de NaNO_3 , T2) microalga cultivada a 222.5 μmol de NH_4Cl , T3) medio f/2 y T4) larvas testigo sin alimento.

La supervivencia se vio afectada por el estadio y el tiempo de cultivo ($p < 0.005$) y no se registró interacción significativa entre el tratamiento x estadio, tratamiento x tiempo y estadio x tiempo ($p > 0.05$). Al final del ensayo (PZIII) no hubo diferencias significativas en la supervivencia entre los tratamientos T1-T3 ($p > 0.95$), mientras que T2 presentó diferencias significativas con ambos T1 y T3 ($p < 0.05$, $p < 0.05$ respectivamente).

7.2.5 Composición química de las larvas de *Litopenaeus vannamei*

El tratamiento utilizado y el estadio afectaron la concentración de proteínas en las larvas ($p < 0.05$), mientras que el tiempo no fue significativa ($p > 0.05$), y se

observó que las interacciones entre ellas no fueron significativas ($p > 0.05$). La mejor ganancia en peso relativo de proteínas de las larvas al finalizar el experimento se registró con el tratamiento T3, este no presentó diferencia significativa con T1 ($p > 0.05$), pero si con T2 ($p < 0.05$).

Durante los seis días en que se llevaron a cabo los ensayos (PZI-PZIII) el contenido promedio de proteínas en larvas para el tratamiento T1 se incrementó de $6.93 \pm 0.896 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en (PZI) a $13.95 \pm 0.855 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en (PZIII) lo cual equivale a $7.03 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ de ganancia en peso relativo a proteínas. T2 también mostró un incremento en la concentración de proteínas iniciando con $6.36 \pm 1.18 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en (PZI) a $12.80 \pm 1.32 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en (PZIII) lo que equivale a una ganancia en peso relativo de proteína de $6.44 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$. T3 también registró una acumulación en proteínas iniciando con $7.87 \pm 0.803 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en (PZI) a $18.93 \pm 1.39 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en (PZIII) esto equivale a una ganancia en peso relativo de proteínas de $11.06 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ (Figuras 20 A, B, C).

La acumulación de carbohidratos en las larvas varía con el tratamiento ($p < 0.05$), estadio larval ($p < 0.05$) y el tiempo ($p < 0.05$), se observó que las interacciones entre ellas no fueron significativas ($p > 0.05$). La mejor acumulación de carbohidratos se registró en el tratamiento T1, pero no hubo diferencias significativas con T2 ($p > 0.05$), por otro lado los tratamientos T1 y T2 presentaron diferencias significativas con T3 ($p < 0.05$).

El contenido de carbohidratos en T1 presentó un incremento de $6.21 \pm 0.71 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en PZI a $10.29 \pm 0.98 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en PZIII lo cual equivale a una ganancia

en peso relativo de carbohidratos de $4.08 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$. Para T2 el contenido de carbohidratos en PZI inició con $5.70 \pm 0.92 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ registrando $9.44 \pm 0.92 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ al final de PZIII lo que equivale a una ganancia en peso relativo de carbohidratos de $3.74 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$. T3 siguió el mismo patrón presentando una acumulación de carbohidratos, iniciando en PZI con $4.67 \pm 1.87 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ y registrando en PZIII $10.21 \pm 0.951 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ lo cual equivale a un incremento en peso relativo de carbohidratos de $5.54 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ (Figuras 20 A, B, C).

La acumulación de lípidos en las larvas varía con el tratamiento ($p < 0.05$), estadio larval ($p < 0.05$) y el tiempo ($p < 0.05$), se observó que la interacción entre tratamiento x estadio fue significativa ($p < 0.05$) y no fue significativo entre tratamiento x tiempo y estadio x tiempo ($p > 0.05$). La mejor acumulación de lípidos se registró en el tratamiento T1, pero no hubo diferencias significativas con T2 ($p > 0.05$), por otro lado los tratamientos T1 y T2 presentaron diferencias significativas con T3 ($p < 0.05$).

El contenido de lípidos mantuvo una tendencia al incremento en los tres tratamientos (T1, T2, T3), presentando en PZI del tratamiento T1 una concentración de $7.13 \pm 0.928 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ y en PZIII registró valores de $12.92 \pm 1.22 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ obteniendo un incremento en peso relativo de lípidos de $5.79 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$. El tratamiento T2 registró $6.54 \pm 0.91 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en PZI y $11.85 \pm 0.802 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en PZIII lo cual equivale a un incremento en peso relativo de lípidos de $5.31 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$. T3 registró valores de $6.19 \pm 1.19 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en PZI y de 9.95 ± 1.34

$\mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ en PZIII obteniendo una acumulación relativa de $3.76 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ (Figuras 20 A, B, C).

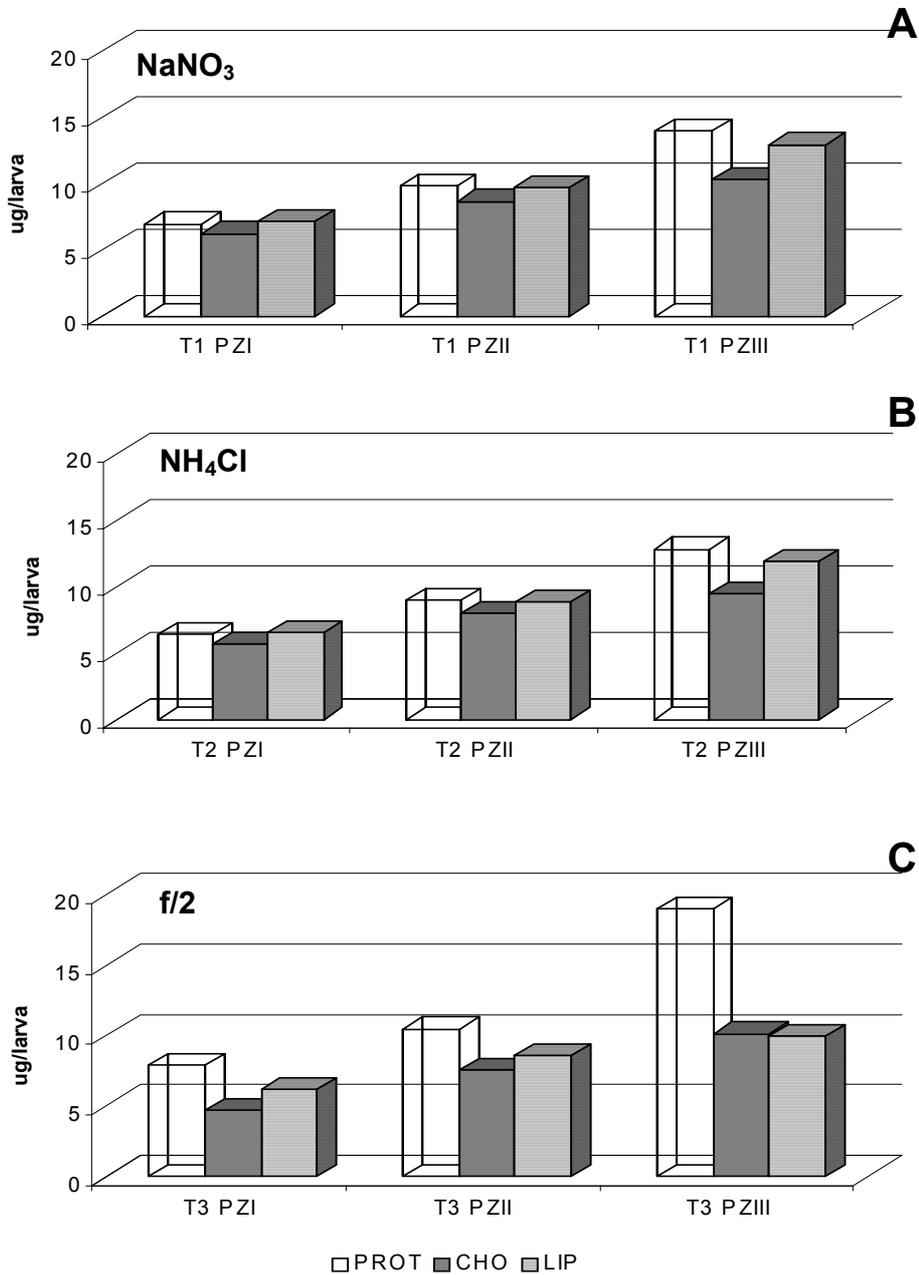


Figura 20. Composición química (proteínas, carbohidratos y lípidos) de larvas de camarón blanco *L. vannamei* alimentadas con *T. fluviatilis*. A) T1 microalga cultivada a $445 \mu\text{mol}$ de NaNO_3 , B) T2 cultivada a $222.5 \mu\text{mol}$ de NH_4Cl , C) T3 cultivada con medio f/2.

7.2.6 Composición de ácidos grasos de larvas de *L. vannamei*

El mayor porcentaje relativo del C16:0 se registró en PZI de los tres tratamientos (T1, T2, T3) con 25.82 %, 23.86 % y 27.35 % respectivamente, mientras que el menor porcentaje se registró en PZII del tratamiento T1 con 9.79 %. El C16:1 presenta los porcentajes máximos en PZII y PZIII del tratamiento T1 con 27.39 % y 25.22 %, mientras que el menor porcentaje se registró en PZIII del T3 con 4.32 %. El C18:2 presenta sus máximos porcentajes en PZII y PZIII del tratamiento T1 con 36.05 % y 31.54 % respectivamente.

El porcentaje relativo mas alto de C20:4 se registró en la PZII del tratamiento T2 con 2.87 %, mientras que el valor mínimo se registró en la PZII de T1. Los máximos porcentajes del C20:5 se registró en la PZIII de T3 con 25.21 % y en la PZI de T2 con 15.25 % y los más bajos en la PZII de T1 con 5.07 % (Tabla 4, Anexo 1)

Acidos grasos saturados, monoinsaturados y polinsaturados

En la Figura 21 (A, B, C) se presentan los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, en donde se observa que los ácidos grasos saturados en el tratamiento T1 registraron valores de 85.03, 73.88 y 117.96 ng·larva⁻¹ para la PZI, PZII y PZIII respectivamente, sus máximos valores de monoinsaturados y poliinsaturados se determinaron en la PZIII con 133.94 y 173.60 ng·larva⁻¹. En el T2 registraron 43.88, 39.87 y 71.81 ng·larva⁻¹ en la PZI, PZII y PZIII respectivamente, los monoinsaturados registraron sus valores máximos en la PZIII con 22.72 ng·larva⁻¹ y los poliinsaturados en la PZIII con 34.59 ng·larva⁻¹. Para el tratamiento T3 la mayor concentración de los saturados se

registra en PZI con $50.62 \text{ ng/larva}^{-1}$ seguido de la PZII con 48.45 y PZIII con $35.38 \text{ ng/larva}^{-1}$, por otro lado los máximos valores de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados se registran en PZII con 31.52 y PZIII con $52.18 \text{ ng/larva}^{-1}$ respectivamente.

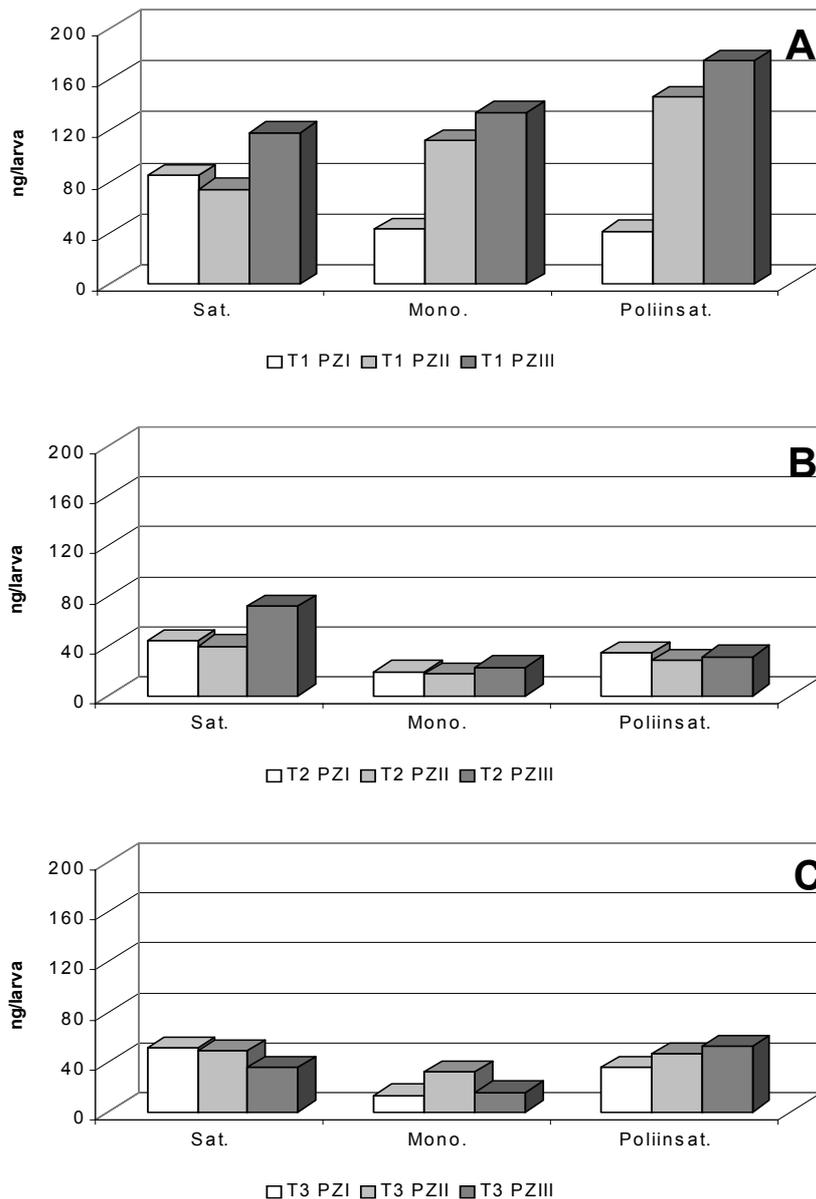


Figura 21. Contenido de ácidos grasos saturados (sat); monoinsaturados (mono) y poliinsaturados (poliinsat.) en larvas de *L. vannamei* alimentadas con *T. fluviatilis* cultivada con $445 \mu\text{mol}$ de NaNO_3 (A); con $222.25 \mu\text{mol}$ de NH_4Cl (B) y en el medio f/2 (C).

La cantidad de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) se registraron valores para el tratamiento T1 de 15.18, 16.81 y 30.47 ng·larva⁻¹ de EPA, y 12.49, 7.95 y 5.63 ng·larva⁻¹ de DHA en los subestadios PZI, PZII y PZIII respectivamente. T2 presentó valores de EPA de 14.89, 11.21 y 12.82 ng·larva⁻¹ y 16.44, 13.53 y 12.22 ng·larva⁻¹ de DHA en los subestadios de PZI, PZII y PZIII, respectivamente. T3 registró valores de EPA de 12.04, 24.16 y 26.05 ng·larva⁻¹ y 20.51, 19.72 y 21.75 ng·larva⁻¹ de DHA en los subestadios de PZI, PZII y PZIII, respectivamente (Figura 22 A,B,C). Para el EPA se registraron diferencias significativas entre los tratamientos T1-T2 ($p < 0.05$), T1-T3 ($p < 0.05$) y T2-T3 ($p < 0.05$), también en el DHA hubo diferencias significativas entre T1-T2 ($p < 0.05$) y T2-T3 ($p < 0.05$) y no presentó diferencia significativa en T1-T3 ($p > 0.05$).

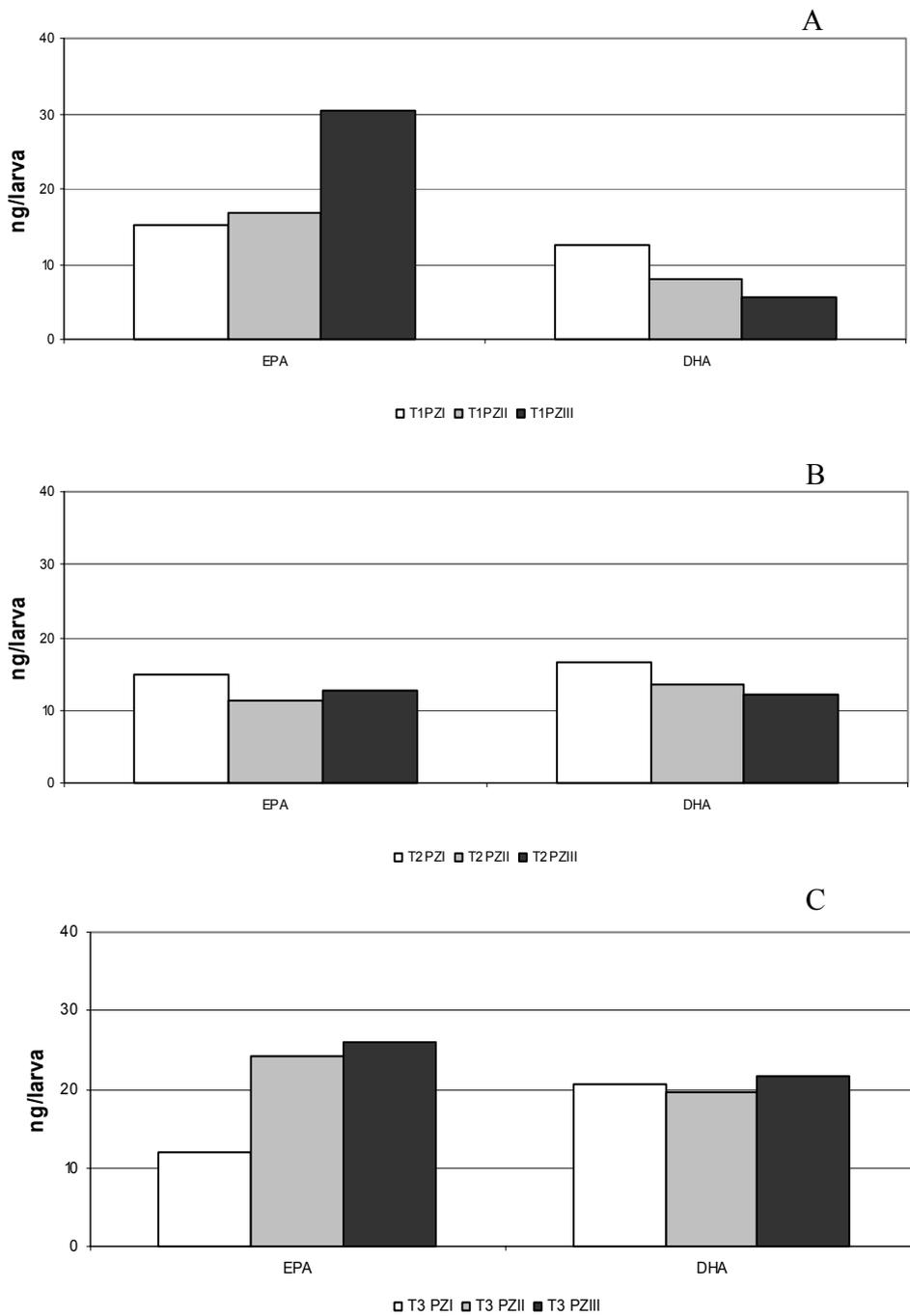


Figura 22 Contenido de EPA y DHA en larvas de *L. vannamei* alimentadas con microalgas cultivadas con 445 μmol de NaNO_3 (A); 222.25 μmol de NH_4Cl (B) y el medio f/2 (C).

Acidos grasos poliinsaturados.

Para el tratamiento T1 el mayor contenido del ácido graso C18:2 se registró en el subestadio de PZIII con 134.23 ± 5.83 ng/larva⁻¹, mientras que para PZI y PZII fueron de 12.22 ± 0.67 y 119.51 ± 1.97 ng/larva⁻¹ respectivamente (Figura 23 A). Hubo diferencias significativas entre los subestadios PZI con PZII y PZIII ($p < 0.012$ y $p < 0.001$) del tratamiento T1. El mayor valor del EPA para T1 fue en el subestadio PZIII con 30.47 ± 0.16 ng/larva⁻¹, mientras que para PZI y PZII fueron de 15.18 ± 0.10 y 16.81 ± 0.98 ng/larva⁻¹ respectivamente, no se registró diferencias significativas entre PZI y PZII ($p > 0.05$) sin embargo si hubo diferencias significativas con PZIII ($p < 0.05$). El DHA presenta los máximos valores en PZI con 12.49 ± 0.19 ng/larva⁻¹, mientras que para PZII y PZIII fueron de 7.95 ± 0.08 y 5.63 ± 0.50 ng/larva⁻¹ respectivamente, PZI presentó diferencias significativas con PZII y PZIII ($p < 0.05$ y $p < 0.05$, respectivamente).

Para el tratamiento T2 el mayor contenido de C18:2 se registró en el subestadio de PZIII con 2.79 ± 0.08 ng/larva⁻¹, mientras que para PZI y PZII fueron de 0.77 ± 0.13 y 1.14 ± 0.008 ng/larva⁻¹ respectivamente (Figura 23 B): No se registró diferencias significativas entre los subestadios PZI, PZII y PZIII del tratamiento T2 ($p > 0.05$). El contenido mayor del EPA para T2 se registró en el subestadio PZI con 14.89 ± 3.00 ng/larva⁻¹, mientras que para PZII y PZIII fueron de 11.21 ± 1.08 y 12.82 ± 0.37 ng/larva⁻¹ respectivamente, no se registró diferencias significativas entre PZI, PZII y PZIII ($p > 0.05$). El DHA presenta los máximos valores en PZI con 16.44 ± 3.63 ng/larva⁻¹, mientras que para PZII y PZIII

fueron de 13.53 ± 1.76 y 12.22 ± 0.59 ng·larva⁻¹ respectivamente, PZI presentó diferencias significativas con PZII y PZIII ($p < 0.05$ y $p < 0.05$, respectivamente).

El tratamiento T3 presentó sus máximos valores del C18:2 en el subestadio PZIII con 1.49 ± 0.009 ng·larva⁻¹, mientras que para PZI y PZII fueron de 1.61 ± 0.04 y 1.26 ± 0.04 ng·larva⁻¹ respectivamente (Figura 23 C), no hubo diferencias significativas entre los subestadios PZI, PZII y PZIII del tratamiento T3 ($p > 0.05$). El contenido mayor del EPA para T3 se registró en el subestadio PZIII con 26.05 ± 1.38 ng·larva⁻¹, mientras que para PZI y PZII fue de 12.04 ± 0.49 y 24.16 ± 1.66 ng·larva⁻¹ respectivamente, no se registró diferencias significativas entre PZII y PZIII ($p > 0.05$). El DHA presentó los máximos valores en PZIII con 21.75 ± 0.68 ng·larva⁻¹, mientras que para PZI y PZII fueron de 20.51 ± 0.03 y 19.72 ± 1.13 ng·larva⁻¹ respectivamente, no se presentó diferencias significativas entre los subestadios PZI, PZII y PZIII del tratamiento T3 ($p > 0.05$).

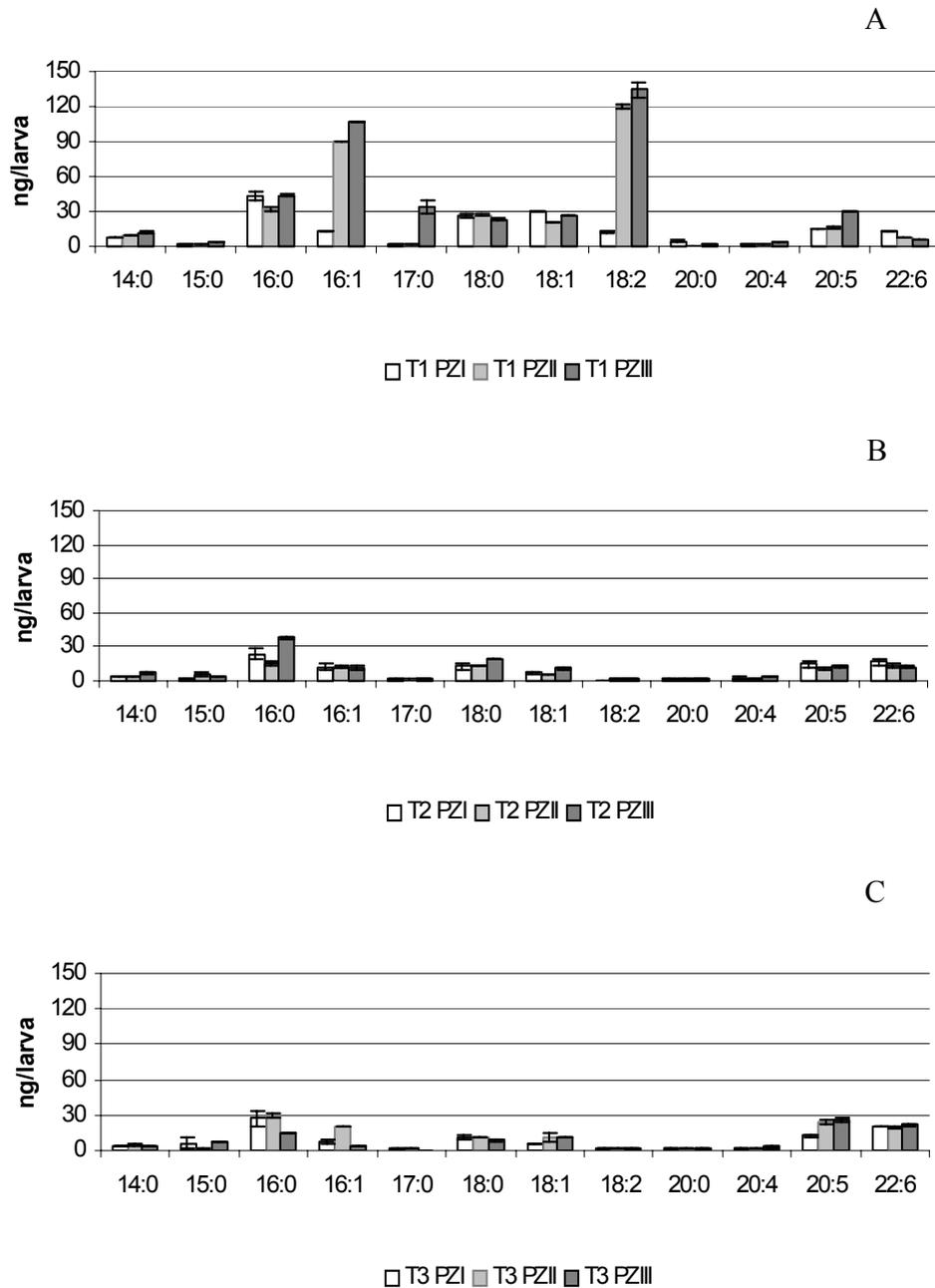


Figura 23. Composición de ácidos grasos de larvas de *L. vannamei* alimentadas con *T. fluviatilis*. La microalga fue cultivada con 445 μmol de NaNO_3 (A), con 222.25 μmol de NH_4Cl (B) y con el medio f/2 (C).

8.- DISCUSION

7.1 Microalgas

En la acuicultura, las especies de microalgas más utilizadas han sido las diatomeas: *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum sp.*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans* (Arce, 1989; Le Borge, 1990), *Thalassiosira sp.* y *Thalassiosira fluviatilis* (Emmerson, 1980; Lagos *et al.*, 2000; Malcolm, 2002).

La microalga *T. fluviatilis*, se caracteriza por su alto contenido de lípidos (Paine y Vadas, 1969; Lagos *et al.*, 2000; López, 2002) y de proteínas (Parsons *et al.*, 1961; Emmerson, 1980; Malcolm *et al.*, 1996; Lagos *et al.*, 2000)

La manipulación o manejo de algunas especies de microalgas durante su cultivo ha sido una de las estrategias para incrementar el contenido químico de proteínas (Herrero *et al.*, 1994; Leonardos y Lucas, 2000), carbohidratos (Sánchez *et al.*, 2002; López, 2002), lípidos totales (Herrero *et al.*, 1991, 1994) y ácidos grasos (Otero *et al.*, 1995; Malcolm *et al.*, 1996), aumentando su calidad como alimento vivo.

La modificación del medio de cultivo ha sido un método ampliamente utilizado para incrementar la producción de biomasa o variar su composición. Los cultivos microalgales limitados por nutrientes son de gran interés en estudios fisiológicos y ecológicos, pero desde el punto de vista del cultivo la productividad microalgal decrece (Fidalgo, 1995).

8.1.1 Densidad celular, crecimiento y asimilación de nitrógeno

En el presente trabajo, las diferencias encontradas en la densidad celular de los cultivos de *T. fluviatilis*, se pueden explicar como un reflejo del aporte de la

concentración de nitrógeno, ya que entre las dos fuentes de nitrógeno utilizadas (NaNO_3 , NH_4Cl) no se registraron diferencias significativas, excepto para los tratamientos con 445 μmol de nitrógeno de ambas fuentes. Como era de esperarse, en los tratamientos con menor concentración de nitrógeno se registró un descenso de la densidad celular, este comportamiento se debe a la disponibilidad del nitrógeno en el medio. Se ha documentado que al adicionar suficiente cantidad de nitrógeno al medio causa un incremento en la síntesis de amino ácidos y en consecuencia en las proteínas. Aumentando los requerimientos de los ceto-ácidos, acelerando la demanda de los intermediarios de los ácidos tricarboxílicos, para mantener esta demanda, es necesario incrementar también el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, resultando en altas tasas de consumo de CO_2 durante la fotosíntesis (Turpin *et al.*, 1988). En cambio cuando hay deficiencia de nitrógeno se promueve la síntesis de lípidos en las células (Suen *et al.*, 1987), se incrementa la de carbohidratos (Harrison *et al.*, 1990) y declina la cantidad de pigmentos fotosintéticos nitrogenados como clorofila a y ficobilinas (Carreto y Cattoggio, 1976; Turpin, 1991).

Los resultados obtenidos en este trabajo, también demostraron que cuando la diatomea *T. fluviatilis* fue cultivada con 4 concentración de compuestos nitrogenados (890, 445, 222.5 y 111.25 μmol), provocó variación en la densidad celular, en el peso seco, la composición química (proteínas, carbohidratos y lípidos), así como en su contenido de clorofila a. Las dos fuentes de nitrógeno utilizadas en el ensayo (NaNO_3 y NH_4Cl) no provocaron diferencias significativas

en las variables antes mencionadas, lo que se deduce que *T. fluviatilis* utiliza ambas fuentes para su crecimiento sin presentar inhibición.

La densidad celular y el contenido de proteínas de *T. fluviatilis* presentó las mayores concentraciones con NH_4Cl , (tratamiento C4 a $890 \mu\text{mol}$), y las menores concentraciones con NaNO_3 (tratamiento N1 a $111.25 \mu\text{mol}$), por tal motivo se deduce que la fuente y concentración de nitrógeno tiene un efecto directo sobre la densidad celular y en el contenido de proteínas, incrementándose en las células cuando se aumentaba la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo; el mismo patrón se presentó para ambas fuentes.

La utilización de distintas fuentes de nitrógeno por parte de las microalgas varía según la especie y se ve reflejado en la concentración celular (Fidalgo *et al.*, 1990). Cuando el nitrógeno se incorpora en forma oxidada (NO_3^-) produce una disminución en la fijación de CO_2 en la célula (Romero y Lara, 1987; Turpin *et al.*, 1988). El NH_4^+ puede ser utilizado como fuente de nitrógeno solo que algunas especies de microalgas son sensibles a altas concentraciones (Fidalgo, 1995).

En este trabajo cuando *T. fluviatilis* se cultivó con NH_4Cl se obtuvo su mayor densidad celular y concentración de proteínas en el día 15 de cultivo, en el tratamiento con $890 \mu\text{mol}$, para el tratamiento con $890 \mu\text{mol}$ NaNO_3 se observó una disminución en ambos parámetros. De lo anterior se sugiere que la microalga incorpora con mayor facilidad el NH_4^+ a su ciclo metabólico y que este no fue tóxico en las concentraciones utilizadas, lo cual le permitió a la microalga incorporarlo para la síntesis de proteínas. Herrero *et al.* (1994) experimentando

con *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) con diferentes fuentes de nitrógeno y a cuatro concentraciones, obtuvieron que la densidad celular aumentaba conforme se incrementaba la concentración de nitrógeno en el cultivo. También observaron un efecto inhibitorio de la NH_2CONH_2 sobre el crecimiento celular cuando la concentración máxima de NH_2CONH_2 fue de 1 mM.

Por otro lado, los resultados de la concentración de proteínas registrados cuando se utilizó el NaNO_3 fueron menores, probablemente por que la microalga invirtió mayor gasto energético en la reducción del NO_3^- para poder incorporarlo en moléculas orgánicas. La preferencia de la microalga en la asimilación del NH_4^+ sobre el NO_3^- , es debida principalmente a que la incorporación de la molécula NH_4^+ a la célula requiere de un gasto energético menor ya que el NH_4^+ es un compuesto reducido que se incorpora directamente a las moléculas orgánicas, como los aminoácidos (Bertl *et al.*, 1984; Chitra *et al.*, 2002), esta reducción básicamente es catalizada por dos enzimas la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR) (Berges, 1997).

El peso seco celular varía en función de la concentración de nitrógeno y de la fase de crecimiento. En el caso de *T. fluviatilis* no se registró efecto en el peso seco por la fuente de nitrógeno utilizada, pero si lo hay a diferentes concentraciones. Al igual que con la densidad celular, el peso seco registró los máximos valores en los tratamientos con mayor concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (890 μmol) en ambas fuentes. Para la mayoría de las especies el peso seco celular aumenta con el tiempo de cultivo, con indiferencia de la fuente de nitrógeno utilizada, principalmente a lo largo de la fase estacionaria.

Excepciones son los cultivos de *C. calcitrans* con fuente de NH_4^+ y de *P. tricornutum* con NO_3^- , NO_2^- y NH_2CONH_2 , en las cuales el peso seco celular es menor en la fase estacionaria que durante la logarítmica (Fidalgo, 1995). Utting (1985) no encontró variaciones del peso seco de *T. suecica* e *I. galbana* cuando fueron cultivadas en condiciones deficientes de nutrientes, mientras que la diatomea *Chaetoceros sp.* mostró un incremento en el peso seco.

En este trabajo se demostró que la concentración de la fuente de nitrógeno en *T. fluviatilis* si influyó en el peso seco y que probablemente esta variable depende de la especie que se este cultivando.

8.1.2 Contenido de Clorofila a (chl a)

La chl a es utilizada para evaluar la biomasa fitoplanctónica (Carreto y Cattogio, 1976; Wilhelm y Manns, 1991) y como un método para estimar la productividad primaria en ecosistemas acuáticos (Cahoon y Safi, 2002). Bajo condiciones experimentales, en la acuicultura también es utilizada para medir la productividad.

En este trabajo el contenido de chl a en *T. fluviatilis* registró para ambas fuentes de nitrógeno valores máximos de 7844 ng/mg de peso seco en los tratamientos con mayor concentración de nitrógeno 890 μmol , disminuyendo conforme decrecía la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo; observándose una relación en la concentración celular y el contenido de chl a. También se registró en los cultivos de *T. fluviatilis* que el contenido de chl a por célula disminuye en la fase estacionaria, de lo anterior se puede deber a la

deficiencia de nitrógeno del medio de cultivo, tal y como lo demostraron los estudios de Turpin (1991).

Herrero *et al.* (1994) encontraron que la relación clorofila *a*-célula se incrementaba conforme aumentaba la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Por otro lado, Carreto y Cattoggio (1976) experimentando con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* encontraron que durante el crecimiento de los cultivos la cantidad de chl *a* por célula disminuyó como resultado de la limitación de nutrientes en el medio principalmente nitrógeno. Sin embargo Wilhelm y Manns (1991) encontraron que la cantidad de chl *a* por célula de *Amphidinium* se incrementaba en la fase logarítmica y disminuía en la fase estacionaria.

8.1.3 Composición química de *T. fluviatilis* durante la fase logarítmica y estacionaria

Durante las fases de crecimiento también se presentan cambios en la composición química de las microalgas. Durante la fase estacionaria, cuando el nitrógeno se vuelve limitante, la célula desvía su metabolismo a la producción de carbohidratos y lípidos, duplicando su contenido (Harrison *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993). En este estudio *T. fluviatilis* presentó diferencias en su composición química, en la fase logarítmica y estacionaria, y no se vió afectada por la fuente de nitrógeno, pero sí con la concentración. Así tenemos que el contenido celular de proteínas se incrementó, alcanzando en la mayoría de los tratamientos los valores máximos al final de la fase logarítmica. Con NH₄Cl, en la fase logarítmica se registró la mayor cantidad de proteínas en el tratamiento con 890 μmol (C4),

indicando que la microalga incorporó las moléculas de NH_4^+ para la producción de proteínas. En la fase logarítmica la concentración de proteínas fue mayor que en la estacionaria en ambas fuentes de nitrógeno registrando una relación de 0.5 veces mas proteínas en la logarítmica, en relación a la estacionaria.

Fidalgo (1995) encontró que el contenido de proteína de *T. suecica* cultivada con NH_2CONH_2 alcanzó valores máximos al comienzo de la fase estacionaria (18-34 %), decreciendo posteriormente al 14-26 %.

En los tratamientos con 111.25, 222.5 y 450 μmol de NaNO_3 , NH_4Cl se registraron menores concentraciones de proteína celular, esto se relacionó generalmente en nuestros cultivos con un aumento relativo de los productos de reserva, como carbohidratos y lípidos.

El contenido celular de carbohidratos de *T. fluviatilis* no registró diferencias significativas con la fuente de nitrógeno, pero sí con la concentración y fase de crecimiento, lo cual sugiere que el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la acumulación de carbohidratos es dependiente de la especie, registrándose un efecto sobre la acumulación celular de carbohidratos. Hubo una mayor acumulación de carbohidratos durante la fase estacionaria para ambas fuentes, y para los cultivos donde se utilizaron menores concentraciones de nitrógeno (111.25, 222.5 y 450) μmol de NaNO_3 y NH_4Cl (Figuras 10, 11). Lo que sugiere que la acumulación de carbohidratos en la fase estacionaria se debe a la disminución de nitrógeno en el medio de cultivo y por lo tanto a la generación de moléculas de reserva como los carbohidratos para participar en el mantenimiento de la célula.

Sukenik y Wahnou (1991) observaron acumulación de carbohidratos y lípidos en *I. galbana* en la fase logarítmica, mientras que Nelson *et al.*, (1992) observaron solo acumulación de carbohidratos para *Isochrysis* sp. (T-ISO) en la fase estacionaria.

El contenido celular de lípidos sigue el mismo patrón que para carbohidratos, observándose una acumulación en la fase estacionaria donde las concentraciones de nitrógeno eran de 111.25, 222.5 y 445 μmol de NaNO_3 . Esta respuesta de *T. fluviatilis* a la acumulación de lípidos durante la fase estacionaria está en función del almacenamiento de material energético de reserva. La fase estacionaria presentó mayor acumulación de lípidos que la fase logarítmica con NaNO_3 , 0.6 veces mas.

Estudios realizados en otra especie de microalga como es el caso de los dinoflagelados, Mansour *et al.*, (2003) utilizando un cultivo batch de *Gymnodinium* sp. estudió los efectos de la fase de crecimiento sobre la composición de lípidos, reportando también, que la fase de crecimiento es un factor importante, el cual tiene influencia sobre el contenido de lípidos y la composición de clases lipídicas, registrando que en la fase estacionaria puede almacenar hasta 2.5 veces mas lípidos que en la fase logarítmica. Herrero *et al.* (1994) cultivando con urea como fuente de nitrógeno y cuatro concentraciones, encontraron que la relación en el contenido de lípidos entre la fase de crecimiento logarítmica y estacionaria de *Dunaliella tertiolecta* fue de 0.5 veces mayor el contenido de lípidos en la fase estacionaria que en la logarítmica, mientras que el contenido de proteínas

registrado en la fase logarítmica fue 2 veces mayor que el reportado para la fase estacionara.

Lípidos

Los lípidos y la composición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las microalgas son considerados importantes en la alimentación de animales filtradores (Fleming *et al.*, 2002; González y Pérez, 2002; Pernet *et al.*, 2003), ya que además de ser fuente de energía metabólica, son componentes esenciales de las membranas celulares, las cuales sirven como transporte de vitaminas solubles en grasas y son la fuente de ácidos grasos esenciales (EFA, por sus siglas en ingles). Estos compuestos son necesarios para mantener la integridad de la membrana celular, para el transporte de lípidos y precursores de algunas hormonas como prostaglandinas (Tamaru *et al.*, 2000). Los PUFAs de cadena larga son los principales requerimientos nutritivos para obtener un buen crecimiento y supervivencia de organismos como el camarón (González y Pérez, 2002), moluscos (Fleming *et al.*, 2002; Farias y Uriarte, 2002) y peces (Aran, 1997); siendo los más importantes los de la familia ω -3 y dentro de éstos destacan el EPA (C20:5 ω -3) y el DHA (C22:6 ω -3) (Ghioni, *et al.*, 1999).

El contenido de ácidos grasos en este trabajo varió con respecto a la concentración de nitrógeno y a la fase de crecimiento. Los ácidos grasos mas afectados por el cambio de concentración de nitrógeno, para la fuente de NaNO_3 fueron C16:0, C18:0, C18:4, C20:5 y C22:6, de los cuales solo el C16:0 y el C22:6 incrementaron su concentración en los tratamientos con menor concentración de

nitrógeno en el medio de cultivo (111.25 μmol). Por otro lado los ácidos grasos C18:0, C18:4 y C20:5 disminuyeron su concentración en *T. fluviatilis*. En este trabajo los ácidos grasos monoinsaturados de *T. fluviatilis* fueron los que se encontraron en mayor concentración, seguidos de los poliinsaturados y los saturados. Valores altos del ácido oleico (C18:1) pudo ser importante y necesario para incrementar la síntesis de los PUFAs de *T. fluviatilis*. Se ha documentado que este ácido graso es un importante precursor del C18:2 ω -6 el cual puede dar origen al C20:5 ω -3 (Arao y Yamada, 1994).

También se observó que el contenido de PUFAs varió en relación a la concentración de nitrógeno. En el caso de los ácidos grasos con 3 insaturaciones como el C18:3, estos registraron un incremento en el tratamiento con 890 μmol de NaNO_3 de hasta 4 pg/cel. Con NH_4Cl se observó un incremento del C18:3 y C18:4 (5 y 7 pg/cel respectivamente), por lo que es probable que estos incrementos hayan ocasionado aumento en C20:5 y C22:6 a partir de la elongación y desaturación del C18:2.

De acuerdo a las dos rutas de biosíntesis del ácido araquidónico (C20:4) propuesta por Nichols y Appleby (1969):



el C18:2 es precursor del C20:4, participando el C20:3 como producto intermedio de la síntesis. En las muestras analizadas en este estudio no se detectó el ácido

C20:3, esto pudo deberse a que la cantidad de muestra utilizada fue muy pequeña, que la concentración de este ácido graso estuviera fuera del límite de detección ó a la síntesis de C20:4.

Los ácidos grasos que son esenciales para la supervivencia de organismos marinos son C20:4, C20:5 y C22:6 (Langdon y Waldock, 1981; Leonardos y Lucas, 2000). En este trabajo el C20:4 para las dos fuentes de nitrógeno registró bajas concentraciones en comparación con el C20:5 y el C22:6. Por ejemplo la mayor concentración de C20:5 se obtuvo con el tratamiento N1 con menor concentración de nitrógeno en el medio (111.25 $\mu\text{mol NaNO}_3$). Para los cuatro tratamientos, el C20:5 registró mayor concentración que su precursor inmediato el C20:4, lo cual probablemente sugiere que el C20:5 se estaba sintetizando a partir del C20:4.

Con NH_4Cl se registraron las mayores concentraciones de C20:5 en los tratamientos C1 y C2 (12 y 17 pg/cel), los cuales contienen menor concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (111.25 y 222.5 $\mu\text{mol de NH}_4\text{Cl}$). También con NH_4Cl los cuatro tratamientos presentaron mayor concentración de C20:5 que su precursor inmediato C20:4.

Otro ácido graso poliinsaturado importante y que estaba presente en la microalga *T. fluviatilis* fué el C22:6, es un ácido altamente insaturado que tiene diversas funciones metabólicas como componente de la membrana celular y ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento y supervivencia de los organismos (FAO, 2002), este ácido graso se encontró en menor concentración que el C20:5. Basándonos en las concentraciones registradas en nuestros cultivos de *T. fluviatilis* podemos suponer una síntesis lenta del C22:6 por parte de la microalga.

El C22:6 al igual que el C20:5 presentó sus concentraciones máximas en los tratamientos con menor concentración de nitrógeno en el medio de cultivo.

8.2 Cultivo larvario de *L. vannamei*

Un procedimiento útil para evaluar las diferencias en la composición química del alimento (microalga) en organismos (larvas de camarón), es el de aplicar condiciones de cultivo iguales para todos los tratamientos modificando la fuente de alimento. La importancia de suministrar una dieta adecuada a los organismos en cultivo se verá reflejada en un rápido crecimiento y mayor supervivencia. En el presente estudio, el alimento (microalga bajo 3 condiciones de cultivo) se agregó a los cultivos larvarios, también se incluyó un grupo control que fueron larvas sin alimento, éstas tuvieron una alta mortalidad al alcanzar el estadio de zoea II, lo que demuestra la necesidad de la larva de disponer inmediatamente después de pasar de nauplio a zoea, de alimento exógeno.

8.2.1 Porcentaje de metamorfosis

El periodo más crítico en la larvicultura es el inicio de la alimentación exógena. Para larvas de especies que tienen estómago parcialmente funcional, el alimento vivo es esencial para una buena supervivencia y crecimiento óptimo (García, 2000; D'Abramo, 2002).

En este trabajo se encontraron diferencias en la velocidad de metamorfosis principalmente en el tratamiento T2 (microalga cultivada con 222.5 μmol de NH_4Cl) el cual se retrazó un día para alcanzar la PZIII. Kuban *et al.*, (1985) observaron diferencias en la velocidad de metamorfosis para *P. vannamei* y *P. stylirostris* utilizando seis especies de microalgas entre ellas *Chaetoceros calcitrans* y *C. gracilis*, las microalgas se cultivaron en medio f/2. López (2002) utilizó

Thalassiosira weissflogii y *C. muelleri* encontrando los porcentajes mas alto de metamorfosis con la dieta de *C. muelleri* alcanzando la PZIII 12 horas antes que con la dieta de *T. weissflogii*.

Por otro lado T1 (microalga cultivada con 445 μmol de NaNO_3) registró el mayor porcentaje de metamorfosis (95 %) mientras que T2 y T3 (microalga cultivada con medio f/2) registraron 88 % y 93 % respectivamente. Lo anterior pudo deberse a la calidad de las dietas, la cual tiene un efecto directo sobre la velocidad de metamorfosis.

Al respecto Naranjo *et al.*, (1999) observaron que las larvas de *Penaeus californiensis* alimentadas con *Chaetoceros gracilis* presentaron una mejor velocidad de metamorfosis que las alimentadas con *Dunaliella sp.*, registrando un retraso de 1 día en las larvas donde no se utilizó la diatomea *C. gracilis* como alimento. Ellos sugieren que las diatomeas son una mejor fuente nutricional que los fitoflagelados, y que estos últimos tienen una baja calidad como alimento.

En este estudio se determinó que la mejor dieta fue la microalga crecida bajo el tratamiento T1 sometida a deficiencia de nitrógeno utilizando NaNO_3 (445 μmol), esto debido a que las larvas zoea alimentadas con esta microalga mostraron los mejores porcentajes de supervivencia (53.09 %) al final del experimento, el mayor porcentaje de metamorfosis al final de la PZIII (95 %) lo cual indica un desarrollo larvario con mayor sincronía al finalizar el ensayo, la mayor longitud total (1.786 mm), la mejor acumulación de carbohidratos ($10.29 \pm 0.98 \mu\text{g} \cdot \text{larva}^{-1}$) y de lípidos ($12.92 \pm 1.22 \mu\text{g} \cdot \text{larva}^{-1}$) de PZI-PZIII.

Para un laboratorio comercial tiene mas valor una larva que presente una mayor velocidad de desarrollo larvario ya que alcanza en menor tiempo su próximo estadio, lo cual representa un ahorro económico (Naranjo *et al.*, 1999).

8.2.2 Longitud de la larva

El crecimiento en talla de la larva es un reflejo directo de la alimentación. La talla máxima de las larvas (mm) registrada en este ensayo se identificó en el subestadio de PZIII sometida al tratamiento T1 con una longitud de 1.786 mm, la diferencia significativa de los valores medios de las tallas entre los tratamientos, se observó a partir de la PZII. Los resultados de longitud obtenidos bajo las condiciones experimentales de este trabajo son menores que las reportadas por Burgueño (2002) y López (2002), lo cual pudo deberse a las diferencias en la composición química de las microalgas utilizadas en los ensayos, pared celular, tamaño de las células, condición y origen de las larvas.

Burgueño (2002) utilizó la microalga *Isochrysis* “*Tahiti*” cultivada a 20, 25 y 30 °C; al proporcionarla como alimento a las larvas zoeas III de camarón *L. vannamei* registró longitudes de 2.164, 2.201 y 2.043 mm respectivamente. Por otro lado López (2002) utilizando *Thalassiosira weissflogii* en la alimentación de larvas de *L. vannamei* registró longitudes de hasta 2.2 mm. Los resultados de longitud de la larva, obtenidos por Burgueño (2002), son mayores a las longitudes obtenidas en este estudio, lo cual podemos asociar principalmente al tamaño y composición química de *I. “Tahiti”*, el tamaño de esta microalga es de 4.8 µm, lo que pudo facilitar a la larva a ingerir y digerir un mayor número de células por

organismo, además de que *Isochrysis* tiene una pared celular menos rígida que la diatomea. Según Emmerson (1980) propone que el desarrollo y crecimiento depende del tipo, calidad y cantidad del alimento consumido. Aunque *T. fluviatilis* es una microalga utilizada para alimentación de larvas por su composición química, su tamaño es mas grande que el de *Isochrysis* lo que pudo dificultar la ingestión de la diatomea por las larvas de camarón, lo cual se vio reflejado en su crecimiento. Por otro lado los resultados de longitud obtenidos por López (2002), pudo estar correlacionado con la condición fisiológicas de los padres, las condiciones de desove y de cultivo de las larvas, ya que la composición química de la microalga *T. weissflogii* fue similar a las obtenidas en este trabajo con *T. fluviatilis* (= *T. weissflogii*).

8.2.3 Porcentaje de supervivencia

La calidad de los huevos y nauplios depende principalmente de las condiciones fisiológicas de los padres, pero también de las condiciones ambientales prevalecientes en los desoves y tanques de cultivo. La calidad larval y postlarval es basado en criterios que incluye el desarrollo de zoea a postlarva (Racotta *et al.*, 2003). Esta calidad larvaria puede señalarse seguido de criterios y herramientas metodológicas, y se pueden dividir en cinco categorías generales: composición química, morfología, comportamiento, utilidad de productividad y supervivencia a pruebas de estrés (Racotta *et al.*, 2003). Específicamente en peneidos, algunos estudios han utilizado algunos componentes bioquímicos de huevos y nauplios como índice de calidad (Cahu *et al.*, 1995), sin embargo

estudios realizados por Racotta *et al.* (2003), en larvas de camarón blanco *L. vannamei*, encontraron que no había ninguna correlación entre la supervivencia de las larvas y la composición química de los nauplios. Otros índices para evaluar la calidad larvaria, son las condiciones fisiológicas de las larvas (Palacios *et al.*, 1998, 1999) o las pruebas de stress de amonio en estadios de zoea o prueba de stress de salinidad en postlarvas, también como un criterio predictivo de supervivencia (Hernández, 2001).

En el presente trabajo no se conocieron las condiciones fisiológicas y de cultivo de los padres de los nauplios, por lo que no se puede asegurar que los resultados obtenidos en la supervivencia sean debido a estas condiciones, ni tampoco se realizaron pruebas de stress para conocer un análisis predictivo de la supervivencia. Sin embargo sí se conoce la composición química de las larvas y como se menciona anteriormente se puede utilizar como un criterio para evaluar la calidad larvaria expresada como supervivencia, que en este trabajo fue influenciada básicamente por la alimentación ya que la composición en proteínas, carbohidratos y lípidos de las dietas utilizadas (T1, T2 y T3) fue diferente (Anexo 1, Tablas 1-8). En este trabajo los mayores porcentajes de supervivencia se registraron en el tratamiento T1 (445 μmol de NaNO_3) con un 53.09 %. La composición química de lípidos y de carbohidratos de la microalga fue mayor en T1 que en los tratamientos T2 y T3, lo cual se ve reflejado en una mayor acumulación de lípidos y de carbohidratos por las larvas. Otro aspecto importante que pudo afectar la supervivencia de las larvas es el tamaño de las células de *T. fluviatilis*, ya que presenta un tamaño entre 5-32 μm y pueden formar cadenas

(Fryxell y Hasle, 1977), lo cual puede ser un impedimento para que las larvas puedan ingerir y digerir estas células, no importando la riqueza de la composición química de la microalga.

8.2.4 Composición química de *L. vannamei*

Proteínas

El alto requerimiento de proteínas y la limitada capacidad de los camarones para almacenar reservas como lípidos y carbohidratos, pudieran estar relacionadas con su capacidad para utilizar las proteínas como una fuente primaria de energía. Los resultados de otros estudios (Ramos *et al.*, 2001) han demostrado que los camarones pueden cambiar de fuente de energía dependiendo de los requerimientos fisiológicos o nutricionales iniciando con el consumo de las proteínas seguido de los lípidos y carbohidratos (Rosas *et al.*, 2000).

La mayor ganancia en peso obtenida con respecto a la cantidad de proteína de las larvas zoea fue en el tratamiento T3 ($18.93 \pm 1.39 \mu\text{g/larva}^{-1}$), el cual no registró la mayor supervivencia (48.05 %). Por otro lado T1 registró una acumulación de $13.95 \pm 1.39 \mu\text{g/larva}^{-1}$ de proteína y una supervivencia del 53.09 %, entonces es probable que las larvas al no tener disponible una suficiente cantidad de proteínas en el alimento como es el caso del tratamiento T1 éstas utilicen otros componentes que sean abundantes en esta dieta como los carbohidratos y los lípidos para cubrir sus funciones metabólicas, lo cual se vio reflejado en la supervivencia y crecimiento de las larvas (Rosas *et al.*, 2000).

Carbohidratos

El glucógeno es la molécula de almacenamiento de carbohidratos en los crustáceos decápodos y es en la glándula digestiva donde principalmente se acumula, un exceso en la dieta genera limitaciones metabólicas en los camarones, provocando una disminución de la capacidad de la α -amilasa para la degradación de las altas concentraciones de carbohidratos; además, induce una saturación de la glándula digestiva afectando la absorción de otros nutrientes (Rosas *et al.*, 2000).

Quinitio y Villegas (1982) utilizaron *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis chuii* en la alimentación de larvas de *Penaeus monodon*; ellos determinaron una supervivencia de 68 % y 64 % respectivamente, encontrando una mayor concentración de carbohidratos en las larvas alimentadas con *C. calcitrans* asociándolas a la supervivencia encontrada.

En este trabajo se registró la mayor concentración de carbohidratos ($10.29 \pm 0.98 \mu\text{g} \cdot \text{larva}^{-1}$) en las larvas del tratamiento T1, estas larvas fueron alimentadas con *T. fluviatilis* con un alto contenido de carbohidratos y son las que presentaron el mayor porcentaje de supervivencia (53.09 %). La acumulación de los carbohidratos en las larvas puede provenir de la alimentación (microalgas) o de la gluconeogénesis (Rosas *et al.*, 2000).

Lípidos

Los requerimientos de lípidos en algunos crustáceos varían según la especie (Kanasawa *et al.*, 1979). En camarones peneidos los lípidos son utilizados

para satisfacer sus funciones metabólicas, además de que son una fuente de ácidos grasos esenciales, fosfolípidos y esteroides necesarios para el crecimiento (González y Pérez, 2002), el cual depende del origen del alimento.

Así Emmerson (1980) alimentando larvas de *Penaeus indicus* con la diatomea *Thalassiosira weissflogii* encontró un buen crecimiento asociándolo a la composición química de la microalga, principalmente en el contenido de lípidos y de proteínas. Quintiño y Villegas (1982) experimentando con *Penaeus monodon* alimentados con *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis chuii*, encontraron que la acumulación de lípidos de las larvas alimentadas con *C. calcitrans* fue mayor a las alimentadas con *T. chuii* lo cual se ve reflejado en un mayor crecimiento y supervivencia de las larvas alimentadas con *C. calcitrans* comparadas con las larvas alimentadas con *T. chuii*.

En este trabajo se demostró que también las variaciones en el medio de cultivo influye en el crecimiento y supervivencia de las larvas, así tenemos que la mayor acumulación de lípidos observada en nuestra investigación fue registrada en las larvas del tratamiento T1, con una mejor asimilación de los ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) los cuales se incrementaron conforme transcurrían los subestadios. Las larvas al terminar el ensayo acumularon aproximadamente el doble de su composición inicial de lípidos (7.13 ± 0.928 a $12.92 \pm 1.22 \mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$), resultados similares fueron encontrados por López (2002), Burgueño (2002) y Guevara (2002), asociándolo a una mayor supervivencia de las larvas y mayor crecimiento.

Acidos grasos

Teshima *et al.*, (1988, 1989) encontraron que durante la maduración de *Penaeus japonicus* existe una acumulación de lípidos en los ovarios, con un alto contenido en ácidos grasos como el C18:3 ω -3, el C20:5 ω -3 y el C22:6 ω -3. También en otros organismos como copépodos (*Acartia tonsa*) se ha encontrado la importancia de la concentración del C18:3 ω -3, el cual está asociado a la producción de huevos encontrando que los niveles de C18:3 ω -3 en los huevos fue 8 veces más concentrados que los C20:0 (Hazzard y Kleppel, 2003).

Estudios de histoquímica y microscópicos han puesto en evidencia la depositación de lípidos en los crustáceos durante la maduración ovárica, encontrando además que los ácidos grasos como los C16:0, C16:1 ω -7 y el C18:1 ω -9 contribuyen de forma importante a la composición de los lípidos de los huevos de *Penaeus kerathurus* (Mourente *et al.*, 1990).

O'Leary y Matthews (1990) experimentando con *Penaeus monodon* encontraron que los niveles de lípidos en hepatopáncreas fueron de 4.66 % en relación con el peso seco, del cual el 70.5 % fue de fosfolípidos. Los ácidos grasos encontrados en los fosfolípidos de *P. monodon* fueron el C16:0 (13.0%), C16:1(5.3%), C18:0(13.2 %), C18:1 ω -9(8.4%), C18:2 ω -6(1.9%), C20:4 ω -6(12.9%), C20:5 ω -3(13.6%) y C22:6 ω -3(15.5%).

Lubzens *et al.*, (1995) reportó que la acumulación de lípidos en *Penaeus semisulcatus* se da en el hepatopáncreas y posteriormente al ovario, siendo los componentes mayores los triacilgliceridos, diacilgliceridos y fosfolípidos.

Pedersen y Storm (2002) encontraron que la composición de ácidos grasos de larvas de *Pandalus borealis* y *P. montagui* en aguas del Oeste de Greenland está conformada principalmente por C16:0, C16:1 ω -7, C18:0, C18:1 ω -7, C20:5 ω -3 y C22:6 ω -3.

En este trabajo, los ácidos grasos mencionados por Mourente *et al.*, (1990); O'Leary y Matthews (1990) y Pedersen y Storm (2002) fueron los componentes lipídicos mas importantes en las larvas del estadio de PZI. Debido a que no analizamos la composición de ácidos grasos de los nauplios de *L. vannamei*, suponemos que la mayor cantidad de estos lípidos sean adquiridos de las reservas proporcionadas por la madre o también a través del alimento exógeno.

Algunos ácidos grasos saturados o monoinsaturados son una reserva lipídica en crustáceos (O'Leary y Matthews 1990) y son fundamentales para la síntesis de otros ácidos grasos de cadena larga (Nichols y Appleby, 1969; Arao y Yamada, 1994). Los ácidos grasos C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1 fueron los componentes mayores en larvas, lo cual induce a pensar que estos ácidos grasos son la principal fuente de energía almacenada y utilizada en primera instancia por las larvas de *L. vannamei*.

Otros ácidos grasos que no son comunes en los organismos marinos C15:0 y C17:0, se detectaron en las larvas zoea de *L. vannamei*, en los tres tratamientos. Estos ácidos grasos se registraron en mayor concentración en el tratamiento T1 con 1 ng/larva⁻¹ del C15:0 y 32 ng/larva⁻¹ del C17:0. Estudios realizados por Castell (1981) demostraron que estos ácidos no se encuentran comúnmente en crustáceos pero sí en bacterias; por lo que la detección de estos puede ser

explicada por la presencia de bacterias. En los tratamientos T2 y T3 las concentraciones fueron bajas (menor de 1 ng/larva⁻¹).

PUFAs

Los ácidos grasos poliinsaturados juegan un papel fundamental en diversas actividades fisiológicas y metabólicas de organismos marinos. Algunos como los camarones tienen limitada su capacidad para sintetizar los ácidos grasos esenciales de las familias ω -3 y ω -6, principalmente ácidos linoléico (C18:2 ω -6) y el linolénico (C18:3 ω -3), por lo que éstos deben ser adquiridos en su dieta (Teshima *et al.*, 1988; Mourente *et al.*, 1990; González y Pérez, 2002; Hazzard y Kleppel, 2003).

Se ha probado que los ácidos grasos C20:5 ω -3 (EPA) y C22:6 ω -3 (DHA) son de gran importancia en el desarrollo de las estructuras de membranas y de la actividad del sistema nervioso del embrión y de la futura larva en algunas especies de crustáceos (Chapelle, 1986; González y Pérez, 2002). Aran (1997) sugiere que las series de ácidos grasos ω -3 y especialmente el C22:6 ω -3 y el C20:5 ω -3 son más valiosos como componentes esenciales de las membranas biológicas, que como reserva de energía. Incluso se ha propuesto que el cociente DHA/EPA asociado a un alto contenido de ácidos grasos ω -3, se relaciona positivamente con la supervivencia (González y Pérez, 2002). A este respecto, Aran (1997) encontró en larvas del pez rodaballo (Scophthalmidae, *Scophthalmus maximus*) que el nivel

de asimilación de DHA era mucho mayor que el de EPA registrando mayor supervivencia.

En nuestro trabajo se observó que en el T1 la relación DHA/EPA fue de 1:2, registrando que existe acumulación de EPA en PZI a PZIII, por lo que un gasto de DHA probablemente lo estuvo utilizando para el crecimiento. También las larvas de este tratamiento mostraron la mayor supervivencia y el mayor crecimiento.

9.- CONCLUSIONES

9.1 Cultivo de *T. fluviatilis*

Las concentraciones (890, 445, 222.5, 111.25 μmol) y las fuentes de nitrógeno (NaNO_3 , NH_4Cl) utilizadas en este trabajo nos permitió evaluar la composición química de la diatomea y podemos concluir que:

a) La microalga *T. fluviatilis* al ser sometida a diferentes concentraciones en su fuente de nitrógeno, modificó la concentración de su composición química, principalmente en los contenidos de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos.

b) A mayor concentración de nitrógeno la síntesis de proteínas fue favorecida principalmente en los tratamientos con 890 μmol NaNO_3 (N4) y 890 μmol NH_4Cl (C4).

c) A bajas concentraciones de nitrógeno hubo incrementos importantes en la concentración de carbohidratos y lípidos.

d) Los ácidos grasos mas abundantes e importantes para la dieta de larvas de camarón fueron: C18:3, C20:5 y C22:6 los cuales estuvieron en abundancia en las microalgas cultivadas con 111.25 y 445 μmol NaNO_3 y en NH_4Cl con 222.25 μmol .

9.2 Cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*

a) La supervivencia de las larvas de *L. vannamei* estuvo influenciada básicamente por la composición química de *T. fluviatilis*.

b) Las mayores tasas de supervivencia de *L. vannamei* se obtuvieron con la diatomea cultivada con 445 μmol de NaNO_3 tratamiento T1. También se registró el mejor porcentaje de metamorfosis de la larva, así como la mayor longitud y la mejor acumulación de lípidos y de carbohidratos.

c) Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, principalmente el C20:5 se acumuló en las larvas de *L. vannamei* durante sus tres estadios de protozoa, registrando la mayor cantidad de C20:5 en las larvas del tratamiento T1, que se reflejo en una mayor supervivencia.

10.- RECOMENDACIONES

Optimizar los sistemas y parámetros físico-químicos de cultivo, estudiando los efectos sobre la producción de biomasa y la calidad química de las microalgas.

Es necesario realizar nuevos ensayos que permitan mejorar la calidad química de las dietas vivas (microalgas) e iniciar estudios incorporando modificaciones en las condiciones de cultivo para obtener altas concentraciones de componentes que son requeridos por las larvas, para el óptimo crecimiento y desarrollo: Como proteínas, pigmentos y la adición de hormonas, con el objetivo de mejorar la calidad y supervivencia de las larvas para que estas sean competitivas con la calidad de las larvas silvestres.

Se recomienda continuar con los estudios que permitan conocer los requerimientos óptimos de todos los componentes nutricionales durante el estadio de protozoa, principalmente en los niveles de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos.

Evaluar el costo real de la producción de la microalga, al manipular las condiciones de cultivo y comparar con los gastos generados de manera tradicional. El objetivo final es el de obtener mayor rendimiento de larvas, con menor costo.

11.- BIBLIOGRAFIA

Calidad de *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas zoea de *Litopenaeus vannamei*

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., y Herrero, C. 1997. Microalgas en acuicultura. En: Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Ed. Universidade Da Coruña. Cap. 8. pp. 151-170
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G. y Lawrence, A.L. 1993. Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales. Memorias del primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. pp. 43-79
- Alceste-Oliviero, C. y Martínez-Espinoza, M. 2000. Regional review of aquaculture status and development trends in Latin America and the Caribbean. En: Conference on Aquaculture in the Third millennium. NACAP-FAO. Bangkok. Febrero 2000. pp 23-30
- Alfonso, E., Ramos, L., Díaz, E., García, T. y Rosas, C. 1993. Manual del II curso internacional de producción de postlarvas de camarones peneidos del Atlántico de América. Facultad de Ciencias, UNAM. México. pp. 132
- Aran, J.E. 1997. Influencia de la composición bioquímica en la cadena trófica microalga-rotífero-larva de rodaballo. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Biología. Departamento de Microbiología. pp. 113
- Arao, T. y Yamada, M. 1994. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 35: 1177-1181
- Arce, R.A. 1989. Cultivo larvario de camarones peneidos. Monografía. Centro de Investigaciones Biológicas. La Paz, B.C.S. México. pp. 160

- Arellano, M.E. y Triviño, A. 1987. Uso de Lonzin en el cultivo de algas. En: Once años dedicados a la investigación de la acuicultura en el Ecuador. Centro nacional de acuicultura e investigaciones marinas. "Edgar Arellano M." Escuela Superior Politécnica del litoral. pp. 147-154
- Arellano, E. 1990. Guías técnicas en el cultivo de larvas de camarón. *Boletín de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar*. pp. 53-86
- Arellano, E. 1993. Investigación bioquímica y nutricional del camarón. Once años dedicados a la investigación de la acuicultura en el Ecuador. Centro nacional de acuicultura e investigaciones marinas. "Edgar Arellano M." Escuela superior politécnica del litoral. pp. 1-18
- Arredondo, V.B. 1995. Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum*. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología y Parasitología
- Bardach, J.E., Ryther, J.H. y Mc Larney, W.O. 1972. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms. *Aquaculture*. Wiley-Interscience, New York, pp. 686
- Berges, J.A. 1997. Minireview: Algal nitrate reductases. *Eur. Journal Phycology*, 32: 3-8
- Bertl, A., Felle, H. y Bentrup, F.W. 1984. Amine transport in *Riccia fluitans*. *Plant Physiology*, 76: 75-78
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917

- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review, CSIRO Marine Laboratories Report 205. Australia. pp. 488-499
- Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D. y Leroi, J.M. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 285-296
- Burgueño, R. 2002. Efecto de la temperatura y de la luz sobre la composición y el valor dietético de la microalga *Isochrysis* "Tahiti" para el cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. pp. 30
- Cahoon, L.B. y Safi, K.A. 2002. Distribution and biomass microalgae in Manukau Harbour, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 36: 257-266
- Carreto, J.I. y Catoggio, J.A. 1976. Variations in pigment contents of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during growth. *Marine Biology*, 36: 105-112
- Castell, J.D. 1981. Fatty acid metabolism in crustaceans. Proceedings of the second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition, October 27-29, 1981, Lewes/Rehoboth Beach, Delaware. Gary D. Pruder, Editor. Baton Rouge, La.: Louisiana State University, Division of Continuing Education. pp.

- Castillo, E. 1998. Análisis físicos, químicos, biológicos y su importancia práctica en la Camaronicultura. *Enfoque Acuícola*, 1: 21-27
- Castrejon, O.L., Porras, D.D. y Band, C. 1994. Cultivo de alimento vivo para la acuicultura. Universidad del Mar, Instituto Nacional Indigenista. Puerto Angel, Oaxaca, México. pp. 55
- Chamberlin, G. W. y Addison L., 1980. Reproduction and grown the *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris*, feed natural diets. Texas A and M University.
- Chapelle, S. 1986. Aspects of phospholipids metabolism in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. *Comparative Biochemistry Physiology*, 4:423-439
- Chitra, R.S., Sumitra, V.C. y Yash dev, S. 2002. Effect of different nitrogen sources and plant growth regulators on glutamine synthetase and glutamate synthase activities of Radish cotyledons. *Bulgarian Journal Plant Physiology*, 28: 46-56
- Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. En: An historical outline of applied algology. En: Handbook of microalgal mass culture editado por Richmond A. CRC Press Inc., Florida USA. 421-454
- Cahu, C.L., Cuzon, G. y Quazuguel, P. 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, a-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry Physiology*. 112: 417-424
- Coll, M.J. 1991. Acuicultura marina animal. Ed. Mundiprensa, Madrid., España. pp 132

- Cury, P. y Roy, C. 1989. Optimal environmental window and pelagic fish recruitment success in upwelling areas. *Journal of Fishery and Aquatic Sciences*, 46:670-679
- D'Abramo, L.R. 2002. Challenges in developing successful formulated feed culture of larval fish and crustaceans. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. pp144-151
- Darryl, E., Alceste, C. y Cabrera, T.R. 2000. Mercado y comercialización de la tilapia en los Estados Unidos de América. *Panorama Acuícola*. Mayo-Junio 2000. pp. 40-43
- De Pauw, N., Morales, J. y Persoone, G. 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints. *Hydrobiologia*, 116:121-133
- Dring, M.J. 1987. The biology of marine plants. Ed. Edward Arnold Publ. Ltd., London, pp 199
- Dubois, M., Gilles, K.A., Halmiton, J.D., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356
- Emmerson, W.D. 1980. Ingestion, growth and development of *Penaeus indicus* larvae as a function of *Thalassiosira weissflogii* cell concentration. *Marine Biology*, 58: 65-73

- Fábregas, J., Herrero, C., Ventura, B. y Abalde, J. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* kyllin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 49:231-244
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liaño, R. y Cabezas, B., 1986. Biomass production and biochemical variability of the marines microalgae *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53: 187-99
- FAO. (2000). Acuicultura: más que una industria de exportación. (<http://www.fao.org/spanish/newsroom/focus/2003/aquaculture.htm>)
- FAO. (2002). Nutrientes esenciales-lípidos. (<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB492S/AB492S02.htm>)
- Farias, A. y Uriarte, I. 2002. Nutrición en larvicultura de pectinidos: Relevancia de proteínas y lípidos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola
- Fidalgo, J.P., López, M.I., Cid, A., Herrero, C. y Abalde, J. 1990. Incidencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de biomasa y composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos masivos. III Congreso Nacional de Acuicultura. pp. 651-656
- Fidalgo, J.P., Cid, A., López, I., Abalde, J. y Herrero, C. 1994. Growth and biochemical profile of juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) fed on different algal diets. *Journal of Shellfish Research*, 1:67-75

- Fidalgo, J.P. 1995. Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. Tesis de doctorado. Universidad de La Coruña. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Celular y Molecular
- Fleming, H.P., Navarro, J.M., Peña, E. Y Martínez, G. 2002. Effect of three conditioning diets on the fatty acid composition of gonads and muscle of *Argopecten purpuratus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 36: 605-620
- Flynn, K.J., Garrido, J.L., Zapata, M., Opik, H. Y Hipkin, C.R. 1992. Changes in fatty acids, amino and carbon/nitrogen biomass during nitrogen starvation of ammonium-and nitrate-grown *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology*, 4:95-104
- Fryxell, G. y Hasle, G. R. 1977. The genus *Thalassiosira*: Some species with a modified ring of central strutted processes. *Beih. Zur Nova Hedwigia*. 54: 67-89
- García, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteínas en dietas artificiales para larvas de peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. pp 287-299
- Ghioni, C., Tocher, D.R., Bell, M.V., Dick, J.R. y Sargent, J.R. 1999. Low C18 to C20 fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4 (n-3), to eicosapentaenoic acid, 20:5(n-3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochimica et Biophysica*, 1437:170-181

- González, M.L. y Pérez, M. 2002. Current status of lipid nutrition of Pacific white Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. pp 36-45
- Guevara, E.Y. 2002. Evaluación del efecto de la temperatura y de la iluminación en cultivos semicontinuos de la diatomea *Chaetoceros muelleri* utilizada como alimento para larvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. pp. 36
- Guillard, R.R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate animals. Plenum, New York. pp. 29-60
- Harrison, P.J., Thompson, P.A. y Calderwood, G.S. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, 2:45-56
- Hazzard, S.E. y Kleppel, G.S. 2003. Egg production of the copepod *Acartia tonsa* in Florida Bay: role of fatty acids in the nutritional composition of the food environment. *Marine Ecology Progress Series*. 252: 199-206
- Hernández, H.R. 2001. Indicadores bioquímico-fisiológicos de calidad larvaria y postlarvaria de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría en uso, manejo y preservación de recursos naturales. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

- Hernández-Saavedra, D. 1991. Composición química de la pared celular de distintos géneros de levaduras marinas. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, México. pp. 25-29
- Herrero, C., Cid, A., Fábregas, J. y Abalde, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacultural Engineering*, 10:99-110
- Herrero, C., Abalde, J., Cid, A., Fidaldo, P. y Fábregas, J. 1994. Variations in the biochemical profile of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) cultured with different nutrient concentrations and urea as a nitrogen source. *Cahier Biologie Marine*, 35:213-223
- Hiroshi, K. 1985. Larval Development of the Blue Shrimp *penaeus stylirostris* Stimpson Reared in the Laboratory. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(7): 1121-1130
- Hudinaga, M. 1942. Reproduction, development, and rearing of *penaeus japonicus*. Bate. *Japanese Journal Zoology*, 10:305-393
- Hudinaga, M. y Kittaka, J. 1967. The large scale production of the young kuruma prawn *penaeus japonicus*. Bate. Inf. *Bulletin Plankton Japanese*, pp: 35-46
- Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora. Curso nacional teórico práctico para la producción de larvas de camarón. Guaymas, Son., 22 al 26 de Mayo de 1995

- James, C., Al-Hinty, S. y Salman, A. 1989. Growth and w3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77:337-351
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. y Wright. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography. Monographs on oceanographic methodology. Published in 1997 by the United Nations Educational, Scientific and cultural Organization. Part I. pp 85
- Jones, D.A., Kurmaly, K y Arshard, A. 1987. Penaeid Shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture*, 64:133-146
- Kanasawa, T., Kirk, M.R. y Bassham, J.A. 1970. Regulatory effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochemical Biophysical*, 205: 401-408
- Kanasawa, A., Teshima, S. y Ono, K. 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochemistry Physiology*, 63: 295-298
- Kawahigashi, D. 1992. "State of the art" shrimp maturation: current problems and future trends. En: Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. pp. 61-64
- Kreeger, D.A. y Langdon, C.J., 1993. Effect of dietary protein content on growth of juvenile mussels, *Mytilus trossulus* (Gould 1850). *Biology Bulletin*, 185: 123-39

- Kuban, F.D., Lawrence, A.L. y Wilkenfeld, J.S. 1985. Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. *Aquaculture*, 47:151-162
- Kureshy, N. y Davis, A. 2000. Metabolic requirement for protein by pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. pp 161-180
- Kurmaly, K., Yule, A.B. y Jones, D.A. 1989. An energy budget for the larvae of *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 81: 13-25
- Lagos, B.A., Hernández, B.S., Rodríguez, G.H. y Victoria, D.P. 2000. Experiencia sobre el larvicultivo del caracol de pala *Strombus gigas* Linnaeus, 1758 en laboratorio en el Caribe Colombiano. Texto larvicultivo del caracol de pala del Boletín Científico INPA No. 4:1-20
- Langdon, C.J. y Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal Marine Biology Assoc.* 61:431-48
- Le Borge, Y. 1990. Culture of microalgae. En: G. Barnabe (ed). *Aquaculture* (1) Ellis Horwood. New York
- Lehninger, A.L. 1981. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, Cap. 14 pp. 371-394

- Leonardos, N. y Lucas, I.A. 2000. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 182: 301-315
- López, E.J.A. 1995. Producción de microalgas. Curso teórico práctico para la producción de larvas de camarón. Guaymas, Sonora. Del 22 al 26 de Mayo de 1995. pp. 10
- López, M.T. 2002. Evaluación nutricia de microalgas marinas en cultivos comerciales de larvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, División de Oceanología, Departamento de Acuicultura. México, pp.63
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193: 265-275
- Lubzens, E., Khayat, M., Ravid, T., Funkenstein, B. y Tietz, A. 1995. Lipoprotein and lipid accumulation within the ovaries of Penaeid shrimp. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 47: 185-195
- Lucien, B.H. 1997. Evolution of world shrimp production: Fisheries and aquaculture. *World Aquaculture*, 28(4):21-33
- Malcolm, R.B. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 145: 79-99

- Malcolm, R.B., Dunstan, G.A., Norwood, S.J. y Miller, K.A., 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal Phycology*, 32:64-73
- Malcolm, R.B. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. pp 282-292
- Mansour, M.P., Volkman, J.K. y Blackburn, S.I. 2003. The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture. *Phytochemistry*, 63: 145-153
- Marsh, J.B. and Weinstein, D.B., 1966. Simple charring method for determination of lipids. *Journal Lipids Research*, 7: 574-576
- Martínez-Córdova, L.R. 1999., Cultivo de Camarones peneidos. Principios y Prácticas. Cap. 4. pp. 67-101, 1ª ed. A.G.T. Editor, S.A.
- Mourente, G., Pereiro, M.P. y Rodríguez, A. 1990. Contenido en ácidos grasos de los lípidos totales, polares y neutros en músculo, hepatopancreas y ovario del crustáceo *Panaeus kerathurus* (Forsk.) antes y después de la puesta. *Aquatic Living Resource*, 3:243-250
- Naranjo, J., Porchas, M.A., Robles, M., Magallón, F.J., Valdez, J. y Villareal, H. 1999. Sobrevivencia, metamorfosis y crecimiento de larvas del camarón *Penaeus californiensis* (Decapoda: Penaidae) alimentadas con diferentes microalgas. *Biología Tropical*, 47(4): 917-922

- Nelson, J.R., Guarda, S., Cowell, L.E. y Hefferman, P.B. 1992. Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30 °C. *Aquaculture*, 106: 357-377
- Nichols, B.W. y Appleby, R.S. 1969. The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae. *Phytochemistry*, 8:1907-1915
- Ocampo, L. 1994. Evaluación del efecto de la temperatura y del peso en el consumo de oxígeno del camarón café *Penaeus californiensis* (Holmes 1900)(Decapoda:Penaeidae). Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencia Marinas. La paz, B.C.S., México. pp. 55
- O'Leary, C.D y Matthews, A.D. 1990. Lipid class distribution and fatty acid composition of wild and farmed prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, 89: 65-81
- Osorio-Galindo, M. 1998. Efecto de la temperatura y salinidad en parámetros poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* Johnson (Crustacea:Copepoda:Calanoidea) en condiciones controladas. Tesis de Maestría en Manejo de Recursos Marinos. Laboratorio de Biología experimental. pp. 45
- Otero, A., Arredondo, B.O., Patiño, M., Lamela, T. y Fabregas, J. 1995. Production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in semicontinuous cultures of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal Marine Biotechnology*, 3:82-85

- Paine, R.T. y Vadas, R.L. 1969. Calorific values of benthic marine algae and their postulated relation to invertebrate. Food preference. *Marine Biology*, 4: 79-86
- Palacios, E., Ibarra, A.M., Ramírez, J.L., Portillo, G. y Racotta, I.S. 1998. Biochemical composition of egg and nauplii in white Pacific shrimp, *Penaeus vannamei*, in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquaculture Resource*. 29: 183-189
- Palacios, E., Pérez, C.I., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M. y Racotta, I.S. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. *Aquaculture*. 171: 309-321
- Paniagua, M., Ramírez, B.L.F., Machuca, G.C. y Salinas, D.H. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe especial OCT-89-01. CICESE, Ensenada, B.C.N.
- Parsons, T.R., Stephens, K. y Strickland, T.D.H. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *Journal Fish Resource*, 18:1001-1016
- Payan-Aguirre, J.C. 1994. Aspectos biológico-poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Copepoda:Calanoidea) para su utilización en acuicultura. Tesis de Maestría en Ciencias Marinas. Laboratorio de Biología experimental. pp. 48
- Pedersen, S.A. y Storm, L. 2002. Northern shrimp (*Pandalus borealis*) recruitment in west Greenland waters. Part II. Lipid classes and fatty acids in Pandalus shrimp larvae: Implications for survival expectations and trophic relationships. *Journal Northwest Atlantic Fisheries Science*, 30:47-60

- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E. y Marcel, R. 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221: 393-406
- Persoone, G. y Claus, C. 1980. Mass culture of algae a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. En: Algae biomass production and use. G. Shelef y C.J. Oedereds (Eds). Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 265-85
- Quinitio, E.T. y Villegas, C.T. 1982. Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon* fabricius larvae fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture*, 29:253-260
- Racotta, I.S., Palacios, E., Hernández, R., Bonilla, A., Pérez, C.I. y Ramírez, J.L. 2003. Criteria for assessing larval and postlarval quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Bonne, 1931). *Aquaculture*. (En prensa)
- Ramos, R., Valdés, I.M. y Molina, C. 2001. Consumo y digestibilidad aparente de tres ingredientes marinos locales incorporados en dietas prácticas para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). *Estudio Oceanológico*, 20: 43-50
- Romero, J.M. y Lara, C. 1987. Photosynthetic assimilation of NO_3^- by intact cells of cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Influence of NO_3^- and NH_4^+ assimilation on CO_2 fixation. *Plant Physiology*, 83: 208-212
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M.E. y Worhoudt, A.V. 2000. El metabolismo de los carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-

- Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. pp 340-359
- Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factors. En: Handbook of microalgas Mass Culture. A. Richmond(ed),. CRC Press, Boca Raton. pp. 69-99
- Salaices, P.H. 1992. Biología del camarón. En: Manual para el cultivo de camarón. Unidad de educación en Ciencia y Tecnología, México. pp. 94
- Sánchez, A., Cerón, M.C., García, F., Molina, E. y Chisti, Y. 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 1015-1023
- Sato, N. y Murata, N. 1980. Temperature shift-induced responses in lipids in the blue green alga *Anabaena variabilis*. The Central role of monogalactosyldiacylglycerol in thermo adaptation. *Biochemical and Biophysical Acta*, 619:349-355
- Sato, N. y Murata, N. 1988. Membrane Lipids. *Methods of enzymology*, 167:251-259
- Schoen, S. 1988. Cell counting. In: Experimental Phycology: a laboratory manual. Lobban, C.S.: D.J. y Kremer, B.R. (Eds.) Cambridge University Press. EUA. pp. 16-22
- Seidam, E.R. y Lawrence, A.L. 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at

- different dissolved oxygen levels. *Journal of World Mariculture Society*, 16: 333-346
- Sorgeloos, P. 1992. Live feeds and their substitution products for larval nutrition of fish shrimp and prawn. 1992. En: Memorias I congreso Ecuatoriano de Acuicultura. pp. 25-36
- Stern, M. 2002. Mercado de pescados y mariscos orgánicos. *Panorama acuícola*, 7:12-13
- Stickney, R.R. 1979. Reproduction, selective breeding and genetics. En: principles of warm water aquaculture. John Wiley & Sons. New York, Chichester, Bribane, Toronto. pp 375
- Suen Yu. Hubbard, J.S. Olser, G. y Tornabene, T.G. 1987. Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis sp.* QII under different nitrogen regimes. *Journal Phycology*, 23:289-296
- Sukenik, A. y Carmeli, Y. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis sp.* *Journal Phycology*, 25:686-692
- Sukenik, A. y Livne, A. 1991. Variations in lipid and fatty acid content in relation to acetyl Co A carboxylase in the marine prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. *Plant Cell Physiology*, 32:371-378
- Sukenik, A. y Wahnnon, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97:61-72

- Sukenik, A., Zmora, O. y Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II *Nannochloropsis sp.* *Aquaculture*, 117:313-326
- Tamaru, C.S., Ako, H., Paguirigan, R. y Pang, L. 2000. Enrichment of artemia for use in freshwater ornamental fish production. Handbook Enrichment of Artemia. 133: 2-22
- Teshima, S., Kanasawa, A., Horinouchi, K. y Koshio, S. 1988. Lipid metabolism in destalked Prawn *Penaeus japonicus*: Induced maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 1123-1129
- Teshima, S., Kanasawa, A., Koshio, S y Horinouchi, K. 1989. Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: Variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas. *Comparative Biochemistry Physiology*, 92: 45-49
- Torrentera, B. L. y Tacoa, A.G.J. 1979. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. FAO
- Thompson, P.A., Guo, M. y Harrison, P.J. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Biology*, 117: 259-268
- Turpin, D.H., Elrifi, I.R., Birch, D.G., Wegwe, H.G. y Holmes, J.J. 1988. Interactions between photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilation in microalgae. 1988. *Canadian Journal Botany*, 66:2083-2097

- Turpin, D.H. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal Phycology*, 27:14-20
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture Engineering*, 4:175-190
- Valdenebro, R.J.O. 1998. Líneas de Investigación y desarrollo tecnológico para la producción de postlarvas de camarón. *Enfoque Acuícola*, 1:11-15
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmán, J., Cailiau, C. y Marty, J.C. 1996. A rapid HPLC method for the determination of phytoplankton pigments in natural waters including the separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*, 18:2377-2382
- Villa, I.M. 1998. Perspectivas y desarrollo de la Camaronicultura en el sur de Sonora. *Enfoque Acuícola*, 1: 5-10
- Viso, C.A. y Marty, C.J. 1993. Fatty Acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry*, 34:1521-1523
- Webb, K.L. y Chu, F.E., 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: Pruder, G.D., Langdon, C. y Conklin, D. (Eds) Biochemical and Physiological Approaches to shellfish nutrition. Proceedings of the second International conference on aquaculture nutrition, Louisiana State University, Louisiana. pp. 272-291

-
- Webber, H.H. 1970. The development of a maricultural technology for the penaeid shrimps of the Gulf and the Caribbean Region. *Helgholander Wiss. Meeresunters.* 20(1-4): 455-463
- Whyte, J.N.C., Bournon, N. y Hodsson, C.A. 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Penaeus vannamei* (jaya) larvae. *Aquaculture*, 78: 333-47
- Whyte, J.N.C. 1990. Nutritional condition of rock scallop, *Crassadoma gigantea* (Gray), larvae fed mixed algal diets. *Aquaculture*, 96: 25-40
- Wilhelm, C. y Manns, L. 1991. Changes in pigmentation of phytoplankton species during growth and stationary phase-consequences for reliability of pigment-based methods of biomass determination. *Journal of Applied Phycology*, 3: 305-310
- Yuan, J.P., Chen, F., Liu, X. y Li, X.Z. 2002. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. *Food Chemistry*, 76: 319-325
- Zhu, J.C. y Lee, K.Y. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9:189-194

ANEXO1

Tabla 1. Promedios diarios y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) de *T. fluviatilis* cultivada con Nitrato de sodio (N1)

Días de Cultivo	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
0	94.9 \pm 4.70	189.9 \pm 27.1	356.6 \pm 10.5
3	74.7 \pm 9.53	178.0 \pm 27.7	318.6 \pm 22.0
6	99.9 \pm 0.94	223.2 \pm 27.5	465.2 \pm 29.8
9	88.5 \pm 7.10	300.4 \pm 9.71	494.5 \pm 10.5
12	102.3 \pm 20.3	282.2 \pm 20.7	476.2 \pm 16.9
15	77.5 \pm 12.7	399.4 \pm 50.3	447.1 \pm 20.9
18	45.2 \pm 7.78	290.2 \pm 9.95	370.1 \pm 8.73

Tabla 2. Promedios diarios y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) de *T. fluviatilis* cultivada con Nitrato de sodio (N2)

Días de Cultivo	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
0	133.2 \pm 19.2	177.1 \pm 78.3	300.2 \pm 1.20
3	158.9 \pm 12.0	188.8 \pm 70.5	338.9 \pm 31.2
6	155.4 \pm 18.3	252.3 \pm 82.5	395.8 \pm 28.9
9	123.7 \pm 43.4	386.7 \pm 10.9	460.4 \pm 51.1
12	110.8 \pm 3.42	188.6 \pm 23.4	411.5 \pm 13.2
15	116.6 \pm 19.1	312.8 \pm 48.7	388.2 \pm 22.4
18	96.27 \pm 2.53	436.6 \pm 5.32	356.4 \pm 40.2

Tabla 3. Promedios diarios y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) de *T. fluviatilis* cultivada con Nitrato de sodio (N3)

Días de Cultivo	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
0	253.9 \pm 50.9	182.6 \pm 5.05	219.6 \pm 16.6
3	325.1 \pm 63.4	216.5 \pm 66.7	244.8 \pm 5.70
6	231.6 \pm 17.4	226.9 \pm 59.9	272.4 \pm 28.2
9	200.0 \pm 24.4	274.1 \pm 36.7	349.1 \pm 44.2
12	182.0 \pm 24.3	203.4 \pm 1.82	360.9 \pm 9.29
15	183.4 \pm 2.27	334.1 \pm 43.0	340.3 \pm 38.7
18	144.7 \pm 7.54	272.1 \pm 64.7	268.5 \pm 32.8

Tabla 4. Promedios diarios y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) de *T. fluviatilis* cultivada con Nitrato de sodio (N4)

Días de Cultivo	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
0	298.7 \pm 0.21	217.4 \pm 19.9	203.9 \pm 6.25
3	351.4 \pm 22.8	215.8 \pm 15.4	240.0 \pm 10.1
6	314.9 \pm 42.6	218.5 \pm 33.7	264.8 \pm 8.86
9	239.7 \pm 36.5	253.7 \pm 10.0	281.9 \pm 61.9
12	186.7 \pm 33.8	141.2 \pm 23.3	326.7 \pm 12.3
15	232.9 \pm 3.62	238.5 \pm 7.44	335.6 \pm 12.5
18	185.6 \pm 10.5	211.5 \pm 5.80	289.1 \pm 13.3

Tabla 5. Promedios diarios y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) de *T. fluviatilis* cultivada con Cloruro de amonio (C1)

Días de Cultivo	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
0	128.5 \pm 22.9	293.4 \pm 12.7	352.9 \pm 5.22
3	126.5 \pm 10.5	350.9 \pm 45.9	378.6 \pm 10.5
6	166.6 \pm 36.6	347.1 \pm 13.2	464.4 \pm 32.5
9	72.21 \pm 20.9	354.3 \pm 22.2	497.7 \pm 11.1
12	78.27 \pm 19.4	220.3 \pm 11.3	501.9 \pm 17.2
15	124.4 \pm 16.6	279.9 \pm 45.6	404.7 \pm 17.7
18	102.9 \pm 11.8	279.1 \pm 22.9	387.6 \pm 11.1

Tabla 6. Promedios diarios y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) de *T. fluviatilis* cultivada con Cloruro de amonio (C2)

Días de Cultivo	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
0	153.5 \pm 17.8	281.6 \pm 54.1	303.2 \pm 5.39
3	143.4 \pm 22.8	351.7 \pm 106.9	348.6 \pm 28.3
6	181.1 \pm 12.2	362.3 \pm 44.0	405.8 \pm 3.52
9	146.8 \pm 11.8	385.6 \pm 13.6	450.9 \pm 28.2
12	124.8 \pm 7.59	223.8 \pm 14.5	457.8 \pm 21.6
15	165.8 \pm 5.84	380.9 \pm 29.1	404.8 \pm 0.08
18	128.5 \pm 23.3	266.6 \pm 21.4	425.3 \pm 14.4

Tabla 7. Promedios diarios y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) de *T. fluviatilis* cultivada con Cloruro de amonio (C3)

Días de Cultivo	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
0	210.3 \pm 11.5	202.8 \pm 39.4	248.2 \pm 11.6
3	230.2 \pm 16.0	205.1 \pm 77.4	263.1 \pm 10.8
6	251.9 \pm 39.8	223.1 \pm 13.7	302.3 \pm 8.15
9	238.3 \pm 52.1	348.6 \pm 20.3	328.6 \pm 24.3
12	151.6 \pm 15.1	173.7 \pm 28.5	370.9 \pm 13.6
15	171.2 \pm 43.7	284.2 \pm 20.6	414.2 \pm 12.0
18	183.8 \pm 56.7	248.1 \pm 16.9	309.4 \pm 7.24

Tabla 8. Promedios diarios y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) de *T. fluviatilis* cultivada con Cloruro de amonio (C4)

Días de Cultivo	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
0	300.6 \pm 0.00	157.0 \pm 19.9	209.4 \pm 17.8
3	393.1 \pm 68.5	142.3 \pm 50.6	235.0 \pm 9.45
6	326.9 \pm 32.9	272.1 \pm 36.4	290.4 \pm 7.86
9	242.3 \pm 12.5	353.0 \pm 54.3	319.8 \pm 6.54
12	250.1 \pm 6.49	142.2 \pm 12.7	338.6 \pm 10.5
15	218.7 \pm 6.95	271.6 \pm 34.8	318.8 \pm 9.05
18	199.4 \pm 11.5	267.9 \pm 30.4	309.2 \pm 14.9

Tabla 9. Valores promedios \pm desviación estándar de temperatura, salinidad, oxígeno y pH de los cultivos larvarios de *L. vannamei* alimentados con las tres dietas experimentales.

Variable	TRATAMIENTO			
	T1 (445 μ mol NaNO ₃)	T2 (222.5 μ mol NH ₄ Cl)	T3 (f/2)	T4 (Sin alimento)
Temperatura(°C)	28.0 \pm 0.4	28.2 \pm 0.3	28.4 \pm 0.5	28.3 \pm 0.3
Salinidad (ups)	35.2 \pm 0.2	35.4 \pm 0.3	35.0 \pm 0.3	35.4 \pm 0.4
Oxígeno (ppm)	5.8 \pm 0.1	5.6 \pm 0.2	5.8 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2
pH	8.0 \pm 0.4	7.9 \pm 0.2	8.2 \pm 0.4	8.0 \pm 0.1