

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE  
ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

---

**EFECTO DE DIETAS MONOESPECIFICAS Y MIXTAS EN EL CRECIMIENTO  
Y SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei*  
(Boone, 1931)**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

MARTÍN PABLO ANTONIO MORENO PÉREZ

Ensenada, Baja California, México, Octubre de 2008

TESIS DEFENDIDA POR  
**Martín Pablo Antonio Moreno Pérez**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

*Director del Comité*

---

Dra. Silvia Emilia Ibarra Obando

*Miembro del Comité*

---

Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez

*Miembro del Comité*

---

Dr. Jorge Adrián Rosales Casián

*Miembro del Comité*

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

*Coordinador del Programa de Posgrado  
en Ciencias con Orientación en  
Acuicultura*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Director de Estudios de Posgrado*

Octubre de 2008

**RESUMEN** de la tesis que presenta **Martín Pablo Antonio Moreno Pérez**, como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS** con orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California, México. Octubre de 2008.

**EFFECTO DE DIETAS MONOESPECIFICAS Y MIXTAS EN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**

Resumen aprobado por:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Director de Tesis

El suministro de alimento vivo es uno de los principales problemas en la acuicultura del camarón debido a que durante las primeras etapas de vida suceden las mayores mortalidades. El objetivo de este trabajo fue evaluar el valor nutrimental de una dieta mono-específica y mixta utilizando cultivos de dos especies de microalgas suministradas como alimento a larvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Se realizaron cultivos mono-específicos por triplicado y no axénicos de *Synechococcus elongatus* y *Chaetoceros muelleri* en sistemas en lotes sin recambio de medio de cultivo en frascos Erlenmeyer (150 ml) y Fernbach (2 l), que sirvieron como inóculo para cultivos semicontinuos en garrafones (15 l). En los cultivos se utilizó el medio "F" descrito por Guillard y Ryther (1962), temperatura de  $20 \pm 1$  °C y luz continua a  $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El porcentaje de dilución utilizado para los cultivos semicontinuos fue de 20% por día para *S. elongatus* y de 30% por día para *C. muelleri*. Durante la fase de estabilidad de los cultivos semicontinuos se evaluó la composición bioquímica de cada especie de microalga. Debido al menor tamaño de *S. elongatus* respecto al de *C. muelleri*, en todos los casos resultó una mayor densidad de células. En los cultivos de *S. elongatus* ocurrieron los mayores porcentajes de carbohidratos, peso orgánico seco y clorofila *a*. En tanto que en los cultivos de *C. muelleri* se presentó un mayor contenido de lípidos. Sin embargo, para ambas especies resultó un porcentaje igual de proteínas. El porcentaje total de aminoácidos esenciales y no esenciales resultó similar entre los cultivos mono-específicos y mixtos. Para *S. elongatus* se encontró un mayor contenido de fenilalanina y alanina, pero los menores valores de cisteína. No se detectaron los ácidos grasos de la serie 22:6n3 (ácido docosahexaenóico: DHA) y 20:5n3 (ácido eicosapentaenóico: EPA) en *S. elongatus*, pero resultó un alto porcentaje de ácido linolénico (18:3n3).

La tasa de crecimiento en las distintas etapas de vida de *L. vannamei* no tuvo diferencia por efecto del tipo de alimento suministrado en forma mono-específica y mixta. Se encontró

consumo preferencial de *S. elongatus* durante las distintas etapas de vida de *L. vannamei*. Esta tendencia fue análoga al utilizar las dietas mixtas de *C. muelleri* y *S. elongatus*. La supervivencia de *L. vannamei* fue similar al utilizar como alimento *S. elongatus*, *C. muelleri* o la mezcla de ambas especies.

Se concluye que *S. elongatus* puede ser utilizada como alimento para la nutrición de etapas larvales de *L. vannamei*, ya que proporciona un valor nutrimental que permite obtener tasas de crecimiento y supervivencia similares a las obtenidas con *C. muelleri*.

**Palabras clave:** *Chaetoceros muelleri*, *Synechococcus elongatus*, crecimiento, composición bioquímica, larvas de camarón.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Martín Pablo Antonio Moreno Pérez**, as a partial requirement to obtain the **MASTER IN SCIENCE** degree with orientation in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, México. October 2008.

**EFFECT OF MONOSPECIES AND MIXED DIETS ON THE GROWTH AND SURVIVOR OF SHRIMP LARVAE *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931)**

The live food supply is one of the main problems in shrimp aquaculture because in the first live shrimp stages high mortalities have been recorded. Our objective was to evaluate the nutritional value of one monospecies and a mixed diet using cultures of two microalgae species as food for white shrimp larvae (*Litopenaeus vannamei*).

The cultures were made in triplicate, axenic and monospecies, for *Synechococcus elongatus* and *Chaetoceros muelleri* in progressively increasing volume starting from an Erlenmeyer flask (150 ml), then to Fernbach flask (2 l) that was used as inocula for the semicontinuous culture in a carboy (15 l). For maintenance of the cultures we used the “f” media of Guillard and Ryther (1962), a temperature of  $20 \pm 1$  °C, and continuous light at  $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The daily dilution percentage used for the semicontinuous cultures was 20% for *S. elongatus* and 30% for *C. muelleri*. During the stabilization stages of the semicontinuous cultures we measured the proximal composition of the microalgae. Because of the small cell size of *S. elongatus* compared to *C. muelleri*, all the cultures of *S. elongatus* had a higher cell density. In the *S. elongatus* cultures we obtained higher carbohydrate content, dry weight, and chlorophyll *a* content. The cultures of *C. muelleri* had a higher lipid content. Both species yielded a similar protein content. The total essential and nonessential amino acid content was similar between the monospecies and mixed cultures. In *S. elongatus* cultures we measured a high content of phenylalanine and alanine, but a lower content of cystein. In the *S. elongatus* cultures, we did not detect any fatty acid 22:6n3 (docosahecaenoic acid: DHA) and 20:5n3 (eicosapentaenoic acid: EPA), but did measure a high content of linolenic acid (18:3n3).

The growth rates of the different live stages of *L. vannamei* were not significantly different when caused by food supplementation with the monospecies and mixed cultures. A preferential food intake was measured for the different life stages of *L. vannamei* and this trend was similar for both the monospecies diets and the mixed diet of *C. muelleri* and *S. elongatus*. The survival of *L. vannamei* was similar when any of the three diets was used.

We concluded that *S. elongatus* can be used as food for the nutrition of larval stages of *L. vannamei* because this microalga provides a high nutritional value that yields growth rates and survival similar to those obtained with *C. muelleri*.

**Keywords:** *Chaetoceros muelleri*, *Synechococcus elongatus*, growth, biochemical composition, shrimp larvae.

## DEDICATORIAS

A mi padre Antonio Moreno quien en donde quiera que este.....  
¡Se que me estas observando!

A mi madre Cristina Pérez por su apoyo incondicional.

A mis hijos Sarai, Saira y Beto.....¡Por ustedes estoy aquí!

A mi cuñado Juan Manuel y mi hermana Katinka .....

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por su paciencia para guiarme académicamente en este trabajo y su incondicional amistad.

A los miembros del comité Dra. Silvia Ibarra Obando, el Dr. Jorge Adrián Rosales Casián y el Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez por sus invaluable observaciones que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios de maestría y al proyecto SEP-CONACyT (clave 45844) por el apoyo económico para la adquisición de materiales y reactivos.

Al M. en C. Juan Manuel Pacheco Vega por su disponibilidad y tiempo brindado para obtener las larvas de camarón.

Al Dr. José Ángel Olivaz Váldez por sus consejos y observaciones durante el mantenimiento de las larvas de camarón.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez por facilitar dos estanques para el mantenimiento de las larvas de camarón.

A Flor Sánchez y Edén Arce, por su colaboración en la instalación del sistema de cultivo y en las evaluaciones de la supervivencia de las larvas de camarón.

A Jerónimo Best, por su colaboración en los conteos celulares durante la etapa de mantenimiento de las larvas de camarón.

A todos y cada uno de mis maestros del CICESE que de manera directa construyeron a mi formación académica.

A todo el personal que labora en el CICESE que de alguna manera influyó en que tuviera una estancia adecuada.

A todos mis compañeros y amigos: Socorro, Iván, Luís, Paola, Getsemani, Ana, Marisol, Marcel, Fernando, Edén, Flor, Vicki, Jesús, Geny, Karina, Silvia y todos los que imperdonablemente pudiera olvidar.

Y no puede faltar Arianita.....tu sabes por que!

A todos ustedes .....GRACIAS.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Resumen español</b>	i
<b>Resumen inglés</b>	iii
<b>Dedicatorias</b>	iv
<b>Agradecimientos</b>	v
<b>Contenido</b>	vi
<b>Lista de Figuras</b>	viii
<b>Lista de Tablas</b>	ix
<b>Capítulo I. INTRODUCCIÓN</b>	1
I. 1 <i>Chaetoceros muelleri</i>	3
I. 2 <i>Synechococcus elongatus</i>	4
I. 3 <i>Artemia</i> sp.	6
I. 4 Camarón blanco del Pacífico ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	7
<b>Capítulo II. OBJETIVOS</b>	9
II. 1 Objetivo general	9
II. 2 Objetivos específicos	9
<b>Capítulo III. MATERIALES MÉTODOS</b>	10
III. 1 Origen de las cepas	10
III. 2 Calidad del agua	11
III. 3 Mantenimiento rutinario de los cultivos	11
III. 4 Crecimiento	11
III. 5 Cultivos semicontinuos	12
III. 6 Análisis bioquímico para <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i>	13
III. 6. 1 Proteínas	13
III. 6. 2 Carbohidratos	14
III. 6. 3 Lípidos	14
III. 6. 4 Peso seco y contenido de cenizas	14
III. 6. 5 Perfiles de aminoácidos	14
III. 6. 6 Perfiles de ácidos grasos	16
III. 6. 7 Clorofila <i>a</i>	17
III. 7 Bioensayo con etapas larvales de camarón <i>L. vannamei</i>	17
III. 7. 1 Obtención de nauplios de <i>L. vannamei</i>	17
III. 7. 2 Aclimatación de nauplios de <i>L. vannamei</i>	17
III. 7. 3 Alimentación de <i>L. vannamei</i>	18
III. 7. 4 Obtención de nauplios de <i>Artemia</i> sp.	18
III. 7. 5 Sistemas de cultivo de nauplios de <i>L. vannamei</i>	20
III. 7. 6 Medición de la talla, largo y ancho del cefalotórax de <i>L. vannamei</i>	20
III. 8 Tratamiento estadístico de los resultados	21

## CONTENIDO (continuación)

<b>Capítulo IV. RESULTADOS</b>	
IV. 1 Crecimiento de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> en sistemas estáticos con Erlenmeyer	22
IV. 2 Crecimiento de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> en sistemas estáticos con Fernbach	26
IV. 3 Crecimiento de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> en sistemas semicontinuos	30
IV. 4 Composición proximal y bioquímica de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i>	36
IV. 5 Perfiles de aminoácidos	36
IV. 6 Perfiles de ácidos grasos	39
IV. 7 Bioensayo con etapas larvales de camarón <i>L. vannamei</i>	41
IV. 7. 1 Crecimiento de <i>L. vannamei</i>	41
IV. 7. 2 Consumo de alimento y supervivencia de <i>L. vannamei</i>	43
<b>Capítulo V. DISCUSIÓN</b>	45
V. 1 Crecimiento de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> en sistemas estáticos	45
V. 2 Crecimiento de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> en sistemas semicontinuos	47
V. 3 Composición proximal y bioquímica de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i>	48
V. 3. 1 Contenido de clorofila <i>a</i>	49
V. 3. 2 Peso seco y cenizas	50
V. 3. 3 Perfiles de aminoácidos y ácidos grasos	52
V. 4 Crecimiento de <i>L. vannamei</i>	55
V. 5 Consumo de alimento por <i>L. vannamei</i>	56
V. 6 Supervivencia de <i>L. vannamei</i>	58
<b>Capítulo VI. CONCLUSIONES</b>	62
<b>Capítulo VII. RECOMENDACIONES</b>	64
<b>Capítulo VIII. LITERATURA CITADA</b>	65

## Lista de Figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 1.	Imagen de la diatomea <i>C. muelleri</i> obtenida por microscopía electrónica (Tomada de <a href="http://www.chbr.noaa.gov/">http://www.chbr.noaa.gov/</a> ).	4
Figura 2.	Imagen de la cianobacteria <i>S. elongatus</i> obtenida por microscopía electrónica. (Tomada por Correa-Reyes y Campa-Ávila).	5
Figura 3.	Nauplio de <i>Artemia</i> en eclosión (Tomada de Browne, 1993).	7
Figura 4.	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células de <i>S. elongatus</i> cultivado en un sistema estático (Erlenmeyer). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	24
Figura 5.	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células de <i>C. muelleri</i> cultivado en un sistema estático (Erlenmeyer). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	25
Figura 6.	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células de <i>S. elongatus</i> cultivado en un sistema estático (Fernbach). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	28
Figura 7.	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células de <i>C. muelleri</i> cultivado en un sistema estático (Fernbach). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	29
Figura 8.	Valores promedio de densidad óptica y del número de células de <i>S. elongatus</i> cultivado en sistema semicontinuo. La flecha ( $\downarrow$ ) indica la muestra para los análisis bioquímicos.	34
Figura 9.	Valores promedio de densidad óptica y del número células de <i>C. muelleri</i> cultivado en sistema semicontinuo. La flecha ( $\downarrow$ ) indica la muestra para los análisis bioquímicos.	35

## Lista de Tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
Tabla I.	Raciones alimenticias (cél ml <sup>-1</sup> por día) basadas parcialmente en el método de Galveston (Smith <i>et al.</i> , 1992) para diferentes estadios de vida de <i>L. vannamei</i> en donde N = nauplio estadio 5, P = postlarva en estadio de desarrollo 1 a 3 y M = mysis en estadio de desarrollo 1 a 3. El alimento suministrando corresponde a <i>S. elongatus</i> , <i>C. muelleri</i> , la mezcla de <i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i> y nauplios de <i>Artemia</i> ( <i>Artemia</i> ml <sup>-1</sup> por día). Se indica el porcentaje de recambio de agua (%R).	19
Tabla II.	Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (DO) inicial (I) y final (F), densidad de células (DC) (cél ml <sup>-1</sup> ) inicial (I) y final (F), tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\sum \mu$ ), para cultivos de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> mantenidos en sistemas estáticos en Erlenmeyer. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias, prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ) a < b.	23
Tabla III.	Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (DO) inicial (I) y final (F), densidad de células (DC) (cél ml <sup>-1</sup> ) inicial (I) y final (F), tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\sum \mu$ ), para cultivos de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> mantenidos en sistemas estáticos en Fernbach. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias, prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ) a < b.	27
Tabla IV.	Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (DO) inicial (I) y final (F), densidad de células (DC) (cél ml <sup>-1</sup> ) antes (A) y después (B) de la dilución, clorofila a ( $\mu\text{gr ml}^{-1}$ ), peso orgánico seco (PSO en $\mu\text{gr} \times 10^{-6}$ cél) y peso de cenizas (PC en $\mu\text{gr} \times 10^{-6}$ cél) para cultivos de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> mantenidos en sistemas semicontinuos. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias, prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ) a < b.	33
Tabla V.	Ecuación de regresión para <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> mantenidos en garrafón con sistemas semicontinuos y los resultados de la prueba de significancia de la pendiente ( $\beta$ ), correlación ( $r^2$ ) y probabilidad ( $P$ ).	33

### Lista de Tablas (continuación)

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
Tabla VI.	Valores promedio y desviación estándar del porcentaje (%) de proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas y la fracción total para cultivos de <i>S. elongatus</i> y <i>C. muelleri</i> mantenidos en sistemas semicontinuos. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias, prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ) $a < b$ .	36
Tabla VII.	Valores promedio del perfil de aminoácidos (% total de peso seco) de la cianobacteria <i>S. elongatus</i> , <i>C. muelleri</i> y la mezcla de <i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i> , cultivada en sistema semicontinuo. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ ) $a < b < c$ .	38
Tabla VIII.	Valores promedio del perfil de ácidos grasos (% total de peso seco) de la cianobacteria <i>S. elongatus</i> , <i>C. muelleri</i> y la mezcla de <i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i> cultivada en sistema semicontinuo. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ ) $a < b < c$ . ** Dato único. ■ No detectado.	40
Tabla IX.	Valores promedio del largo y ancho del cefalotórax y crecimiento para larvas de <i>L. vannamei</i> en diferentes estadios de vida alimentadas con <i>S. elongatus</i> , <i>C. muelleri</i> y la mezcla de <i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i> . El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ ) $a < b < c$ .	42
Tabla X.	Valores promedio de la longitud total (mm), tasa de crecimiento (mm por día) e índice de rendimiento para larvas de <i>L. vannamei</i> en diferentes estadios de vida al ser alimentadas con <i>S. elongatus</i> , <i>C. muelleri</i> y la mezcla de <i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i> . El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ ) $a < b < c$ .	42

**Lista de Tablas (continuación)**

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
Tabla XI.	Valores promedio del consumo (%) de <i>S. elongatus</i> , <i>C. muelleri</i> y la mezcla de <i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i> (50% del peso seco de cada especie) suministradas como alimento en distintos estadios de <i>L. vannamei</i> . El signo ( $\pm$ ) indica desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ ) $a < b < c$ .	43
Tabla XII.	Valores promedio del porcentaje de supervivencia de larvas de <i>L. vannamei</i> del estadio nauplio V hasta postlarva I, al ser alimentadas con <i>S. elongatus</i> , <i>C. muelleri</i> y la mezcla de <i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i> . El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ ) $a < b < c$ .	44

## Capítulo I

---

### INTRODUCCIÓN

---

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos, entre los cuales se incluyen peces, reptiles, anfibios, crustáceos, moluscos, algas y microalgas utilizados para la alimentación, conservación y ornato. El suministro de alimento vivo para organismos en cultivo es uno de los principales problemas en la acuicultura, de ahí la importancia de utilizar nuevas especies y tecnologías de cultivo de microalgas (De Nogales-Pérez y Santos-Perea, 1995).

Las microalgas son organismos del tipo procarionte y eucarionte que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos. Su importancia radica en que son los productores primarios de la cadena trófica, además por la diversidad de tamaño de las especies (5 – 50 micras) son adecuadas para la ingesta de una gran variedad de organismos que se alimentan de manera directa o indirecta de ellas (Renaud *et al.*, 2002). Debido a que las microalgas concentran proteínas, carbohidratos, ácidos grasos y vitaminas es un alimento necesario para la nutrición adecuada de larvas y juveniles de moluscos, crustáceos y ciertos peces herbívoros (Brown *et al.*, 1997; Pedrazzoli *et al.*, 1998). En las últimas cuatro décadas, cientos de especies de microalgas han sido utilizadas como alimento para diversas etapas de vida de organismos cultivados. Sin embargo, menos de veinte especies han tenido un amplio uso en acuicultura. Las especies de microalgas a utilizar en la acuicultura deben

tener ciertas características como: un tamaño apropiado para la ingesta, de 1 a 15 micras para organismos filtradores y de 10 a 100 micras para organismos pastoreadores (Webb y Chu, 1983; Kawamura *et al.*, 1998); las microalgas deben presentar tasas de crecimiento rápidas; ser tolerantes a cambios ambientales (temperatura, luz y nutrientes); tener una composición de nutrientes adecuada para los organismos que las consumirán y que su cultivo no produzca toxinas que pudieran ser transferidas a eslabones superiores de la cadena alimenticia (Brown, 2002).

La optimización de cultivos microalgales se ha enfocado en la importancia de controlar y mejorar la producción de biomasa y la composición bioquímica. El valor nutrimental de un cultivo microalgal puede modificarse por efecto de las variables ambientales y las condiciones de cultivo (Enright *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1997). Sin embargo, una mezcla seleccionada de distintas especies de microalgas puede ofrecer un mejor valor nutrimental para la alimentación de organismos en cultivos. Los cultivos de microalgas que tienen propiedades adecuadas de nutrición como alimento para organismos en cultivo, ya sea como monoespecies o en una dieta mixta son, entre otras: *Chaetoceros calcitrans*, *C. muelleri*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica*, *Skeletonema costatum* y *Thalassiosira pseudonana* (Enright *et al.*, 1986; Thompson *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1997).

Los antecedentes científicos indican que la utilización de microalgas como alimento de zooplancton y moluscos al suministrar dietas monoespecíficas generan menores tasas de crecimiento, en comparación con los organismos que se alimentan con dietas mixtas de dos o tres especies (Richmond, 1986; Borowitzka, 1988; Richmond, 2003). La mayor eficiencia

nutricional de las dietas mixtas se debe a que usualmente, el tener una dieta de microalgas con mas de una especie, tendrá una composición bioquímica mas variada por lo que mejorará la tasa de crecimiento y de supervivencia de los organismos que la consuman como alimento.

A pesar de los diversos esfuerzos que se han realizado para tratar de sustituir el suministro de alimento vivo, hasta la fecha ninguna de las formulaciones alternas permite obtener niveles comparables de crecimiento y de supervivencia de los organismos cultivados (Artiles *et al.*, 2001).

### **I. 1 *Chaetoceros muelleri***

*Chaetoceros* es probablemente el genero mas numeroso de diatomeas planctónicas con aproximadamente 400 especies descritas (von Quillfeldt, 2001) y se caracterizan por ser eucariontes, tener una pared celular de sílice y algunas con setas, son unicelulares pero algunas especies forman cadenas. *C. muelleri* es unicelular y puede vivir a temperaturas de entre 15 y 30 °C y salinidades de 35 ppm. Esta especie es una de las mas utilizadas para alimentar organismos acuáticos debido a su tamaño (4 a 9 µm en promedio) y su alto contenido de ácidos grasos polinsaturados (Treece y Fox, 1993; Pacheco-Vega, 2003); además, *C. muelleri* es la especie mas utilizada como alimento vivo en la mayoría de las granjas de producción de camarón en el Noroeste de México (López-Elías *et al.*, 2005).

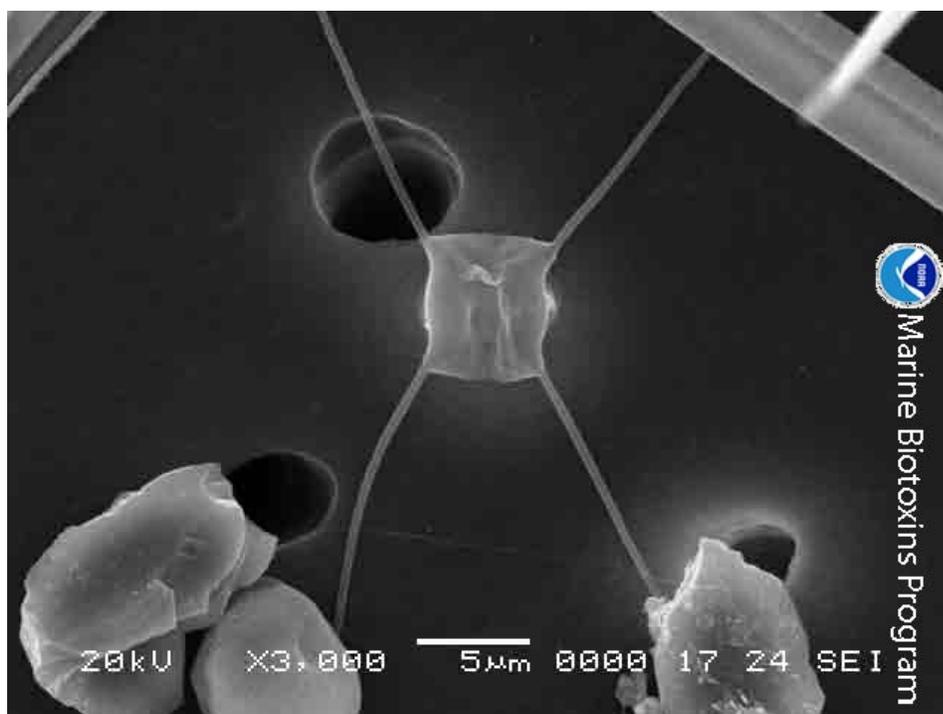


Figura 1. Imagen de la diatomea *C. muelleri* obtenida por microscopía electrónica (Tomada de <http://www.chbr.noaa.gov/>).

## I. 2 *Synechococcus elongatus*

Las cianobacterias son un grupo de organismos procariontes, fotosintéticos y por sus características fisiológicas les permite adaptarse a grandes cambios ambientales (Tandeu de Marsac y Houmard, 1993); algunas especies son capaces de sobrevivir bajo condiciones extremas tales como desiertos, aguas termales y lagos alcalinos (Oren, 2000). Las cianobacterias pueden aportar metabolitos biológicamente activos (Borowitzka, 1995), con una variedad de aplicaciones biotecnológicas (Valle Ramírez de Arellano, 2007), y como alimento en la producción acuícola (Borowitzka, 1988; Campa-Ávila, 2002; Rosales *et al.*, 2004). La cepa de *S. elongatus* pertenece al grupo de las Cianofíceas (algas verde-azul), es una especie que fue aislada en una granja de cultivo de camarón en San Blas, Nayarit,

México (Aguilar-May, 2002), que tiene un tamaño promedio de 2.7  $\mu\text{m}$  y puede formar cadenas de hasta seis células. Esta cianobacteria tiene un gran potencial de uso acuícola, por su tamaño, la tolerancia a condiciones extremas (salinidad, iluminación y temperatura), su composición proximal, el contenido de aminoácidos y ácidos grasos polinsaturados (Campa-Ávila, 2002), su alta capacidad de remoción de nutrientes (Aguilar-May, 2002, 2006; Aguilar-May y Sánchez-Saavedra, 2008) y por su actividad antimicrobiana (Bernáldez *et al.*, 2008).

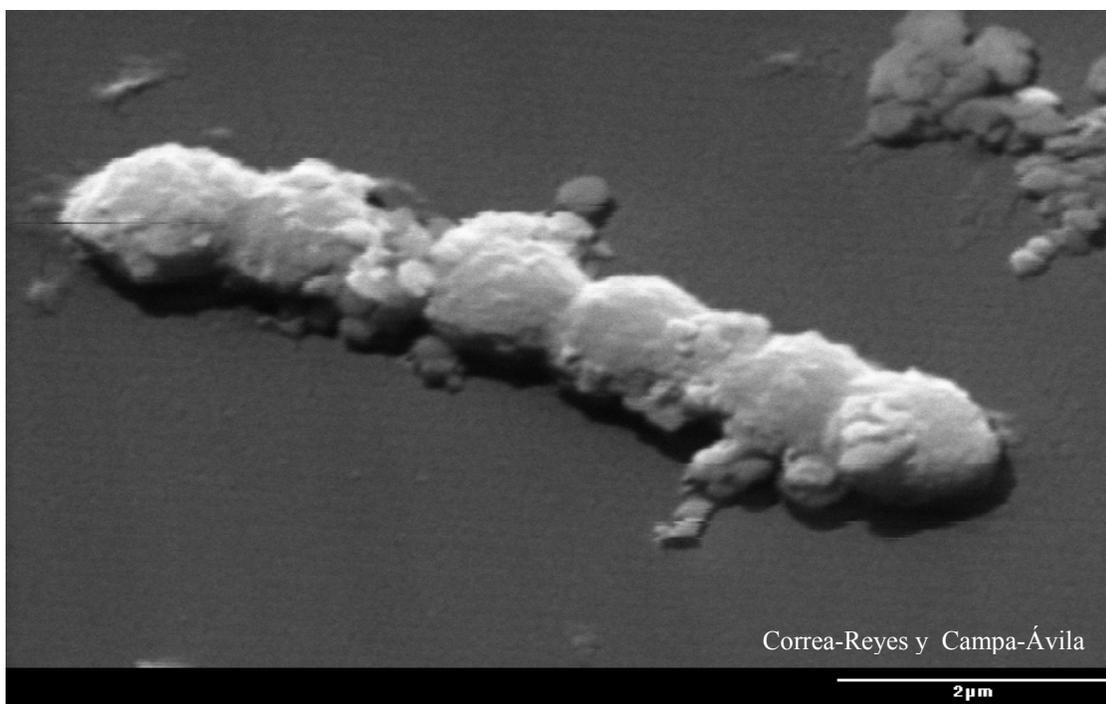


Figura 2. Imagen de la cianobacteria *S. elongatus* obtenida por microscopía electrónica (Tomada por Correa-Reyes y Campa-Ávila).

### **I. 3 *Artemia* sp.**

*Artemia* es un crustáceo perteneciente a la subclase Branchiopoda y representa un género ampliamente utilizado en la acuicultura por sus características nutrimentales y de crecimiento (Castro-Barrera *et al.*, 2003). Sus nauplios se utilizan como alimento en las primeras etapas de vida de los peces y los crustáceos. El amplio uso de *Artemia* en la acuicultura se debe a la facilidad para obtener un cultivo a partir de quistes que pueden ser descapsulados. Es un organismo halotolerante, resistente a cambios de temperatura y además tiene la ventaja que puede servir como vector de nutrientes, medicamentos y hormonas para los organismos que los consumen (Gelabert y De La Cruz, 1990). La calidad nutritiva de la *Artemia* puede variar entre sus especies y de las condiciones ambientales en que se producen los quistes. El contenido de proteínas varía de 41% a 66% en nauplios de diferentes regiones, y el contenido de proteínas en adultos entre 58% a 64% (Castro *et al.*, 1995). Los nauplios y los adultos de *Artemia*, usualmente contienen los aminoácidos que son esenciales en la nutrición de peces y crustáceos. En la *Artemia* el contenido de aminoácidos respecto al de proteínas es más estable, debido probablemente, a que es una característica controlada genéticamente (Castro, 1993). Además, *Artemia* tiene ácidos grasos polinsaturados como el eicosapentaenóico (20:5n-3), que es indispensable en la nutrición de organismos marinos, además contiene ácidos grasos saturados como el linolénico (18:3n-3) que es necesario en las etapas larvales de especies de agua dulce (Castro y Gallardo, 1993).



Figura 3. Nauplio de *Artemia* en eclosión (Tomada de Browne, 1993).

#### **I. 4 Camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)**

El cultivo del camarón ha tenido un importante incremento en las últimas dos décadas y es una actividad económicamente importante, esto se debe a su elevado costo en el mercado y a la demanda nacional e internacional.

En México la producción total de camarón en el año 2006 fue aproximadamente de 158 mil toneladas, de las cuales el 43% fueron de captura en altamar y 57% de cultivo ([www.conapesca.sagarpa.gob.mx](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx)). La especie de camarón más utilizada para el cultivo ha sido *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2006), como otras especies de peneidos cambia su morfología durante las distintas etapas del ciclo de vida. Durante la etapa de nauplio (N1-N5), se caracteriza por que nada intermitente, es fototáctica positiva y se alimenta de su reserva vitelina. En el estadio de protozoa (I, II y III) cambia a una alimentación herbívora usualmente de fitoplancton, en la etapa de mysis inicia alimentación carnívora, sin

embargo, continúa alimentándose del fitoplancton. En el hábitat natural *L. vannamei* cambia sus hábitos planctónicos aproximadamente cinco días después de su metamorfosis a postlarva, trasladándose a la zonas costeras e inicia su alimentación con base en detritos bénticos, gusanos, bivalvos y crustáceos. Esta especie tiene una coloración blanco translúcido, pero puede tener variaciones de acuerdo al sustrato, alimentación y turbidez del agua, puede alcanzar una talla máxima de 23 cm y por lo general las hembras crecen con mayor rapidez y alcanzan tallas mayores (FAO, 2008). Su hábitat principal es el fondo lodoso y profundidades de hasta 72 metros, teniendo preferencia por regiones costeras con manglares y de estuarios (Dore y Frimodt, 1987). *L. vannamei* se distribuye geográficamente desde el Pacífico Oriental de Sonora hasta el Norte de Perú (Pérez Farfante y Kensley, 1997).

Los camarones peneidos se destacan en la actividad acuícola a escala mundial por su alto valor comercial en el mercado, y aunque en 1980 menos del 1% del camarón provenía de las granjas comerciales en la actualidad su cultivo muestra un incremento acelerado y se considera que en un futuro cercano alcance el 50% de la producción mundial de camarón (Rosenberry, 2004).

La producción acuícola del camarón se ha incrementado por su alta demanda en los mercados nacionales y extranjeros, por tanto es necesario buscar alternativas de alimentación para los estadios larvales del camarón y lograr mayores tasas de crecimiento y supervivencia durante su cultivo.

## Capítulo II

---

### OBJETIVOS

---

#### II. 1 Objetivo general

Evaluar el valor nutricional de una dieta mixta utilizando cultivos de dos especies de microalgas suministradas como alimento a larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

#### II. 2 Objetivos específicos

1. Evaluar la tasa de crecimiento poblacional de cultivos estáticos de *Synechococcus elongatus* y *Chaetoceros muelleri*.
2. Evaluar la composición proximal y bioquímica de cultivos semicontinuos de *S. elongatus* y *C. muelleri* mantenidos en forma individual y una mezcla de las dos especies
3. Evaluar el crecimiento y la supervivencia de las larvas de camarón blanco (*L. vannamei*), alimentadas con *S. elongatus* y *C. muelleri* suministradas en forma individual y mixta.

## Capítulo III

---

### MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### III. 1 Origen de las cepas

En esta investigación se utilizó la cianobacteria *S. elongatus* (Naegeli, 1849) Naegeli es una cepa que fue aislada por la técnica de dilución seriada por Aguilar-May (2002), a partir de muestras de agua de una granja de cultivo de camarón. Esta especie se caracteriza por tener células aisladas y por formar colonias lineales de hasta seis células dependiendo de la fase de crecimiento. Las células individuales tienen un tamaño promedio de 2.7 micras (Aguilar-May, 2006). La especie de *S. elongatus* se caracterizó molecularmente por el medio del gen 16 S (Aguilar-May y Sánchez-Saavedra, 2008).

También se utilizó la diatomea *C. muelleri* (Lemmerman, 1898) que fue obtenida de la Colección de Cepas de Microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La cepa de la diatomea tiene un tamaño promedio de 4.9 x 8.8 micras (Pacheco-Vega, 2003) y fue aislada por el Instituto Oceánico de Hawai, Estados Unidos, en 1981 y se ha mantenido desde entonces en el medio “f/2” en el CICESE.

### III. 2 Calidad del agua

El agua de mar que se utilizó para el mantenimiento de los cultivos provino del sistema semicerrado que abastece al laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura del CICESE. El agua de mar se pasó por una serie de filtros de algodón de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$  y fue irradiada con luz ultravioleta. El agua de mar que se utilizó en volúmenes de hasta 2 l fue esterilizada en una autoclave a 121  $^{\circ}\text{C}$  y a una presión de 1.02  $\text{kg cm}^{-2}$  por un periodo de 20 minutos. Para los cultivos mantenidos en volúmenes de 15 l, el agua de mar se desinfectó con la técnica descrita por Hemerick (1973), en la cual se adicionó hipoclorito de sodio comercial al 6% (3ml  $\text{l}^{-1}$  de agua), por 24 horas y después se neutralizarlo con tiosulfato de sodio (0.15  $\text{g l}^{-1}$ ) y aireación.

### III. 3 Mantenimiento rutinario de los cultivos

Se mantuvieron cultivos estáticos, no axénicos y monoespecíficos para cada una de las cepas de *S. elongatus* y de *C. muelleri*. Los cultivos de cada especie se realizo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962). En la cepa de *S. elongatus* se utilizó una doble proporción de vitaminas a la descrita en el medio “f” (Guillard y Ryther, 1962). Los cultivos se tuvieron a una temperatura ambiental de  $20 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  y a una intensidad de luz continua de 100  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provista por medio de lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Silvania F40 CW).

### III. 4 Crecimiento

Para evaluar el crecimiento de las dos especies las células se contaron en un hematocitómetro Marienfeld<sup>®</sup> de 0.1 mm de profundidad. Con los datos de los conteos

celulares se calculó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) utilizando la ecuación descrita por Fogg y Thake (1987) y la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ; Nieves *et al.*, 1998).

### **III. 5 Cultivos semicontinuos**

Con el propósito de tener una producción continua de microalgas se mantuvieron cultivos semicontinuos y monoespecíficos de *S. elongatus* y de *C. muelleri*. Los cultivos se hicieron por triplicado en volúmenes progresivamente mayores desde Erlenmeyer (150 ml), Fernbach (2 l) y botellón de vidrio o Carboy (15 l). El medio de cultivo utilizado para los cultivos semicontinuos y las condiciones ambientales se describieron en la sección II. 3.

Para los cultivos mantenidos en botellón, diariamente se evaluó el número de células producida por medio de conteos directos con un hematocitómetro. Cuando los cultivos se encontraban en la fase exponencial y antes de iniciar la fase de declinamiento relativo del crecimiento se inició la dilución de los cultivos. Los porcentajes de dilución utilizados para cada especie fueron los evaluadas previamente por otros autores: 20% por día para *S. elongatus* (Campa-Ávila, 2002) y 30% por día para *C. muelleri* (Pacheco-Vega, 2003). Se verificó la estabilidad de los cultivos semicontinuos con los porcentajes de dilución utilizados y en su caso se adecuó a las condiciones experimentales de este trabajo.

El crecimiento de las células de *C. muelleri* y *S. elongatus* en los cultivos semicontinuos se evaluaron por medio de mediciones diarias de la densidad óptica (DO) antes y después de diluir. Los valores de DO se obtuvieron con un espectrofotómetro Hach modelo DR/4000 UV-VIS, a una longitud de onda de 550 nm para evitar los picos de absorción de las clorofilas. Diariamente se midió la cantidad de células por medio de conteos directos como

fue descrito anteriormente. Además, cada día se midió el valor del pH del volumen de cultivo cosechado para cada especie.

### **III. 6 Análisis bioquímico para *S. elongatus* y *C. muelleri***

A partir del volumen cosechado de los cultivos semicontinuos por triplicado se tomaron muestras en días alternos para los análisis de la composición bioquímica de cada una de las especies. Del volumen cosechado se colectó una submuestra de 15 ml y se concentró en filtros de fibra de vidrio (Poretics GF/C). Cada filtro fue previamente lavado con agua destilada e incinerado a 470 °C por cuatro horas. Todas las muestras se almacenaron congeladas a -20 °C hasta obtener el total de las muestras en los experimentos para realizar los análisis químicos respectivos.

#### **III. 6. 1 Proteínas**

La extracción de las proteínas se hizo con hidróxido de sodio, siguiendo el método descrito por Malara y Charra (1972a). Las condiciones óptimas para la extracción de proteínas de *S. elongatus* son 0.2 N de NaOH a 100 °C por 30 minutos (Campa-Ávila 2002 y Correa-Reyes 2001). Para la reacción de proteínas se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteau y se cuantificó por el método de Lowry *et al.* (1951). Para la elaboración de la curva de calibración de las proteínas, se utilizó como estándar el suero de albúmina de bovino (98%) Sigma<sup>®</sup>.

### **III. 6. 2 Carbohidratos**

La extracción de carbohidratos se efectuó con ácido sulfúrico siguiendo la técnica descrita por Whyte (1987) y la determinación se realizó con fenol según el método de Dubois *et al.* (1956) y Malara y Charra (1972b). El estándar utilizado para la elaboración de la curva de calibración fue una solución de glucosa (99%) Sigma<sup>®</sup>.

### **III. 6. 3 Lípidos**

Se extrajeron los lípidos con una mezcla de cloroformo-metanol-agua, siguiendo la técnica descrita por Bligh y Dyer (1959) y modificada por Chiaverini (1972). La cuantificación de lípidos se efectuó por el método de Pande *et al.* (1963). Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó como solución estándar tripalmitina (99%) Sigma<sup>®</sup>.

### **III. 6. 4 Peso seco y contenido de cenizas**

Las evaluaciones del porcentaje de contenido orgánico y el porcentaje del contenido de cenizas para los cultivos semicontinuos, se efectuaron en días alternos a partir del volumen cosechado según la técnica propuesta por Sorokin (1973). Las muestras se mantuvieron en una estufa a 60 °C hasta obtener valores de peso constante. Para conocer el contenido de cenizas, las muestras se incineraron en una mufla a 470 °C por cuatro horas y por diferencias entre el peso seco constante y el peso después de incinerar, se obtuvo el porcentaje de cenizas.

### **III. 6. 5 Perfiles de aminoácidos**

Para el perfil de aminoácidos se utilizó por triplicado una submuestra de 25 mg de biomasa seca del volumen cosechado en los cultivos semicontinuos de *S. elongatus* y *C. muelleri*.

Todas las muestras fueron lavadas con formiato de amonio al 3%, congeladas a -20 °C y liofilizadas en un liofilizador Labconco (Lyph-Lock 6 liter Freeze Dry System<sup>®</sup>).

Para el análisis de aminoácidos, se tomó una submuestra de cada uno de los tratamientos, la cual fue desengrasada por el método Soxhlet (APHA, 1980). De la submuestra se pesó una alícuota de aproximadamente 20 mg y la extracción de la proteína se hizo en tubos de vidrio con tapa roscada se les agregó 2 ml de HCl 6N fenólico (0.06%) y se dejó en una atmósfera libre de oxígeno desplazado con nitrógeno. Cada tubo se calentó a 110 °C por 24 h para llevar a cabo la digestión de las muestras. La muestra digerida se aforó a 50 ml con agua desionizada y se agregaron 2 ml de estándar interno (ácido  $\alpha$  amino-n-butírico), se filtraron 15 ml de muestra y se congeló en una atmósfera de nitrógeno hasta su análisis.

Las muestras se descongelaron y en un vial ámbar de 1.5 ml de capacidad se adicionaron 70  $\mu$ l de amortiguador de boratos, 20  $\mu$ l de derivatizador y 10  $\mu$ l de muestra. El vial con los reactivos y la muestra se calentó durante diez minutos a 55 °C. Se inyectaron 10  $\mu$ l en un cromatógrafo líquido de alta precisión (High Performance Liquid Chromatograph: HPLC) (Waters AccQTag Chemistry Package). El tiempo de reacción para cada muestra fue de 50 minutos. La concentración de aminoácidos se calculó a partir de las áreas obtenidas en cada aminograma.

Los análisis de aminoácidos se hicieron en el Laboratorio de Cromatografía de la unidad de servicios de apoyo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por medio de servicios profesionales.

### III. 6. 6 Perfiles de ácidos grasos

Para conocer la composición de ácidos grasos se utilizaron 20 ml de submuestra de cada tratamiento. La extracción de cada muestra se hizo siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959) utilizando una mezcla de metanol, cloroformo y agua (1:1:0.9), las alícuotas de los lípidos extraídos fueron puestas a reflujo por tres minutos en una solución en metanol de 0.5 M KOH. La metilación fue lograda por reflujo por tres minutos en una solución de trifluoruro de Boro 14% en metanol (BF<sub>3</sub>-MeOH), según lo sugerido por Durazo-Beltrán (2003) y Metcalfe *et al.* (1966). Los metil ésteres de los ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas con simple cuadrupolo (VARIAN CP-3800-1200), con una columna capilar (Omegawax 250) (30 m · 0.32 mm, 0.25 µm grosor de la película, Supelco), detector de ionización de flama (260 °C) e hidrógeno como gas de acarreo. La temperatura inicial del horno fue de 140 °C y se mantuvo por 5 minutos. Posteriormente, se incrementó a una tasa de 4 °C por minuto hasta alcanzar los 250 °C. La identificación de los ácidos grasos se efectuó por comparación con los tiempos de retención relativos de estándares (ésteres metílicos de aceites de fuente marina PUFA-1, PUFA-3, Supelco). La cuantificación de ácidos grasos se hizo con el ácido nonadecanoico (19:0) como estándar interno.

Los análisis de ácidos grasos se realizaron en el Laboratorio de Cromatografía de la unidad de servicios de apoyo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por medio de servicios profesionales.

### **III. 6. 7 Clorofila *a***

El contenido de clorofila *a* se evaluó utilizando acetona al 90% siguiendo la técnica descrita por Parsons *et al.* (1984).

### **III. 7 Bioensayo con etapas larvales de camarón *L. vannamei***

La producción masiva de microalgas mantenida en los cultivos semicontinuos descritos en la sección III. 5 se suministró como alimento a las larvas de camarón.

#### **III. 7. 1 Obtención de nauplios de *L. vannamei***

Los nauplios de camarón blanco (*L. vannamei*) fueron obtenidos de un desove con camarones cultivados provenientes del laboratorio de producción de postlarvas de camarón (Granjas Marinas de Sinaloa, S.A. de C.V.) ubicado en la Paz Baja California Sur. El lote de organismos fue de aproximadamente de 100,000 nauplios, que fueron transportados en bolsas de plástico con oxígeno a saturación y temperatura de 25 °C. Los nauplios se transportaron dentro de una hielera por vía terrestre. Los organismos fueron llevados al laboratorio de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California.

#### **III. 7. 2 Aclimatación de nauplios de *L. vannamei***

Los nauplios se colocaron en una cubeta de plástico conteniendo agua de mar a la misma temperatura a la cual fueron recibidos. Se les incrementó la temperatura gradualmente en un período de dos horas hasta igualar los parámetros de siembra. Posteriormente los

nauplios fueron transferidos a cubetas de 18 l de capacidad con 10 l de volumen de agua, mediante el método volumétrico, utilizando varias alícuotas de 100 ml de manera aleatoria hasta obtener la densidad de siembra de 100 nauplios por litro.

### **III. 7. 3 Alimentación de *L. vannamei***

Se incrementó la razón de alimento (cél ml<sup>-1</sup>) de *C. muelleri* y *S. elongatus* de nauplio V hasta protozoa II, seguido de un cambio paulatino de la dieta suministrando nauplios de *Artemia* iniciando en protozoa III y hasta mysis III.

La tabla de raciones de alimentación para cada especie de microalga fue considerada según lo descrito en el método de Galveston para *C. muelleri* (Smith *et al.*, 1992). Debido a que *S. elongatus* no ha sido previamente utilizada como alimento para las larvas de camarón, no se conoce la ración alimenticia. Por lo anterior, se consideraron las diferencias en el tamaño de las células, en el peso seco de *C. muelleri* y de *S. elongatus*, con lo anterior se hizo una equivalencia en las cantidades de células a utilizar de *S. elongatus* y la mezcla de ambas especies con base en peso seco de *C. muelleri* por millón de células descritas en el método de Galveston (Smith *et al.*, 1992)

### **III. 7. 4 Obtención de nauplios de *Artemia* sp.**

Durante los estadios de protozoa II hasta el estadio de mysis III las larvas de camarón requieren consumir nauplios de *Artemia*. La calidad de la *Artemia* fue “Premium” comercializada por el grupo "INVE". Los quistes fueron originarios del Gran Lago Salado, procesados y empacados en Grantsville, Utah Estados Unidos de Norte América. La composición bioquímica de los nauplios de *Artemia* según indica INVE® es de 57% de

proteínas y 22% de lípidos. Para la eclosión de los quistes se debilitó el corion con hipoclorito de sodio al 6% diluido al 50% con agua, una vez que eclosionaron los nauplios de *Artemia*, se suministraron a las larvas de camarón considerando las raciones descritas en el método de Galveston (Smith *et al.*, 1992) y modificadas para *S. elongatus* y la mezcla de ambas especies (Tabla I). Los nauplios recién eclosionados fueron congelados y almacenados a una temperatura de -4 °C y antes de suministrarse como alimento a las larvas se descongelaron a temperatura ambiente por un periodo de tres horas.

Tabla I. Raciones alimenticias (cél ml<sup>-1</sup> por día) basadas parcialmente en el método de Galveston (Smith *et al.*, 1992) para diferentes estadios de vida de *L. vannamei* en donde N = nauplio estadio 5, P = postlarva en estadio de desarrollo 1 a 3 y M = mysis en estadio de desarrollo 1 a 3. El alimento suministrando corresponde a *S. elongatus*, *C. muelleri*, la mezcla de *S. elongatus* + *C. muelleri* y nauplios de *Artemia* (*Artemia* ml<sup>-1</sup> por día). Se indica el porcentaje de recambio de agua (%R).

Estadio	Microalgas		Mezcla de microalgas	<i>Artemia</i>	%R
	<i>C. muelleri</i>	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i> + <i>S. elongatus</i>		
N-5	62 000	680 000	30 000 + 341 000	0	0
P-1	120 000	1 300 000	62 000 + 679 000	0	0
P-2	120 000	1 300 000	62 000 + 679 000	0	30
P-3	120 000	1 300 000	62 000 + 679 000	0.5	50
M-1	100 000	1 100 000	50 000 + 563 000	1.5	50
M-2	75 000	846 000	37 000 + 422 000	5	50
M-3	50 000	560 000	25 000 + 282 000	8	60

### **III. 7. 5 Sistemas de cultivo de nauplios de *L. vannamei***

El sistema experimental consistió en dos estanques de fibra de vidrio de 380 l que contenían las 15 unidades experimentales. Las unidades experimentales consistieron en 15 cubetas plásticas de 18 litros de capacidad color blanco. Las cubetas fueron distribuidas en forma aleatoria y mantenidas en un baño maría, con iluminación continua y provista por lámparas fluorescentes de luz de día con irradiancia entre 28 - 33  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para mantener la temperatura adecuada dentro de un rango de 27 a 29 °C, el baño maría incluyó tres calentadores sumergibles, controlados individualmente por un sistema digital de temperatura marca “Aqua Logic Inc.” con una precisión de  $\pm 0.5$  °C.

Se hizo un recambio diario de agua en los sistemas experimentales, por lo cual fue necesario mantenerla en la misma temperatura. Se utilizó un reservorio plástico con 100 litros de agua de mar filtrada como ya descrito en la sección III. 2, y un calentador sumergible de similares características a las ya descritas.

### **III. 7. 6 Medición de la talla, largo y ancho del cefalotórax de *L. vannamei***

Al inicio y al final de la fase experimental con las larvas de camarón se midió la talla, con una submuestra de organismos de cada tratamiento que fueron preservadas con Lugol acidificado. Las mediciones de la talla se efectuaron con un microscopio estereoscópico Olympus® modelo SZ con una reglilla de calibración. Se evaluó la supervivencia de los organismos en cada tratamiento al considerar el número inicial de organismos colocados en cada tratamiento y el número al final del experimento.

Para cada tratamiento se evaluó el índice de rendimiento (IR), o incremento relativo de la biomasa según el tiempo del bioensayo. Este índice permitió considerar distintas variables que influyen en el crecimiento de larvas. El IR, se calculó de acuerdo a la ecuación descrita por Díaz-Iglesias *et al.* (1991), que considera el tiempo del bioensayo, la supervivencia y la ganancia en peso. Debido al tamaño pequeño de los organismos el IR se modificó para este estudio y se utilizó la longitud total en lugar de la ganancia en peso.

### **III. 8 Tratamiento estadístico de los resultados**

Las posibles diferencias en el crecimiento de la longitud total de larvas de *L. vannamei* y las posibles diferencias en los cultivos estáticos de *C. muelleri* y de *S. elongatus* se evaluaron por medio de un análisis de covarianza (ANCOVA). Previo a éste análisis estadístico se tomó en consideración los supuestos que sustentan esta prueba: la normalidad y homogeneidad de varianzas (Zar, 1984). Cuando se obtuvieron diferencias entre tratamientos, se aplicó un análisis *a posteriori* (Zar, 1984).

Se utilizó un análisis de varianza de una vía para comparar los valores de la composición bioquímica obtenida de *C. muelleri* y *S. elongatus* cultivadas en los sistemas semicontinuos. Esta misma prueba estadística se utilizó para comparar los valores de crecimiento, supervivencia y del IR obtenidos durante el bioensayo con larvas de camarón.

Los análisis estadísticos se realizaron con un alfa de 0.05 y con el paquete de programas STATISTICA<sup>®</sup> versión 6 para Windows (StatSoft, Inc. 2002).

## Capítulo IV

---

### RESULTADOS

---

#### IV. 1 Crecimiento de *S. elongatus* y *C. muelleri* en sistemas estáticos con Erlenmeyer

Los cultivos de *S. elongatus* se iniciaron con  $1.7 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>, con una fase de acondicionamiento de un día, seguida de una fase exponencial hasta el día doce sin evidente fase estacionaria que alcanzaron una densidad promedio de  $68.4 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> (Figura 4, Tabla II).

Los valores promedio de densidad óptica para de los cultivos de *S. elongatus* tuvieron una tendencia similar de crecimiento a la descrita para los conteos celulares. Se evaluó una tasa de crecimiento promedio ( $\mu$ ) de 1.39 por día durante la fase exponencial y una tasa de crecimiento acumulada ( $\sum \mu$ ) promedio de 5.35 (Figura 4, Tabla II).

Los cultivos de *C. muelleri* se iniciaron con  $3.4 \times 10^5$  cél ml<sup>-1</sup>, con una fase de acondicionamiento de un día, seguido de una fase exponencial de tres días. A partir del día cuatro inició la fase de crecimiento lento y después del día seis se encontró una fase semi exponencial hasta el día doce. Los cultivos de *C. muelleri* no tuvieron una fase estacionaria definida y alcanzaron una densidad promedio final de  $6.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> (Figura 5, Tabla II).

Los valores promedio de densidad óptica para los cultivos de *C. muelleri* tuvieron una tendencia similar de crecimiento a la descrita para los conteos celulares. Se evaluó una tasa

de crecimiento promedio ( $\mu$ ) de 1.30 por día durante la fase exponencial, y una tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma \mu$ ) promedio de 4.13 (Figura 5, Tabla II).

Al comparar las tasas de crecimiento entre las dos especies cultivadas se encontró que los cultivos de *S. elongatus* tuvieron diferencias ( $P < 0.001$ ) en la densidad celular respecto a la obtenida en los cultivos de *C. muelleri*. No se evaluó diferencia significativa ( $P = 0.663$ ) en la tasa de crecimiento durante la fase exponencial ( $\mu$ ) para las dos especies. Sin embargo, *S. elongatus* resultó con una tasa de crecimiento acumulada mayor ( $\Sigma \mu = 5.35$ ) significativa respecto a la obtenida para *C. muelleri* ( $\Sigma \mu = 4.13$ ) ( $P < 0.001$ ) (Tabla II).

Tabla II. Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (DO) inicial (I) y final (F), densidad de células (DC) (cél ml<sup>-1</sup>) inicial (I) y final (F), tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma \mu$ ), para cultivos de *S. elongatus* y *C. muelleri* mantenidos en sistemas estáticos en Erlenmeyer. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias, prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ) a < b.

	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	Probabilidad
DO I	0.025 $\pm$ 0.002a	0.029 $\pm$ 0.002a	$P = 0.070$
DO F	0.383 $\pm$ 0.004b	0.315 $\pm$ 0.007a	$P < 0.001$
DC I	1.7 x10 <sup>6</sup> $\pm$ 8.9 x10 <sup>4</sup> b	3.4 x10 <sup>5</sup> $\pm$ 1.8 x10 <sup>4</sup> a	$P < 0.001$
DC F	68.4 x10 <sup>6</sup> $\pm$ 3.2 x10 <sup>6</sup> b	6.0 x10 <sup>6</sup> $\pm$ 3.8 x10 <sup>5</sup> a	$P < 0.001$
$\mu$	1.39 $\pm$ 0.45a	1.30 $\pm$ 0.19a	$P = 0.663$
$\Sigma \mu$	5.35 $\pm$ 0.06b	4.13 $\pm$ 0.04a	$P < 0.001$

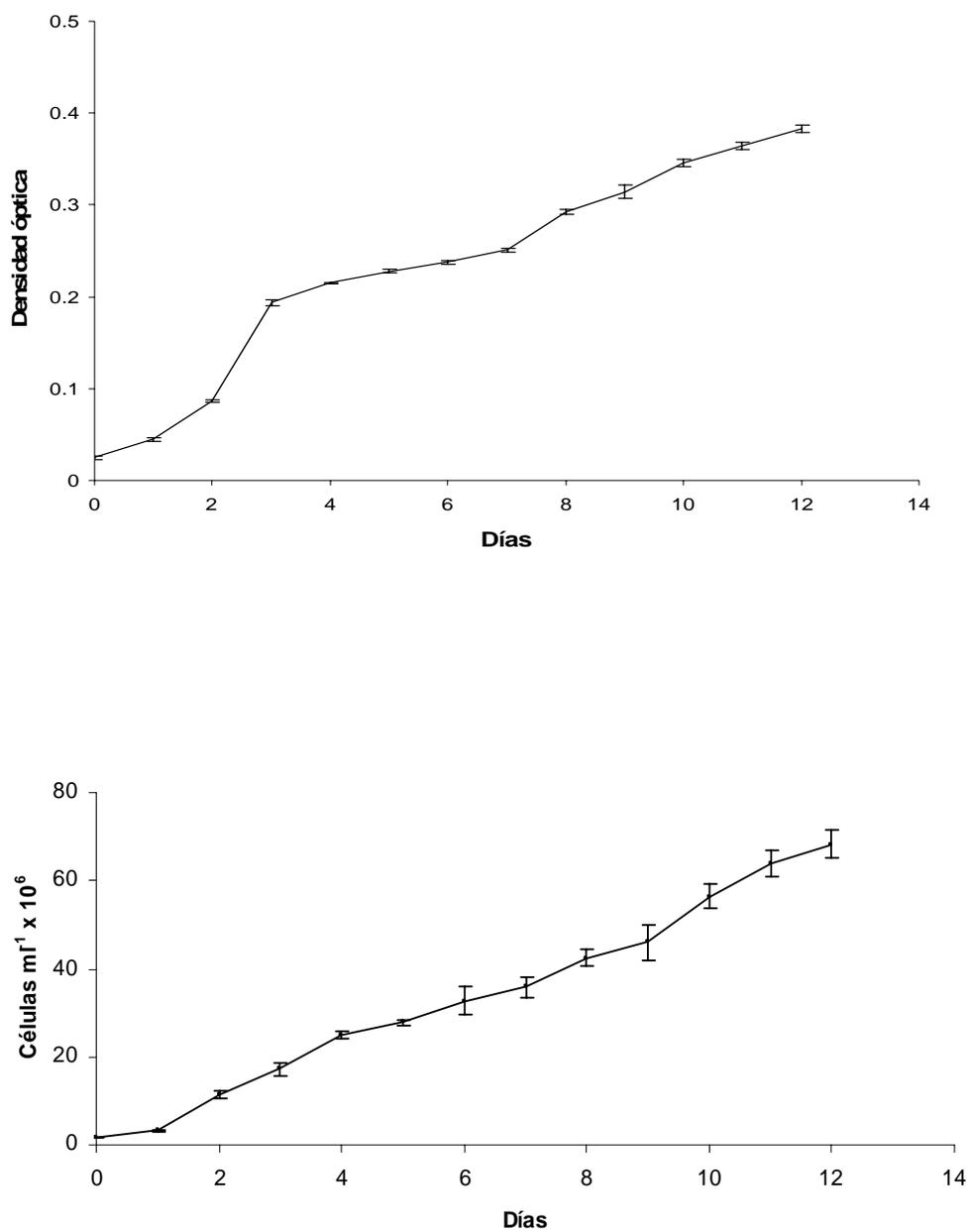


Figura 4. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células de *S. elongatus* cultivado en un sistema estático (Erlenmeyer). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

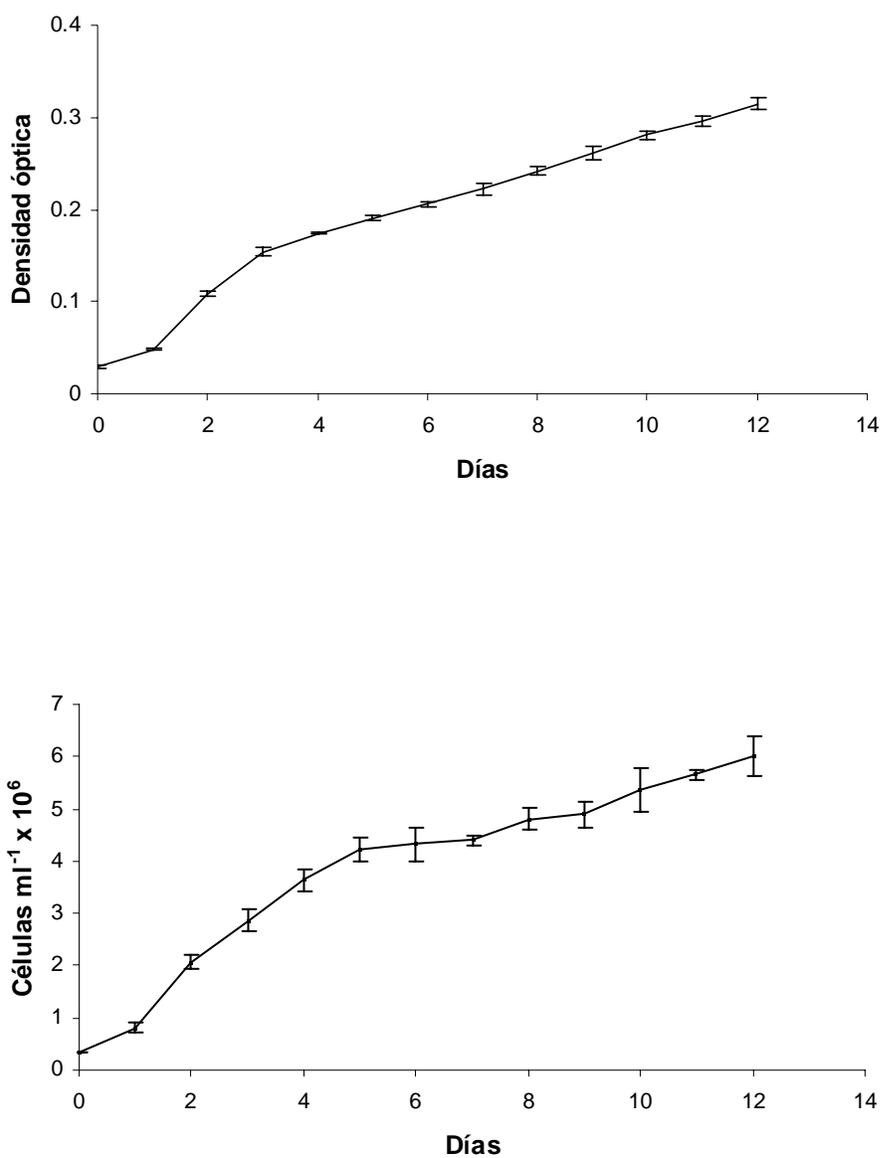


Figura 5. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células de *C. muelleri* cultivado en un sistema estático (Erlenmeyer). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

Al comparar las curvas de crecimiento de *S. elongatus* y *C. muelleri* en matraz Erlenmeyer (ANCOVA) resultó que el crecimiento de ambas especies fue estadísticamente diferente ( $P < 0.001$ ) y tuvo un cambio significativo respecto al tiempo ( $P < 0.001$ ).

#### **IV. 2 Crecimiento de *S. elongatus* y *C. muelleri* en sistemas estáticos con Fernbach**

Los cultivos de *S. elongatus* se iniciaron con  $1.3 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> y una fase de acondicionamiento de un día, seguido de una fase exponencial de dos días, a partir del tercer día se presentó la fase de crecimiento lento de un día para después entrar en una evidente fase estacionaria hasta el día ocho donde el cultivo alcanzó una densidad promedio final de  $14.2 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> (Figura 6, Tabla III).

Los valores promedio de densidad óptica para de los cultivos de *S. elongatus* tuvieron una tendencia similar de crecimiento a la descrita para los conteos celulares. Se evaluó una tasa de crecimiento promedio ( $\mu$ ) de 1.07 por día durante la fase exponencial y una tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma \mu$ ) promedio de 3.51 (Figura 6, Tabla III).

Los cultivos de *C. muelleri* se iniciaron con  $2.3 \times 10^5$  cél ml<sup>-1</sup>, con una fase de acondicionamiento de un día, seguido de una fase exponencial de dos días, a partir del día tres la fase estacionaria hasta el día cinco, con un crecimiento lento durante un día, para continuar con la fase estacionaria hasta el día ocho. Los cultivos alcanzaron una densidad promedio final de  $2.2 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> (Figura 7, Tabla III).

Los valores promedio de densidad óptica para los cultivos de *C. muelleri* tuvieron una tendencia similar de crecimiento a la descrita para los conteos celulares. Se evaluó una tasa

de crecimiento promedio ( $\mu$ ) de 1.37 por día durante la fase exponencial, y una tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) promedio de 3.24 (Figura 7, Tabla III).

Al comparar las tasas de crecimiento entre las dos especies, *S. elongatus* obtuvo una densidad celular mayor y significativa respecto a la obtenida en los cultivos de *C. muelleri* ( $P < 0.001$ ). No hay una diferencia ( $P = 0.055$ ) en la tasa de crecimiento durante la fase exponencial ( $\mu$ ) para las dos especies. Sin embargo, hubo una diferencia significativa en la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu = 3.51$ ), respecto a la obtenida para *C. muelleri* ( $\Sigma\mu = 3.24$ ) ( $P = 0.002$ ) (Tabla III).

Tabla III. Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (DO) inicial (I) y final (F), densidad de células (DC) ( $\text{cél ml}^{-1}$ ) inicial (I) y final (F), tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ), para cultivos de *S. elongatus* y *C. muelleri* mantenidos en sistemas estáticos en Fernbach. El signo ( $\pm$ ) indica la desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias, prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ )  $a < b$ .

	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	Probabilidad
DO I	$0.016 \pm 0.001a$	$0.014 \pm 0.002a$	$P = 0.101$
DO F	$0.183 \pm 0.011b$	$0.164 \pm 0.003a$	$P = 0.038$
DC I	$1.3 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^4b$	$2.3 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^3a$	$P < 0.001$
DC F	$14.2 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^5b$	$2.2 \times 10^6 \pm 6.5 \times 10^4a$	$P < 0.001$
$\mu$	$1.07 \pm 0.32a$	$1.37 \pm 0.14a$	$P = 0.055$
$\Sigma\mu$	$3.51 \pm 0.06b$	$3.24 \pm 0.03a$	$P = 0.002$

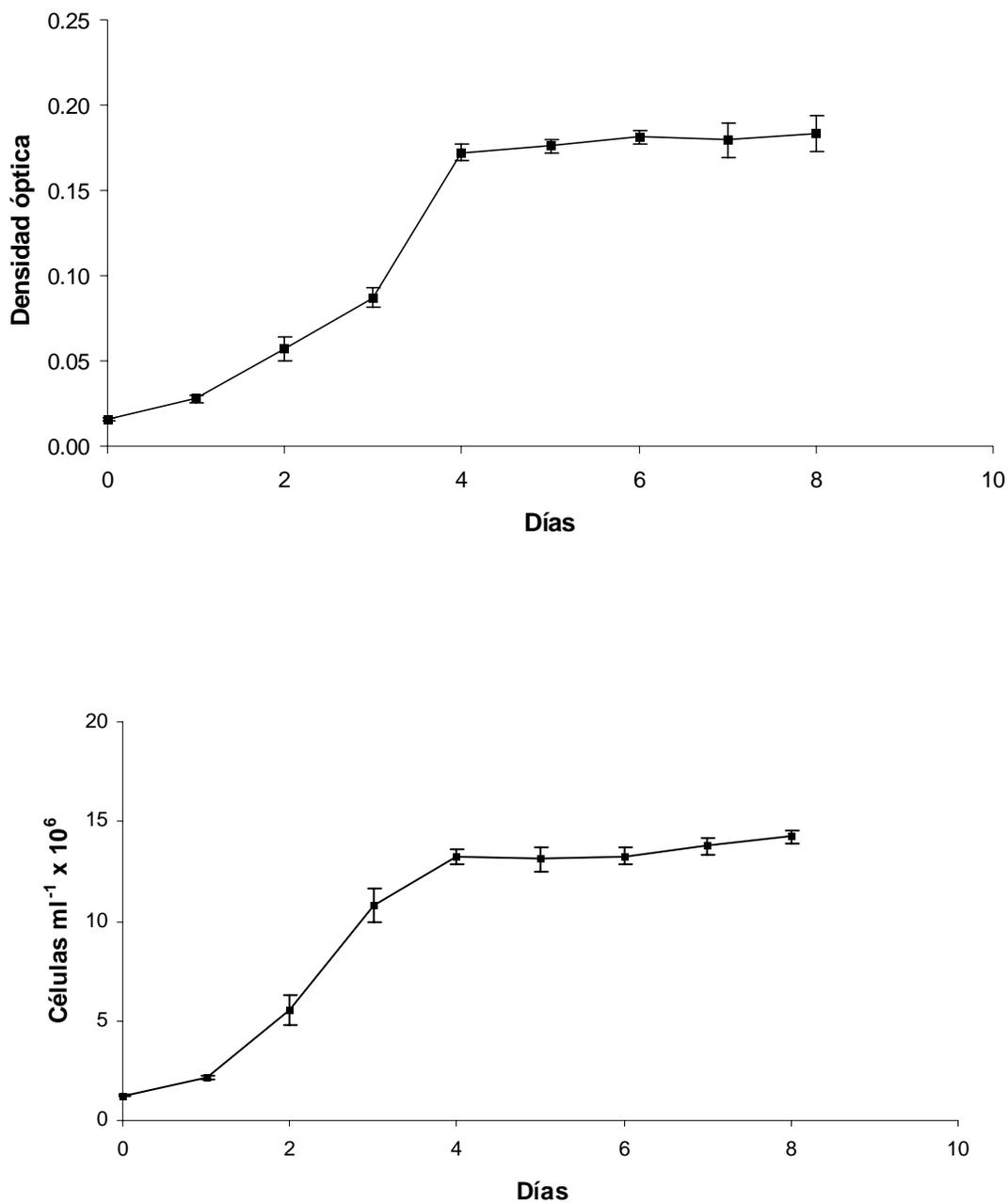


Figura 6. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células de *S. elongatus* cultivado en un sistema estático (Fernbach). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

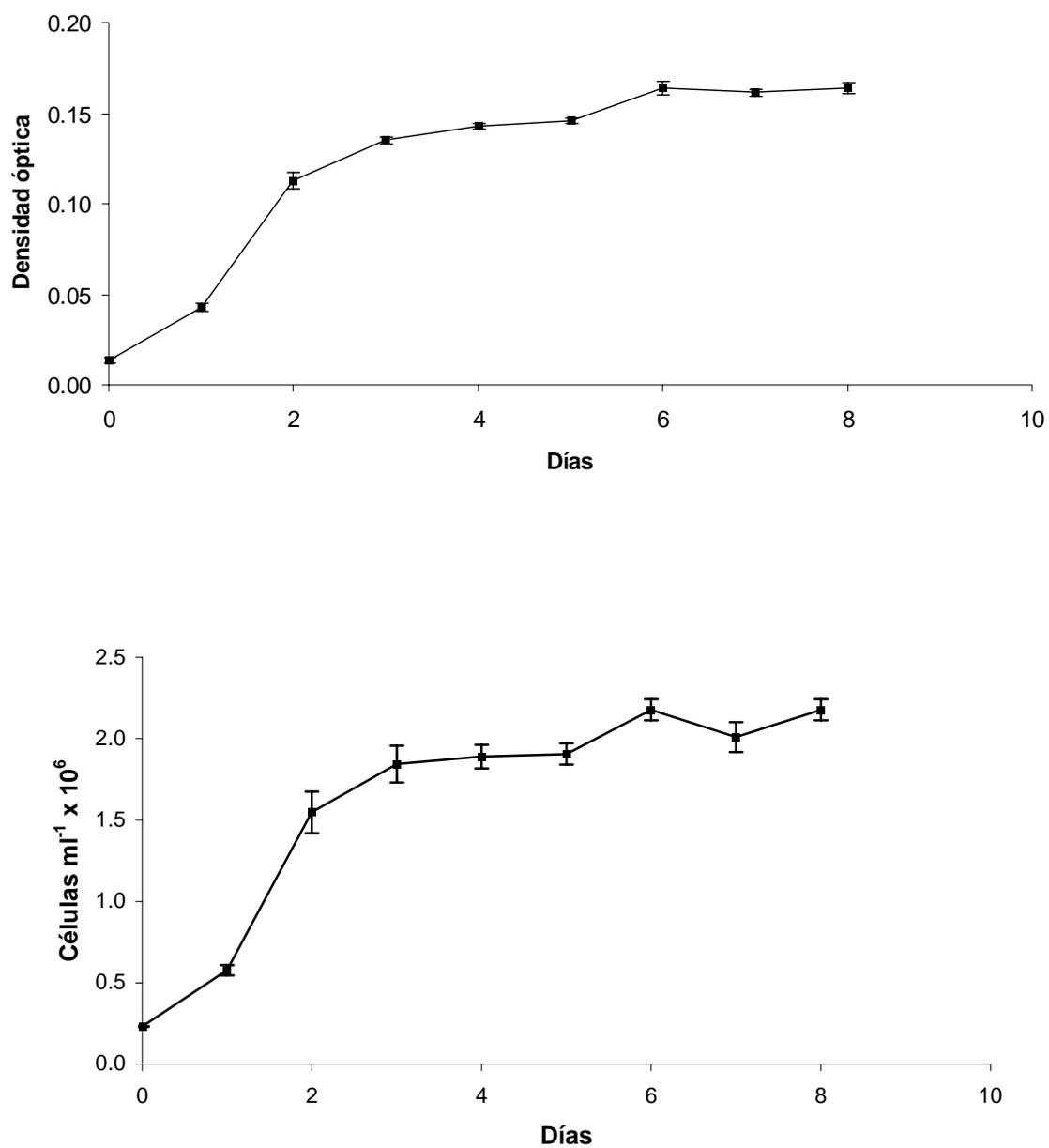


Figura 7. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células de *C. muelleri* cultivado en un sistema estático (Fernbach). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

Al comparar las curvas de crecimiento de *S. elongatus* y *C. muelleri* en matraz Fernbach (ANCOVA) resultó que el crecimiento de ambas especies fue diferente ( $P < 0.001$ ) y tuvo un cambio significativo respecto al tiempo ( $P < 0.001$ ).

#### **IV. 3 Crecimiento de *S. elongatus* y *C. muelleri* en sistemas semicontinuos**

Los cultivos de *S. elongatus* se iniciaron con una fase de acondicionamiento de un día, seguida de una fase exponencial de tres días. A partir del día cuatro se inició la dilución de los cultivos. El promedio de la densidad celular fue de  $36.3 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> antes y de  $28.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> después de la dilución (Figura 8, Tabla IV). Se consideró que el cultivo se estabilizó con la dilución a partir del día seis. Se aplicó una prueba de significancia del coeficiente beta ( $\beta = 0$ ) de la regresión con los valores de la densidad de células de *S. elongatus* antes de la dilución y en función del tiempo. La prueba evidenció que los cultivos estaban estables ( $P = 0.292$ ) con un valor de  $\beta = 0.363$  (Tabla V).

Los valores promedio de la densidad óptica de los cultivos de *S. elongatus* tuvieron una tendencia similar a la descrita en la densidad de células de esta especie (Figura 8).

Los cultivos de *S. elongatus* tuvieron valores promedio de clorofila *a* de  $1.96 \mu\text{gr ml}^{-1}$ , peso orgánico seco de  $2.7 \mu\text{gr} \times 10^{-6}$  cél y peso de cenizas de  $1.8 \mu\text{gr} \times 10^{-6}$  cél (Tabla IV).

Los cultivos de *C. muelleri* iniciaron la fase de acondicionamiento de un día, seguida de una fase exponencial de tres días y a partir del día cuatro se inició la dilución de los cultivos. El promedio de la densidad celular fue de  $2.8 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> antes y de  $2.4 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> después de la dilución (Figura 9, Tabla IV). Se consideró que el cultivo se estabilizó a partir del sexto día. Se realizó una prueba de significancia del coeficiente beta ( $\beta = 0$ ) de la

regresión con los valores de la densidad de células de *C. muelleri* antes de la dilución y en función del tiempo. La prueba evidenció que los cultivos se estabilizaron en producción de biomasa ( $P = 0.865$ ) con un valor de  $\beta = 0.137$  (Tabla V).

Los valores promedio de la densidad óptica de los cultivos de *C. muelleri* tuvieron una tendencia similar a la descrita para la concentración de células de esta especie (Figura 8).

Los cultivos de *C. muelleri* presentaron valores promedio de clorofila *a* de  $1.74 \mu\text{gr ml}^{-1}$ , peso orgánico seco de  $3.0 \mu\text{gr} \times 10^{-5} \text{ ml}^{-1}$  y peso de cenizas de  $3.0 \mu\text{gr} \times 10^{-5} \text{ cél}$  (Tabla IV).

Los valores de clorofila *a* para *S. elongatus* fueron significativamente mayores ( $1.96 \mu\text{gr ml}^{-1}$ ), respecto a los obtenidos en los cultivos de *C. muelleri* ( $1.74 \mu\text{gr ml}^{-1}$ ) ( $P = 0.016$ ) (Tabla IV).

Los valores promedio del peso orgánico seco de *S. elongatus* fueron menores y diferentes ( $2.7 \times 10^{-6} \mu\text{gr ml}^{-1}$ ) respecto a los valores obtenidos para *C. muelleri* ( $3.0 \times 10^{-5} \mu\text{gr ml}^{-1}$ ) ( $P < 0.001$ ). En peso de las cenizas también se detectó diferencias ( $P < 0.001$ ) entre ambas especies (Tabla IV).

Con base a la lectura obtenida en la densidad óptica y a los conteos celulares que se hicieron de manera conjunta durante el tiempo de cultivo, se obtuvo la ecuación de regresión que relaciona ambas variables.

Ecuación de regresión:  $y = a + bx$

Donde:

$y$  = células por mililitro ( $\text{cél ml}^{-1}$ )

$a$  = ordenada de origen

$b$  = pendiente

$x$  = densidad óptica (DO)

Las ecuaciones de regresión obtenidas para cada especie se muestran a continuación:

Para *C. muelleri*:

$$y (\text{cél ml}^{-1}) = 922700 x + 3 \times 10^6 (\text{DO}) \quad r^2 = 0.68$$

Para *S. elongatus*:

$$y (\text{cél ml}^{-1}) = 1 \times 10^8 x + 2 \times 10^6 (\text{DO}) \quad r^2 = 0.92$$

Tabla IV. Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (DO) inicial (I) y final (F), densidad de células (DC) (cél ml<sup>-1</sup>) antes (A) y después (B) de la dilución, clorofila *a* (μgr ml<sup>-1</sup>), peso orgánico seco (PSO en μgr x 10<sup>-6</sup> cél) y peso de cenizas (PC en μgr x 10<sup>-6</sup> cél) para cultivos de *S. elongatus* y *C. muelleri* mantenidos en sistemas semicontinuos. El signo (±) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias, prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ) a < b.

	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	Probabilidad
DO I	0.020 ± 0.002b	0.015 ± 0.002a	$P < 0.001$
DO F	0.227 ± 0.010b	0.122 ± 0.005a	$P < 0.001$
DC A	36.3 x10 <sup>6</sup> ± 2.5 x10 <sup>6</sup> b	2.8 x10 <sup>6</sup> ± 1.4 x10 <sup>5</sup> a	$P < 0.001$
DC B	28.0 x10 <sup>6</sup> ± 2.5 x10 <sup>6</sup> b	2.4 x10 <sup>6</sup> ± 1.5 x10 <sup>5</sup> a	$P < 0.001$
Clorofila	1.96 ± 0.09b	1.74 ± 0.03a	$P < 0.001$
POS	2.7 x10 <sup>-6</sup> ± 1.6 x10 <sup>-7</sup> a	3.0 x10 <sup>-5</sup> ± 1.8 x10 <sup>-6</sup> b	$P < 0.001$
PC	1.8 x10 <sup>-6</sup> ± 5.2 x10 <sup>-7</sup> a	3.0 x10 <sup>-5</sup> ± 3.0 x10 <sup>-6</sup> b	$P < 0.001$

Tabla V. Ecuación de regresión para *S. elongatus* y *C. muelleri* mantenidos en garrafón con sistemas semicontinuos y los resultados de la prueba de significancia de la pendiente ( $\beta$ ), correlación ( $r^2$ ) y probabilidad ( $P$ ).

	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>
Ecuación de regresión	$y = 300456x + 3x10^7$	$y = 8027.8x + 3x10^6$
$r^2$	0.131	0.019
$\beta$	0.363	0.137
$P$	0.292	0.865

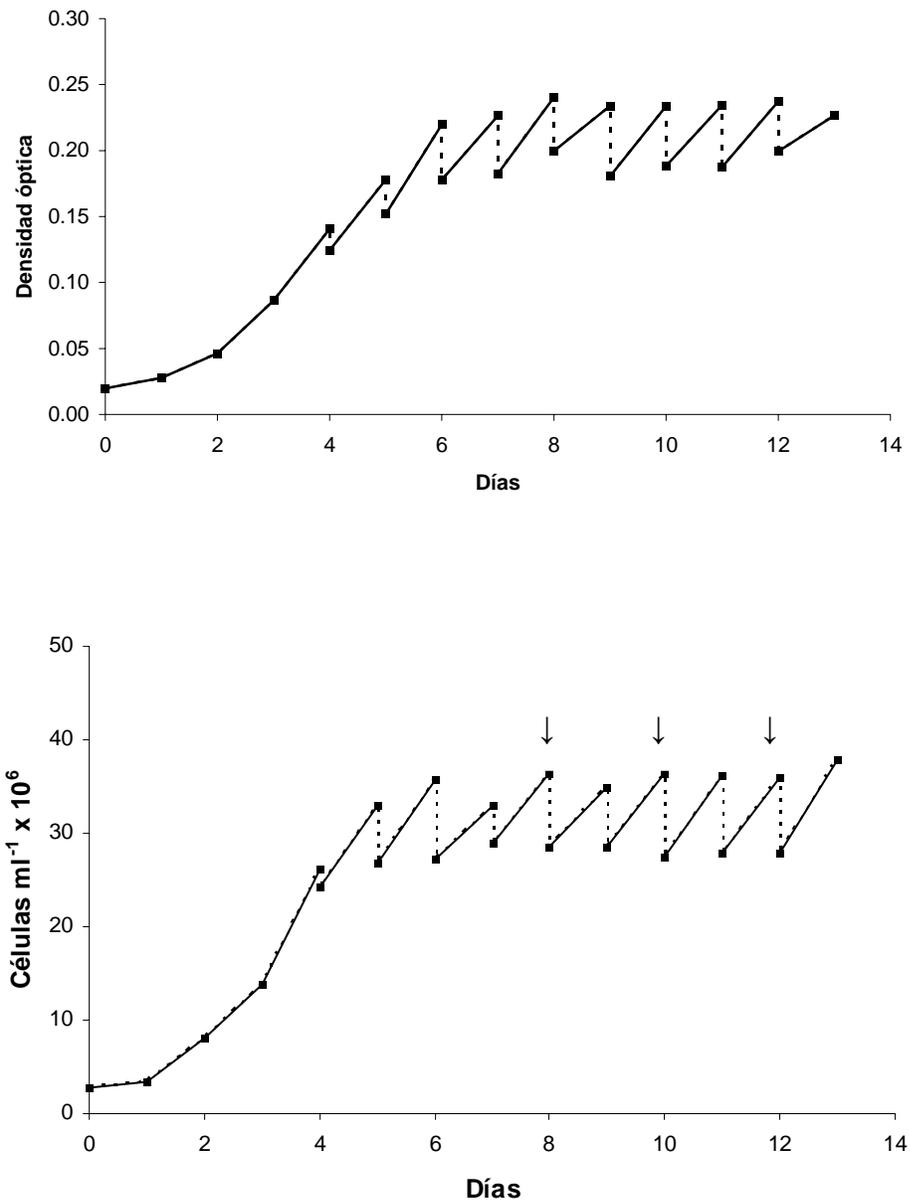


Figura 8. Valores promedio de densidad óptica y del número de células de *S. elongatus* cultivado en sistema semicontinuo, la flecha (↓) indica la muestra para los análisis bioquímicos.

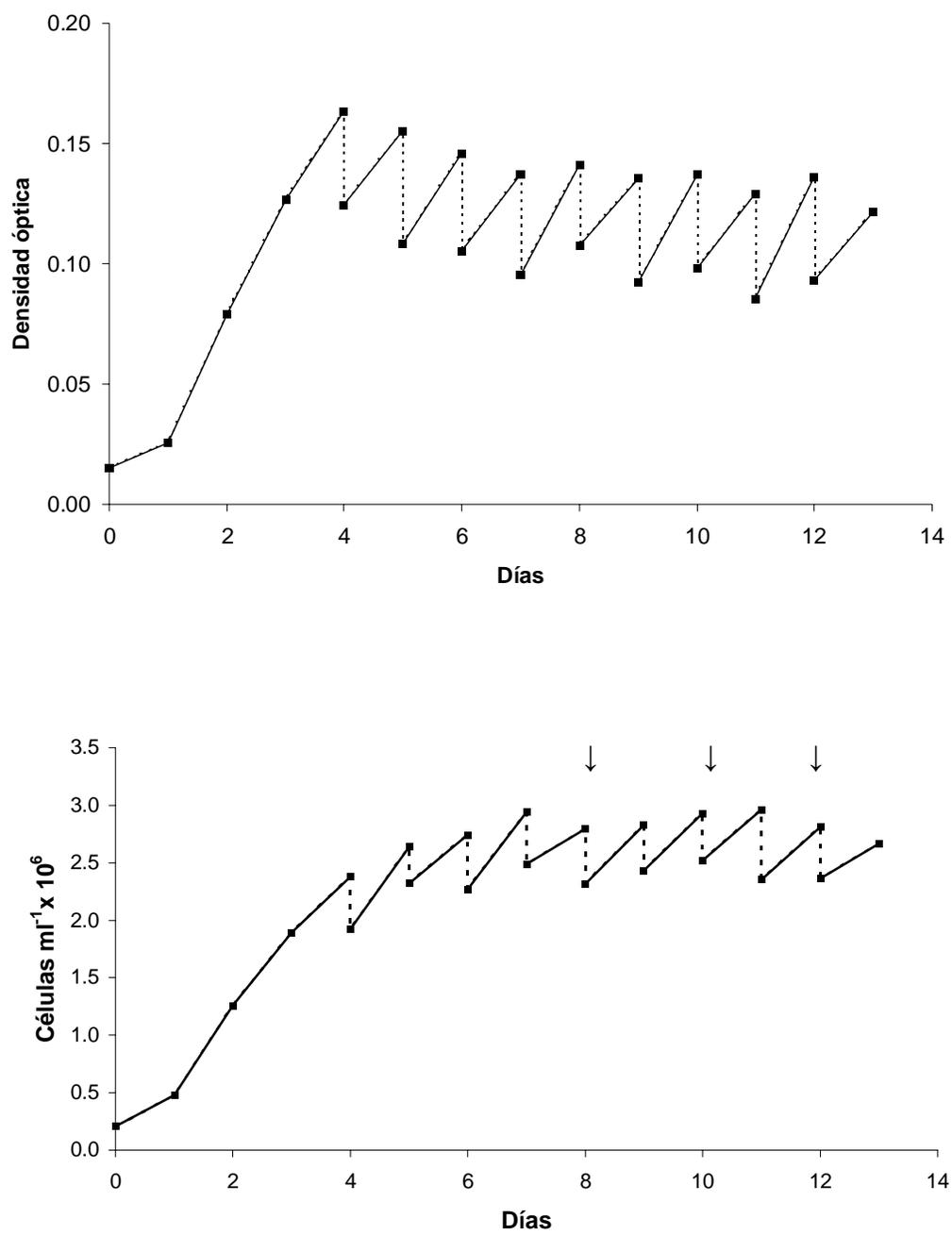


Figura 9. Valores promedio de densidad óptica y del número células de *C. muelleri* cultivado en sistema semicontinuo, la flecha (↓) indica la muestra para los análisis bioquímicos.

#### IV. 4 Composición proximal y bioquímica de *S. elongatus* y *C. muelleri*

Los valores promedio de proteína para *S. elongatus* y *C. muelleri* no presentaron diferencias ( $P = 0.136$ ). Sin embargo, se encontró diferencia en el contenido de lípidos ( $P < 0.001$ ) y de carbohidratos ( $P < 0.001$ ). En peso de las cenizas no se detectó una diferencia ( $P = 0.608$ ) entre ambas especies (Tabla VI), así como entre los porcentajes de la fracción total evaluados para *S. elongatus* y *C. muelleri* ( $P = 0.587$ ).

Tabla VI. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje (%) de proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas y la fracción total para cultivos de *S. elongatus* y *C. muelleri* mantenidos en sistemas semicontinuos. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias, prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ )  $a < b$ .

	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	Probabilidad
Proteínas	21.9 $\pm$ 0.9a	20.0 $\pm$ 2.1a	$P = 0.136$
Lípidos	9.0 $\pm$ 0.4a	20.3 $\pm$ 1.8b	$P < 0.001$
Carbohidratos	28.9 $\pm$ 2.1b	17.9 $\pm$ 1.3a	$P < 0.001$
Cenizas	39.1 $\pm$ 11.8a	46.0 $\pm$ 18.0a	$P = 0.608$
Total	95.8 $\pm$ 14.5a	104.2 $\pm$ 20.0a	$P = 0.587$

#### IV. 5 Perfiles de aminoácidos

En los cultivos semicontinuos de *S. elongatus* la mayor proporción de aminoácidos esenciales fueron la leucina (4.91%), arginina (4.74%), valina (3.66%), fenilalanina (3.67%), e isoleucina (3.14%). Los mayores porcentajes de los aminoácidos no esenciales fueron la cisteína (38.06%), el glutamato (7.76%) y el aspartato (5.45%) (Tabla VII).

Para los cultivos semicontinuos de *C. muelleri*, la mayor proporción de los aminoácidos esenciales fue para la leucina (3.91%), histidina (3.63%), arginina (3.26%), y valina (3.16%). El mayor porcentaje de los aminoácidos no esenciales fue la cisteína (49.33%), el glutamato (6.82%) y el aspartato (6.36%) (Tabla VII).

Respecto a la mezcla de los cultivos de *S. elongatus* y *C. muelleri*, los aminoácidos esenciales presentes con mayor porcentaje fueron la arginina (4.35%), leucina (4.30%), lisina (3.85%) y valina (3.57%). El mayor porcentaje de los aminoácidos no esenciales fue cisteína (45.76%), glutamato (7.16%) y aspartato (6.20%) (Tabla VII).

El porcentaje total de aminoácidos esenciales de *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de las dos especies no presentó diferencia significativa ( $P = 0.686$ ). Tampoco se encontró diferencia en el porcentaje de los aminoácidos no esenciales de las dos especies y la mezcla de ambas ( $P = 0.968$ ).

Tabla VII. Valores promedio del perfil de aminoácidos (% total de peso seco) de la cianobacteria *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de *S. elongatus* + *C. muelleri*, cultivada en sistema semicontinuo. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ )  $a < b < c$ .

Aminoácidos	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	<i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i>
Esenciales			
Arginina	4.74 $\pm$ 0.94a	3.26 $\pm$ 0.33a	4.35 $\pm$ 0.09a
Histidina	1.83 $\pm$ 0.36a	3.63 $\pm$ 0.40c	2.54 $\pm$ 0.06b
Isoleucina	3.14 $\pm$ 0.57a	2.56 $\pm$ 0.27a	3.00 $\pm$ 0.09a
Leucina	4.91 $\pm$ 0.97a	3.91 $\pm$ 0.40a	4.30 $\pm$ 0.14a
Lisina	2.93 $\pm$ 0.82a	2.94 $\pm$ 0.91a	3.85 $\pm$ 0.35a
Metionina	0.92 $\pm$ 0.17a	1.16 $\pm$ 0.13a	1.02 $\pm$ 0.07a
Fenilalanina	3.67 $\pm$ 0.51c	2.41 $\pm$ 0.26a	2.71 $\pm$ 0.11a
Treonina	3.08 $\pm$ 0.59a	2.13 $\pm$ 0.24a	2.84 $\pm$ 0.14a
Valina	3.66 $\pm$ 0.69a	3.16 $\pm$ 0.31a	3.57 $\pm$ 0.23a
Subtotal	28.88 $\pm$ 1.27a	25.16 $\pm$ 0.84a	28.18 $\pm$ 1.04a
No esenciales			
Alanina	3.53 $\pm$ 0.67c	2.06 $\pm$ 0.31a	2.61 $\pm$ 0.12b
Aspartato	5.45 $\pm$ 1.05a	6.36 $\pm$ 0.62a	6.20 $\pm$ 0.08a
Cisteína	38.06 $\pm$ 4.16a	49.33 $\pm$ 5.55b	45.76 $\pm$ 0.60b
Glutamato	7.76 $\pm$ 1.54a	6.82 $\pm$ 0.96a	7.16 $\pm$ 0.21a
Glicina	2.89 $\pm$ 0.50a	2.55 $\pm$ 0.34a	2.76 $\pm$ 0.10a
Prolina	3.03 $\pm$ 0.49a	3.05 $\pm$ 0.24a	3.08 $\pm$ 0.09a
Serina	2.11 $\pm$ 0.38a	3.07 $\pm$ 0.28b	2.45 $\pm$ 0.03a
Tirosina	2.27 $\pm$ 0.44a	1.60 $\pm$ 0.17a	1.82 $\pm$ 0.17a
Subtotal	65.10 $\pm$ 12.24a	74.84 $\pm$ 16.27a	71.84 $\pm$ 14.98a
Total	93.98	100.00	100.00

#### IV. 6 Perfiles de ácidos grasos

Para los cultivos semicontinuos de *S. elongatus*, la mayor proporción de ácidos grasos saturados fue para el 16:0 (42.28%) y 18:0 (2.35%) (Tabla VIII). Sin embargo, no se detectó la presencia del 20:0, 22:0 y 24:0. En los ácidos grasos monoinsaturados la mayor proporción fue para el 16:1n7 (13.37%) y el 18:1n9 (10.80%). Entre los polinsaturados sólo se detectaron el 18:3n3 (17.66%), 18:2n6t (10.65%) y el 18:2n6c (0.38%).

Para las cultivos semicontinuos de *C. muelleri*, la mayor proporción de ácidos grasos saturados fue para el 16:0 y 18:0 (34.87 y 4.73%) respectivamente. En los ácidos grasos monoinsaturados la mayor proporción fue para el 16:1n7 (29.27%) y el 18:1n9 (0.98%). Sin embargo, no se detectó el 17:1n7. Para los ácidos polinsaturados el porcentaje del eicosapentanoico (20:5n3) fue de 16.76% y del docosahexaenoico (20:6n3) de 1.25% (Tabla VIII).

En la mezcla de los cultivos de *S. elongatus* y de *C. muelleri*, la mayor proporción de ácidos grasos fue para el 16:0 (36.26%), 18:0 (3.59%) y 24:0 (6.32%). El ácido graso monoinsaturado presente en mayor cantidad fue el 16:1n7 (22.59%). Respecto a los polinsaturados el porcentaje del eicosapentanoico (20:5n3) fue de 9.89%, y del docosahexaenoico (22:6n3) fue de 0.79% (Tabla VIII).

En el contenido total de ácidos grasos saturados no hubo una diferencias ( $P = 0.867$ ), entre *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de ambas especies. En el promedio de ácidos grasos monoinsaturados no hubo diferencias ( $P = 0.823$ ), ni entre los promedios de los ácidos grasos polinsaturados ( $P = 0.158$ ) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Valores promedio del perfil de ácidos grasos (% total de peso seco) de la cianobacteria *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de *S. elongatus* + *C. muelleri* cultivada en sistema semicontinuo. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ )  $a < b < c$ . \*\* Dato único. ■ No detectado.

Ácidos grasos	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	<i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i>
Saturados			
15:0	0.14 $\pm$ 0.40a	1.40 $\pm$ 0.07c	0.96 $\pm$ 0.03b
16:0	42.28 $\pm$ 0.60b	34.87 $\pm$ 2.53a	36.26 $\pm$ 0.96a
17:0	0.67 $\pm$ 0.04c	0.21 $\pm$ 0.01a	0.32 $\pm$ 0.03b
18:0	2.35 $\pm$ 0.27a	4.73 $\pm$ 0.05c	3.59 $\pm$ 0.09b
20:0	■	0.40 $\pm$ 0.04b	0.27 $\pm$ 0.06a
22:0	■	1.11 $\pm$ 0.14b	0.65 $\pm$ 0.02a
24:0	■	0.97 $\pm$ 0.15a	6.32 $\pm$ 0.17b
Subtotal	45.40 $\pm$ 20.63a	43.70 $\pm$ 12.71a	48.40 $\pm$ 13.13a
Monoinsaturados			
16:1n7	13.37 $\pm$ 0.29a	29.27 $\pm$ 1.45c	22.59 $\pm$ 0.99b
17:1n7	1.69 $\pm$ 0.12b	■	0.51 $\pm$ 0.03a
18:1n9	10.80 $\pm$ 0.80c	0.98 $\pm$ 0.19a	4.17 $\pm$ 0.51b
Subtotal	25.86 $\pm$ 6.14a	30.30 $\pm$ 20.00a	27.30 $\pm$ 11.84a
Polinsaturado			
18:2n6t	10.65 $\pm$ 0.34c	0.80 $\pm$ 0.09a	3.98 $\pm$ 0.43b
18:2n6c	0.38 $\pm$ 0.003c	**0.06b	0.03 $\pm$ 0.02a
18:3n6	■	2.71 $\pm$ 0.37b	1.66 $\pm$ 0.16a
18:3n3	17.66 $\pm$ 0.46b	■	5.58 $\pm$ 0.32a
20:3n6	■	0.15 $\pm$ 0.02b	0.08 $\pm$ 0.01a
20:4n6	■	4.37 $\pm$ 0.91b	2.31 $\pm$ 0.15a
20:5n3	■	16.76 $\pm$ 3.13b	9.86 $\pm$ 1.60a
22:1n9	■	0.05 $\pm$ 0.08a	0.07 $\pm$ 0.01a
22:6n3	■	1.25 $\pm$ 0.24a	0.79 $\pm$ 0.21a
Subtotal	28.70 $\pm$ 8.69a	26.20 $\pm$ 5.66a	24.40 $\pm$ 3.30a
Total	100.00	100.10	100.00

#### **IV. 7 Bioensayo con etapas larvales de camarón *L. vannamei***

Durante los bioensayos con larvas de *L. vannamei* las condiciones de los sistemas experimentales se mantuvieron en valores promedio de  $28 \pm 1$  °C, salinidad de  $33 \pm 1.5\%$ , oxígeno de  $6.2 \pm 0.3$  mg l<sup>-1</sup>, amonio en  $0.14 \pm 0.10$  mg l<sup>-1</sup>, nitratos a 0 mg l<sup>-1</sup> y nitritos en  $0.06 \pm 0.07$  mg l<sup>-1</sup>.

##### **IV. 7. 1 Crecimiento de *L. vannamei***

Los valores promedio de la talla evaluada como el largo ( $P = 0.118$ ) y ancho ( $P = 0.173$ ) del cefalotórax en los nauplios en estadio V de *L. vannamei*, muestran que no existió diferencia significativa por efecto del tipo de alimento suministrado en forma monoespecífica (*S. elongatus* y *C. muelleri*) o la mezcla de ambas especies (Tabla IX). Durante la etapa de Postlarva I de *L. vannamei* se encontró que no se modificó el ancho del cefalotórax por efecto del tipo de alimento ( $P = 0.840$ ). Sin embargo, el largo del cefalotórax fue significativamente menor ( $P = 0.029$ ) en las postlarvas alimentadas con *S. elongatus* y la mezcla de ambas especies (Tabla IX).

Los valores promedio iniciales de la longitud total de los estadios de nauplio V y protozoa I de *L. vannamei* sugieren que no hubieron diferencias ( $P = 0.840$ ). Sin embargo, durante los distintos estadios de vida se evaluaron algunas diferencias por el efecto del tipo de alimento suministrado (Tabla X). No se presentó diferencia en la tasa de crecimiento total ( $P = 0.057$ ), ni tampoco en el índice de rendimiento ( $P = 0.358$ ) (Tabla X). El crecimiento para las distintas etapas larvales de *L. vannamei* alimentadas con *S. elongatus*, *C. muelleri* o la mezcla de ambas especies no presentó diferencias en la longitud total (ANCOVA) ( $P < 0.931$ ) y si hubo un cambio significativo respecto al tiempo ( $P < 0.001$ ).

Tabla IX. Valores promedio del largo y ancho del cefalotórax y crecimiento para larvas de *L. vannamei* en diferentes estadios de vida alimentadas con *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de *S. elongatus* + *C. muelleri*. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ )  $a < b < c$ .

Estadios	Talla (mm)	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	<i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i>
Nauplio V	Largo	0.588 $\pm$ 0.04a	0.602 $\pm$ 0.02a	0.588 $\pm$ 0.04a
	Ancho	0.379 $\pm$ 0.06a	0.353 $\pm$ 0.04a	0.349 $\pm$ 0.04a
Postlarva I	Largo	1.072 $\pm$ 0.06a	1.196 $\pm$ 0.02b	1.098 $\pm$ 0.04ab
	Ancho	0.635 $\pm$ 0.06a	0.663 $\pm$ 0.03a	0.614 $\pm$ 0.06a
Crecimiento de Nauplio V a Postlarva I	Largo	0.484 $\pm$ 0.060a	0.595 $\pm$ 0.040a	0.509 $\pm$ 0.068a
	Ancho	0.256 $\pm$ 0.051a	0.311 $\pm$ 0.006a	0.265 $\pm$ 0.025a

Tabla X. Valores promedio de la longitud total (mm), tasa de crecimiento (mm por día) e índice de rendimiento para larvas de *L. vannamei* en diferentes estadios de vida al ser alimentadas con *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de *S. elongatus* + *C. muelleri*. El signo ( $\pm$ ) indica 1 desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ )  $a < b < c$ .

Estadios	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	<i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i>
Nauplio V	0.84 $\pm$ 0.00a	0.83 $\pm$ 0.00a	0.86 $\pm$ 0.00a
Zoea I	1.72 $\pm$ 0.09a	1.72 $\pm$ 0.04a	1.61 $\pm$ 0.04a
Zoea II	1.84 $\pm$ 0.04a	2.00 $\pm$ 0.04b	2.25 $\pm$ 0.08c
Zoea III	2.22 $\pm$ 0.06a	2.21 $\pm$ 0.08a	2.30 $\pm$ 0.06a
Mysis I	2.48 $\pm$ 0.15a	3.07 $\pm$ 0.06b	3.29 $\pm$ 0.17b
Mysis II	2.74 $\pm$ 0.08a	3.39 $\pm$ 0.19a	3.27 $\pm$ 0.06a
Mysis III	3.07 $\pm$ 0.08a	3.41 $\pm$ 0.28a	3.33 $\pm$ 0.08a
Postlarva I	3.57 $\pm$ 0.21a	3.99 $\pm$ 0.06b	3.75 $\pm$ 0.12ab
Tasa de crecimiento de Nauplio V a Postlarva I	0.273 $\pm$ 0.027a	0.315 $\pm$ 0.011a	0.288 $\pm$ 0.006a
Índice de rendimiento	9.99 $\pm$ 0.0003a	9.99 $\pm$ 0.0002a	9.99 $\pm$ 0.0001a

#### IV. 7. 2 Consumo de alimento y supervivencia de *L. vannamei*

Se encontró una diferencia significativa en el consumo de las células evaluadas como porcentaje del total de la ración suministrada en *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de ambas especies para las distintas etapas de vida de *L. vannamei* ( $P < 0.001$ ) (Tabla XI).

Tabla XI. Valores promedio del consumo (%) de *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de *S. elongatus* + *C. muelleri* (50% del peso seco de cada especie) suministradas como alimento en distintos estadios de *L. vannamei*. El signo ( $\pm$ ) indica desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ )  $a < b < c$ .

Estadios	<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	<i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i>	
Zoea II	92.11 $\pm$ 0.83b	76.61 $\pm$ 7.09a	92.44 $\pm$ 0.54b	71.34 $\pm$ 12.57a
Zoea III	92.30 $\pm$ 0.46b	49.36 $\pm$ 9.50a	87.46 $\pm$ 2.32b	82.03 $\pm$ 4.92b
Mysis I	89.67 $\pm$ 2.29c	50.83 $\pm$ 5.26a	85.00 $\pm$ 1.74c	71.45 $\pm$ 13.11b
Mysis II	86.89 $\pm$ 1.46b	42.73 $\pm$ 11.15a	87.01 $\pm$ 4.83b	42.13 $\pm$ 9.45a
Mysis III	83.22 $\pm$ 2.45c	57.38 $\pm$ 17.52b	69.17 $\pm$ 0.88ab	25.94 $\pm$ 4.19a

No se encontró una diferencia en la supervivencia obtenida durante el bioensayo con *L. vannamei* alimentado con *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de ambas especies ( $P = 0.364$ ) (Tabla XII).

Tabla XII. Valores promedio del porcentaje de supervivencia de larvas de *L. vannamei* del estadio nauplio V hasta postlarva I, al ser alimentadas con *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de *S. elongatus* + *C. muelleri*. El signo ( $\pm$ ) indica la desviación estándar. Valores con letras diferentes indican diferencias ( $\alpha = 0.05$ ).  $a < b < c$ .

<i>S. elongatus</i>	<i>C. muelleri</i>	<i>S. elongatus</i> + <i>C. muelleri</i>
31.96 $\pm$ 3.24a	34.58 $\pm$ 4.60a	29.71 $\pm$ 3.57a

## Capítulo V

---

### DISCUSIÓN

---

El cultivo de camarón en México es una actividad económicamente rentable, sin embargo se requiere optimizar diversos procesos para su producción. Uno de los procesos es la producción de alimento vivo, en particular la utilización de especies de microalgas que puedan ser mantenidas en condiciones de cultivo tolerantes a las fluctuaciones de temperatura, de irradiancia y de nutrientes.

#### **V. 1 Crecimiento de *S. elongatus* y *C. muelleri* en sistemas estáticos**

Debido a la diferencia de tamaño entre *S. elongatus* y *C. muelleri* la cantidad del inóculo para los cultivos en Erlenmeyer fue de 15 ml para *S. elongatus* y de 20 ml para *C. muelleri*. Diversos autores como Lorenz *et al.* (2005), indican que la concentración del inóculo recomendado para iniciar un cultivo microalgal es de de 1 al 10%. Sin embargo, debido al el tamaño de las células y a las características fisiológicas específicas, las diversas especies pueden requerir distintos porcentajes de inóculo para obtener un mayor crecimiento. Este tipo de estrategia de cultivo ha sido indicada previamente para la cianobacteria *Synechococcus* sp. y puede llegar a requerir inóculos de hasta el 25% (Aguilar-May, 2006). La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) en matraz Erlenmeyer para *C. muelleri* fue similar a la mencionada por Medina-Reyna y Cordero-Esquivel (1998), y Pacheco-Vega, (2003), en

cultivos hechos en matraces Erlenmeyer ( $\mu = 1.48 \text{ día}^{-1}$ ), con medio “f/2”. Para *S. elongatus* la tasa de crecimiento (1.39 por día), resultó similar a la obtenida por Lourenço *et al.* (2002) en cultivos mantenidos en medio “f/2” (1.34 por día). Diversos autores citan menores tasas de crecimiento para *S. elongatus* en cultivos en Erlenmeyer (0.76 por día) a 25 °C y  $116 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Campa-Ávila, 2002), así como para los cultivos de células libres (0.75 por día) e inmovilizadas con quitosano (0.96 por día), y mantenidos en medio “f” y a  $35 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Aguilar-May, 2006). Estas diferencias se pueden atribuir a las distintas irradiancias, cantidades de nutrientes y temperaturas utilizadas en los cultivos.

Los valores obtenidos en la concentración celular ( $\text{cél ml}^{-1}$ ) para *C. muelleri* y *S. elongatus* resultan menores a los citados por Bernáldez *et al.* (2008), para *S. elongatus* y *C. muelleri* en similares condiciones de cultivo durante el día doce de la en fase estacionaria. Es posible que se deba a que en este estudio la concentración celular se avaluó al octavo día del cultivo.

La mayor concentración de células ( $\text{cél ml}^{-1}$ ) obtenidas en los cultivos de *S. elongatus* respecto a la de *C. muelleri* en matraz Fernbach, posiblemente se deba a las diferencias en tamaño. Además de que *S. elongatus* es un organismo procarionte que se caracterizan por tener una menor organización celular, mayor tasa de crecimiento y adaptarse mejor a condiciones extremas de luz, temperatura, salinidad y nutrientes (Graham y Wilcox, 2000). La concentración celular que resultó en los matraces Erlenmeyer para *S. elongatus* y *C. muelleri*, fue mayor a la obtenida en Fernbach aún utilizando el mismo medio de cultivo. Esta tendencia coincide con lo citado por Wood *et al.* (2005), quienes mencionan que la tasa de crecimiento por unidad de tiempo, es proporcional al tamaño del inóculo. En este

estudio la cantidad de inóculo, respecto al volumen del medio de cultivo en Fernbach, fue un 17% menor para *S. elongatus* y en un 35% menos para *C. muelleri* respecto al inóculo en matraz Erlenmeyer.

## **V. 2 Crecimiento de *S. elongatus* y *C. muelleri* en sistemas semicontinuos**

Una de los objetivos que de manera directa conducen al éxito de la actividad acuícola es la producción del alimento vivo adecuado para estadios larvales de crustáceos y peces. Una alternativa viable es la producción de cultivos microalgales que se caracterizan por obtener altas densidades, en espacios limitados y altamente eficientes (Ukeles, 1980). Una práctica común es la producción de cultivos semicontinuos para lograr una cosecha de microalgas constante de manera sincrónica y como consecuencia una composición bioquímica similar. Las limitaciones en el crecimiento de cultivos microalgales pueden deberse a la falta de nutrientes y/o su inadecuado suministro, por lo que la tasa de crecimiento disminuye en relación directa al suministro de un nutrimento específico y si este se mantiene por debajo de la tasa de absorción, la tasa de crecimiento es limitada por los nutrientes. En los cultivos semicontinuos de *S. elongatus* y *C. muelleri*, la cantidad del inóculo inicial fue de 2.2 l para ambas especies. Los porcentajes de dilución utilizados (20% por día para *S. elongatus* y 30% por día para *C. muelleri*) fueron análogos a los de von Elert y Wolffrom (2001), quienes mencionan que para cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos a una temperatura de 20 °C y  $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con medio WC (modificado de Guillard, 1975) utilizaron un factor de dilución del 25% por día que les permitió tener cosechas estables. Pacheco-Vega y Sánchez-Saavedra (2008) en cultivos semicontinuos de *C. muelleri* con un 30% de

dilución por día obtuvieron una producción promedio diaria de  $2.7 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> que son análogas ( $2.4 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) a las obtenidas en este estudio.

### **V. 3 Composición proximal y bioquímica de *S. elongatus* y *C. muelleri***

Los cambios en el medio de cultivo de microalgas han sido un método ampliamente utilizado para incrementar la producción de células o variar su composición bioquímica (Andersen, 2005), en función de los nutrientes, la temperatura y la disponibilidad de la luz (Thompson y Guo, 1992; Simental-Trinidad *et al.*, 2001).

Debido a la constancia en la densidad de células producidas en los cultivos semicontinuos de *S. elongatus* y *C. muelleri*, se puede considerar que no existió limitación de nutrientes en el medio de cultivo. Para los cultivos semicontinuos de *C. muelleri* los valores de proteínas (20.0%), carbohidratos (17.9%) y lípidos (19.7%) resultaron similares a los citados por Pacheco-Vega y Sánchez-Saavedra (2008), en condiciones análogas de cultivo y con un 30% de dilución por día. Mallo y Fenucci (2004), al alimentar larvas de *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) con diferentes especies de microalgas cultivadas en medio “f/2” mencionan para *C. gracilis* valores promedio de 23.9% de proteína, 19% de carbohidratos y 8.7% de lípidos.

Enrigh *et al.* (1986) y Brown *et al.* (1997) mencionan que el valor nutritivo de un cultivo de microalgas se puede incrementar significativamente modificando las variables ambientales y las condiciones del cultivo, además de que la manipulación de estas variables permiten mejorar la producción de células y la composición bioquímica requerida para cubrir las necesidades nutrimentales de los organismos a cultivar.

### V. 3. 1 Contenido de clorofila *a*

La luz en términos de fotoperíodo, longitud de onda e intensidad son de vital importancia para las microalgas como aporte de energía para los procesos de fotosíntesis y su disponibilidad es un factor limitante para el crecimiento de los cultivos microalgales. Debido a que los cultivos semicontinuos de *S. elongatus* y *C. muelleri* se encontraron estables en producción de células con la dilución utilizada, no se consideró una limitación de nutrientes ya que se ha indicado que la concentración de pigmentos fotosintéticos en las microalgas y las cianobacterias está influenciada por la cantidad y la calidad de luz, así como el aporte de nutrientes (Lourenço *et al.*, 2002).

En este trabajo el contenido de clorofila *a* para *S. elongatus* fue similar a lo mencionado por Aguilar-May (2006), para cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en condiciones similares de cultivo. Respecto a la cantidad de clorofila *a* en *C. muelleri* se observó una menor cantidad ( $1.74 \mu\text{gr ml}^{-1}$ ) respecto a *S. elongatus* ( $1.96 \mu\text{gr ml}^{-1}$ ). Esta diferencia en el contenido de clorofila *a* puede resultar de las distintas características fisiológicas, a la menor organización celular, y al menor tamaño de *S. elongatus*. Eriksen e Iversen (1995), menciona que hay una tendencia de aumentar el contenido de clorofila *a* conforme aumenta la densidad de células, esta es una estrategia para compensar el efecto de autosombreado. En este estudio *S. elongatus* tuvo la mayor concentración celular y posiblemente aumentó el efecto de autosombreado. Sánchez-Saavedra *et al.* (1996), indican que *Dunaliella bardawill* tiene una relación inversa entre la cantidad de clorofila *a* y la intensidad de luz utilizada. López-Muñoz *et al.* (1992), al evaluar el contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas cultivadas con diferentes irradiancias encontró que al aumentar la

densidad de células, disminuye la cantidad de luz disponible en el medio por lo que se incrementa el contenido de clorofila por célula. Sin embargo, la cantidad de clorofila *a* no refleja el estado fisiológico de las células por que tiene una relación inversa con la irradiancia y una relación directa con la concentración de nutrientes en el medio.

Fujiki y Tagushi (2002), dicen que el contenido de pigmentos depende de la disponibilidad de la luz, como respuesta a un mayor irradiancia se produce una reducción del contenido de clorofila. Esta estrategia es considerada un proceso de autorregulación del aparato fotosintético para alcanzar un balance entre la ganancia de luz y la demanda de energía necesaria para el crecimiento microalgal, cuando la irradiancia excede la requerida para la saturación de la actividad fotosintética, puede ocurrir fotoinhibición y una acumulación de fotodaño en los centros de reacción de los cloroplastos (Powles, 1984).

### **V. 3. 2 Peso seco y cenizas**

El peso seco de microalgas puede variar debido a las características de las especies, con la edad del cultivo, la cantidad de nutrientes disponibles en el medio, de la fase de crecimiento, así como de la cantidad y de la calidad de luz (Wang *et al.*, 1997; Simental-Trinidad *et al.*, 2001). La normalización de la composición bioquímica microalgal respecto al peso seco libre de cenizas (%), permite obtener un indicador de los cambios fisiológicos y el contenido celular para establecer comparaciones entre diferentes especies y condiciones de cultivo.

Los resultados de peso seco obtenidos para *C. muelleri* (58.2%) en el presente estudio resultaron análogos a los mencionados por Torres-Rodríguez *et al.* (2006) quienes mantuvieron el cultivo con la misma especie a la intemperie en diferentes situaciones

estacionales. Para *S. elongatus* los valores del peso seco (59.8%) resultaron similares a los indicados por Campa-Ávila (2002) para *Synechococcus* sp. cultivado en medio “f/2” a 25 °C.

Los valores de cenizas obtenidos para *C. muelleri* (46.0%) y *S. elongatus* (39.1%), fueron similares a los mencionados por otros autores (Pacheco-Vega, 2003; Torres-Rodríguez *et al.*, 2006; Pacheco-Vega y Sánchez-Saavedra, 2008), pero mayores a los indicados por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1994) para *Chaetoceros* sp. al realizar cultivos con luz azul y blanca a 23 °C y en medio “F”. Las variaciones en los resultados obtenidos en este estudio respecto a los citados por diversos autores, pueden deberse a las distintas condiciones del cultivo, la fase de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes en el medio. El mayor contenido de ceniza en *C. muelleri* resulta por ser es una diatomea, y este grupo de organismos se caracterizan por tener una frústula compuesta de sílice (Werner, 1977).

Las diferencias en los valores promedio del porcentaje total de la fracción orgánica obtenida para *C. muelleri* (104.2%) y *S. elongatus* (98.9%), se pueden deber a la técnica de evaluación utilizada (Berges *et al.*, 1993), así como los compuestos utilizados como estándar para evaluar la composición proximal los cuales no tienen el 100% de pureza (albúmina de bovino, glucosa y tripalmitina) que genera una variación en los resultados. López-Elías (1990) menciona que estas variaciones químicas pueden causar sobre o subestimación de la cantidad de estos constituyentes. Además, durante el proceso de filtración para la obtención de las muestras, una pequeña fracción de volumen de cultivo (gotas) puede modificar los resultados de los análisis de la composición proximal.

### V. 3. 3 Perfiles de aminoácidos y ácidos grasos

Los aminoácidos representan un aporte de energía metabólica y son esenciales para el metabolismo de los lípidos y carbohidratos, así como en la síntesis de proteína en tejidos y otros compuestos importantes como la adrenalina, tiroxina, melanina, histamina, hemoglobina, pirimidinas, purinas, ácidos nucleicos, colina, ácido fólico y sales biliares. Además de que las reacciones bioquímicas son catalizadas por enzimas constituidas por aminoácidos (FAO, 1989).

Los aminoácidos detectados en *C. muelleri* y *S. elongatus* tales como arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y valina, son esenciales para organismos marinos (FAO, 1989; Brown, 1991). Los resultados obtenidos para los cultivos de *S. elongatus* y *C. muelleri* muestran un porcentaje similar en casi todos los aminoácidos detectados. La arginina que es uno de los aminoácidos mas importantes para el óptimo crecimiento de larvas de *L. vannamei* (Brown, 1991). Por anterior, se consideró que los aminoácidos disponibles en las distas utilizadas en éste estudio no actuarían como limitantes para el crecimiento en las larvas de *L. vannamei*.

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los mencionados por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1994) para *Chaetoceros* sp. al evaluar la composición bioquímica bajo diferentes condiciones de luz. Además, son similares a los indicados por Campa-Ávila (2002) para *Synechococcus* sp. con excepción de que este autor no detectó la presencia de histina y metionina. James *et al.* (1989), analizaron la composición de aminoácidos de *Nannochloropsis* cultivada a diferentes temperaturas y la composición de aminoácidos fue similar a la evaluada para *C. muelleri* y *S. elongatus* en el presente trabajo. La composición de aminoácidos que componen las proteínas de las microalgas resulta similar entre

especies, y que se modifican poco debido a la fase de crecimiento y a las condiciones de luz (Brown, 1991; Brown *et al.*, 1993 a,b).

Forster y Dominy (2006), mencionan que muchos de los requerimientos específicos de aminoácidos para *L. vannamei* son desconocidos. Un método comúnmente utilizado para medirlos es por medio del nivel de aminoácidos libres contenidos dentro de un tejido específico (Kaushik, 1979). Wilson y Poe (1973), obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.96 al relacionar los requerimientos de aminoácidos esenciales respecto a los aminoácidos esenciales obtenidos del músculo del bagre. Teshima *et al.* (1986), indican que el porcentaje de arginina encontrado en el tejido de larvas de *L. japonicus* fue de 9.1%, que es similar al encontrado en el tejido muscular de esta especie.

Cruz-Reyes (1997), cuantificó los aminoácidos en el tejido de distintos estadios de *L. vannamei*. Sus resultados representan en su mayoría, valores menores a los obtenidos en este estudio para *C. muelleri*, *S. elongatus* y la mezcla de ambas especies.

El porcentaje total de ácidos grasos en *C. muelleri*, *S. elongatus* y la mezcla de ambas especies fue similar. Se evaluó un mayor porcentaje total de ácidos grasos saturados, respecto a los monoinsaturados y los polinsaturados. Esta tendencia (saturados>monoinsaturado> polinsaturados) fue también indicada por otros autores para *Synechococcus* sp. (Campa-Ávila, 2002). Para *C. muelleri* se tuvo un porcentaje similar del total de ácidos grasos respecto a lo mencionado por Lourenço *et al.* (2002), para la misma especie en similares condiciones de cultivo.

Campa-Ávila (2002) indica para *Synechococcus* sp. valores similares de ácidos grasos a los evaluados en este estudio. Las pequeñas diferencias pueden deberse a las distintas condiciones de cultivo, ya que este autor utilizó una temperatura mas alta. La temperatura

en los cultivos de microalgas produce una relación inversa entre los porcentajes de ácidos grasos polinsaturados e insaturados, respecto a la magnitud de la temperatura. Esto es, a menores temperaturas se produce un aumento en el porcentaje de ácidos grasos para mantener la membrana homeoviscosa (Thompson *et al.*, 1993).

Los ácidos grasos polinsaturados son considerados esenciales para peces y crustáceos, ya que no pueden sintetizar *de novo* tales como los ácidos grasos de la serie n-3 (EPA: 20:5n-3) y n-6 (DHA: 22:6n-3), y por lo tanto requieren un aporte exógeno suministrado en la dieta (Tacon, 1990).

Los porcentaje del ácido graso docosahexaenóico (DHA: 22:6n-3) detectados en este estudio para *C. muelleri* (1.25%), coinciden con los evaluados para la misma especie por Brown (1997), este autor indica que las diatomeas se caracterizan por tener un bajo contenido de DHA, de entre 0.10 a 2.71% para diferentes especies de microalgas. El DHA (22:6n-3) no se detectó en *S. elongatus*, lo que coincide con lo indicado por Campa-Ávila (2002) para la misma especie.

El contenido del ácido graso eicosapentanóico (EPA: 20:5n-3) detectado para *C. muelleri* en este trabajo (16.76%), coincide con los valores evaluados por Brown *et al.* (1997) para el genero *Chaetoceros*, el cual es rico en este ácido graso (0.6 a 34.0%), sin embargo, en *S. elongatus* no se detectó el EPA.

Con relación al araquidónico (ARA:18:2n-6t), se encontró mayor porcentaje en *S. elongatus*, respecto a lo que tuvo *C. muelleri*. Estos valores difieren de los citados para *C. muelleri* por otros autores al realizar cultivos con distintas aportes químicos de nitrógeno (Laurenço *et al.*, 2002; Pacheco-Vega y Sánchez-Saavedra, 2008). Estas diferencias pueden deberse a que el contenido de ácidos grasos en diversas especies o incluso en una misma

especie de microalga, puede presentar variaciones significativas por efecto de la cantidad y la forma química de los nutrientes en el medio de cultivo (Thompson y Guo, 1992; Carvalho y Malcata, 2003).

#### **V. 4 Crecimiento de *L. vannamei***

En los cultivos comerciales de *L. vannamei* ha sido común la utilización de *C. muelleri* como alimento para sus larvas López-Tapia (2002). En el presente estudio, las tasas de crecimiento para las distintas etapas de vida de *L. vannamei*, fueron similares a las indicadas por Pacheco-Vega (2003), al utilizar como alimento cultivos de *C. muelleri* en un medio no convencional y con distintos aportes químicos de nitrógeno. En otros estudios alimentando a las larvas de camarón de *L. vannamei* con nematodos Focken *et al.* (2006), así como larvas de *Panagrellus redivivus* alimentados con las microalgas *C. gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Dunalliella* sp. (Naranjo *et al.*, 1999), en ambos trabajos las larvas exhibieron valores de crecimiento mayores a las encontradas en el presente estudio.

Las diferencias en la tasa de crecimiento obtenidas en los distintos estudios, podrían deberse a la utilización de distintas especies de microalgas y distintas variables ambientales en el cultivo. Además hay que considerar las relacionadas con la asimilación y digestibilidad características de la especie de camarón por que tienen una respuesta especie-específico. Kuban *et al.* (1985), mencionan que los requerimientos nutrimentales en estadios larvales pueden ser muy diferentes entre diversas especies de peneidos.

Otra factor importante que influye en el crecimiento de las etapas larvales de *L. vannamei* es el contenido de ácidos grasos. Diversos autores indican que los ácidos grasos polinsaturados de cadena larga son esenciales para el desarrollo de larvas de peneidos,

principalmente el docosahexaenóico (DHA: 20:6n-3) y el eicosapentanóico (EPA: 20:5n-3) (Tacon, 1990; Piña *et al.*, 2006).

Aunque los ácidos grasos de la serie 20:6n-3 (DHA) y 20:5n-3 (EPA) no fueron detectados en los cultivos de *S. elongatus* suministrado como alimento par *L. vannamei*, no se evaluó diferencia en la longitud total de *L. vannamei* por efecto del tipo de dieta. Los valores de la longitud de las larvas de *L. vannamei* resultan similares a los descritos por Treece y Fox (1993), Iversen *et al.* (1993) y López-Tapia (2002). Se menciona que las diferencias en el tamaño de las etapas larvales de diferentes especies de peneidos, pueden ser por el efecto de distintas condiciones de cultivo, la calidad de los progenitores y calidad y la cantidad del alimento suministrado (García y Le Reste, 1986).

#### **V. 5 Consumo de alimento por *L. vannamei***

*Artemia* es una de las especies más versátiles y comúnmente utilizadas como alimento en la camaronicultura debido a que posee las características adecuadas (tamaño, movilidad y contenido nutrimental) para alimentar estadios tempranos de peces y crustáceos (Gelabert y De La Cruz, 1990). Una de las principales características de *Artemia* es el mayor contenido de proteínas y lípidos en los nauplios recién eclosionados. La composición bioquímica de los nauplios de *Artemia* dependerá del estado nutrimental de los progenitores y de las condiciones ambientales en donde vivan, de ahí que existan quistes de *Artemia* de distinta calidad (Tacon, 1990). Los quistes sin descapsular tienen una capa externa llamado corion, que esta compuesta de lipoproteínas. Cuando los quistes inician la eclosión a nuplio, generalmente no tienen grandes diferencias en su composición bioquímica (Sorgeloos *et al.*, 1986). Durante la etapa naupliar de *Artemia* se evalúan pequeños cambios en la

composición de aminoácidos y ácidos grasos, pero se consideran cambios mínimos para la nutrición de larvas de camarón. Los valores promedio de la composición para nauplios de *Artemia* son de 55% proteína, 15% lípidos, 5% carbohidratos y 10% cenizas, con una digestibilidad promedio de 80%. Estos valores tienen variaciones mínimas entre diferentes estadios y periodos de incubación (FAO, 1989; Tacon, 1990; García-Ortega *et al.*, 1998).

En este trabajo los nauplios de *Artemia* se suministraron congelados para alimentar a las larvas de *L. vannamei*, ya que además la manipulación de los cultivos de nauplios de *Artemia* puede ser vector de contaminación por bacterias del género *Vibrio* en los estanques de cultivo de larvas de camarón (López-Torres, 2006). Otro factor importante para suministrar los nauplios de *Artemia* no vivos, fue que *Artemia* tiene una mayor tasa de crecimiento que las larvas de *L. vannamei* y nada con mayor velocidad, lo que dificulta su captura.

El consumo selectivo del alimento por las larvas de camarón puede ser afectado por diversos factores como: el tamaño y la forma, que sea alimento vivo ó inerte, la flotabilidad, el contenido nutrimental, la textura, el color y la palatabilidad (Gallardo *et al.*, 2003). Respecto al consumo de *S. elongatus* y *C. muelleri* durante las distintas etapas de vida de *L. vannamei*, se considera que no ocurrió limitación en la disponibilidad del alimento suministrado, ya que el consumo del alimento evaluado en los distintos estadios de vida no superó el 92% de la concentración celular (cél ml<sup>-1</sup>). Godínez *et al.* (2005), mencionan que una sobre o subalimentación pueden afectar la supervivencia, el crecimiento y el índice de desarrollo larvario. Los resultados obtenidos muestran un mayor consumo de la especie *S. elongatus* respecto a *C. muelleri*, inclusive al suministrar como alimento la mezcla de las dos especies. Lo anterior es posible que este relacionado con un consumo

preferencial por las células de menor tamaño como *S. elongatus* respecto a *C. muelleri*. Yúfera y Lubián (1990), sugieren que el menor tamaño de células permite su entrada con mayor facilidad al tracto digestivo, causando además una menor fricción y facilitando su digestión.

Araos-Dzul *et al.* (2000), indican que en etapas larvales de *Farfantepenaeus duorarum* alimentado con *Chaetoceros* y *Tetraselmis* y dos tipos de microencapsulado, se encontró una relación directa entre el tamaño de la partícula de alimento y el consumo hecho por la larva. Los resultados obtenidos acerca del consumo del alimento vivo por las distintas etapas larvales de *L. vannamei* muestran que conforme aumentó el tamaño del organismo se detectó una disminución en el consumo del alimento (*C. muelleri* y *S. elongatus*). Este resultado tiene una aplicación práctica directa en la camaronicultura, ya los resultados obtenidos en este estudio, muestran que se debe de tomar en cuenta el tamaño de la partícula alimenticia, debido a que: (1) las larvas de *L. vannamei* seleccionaron el alimento de acuerdo a su etapa de vida y (2) la preferencia de microalgas disminuye en la medida que las larvas alcanzaron un mayor desarrollo larval e incrementaron el consumo de *Artemia*.

#### **V. 6 Supervivencia de *L. vannamei***

No se encontró diferencia en la supervivencia de *L. vannamei* al utilizar como alimento *S. elongatus*, *C. muelleri* o la mezcla de las dos especies. El alimento suministrado no causó cambios importantes en el valor nutricional que permitió mantener el crecimiento y la supervivencia.

Los valores de supervivencia evaluados en este estudio, resultaron similares a los obtenidos con *C. muelleri* cultivado con fertilizantes agrícolas y utilizado como alimento para larvas de *L. vannamei* (Valenzuela-Espinosa *et al.*, 1999; Pacheco-Vega, 2003). La supervivencia también resultó similar a la obtenida en larvas de camarón *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) (Tobías-Qunitio y Villegas, 1982).

Los valores de supervivencia en este estudio resultan inferiores a los indicados por López-Tapia (2002), al utilizar como alimento *C. muelleri*, *Thalassiosira weissfloggi* y la mezcla de ambas. Así como también a los descritos por Araos-Dzul *et al.* (2000) para las larvas de *Farfantepenaeus duorarum* con dos tipos de microencapsulados. La diferencia en los valores de supervivencia de larvas de camarón evaluados en los distintos estudios, puede ser causa de las diferencias en el tamaño y densidad de células de las diversas especies de microalgas utilizadas como alimento (Pacheco-Vega, 2003; Piña *et al.*, 2006).

Los principales factores ambientales que influyen en la fisiología de las larvas son: la temperatura, la salinidad, la concentración de oxígeno disuelto, la luz en cantidad, el ciclo de luz:oscuridad, la saciedad del organismo y el origen de las larvas (De la Cruz, 1989; Brown, 2002). En el presente estudio se mantuvieron constantes la mayoría de las variables ambientales con excepción del tamaño de las partículas suministradas como alimento (*C. muelleri* y *S. elongatus*), el resto de las variables ambientales y de cultivo se situó dentro de los valores recomendados como óptimos para el crecimiento y supervivencia de larvas de *L. vannamei*.

Iversen *et al.* (1993) y Pacheco-Vega (2003) mencionan que elevados valores de supervivencia indicados en algunas granjas camaronícolas comerciales, se deben a que no existe un estricto control de la calidad del agua, lo cual permite la entrada de una gran

variedad de microalgas del medio natural con lo que se incrementa la microflora aumentando la cantidad de alimento disponible sin embargo, también se permite la presencia de bacterias no patógenas (*e.g. Rhodovulum sulfidophilum*).

En los cultivos de *L. vannamei* realizados en este estudio se detectó como epibionte *Leucothrix* sp. Se ha mencionado que es común la presencia de epibiontes en el exoesqueleto de las larvas de crustáceos y que estos pueden tener relación con agentes patógenos, como la bacteria *Leucothrix mucor* (Johnson, 1989). La bacteria *L. mucor* es una especie saprofita que no penetra la cutícula de crustáceos y se le encuentra en una gran variedad de crustáceos bentónicos, huevos, larvas y en el detritus. Este tipo de bacteria se ha detectado para casi todas las especies del género *Penaeus* o *Litopenaeus* (Gómez-Gil *et al.*, 2001), aunque en este trabajo no se cuantificó la cantidad de *Leucothrix* sp. la presencia de estos organismos en condiciones ambientales que sean favorables para su proliferación pueden afectar la supervivencia de las larvas del camarón.

En las setas de *L. vannamei* se observaron adherencias de *C. muelleri* y *S. elongatus* y resultó mas notorio en las larvas alimentadas solo con *S. elongatus*. Este resultado se relaciona con el menor tamaño de esta especie y la mayor densidad de células suministradas como alimento. En estudios previos con larvas de *L. vannamei* alimentadas con microalgas vivas y congeladas de *Tetraselmis* sp. se detectó adhesión de estas microalgas en las setas en el estadio de protozoa II, estas adhesiones pueden causar dificultad en el nado de las larvas de crustáceos debido a que disminuyen la movilidad (Pérez y Puello-Cruz, 2007). Godínez *et al.* (2005), mencionan que existe una relación directa entre la supervivencia y la tasa de ingestión, sin embargo, el suministro excesivo del alimento en condiciones de

cultivo no asegura una alta supervivencia debido a que deteriora la calidad del agua, disminuye la concentración de oxígeno y decrece la supervivencia.

Se ha evaluado que los diferentes medios utilizados para el transporte de las larvas de camarón pueden influir en la supervivencia. Suárez *et al.* (2001) y Piña *et al.* (2006), mencionan una supervivencia significativamente mayor para larvas de *L. vannamei* al ser transportadas en vuelos comerciales en comparación al uso de avioneta. Se indica que la manipulación del personal involucrado en el transporte, es una variable adicional que influye en la supervivencia de los organismos. El transporte de las larvas de *L. vannamei*, se realizó por vía terrestre por un periodo de 24 horas, debido a la falta de vuelos comerciales que permitieran el transporte de contenedores con organismos vivos desde la ciudad de la Paz, Baja California Sur hasta Tijuana, Baja California.

## Capítulo VI

---

### VI. CONCLUSIONES

---

- El porcentaje de dilución utilizado en los cultivos semicontinuos de *S. elongatus* y *C. muelleri* fueron adecuados, ya que se mantuvo estable la concentración celular y su composición bioquímica.
- En los cultivos semicontinuos el porcentaje de proteínas fue similar para *C. muelleri* y *S. elongatus* sin embargo, *C. muelleri* superó el porcentaje de lípidos y *S. elongatus* resultó con el mayor porcentaje de carbohidratos.
- El contenido total de aminoácidos esenciales y ácidos grasos fue similar entre *S. elongatus* y *C. muelleri* en los cultivos semicontinuos.
- El mayor porcentaje de fenilalanina se presentó en *S. elongatus*. El mayor contenido de histidina se evaluó en *C. muelleri* y la mezcla de los cultivos de ambas especies.
- En *S. elongatus* se encontró una mayor porcentaje de 18:3n3, y no se detectaron los ácidos grasos de la serie 20:3n6 y 22:6n3. Para *C. muelleri* se tuvo el mayor

porcentaje de 20:5n3 y 22:3n6, respecto a la mezcla de los cultivos de ambas especies.

- Se encontró una mayor preferencia en el consumo de *S. elongatus* cuando fue utilizado como dieta monoespecífica y mixta para etapas larvales de *L. vannamei*.
- La tasa de crecimiento, el índice de rendimiento y la supervivencia de las larvas de *L. vannamei* fue similar al suministrar como alimento *S. elongatus*, *C. muelleri* y la mezcla de ambas especies. Sin embargo, cuando se suministró como alimento *S. elongatus* el cefalotórax de postlarva I de *L. vanannei* es de menor longitud.
- La cianobacteria *S. elongatus* puede ser utilizada como alimento para la nutrición de etapas larvales de *L. vannamei*, ya que proporciona un valor nutrimental que permite obtener tasas de crecimiento y supervivencia similares a las obtenidas con *C. muelleri*.

## Capítulo VII

---

### VII. RECOMENDACIONES

---

- Evaluar la concentración celular óptima para alimentar larvas de *L. vannamei* con *S. elongatus*.
- Evaluar el valor nutrimental de *S. elongatus* para otras especies de organismos de importancia en la acuicultura, así como la posible modificación de su contenido nutrimental mediante variaciones en el medio de cultivo, parámetros físicos y químicos

## Capítulo VIII

---

### VIII. LITERATURA CITADA

---

- Aguilar-May, B. 2002. Remoción de nutrientes con tres microalgas marinas en agua sintética simulando un efluente de cultivo de camarón. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California, México. 104 pp.
- Aguilar-May, B. 2006. Inmovilización de células de la cianobacteria *Synechococcus* sp. para remover nutrientes de efluentes acuícolas. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California México. 117 pp.
- Aguilar-May, B. y Sánchez-Saavedra, M.P. 2008. Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* Journal of Applied Phycology. DOI: 10.1007/s10811-008-9376-7.
- Andersen, R.A. 2005. Algal Curing Techniques. Phycological Society. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 578 pp.
- A.P.H.A. 1980. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, New York. 1134 pp.
- Araos-Dzul, J., López-Téllez, N., Sarabia-Gómez, D. y Ramírez-Ligonio, H. 2000. Alimentación de larvas de camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* con dos tipos de microencapsulados. Instituto Nacional de la Pesca (INP) y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. Ciencia Pesquera. 14:33-37.
- Artiles, M.A. Bárbaro, J. Galindo, Fraga, I. y Francisco, V. 2001. Influencia de la inclusión de microalgas secas en la alimentación de protozoas de *Penaeus schmitti*. Revista de Investigaciones Marinas. 22(1): 45-55.

- Berges, J.A., Fisher, A.E. y Harrison, P.J. 1993. A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assay using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Marine Biology*. 115:187-193.
- Bernaldez, S.J., Sánchez-Saavedra, M.P., Licea, A. 2008. Antibacterial activity of marine microalgae and cyanobacteria. *Sometida a Journal of Applied Phycology*.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917 pp.
- Borowitzka, M.A. 1988. Vitamins and fine chemical from microalgae. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L.J. (Eds.). *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 153-196 pp.
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as a source of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*. 7: 3-15.
- Browne, R.A. 1993. Sex and single brine shrimp. *Natural History*. 102: 34-39.
- Brown, M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Marine Biology Ecology*. 145: 79-99.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Barrett, S.M. y LeRoi, J.M. 1993a. The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (clone T-ISO). *Journal of Phycology*. 29:601-612.
- Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D. y LeRoi, J.M. 1993b. 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.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volman, J.K. y Dunstan, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151:315-331.
- Brown, M.R. 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. En: Cruz-Suárez, L., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre. Mérida, Yucatán, México. 375 pp.

- Campa-Ávila, M.A. 2002. Evaluación del valor nutricional en dos especies de microalgas al ser suministradas como alimento al rotífero *Brachionus plicatilis*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 97 pp.
- Carvalho A.P y Malcata, F.X. 2003. Kinetic modeling of the autotrophic growth of *Pavlova lutheri*: study of the combined influence of light and temperature. *Biotechnology Progress*. 19:1128–1135.
- Castro B.T. 1993. Biología y Cultivo de *Artemia franciscana* en el ex Lago de Texcoco, de Ecatepec, Estado de México, México. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad de México, Distrito Federal, México. 72 pp.
- Castro, B.T., Castro, J., Gallardo, C. y Malpica, A. 1995. Propiedades de *Artemia* spp. para la nutrición en la acuicultura. *Oceanología* 3(1):31-38.
- Castro, B.T. y Gallardo, C. 1993. *Artemia* sp. Cuaderno No.31, Universidad Autónoma Metropolitana. Xochimilco, Estado de México. Ed. CBS. México. 54 pp.
- Castro-Barrera T., De Lara Andrade, R., Castro-Mejía G., y Malpica-Sánchez A. 2003. Alimento vivo en la acuicultura. *EL Hombre y su Ambiente*. División de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Unidad Xochimilco. México. 43 pp.
- Correa-Reyes, J.G. 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo de abulón. Tesis de Doctorado. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California, México. 135 pp.
- Chiaverini, J. 1972. Techniques d'extraction et d'analyse des lipides. Université de Paris et Marie Curie, Paris. Station Zoologique Ville France sur mer. Notes de Travail 12: 12 pp.
- Cruz-Reyes, G. 1997. Cuantificación de aminoácidos de los estadios larvales del camarón *Litopenaeus vannamei* y estimación de los requerimientos de aminoácidos esenciales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- De la Cruz, S.A. 1989. La selección del tamaño de las partículas alimenticias por las larvas del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. *Revista de Investigaciones Marinas de Cuba*. 10(2):163-174.

- De Nogales-Pérez, C. y Santos-Perea I. 1995. Cultivo de camarón en estanques. Fundamentos de Acuicultura Marina. Instituto Nacional de la Pesca y Acuicultura. Santa Fé Bogota, Colombia. 103 pp.
- Díaz-Iglesias, E., Brito-Pérez, R. y Báez-Hidalgo, M. 1991. Cría de postlarvas de langosta *Panulirus argus* en condiciones de laboratorio. Memorias del Taller Internacional sobre Ecología y Pesquerías de Langosta. Revista de Investigaciones Marinas de Cuba. 12(1-3):323-331.
- Dore, I. y Frimodt, C. 1987. An Illustrated Guide To Shrimp of The World. Osprey Books, Huntington, New York, EUA. 229 pp.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28: 350-356.
- Durazo-Beltrán, E. 2003. Efecto de los ácidos grasos de cadena larga en el crecimiento y metabolismo del abulón azul (*Haliotis fulgens*). Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México. 34 pp.
- Enrigh, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. Castell, J.D. 1986. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 96:1-13.
- Eriksen, N.T. y Iversen, L.J. 1995. Photosynthetic pigments as nitrogen stores in the cryptophyte alga *Rhodomonas* sp. Journal of Marine Biotechnology. 3:193-195.
- FAO (Food and Agricultura Organization). 1989. Nutrición y Alimentación de Peces y Camarones Cultivados. Manual de Capacitación. Roma, Italia. 592 pp.
- FAO (Food and Agricultura Organization). 2006 FISHSTAT Plus. Universal Software For Fishery Statistical Time Series. Fisheries Department, Fishery Information Data and Statistic Unit Data sets released. EUA. 198 pp.
- FAO (Fisheries and Aquaculture Department) 2008. Programa de información de especies acuáticas - *Penaeus vannamei*. Text by Briggs, M. En: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 2 Jul 2007.
- Focken, U., Schlechtriem, C., von Wuthenau, M., García-Ortega, A., Puello-cruz, A. y Becker, K. 2006. *Panagrellus redivivus* mass produced on solid media as live food for *Litopenaeus vannamei* larvae. Aquaculture. 37:1429-1436.

- Fogg, G.E. y Thake, B.J. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.
- Forster, I.P. y Dominy, W.G. 2006. Efficacy of three methionine sources in diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 37(4): 474-480.
- Fujiki, T. y Tagushi, S. 2002. Variability in chlorophyll a specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance. *Journal of Plankton Research* 24 (9):859–874.
- Gallardo, P., Martínez, G., Brito, A., Barrera, J., Pedroza-Islas, Cuzon, R.G., Rosas, C. y Gaxiola, G. 2003. Effect of *Artemia* nauplii replacement by an artificial feed containing krill hydrolysate on ingestion rate, oxygen consumption, and energy budget in the mysis of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Nauplius* 11(2): 69-81.
- García, S. y Le Reste, L. 1986. Ciclos vitales, dinámica, explotación y ordenación de las poblaciones de camarones peneidos costeros. Food and Agricultural Organization (FAO). Documento Técnico Pesca 203. Roma, Italia. 180 pp.
- García-Ortega, A. Verreth, J.A.J. Coutteau, P. Segner, H. Huisman, E.A. y Sorgeloos, P. 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture*. 161: 501–514.
- Gelabert R. y De la Cruz, A. 1990. La selección del tamaño de partículas alimenticias por *Artemia* (*Branchiopoda*). *Revista de Investigaciones Marinas de Cuba* 11(1): 63-69.
- Godínez, D.E., Díaz, A.H. y Gallo, M.C. 2005. Índice de desarrollo y supervivencia de larvas del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1871), alimentadas con diferentes concentraciones de *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18 (1):27-33.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., Flores-Guerra, A.L. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: *Camaronicultura y Medio Ambiente*. Páez-Osuma, F. (Ed.). Universidad Nacional Autónoma de México y El Colegio de Sinaloa. Ciudad de México, Distrito Federal, México. (14): 315-345.
- Graham, L.E. y Wilcox, L.E. 2000. *Algae*. Prentice Hall International, London. 420 pp.
- Guillard, R.L.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. 29-60. En: M.L. Smith y M.H. Chanley (Eds.). *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press, New York. EUA. 338 pp.

Guillard, R.L.L y Rhyter, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detenula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian. Journal Microbiology. 8: 229-239.

Hemerick, G. 1973. Mass culture. En: Handbook of Phycological Methods. 255-273 Culture Methods and Growth Measurement. Stein, J.R. (Ed.). Cambridge University Press, New York. EUA. 448 pp.

<http://www.chbr.noaa.gov/>

Iversen, S., Donald, M. y Higman, J.B. 1993. Shrimp capture and culture fisheries of the United States. Blackwell Scientific Publications. Osney Mead, Oxford. 15-33 pp.

James, C.M., Al-Hinty, S. y Salman, A.E. 1989. Growth and w3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimens. Aquaculture. 77: 337-357.

Johnson, S.K. 1989. Handbook of Shrimp Diseases. Texas A & M University. Texas, EUA. 25 pp.

Kaushik, S. 1979. Application of a biochemical method for the estimation of amino acid needs in fish: quantitative arginine requirements in different salinities. En: Halver J.E. y Tiew K. (Eds.). Finfish Nutrition and Fishfeed Technology. I.H. Heenemann GmbH and Co., Berlin. 197-207 pp.

Kawamura, T., Roberts, D.R. y Takami, H. 1998. A review of the feeding and growth of postlarval abalone. Journal of Shellfish Research. 17 (3): 615-625.

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.

López-Elías, J.A. 1990. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados; Evaluación de técnicas analíticas y de producción. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. México. 163 pp.

- López-Elías, J.A., Voltolina, D., Enríquez-Ocaña, F. y Gallegos-Simental G. 2005. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican comercial hatchery. *Aquacultural Engineering*. 33:181-191.
- López-Muñoz, I., Abalde, J. y Herrero, C. 1992. Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *Nova Acta Científica Compostelana (Biologia)*. 3:59-65.
- López-Tapia, M.R. 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. Ensenada, Baja California, México. 43 pp.
- López-Torres, M.A. 2006. Comunidades bacterianas asociadas con biopelículas en tanques de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*. Departamento de Biotecnología Marina. Posgrado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California México. 220 pp.
- Lorenz, M., Friedl, T. y Day, J.G. 2005. Perpetual maintenance of actively metabolizing microalgal cultures. En: Anderson, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Press. Amsterdam. 145-156 pp.
- Lourenço, S., Barbarino, E., Manchini-Filho, J., Schinke, K. y Aidar, E. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*. 41(2):158-168.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*. 193:265-275.
- Malara, G. y Charra, R. 1972a. Dosages des proteines particulaires selon la méthode de Lowry. Université de Paris. Sation Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail 6:11 pp.
- Malara, G. y Charra, R. 1972b. Dosages des glucides particulaires de phytoplankton selon la methode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail 6:12 pp.
- Mallo, J.C. y Fenucci, J.L. 2004 Alimentación de protozoas del langostino *Pleoticus muelleri* Bate utilizando diferentes microencapsulados y especies de microalgas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 39 (1):13-19.

- Medina-Reyna, C.E. y Cordero-Esquivel, B. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* Lemerman, mantenida en cultivo estático con un medio comercial. Universidad del Mar. Ciencia y Mar. 5(2):19-25.
- Metcalf, L.D., A.A. y J.R. Schmitz. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Analytic Chemistry. 38:514-515.
- Naranjo, J., Porchas, M.A., Robles, M., Magallon, F., Valdez, J. y Villarreal, H. 1999. Sobrevivencia, metamorfosis y crecimiento de larvas del camarón *Penaeus californiensis* (Decapoda: Penaeidae) alimentadas con diferentes microalgas. Revista de Biología Tropical. 47 (4):917-922.
- Nieves, M.D., Voltolina, D. y Barrera, A. 1998. A new parameter for comparison of microalgae growth. Revista Italiana de Acuicultura. 33:178-184.
- Oren, A. 2000. Salts and brines. En: Whitton, A. y Potts, M. (Eds.). The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 281-306 pp.
- Pacheco-Vega, J.M. 2003. Crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en un medio no convencional y evaluación del valor nutricional al ser suministrada como alimento a larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California México. 85 pp.
- Pacheco-Vega, J.M. y Sánchez-Saavedra, M.P. 2008. The biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* Lemerman grown with an agricultural fertilizar. Journal of the World Aquaculture Society. En prensa.
- Pande, S.V., Khan, R.P. y Venkitasubramanian, T.A. 1963. Microdeterminatios of lipids and serum total acids. Analytical Biochemistry. 6:415-423.
- Parsons, T.R., Maita Y., y Lalli, C.M. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford. 173 pp.
- Pedrazzoli, A., Molina, C., Montoya, N., Townsend, S., Leon-Hing, A. Parades Y. y Calderon, J. 1998. Recent advances on nutrition research of *Penaeus vannamei* in Ecuador. Reviews in Fisheries Science. 6:143-151.
- Pérez-Farfante, I. y Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of The World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Memories du Museum National D'Historie Naturelle. Paris, France. 233 pp.

- Pérez, E.I. y Puello-Cruz, A.C. 2007. Evaluación del crecimiento y supervivencia en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* usando como fuente de alimento microalgas vivas y congeladas. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 7(5):1695-7504. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507/050706.pdf>
- Piña P., Voltolina D., Nieves M. y Robles M. 2006. Survival, development and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. Aquaculture. 253(1-4):523-530.
- Powles, S.B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. Annual Review Plant Physiology. 35:15-44.
- Renaud, S., Luong-van, T., Lambrinidis, G. y Parry, D. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. Aquaculture. 211:195-214.
- Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, EUA. 528 pp.
- Richmond, A. 2003. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing, New York. EUA. 633 pp.
- Rosales, N., Ortega, J., Mora, R. y Morales, E. 2004. Influencia de la salinidad sobre crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. Ciencias Marinas. 31(2):349-355.
- Rosenberry, B. 2004. World Shrimp Farming. Rosenberry, B. (Ed.). An Annual Report. Shrimp News International, EUA. 276 pp.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y Voltolina, D. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. Comparative Biochemistry and Physiology. 107B(1):39-44.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Jiménez, C. y Figueroa, F.L. 1996. Far-red light inhibits growth but promotes carotenoid accumulation in the green microalgae *Dunaliella bardawill*. Physiologia Plantarum. 97:385- 389.
- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P y Correa-Reyes, J.G. 2001. Biochemical composition of benthic marine diatoms using a common agricultural fertilizer as culture medium. Journal of Shellfish Research. 20:611-617.

- Smith, L.L., Biedembach, J.M. y Lawrence, A.L. 1992. Penaeid larviculture: Galveston method. 171-191. En: Fast, A.W. y Lester, L.J. (Eds.). *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier Publishers, London. 862 pp.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P.H., Tackaert, W. y Versichele, D. 1986. *Manual for the culture and use of the brine shrimp Artemia in Aquaculture*. Faculty of Agriculture, State University of Gent, Belgium. 319 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-344. En: *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Stein, J. (Ed.). Cambridge University Press, London. 448 pp.
- StatSoft, Inc. 2002. *Statistica for Windows [Computer program manual]*. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14<sup>th</sup> Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com.
- Suárez, J.A., García, A., Newmark, F. y Bador, R. 2001. Efecto de las condiciones de transporte, recepción, aclimatación y siembra de nauplios de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) sobre la sobrevivencia en larvicultura. *Boletín de investigaciones Marinas y Costeras*. 30:3-18.
- Tacon, A.G.J. 1990. *Standard Methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp*. Argent Laboratories Press. Mariculture and Fisheries Department. Safat, Kuwait. 21-33.
- Tandeu de Marsac, N. y Houmard, J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: New steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 104:119-190.
- Teshima, S.A., Kanazawa, A. y Yamashita, M. 1986 Dietary value of several proteins and supplemental amino acids for larvae of the prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 51: 225-235.
- Thompson, P.A. y Guo, M. 1992. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*. 28: 481-488.
- Thompson, P.A., Guo, M.X. y Harrison, P.J. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Biology*. 117:259-268.
- Tobias-Quinitio, E. y Villegas, C.T. 1982. Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon* Fabricius larvae feed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture*. 29:253-260.

- Torres-Rodriguez, L.M., Voltolina, D. y Sánchez-Saavedra, M.P. 2006. Producción de microalgas a la intemperie en diferentes situaciones estacionales en Bahía Kino, Sonoras. *Industria Acuicola*. 2:8-10.
- Treece, G. y Fox, J. 1993. Design Operation and Training Manual for an Intensive Culture Shrimp Hatchery (With Emphasis on *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei*). Texas A & M University Sea Grant College. Program Bryan. Texas, EUA. Publication 93-505. 187 pp.
- Ukeles, R. 1980. Algae Biomass. Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. 287- 306 pp.
- Valenzuela-Espinosa, E., Gendrop-Funes, V., Pérez-Castañeda, R. y Wilburn-González, J.G. 1999. Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone) alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas*. 25 (3):423-437.
- Valle-Ramírez de Arellano, G.A. 2007. Utilización de microalgas para la remoción de cadmio y zinc de efluentes de aguas residuales urbanas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 70 pp.
- von Elert, E. y Wolffrom, T. 2001. Supplementation of cyanobacterial food with polyunsaturated fatty acids does not improve growth of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*. 46:1552-1558.
- von Quillfeldt, C.H. 2001. Identification of Some Easily Confused Common Diatom Species in Arctic Spring Blooms. *Botanica Marina*. 44:375 – 389.
- Wang, Q.H., Wang, S.H., Ding, M J., Li, M., Shi, R.F. y Cheng, A.H. 1997. Studies on the culture conditions of benthic diatoms for feeding abalone. I. Effects of temperature and light intensity on growth rate. *Chinese Journal of Limnology*. 15:296–302.
- Webb, K.L. y Chu, F.E. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: Pruder, G.D., Langdon, C.J. y Conklin, D.E. (Eds.). *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, EUA. 272-291 pp.
- Werner, D. 1977. *The Biology of the Diatoms*. Botanical Monographs. Vol. 13. Berkeley: University of California Press. EUA. 498 pp.

Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60: 231-241.

Wilson, R.P. y Poe, W.E. 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. *Journal Nutrition*. 103:1359–1364.

Wood, A., Everroad, M.R.C. y Wingard, L.M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. En: Anderson, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Press. Amsterdam. 269–286 pp.

[www.conapesca.sagarpa.gob.mx](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx)

Yúfera, M. y Lubián, L.M. 1990. Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. En: Akatsuka, I. (Ed.). *Introduction to Applied Phycology*. SPB The Academic Publishing, The Hague, Netherlands. 209-227 pp.

Zar, J. H. 1984. *Bioestatistical Analysis*. Prentice-Hall International, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, EUA. 718 pp.