

# Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



METABOLISMO RESPIRATORIO, EXCRECIÓN NITROGENADA, RELACION O<sub>2</sub>/N, CAPACIDAD OSMORREGULADORA, CRECIMIENTO, FRECUENCIA DE MUDA Y SOBREVIVENCIA EN JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* MANTENIDO A BAJA SALINIDAD Y ALIMENTADO CON DIFERENTES DOSIS DE ASTAXANTINA

TESIS  
MAESTRIA EN CIENCIAS

REBECA MEDINA ZENDEJAS

Ensenada, Baja California, Mexico. Abril del 2006

TESIS DEFENDIDA POR  
**Rebeca Medina Zendejas**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Fernando Díaz Herrera  
Director del Comité



Dra. Denisse Re Araujo  
Miembro del Comité



Dra. Diana Tentori Santacruz  
Miembro del Comité



Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
Coordinador del programa de  
posgrado en Biotecnología Marina



Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla  
Director de Estudios de Posgrado

26 de abril de 2006

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



**CICESE**

---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**METABOLISMO RESPIRATORIO, EXCRECIÓN NITROGENADA, RELACIÓN O: N,  
CAPACIDAD OSMORREGULADORA, CRECIMIENTO, FRECUENCIA DE MUDA Y  
SOBREVIVENCIA EN JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* MANTENIDO A BAJA  
SALINIDAD Y ALIMENTADO CON DIFERENTES DOSIS DE ASTAXANTINA**

TESIS

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

Presenta:

**REBECA MEDINA ZENDEJAS**

Ensenada, Baja California, México, Abril del 2006.

**RESUMEN** de la tesis de **Rebeca Medina Zendejas**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. México. Mayo del 2006.

**METABOLISMO RESPIRATORIO, EXCRECIÓN NITROGENADA, RELACIÓN O: N, CAPACIDAD OSMORREGULADORA, CRECIMIENTO, FRECUENCIA DE MUDA Y SOBREVIVENCIA EN JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* MANTENIDO A BAJA SALINIDAD Y ALIMENTADO CON DIFERENTES DOSIS DE ASTAXANTINA.**

Resumen aprobado por:

  
Dr. Fernando Díaz Herrera  
Director de Tesis

El consumo de oxígeno de *L. vannamei* aclimatado a baja salinidad (3‰), mostró una relación directa con las diferentes concentraciones de astaxantina adicionadas en el alimento. La tasa de consumo de oxígeno de los organismos alimentados con el tratamiento (C), fue significativamente la más baja ( $QO_2 = 1.05 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ p.s}$ ) respecto a la tasa respiratoria obtenida en los organismos provenientes de los tratamientos A, B y D.

La excreción amoniacal de los organismos que fueron alimentados con el tratamiento (C), excretaron ( $0.070 \text{ mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ p.s}$ ) siendo los organismos que menos excreción amoniacal presentaron con respecto a los organismos provenientes de los demás tratamientos. Se calculó la relación atómica O: N, la cual indico que los organismos alimentados con los tratamientos A, B y D, utilizaron como sustrato energético a las proteínas, mientras que los organismos alimentados con el tratamiento C, utilizaron una mezcla de lípidos y carbohidratos. La capacidad osmorreguladora de los organismos antes de la reducción de la salinidad fue de  $-187 \text{ mOsm K}^{-1}$  con un patrón de regulación hiposmótica. Después de la reducción de la salinidad la capacidad osmorreguladora de los camarones fue de ( $528 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ) obteniéndose un patrón de regulación hiper-osmótico. La capacidad osmorreguladora de los organismos aclimatados a baja salinidad (3‰) provenientes del tratamiento (C), fue significativamente menor ( $250 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ) y la más cercana a (0), cuando fue comparada con la capacidad osmorreguladora de los organismos alimentados con los tratamientos (A, B y D). La frecuencia del ciclo de muda cuantificada para los organismos provenientes del tratamiento con  $80 \text{ mg Kg}^{-1}$  de astaxantina, fue la más corta, respecto a los camarones provenientes de los demás tratamientos. El coeficiente de crecimiento diario cuantificado para los organismos alimentados con  $80 \text{ mg Kg}^{-1}$  de

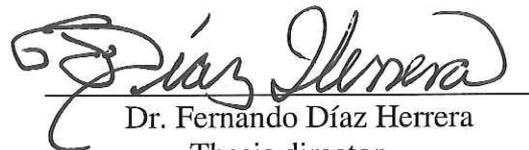
astaxantina, mostró diferencias significativas respecto a los tratamientos (A, B y D) ( $P < 0.05$ ). Además los camarones a los que se les proporciono el tratamiento (C) exhibieron una sobrevivencia del 80%. En el presente trabajo se concluye que la dieta adicionada con  $80 \text{ mg Kg}^{-1}$  de astaxantina es la adecuada para el cultivo de *L. vannamei* a baja salinidad. Esta concentración le ayudo al organismo a destinar una menor cantidad de energía para mantener la homeostasis, por lo que la mayor proporción de energía se utilizo en el crecimiento del organismo.

**PALABRAS CLAVE:** *Litopenaeus vannamei*, consumo de oxígeno, excreción nitrogenada, capacidad osmorreguladora.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Rebeca Medina Zendejas** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, Mexico. May 2006.

**METABOLISM RESPIRATORY, AMMONIUM EXCRETION, RATIO O: N, OSMOREGULATORY CAPACITY, GROWTH, MOULTING FREQUENCY AND SURVIVAL OF *Litopenaeus vannamei*, FED AT DIFFERENT ASTAXANTHIN CONCENTRATIONS ACCLIMATED TO LOW SALINITY WATER**

Abstract approved by:



Dr. Fernando Díaz Herrera  
Thesis director

The oxygen consumption of *L. vannamei* acclimated to low salinity water (3‰), was related to different concentrations of astaxanthin dietary. The rate of oxygen consumption of shrimps fed with treatment C, were significantly lower ( $QO_2 = 1.05 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ d. w.}$ ) respect shrimps fed with the other treatments. The ammonium excretion in shrimps that received treatment C, was ( $0.070 \text{ mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ d. w.}$ ), respect to the other treatments was significantly lower. The ratio O: N was calculated; this ratio indicated that shrimps fed with treatments A, B and D, utilized proteins as energetic substrate, on the other hand, in the shrimps fed with treatment C, there was a tendency to use as energetic substrate lipids and carbohydrates, this indicated an energetic advantage for shrimps fed with treatment C. The transformation of lipids and carbohydrates has a low energetic cost, compared with the degradation of proteins. The osmoregulatory capacity of shrimps before of salinity reduction was ( $-187 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ). The shrimps were hypo-osmoregulators. After of the salinity reduction the osmoregulatory capacity of the shrimps was ( $528 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ), they were hyper-osmoregulators. The osmoregulatory capacity of the organisms acclimated to low salinity water (5‰) fed with treatment (C) was significantly lower ( $250 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ) and most closely to (0), when it was compared with shrimps fed with the other treatments (A, B y D). The moulting frequency for the organisms fed with treatment (C)  $80 \text{ mg Kg}^{-1}$  of

astaxanthin, was shortest, respect to shrimps fed with the other treatments. The growth in shrimps fed with treatment (C) was the highest respect to shrimps fed with the other treatments ( $P < 0.05$ ). The survival of shrimps fed with treatment (C) was (80%).

In the present work, the diet with astaxanthin  $80 \text{ mg Kg}^{-1}$  supplemented was adequately for the culture of *L. vannamei* in low salinity water to. This dietary provided the energy requirements needed to maintain homeostasis in shrimps which made possible to use energy for growth.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulatory capacity.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES:**

**Ricardo Medina y Jovita Zendejas. Por todo su amor y sobre todo, por ser mi más grande motivación en la vida.**

**A MIS HERMANOS: José Luis, Martín, Joel, Magdalena, Maria Estela, Crecencio, Rosa y Ana. Por ser mis guías y parte importante en mi vida.**

**A MIS AMIGAS: Laura Gómez y María del Carmen Gutiérrez Corona. Gracias por su valiosa amistad, incondicional y sincera, por todos los momentos de felicidad y compañerismo a lo largo de nuestras vidas.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Díaz Herrera, por haber aceptado ser mi director de tesis. Por su orientación y apoyo para la realización de este trabajo.

A los miembros del comité: Dra. Dennise Re Araujo y a la Dra. Diana Tentori por sus valiosas críticas y aportes para la realización de este trabajo.

Al laboratorio de producción de larvas Acuapacific, en especial a Fernando Marino por habernos apoyado con los organismos empleados en este estudio.

Al personal de Biotecnología Marina y acuicultura, por habernos apoyado y asesorado, durante la realización del trabajo y por ayudarnos a resolver las dudas que se presentaron en su momento.

Mi más sincero agradecimiento a Maricela Flores, por su amistad y apoyo en las horas de trabajo. Por brindarme serenidad y orientación, en los momentos difíciles. Por transmitirme sus experiencias y su incansable inquietud por el saber.

A María del Carmen Gutiérrez Corona, por compartir tu alegría y buenas vibras a lo largo de nuestras vidas. Así como los momentos que pasamos juntas, durante nuestra estancia en el postgrado.

A Dennise Castro Osuna, por manifestarme su amistad sincera, cariño, ternura y su incansable buen humor.

A mis compañeros y amigos de generación: José Iván Galván Mendoza, William Capa, Karla Juárez, Humberto Machado, Ricardo Sánchez y Mimi Sánchez. Por su cariño y apoyo.

Al CONACYT, por haberme otorgado la beca durante mi estancia en esta institución y al CICESE, por otorgarme la beca interna durante los últimos meses para continuar y concluir este trabajo.

A los técnicos: Francisco Valenzuela, José María Domínguez y Francisco J. Ponce del Departamento de dibujo del CICESE.

A todo el personal administrativo del CICESE, que me brindaron todo el apoyo en la realización de trámites y documentación durante mi estancia en esta institución.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Forma molecular de la astaxantina	2
<b>Figura 2</b> Ruta de bioconversión de carotenoides en peneidos propuesta por Meyers y Latscha (1997).	3
<b>Figura 3</b> Esquema del diseño experimental, realizado en camarones juveniles <i>L. vannamei</i> , alimentados con una dieta adicionada con diferentes niveles de astaxantina.	17
<b>Figura 4</b> Esquema del sistema respirométrico utilizado para determinar el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los juveniles de <i>L. vannamei</i> .	18
<b>Figura 5</b> Consumo de oxígeno ( $QO_2 = \text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ p.s}$ ) de los juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con una dieta con diferentes niveles de astaxantina.	23
<b>Figura 6</b> Excreción de amonio ( $\text{mg NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de p.s) en juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con diferentes concentraciones de astaxantina	24
<b>Figura 7</b> Relación atómica O: N de juveniles del camarón blanco <i>L. vannamei</i> , alimentado con una dieta con diferentes concentraciones de astaxantina.	25
<b>Figura 8</b> Capacidad osmorreguladora en juveniles de camarón blanco <i>L. vannamei</i> alimentados con diferentes dosis de astaxantina. El asterisco indica que estos organismos fueron alimentados con una dieta basal libre de carotenoides.	26
<b>Figura 9</b> Coeficiente de crecimiento diario, de los juveniles de camarón blanco, durante la fase experimental alimentados con diferentes dosis de astaxantina	28
<b>Figura 10</b> Frecuencia de muda de los juveniles de camarón blanco <i>L. vannamei</i> , provenientes de cada condición experimental	29

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla I</b> Principales efectos de la astaxantina en crustáceos	5
<b>Tabla II</b> Composición proximal de la dieta comercial Rangen® Suministrada a los organismos.	12
<b>Tabla III</b> Ingredientes adicionados a la dieta basal durante la reformulación	14
<b>Tabla IV</b> Análisis bromatológico de la dieta basal, control y las adicionadas con astaxantina.	15
<b>Tabla V</b> Número inicial de organismos y la sobrevivencia, en los juveniles de camarón blanco, <i>L. vannamei</i> alimentados con diferentes concentraciones de astaxantina.	28

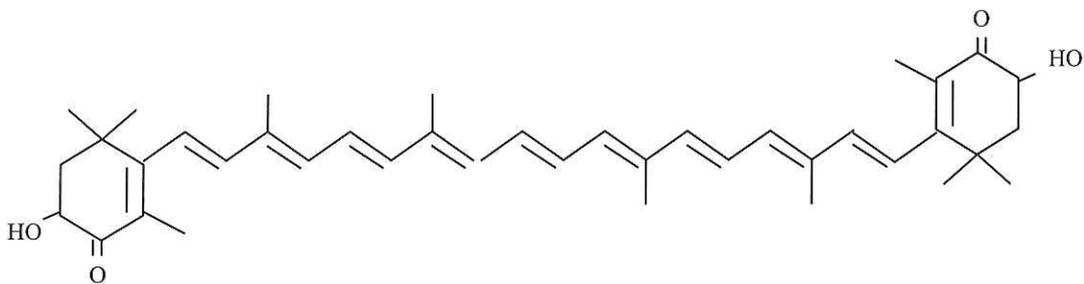
## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cultivo de crustáceos ha tenido un gran impulso en cuanto a investigaciones se refiere, particularmente el interés se ha centrado sobre la condición fisiológica del organismo, la cual, es una de las componentes más importantes para conocer los requerimientos nutricionales y ambientales de los organismos, ya que son considerados como necesarios para la optimización de la industria camaronícola (Bahere, 2000; Chang *et al.*, 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000). Por esta razón han sido diseñados alimentos balanceados que cubren todos los requerimientos nutrimentales del organismo. Adicionado a lo anterior, se han incluido en la dieta diversos tipos de aditivos nutricionales como los carotenoides,  $\beta$ -glucanos y las macroalgas con el fin de mejorar el estado nutrimental de los organismos y así aumentar la tolerancia al estrés, reducir el periodo de muda e incrementar el crecimiento y sobrevivencia (Kontara *et al.*, 1995; Meyers y Latscha 1997; Petit *et al.*, 1997; Merchie *et al.*, 1998; Chien y Shiau 2005). La limitación o carencia de estas macromoléculas, conduce a desequilibrios nutrimentales, alteraciones fisiológicas y enfermedades (Harrison, 1990, Scott 1994).

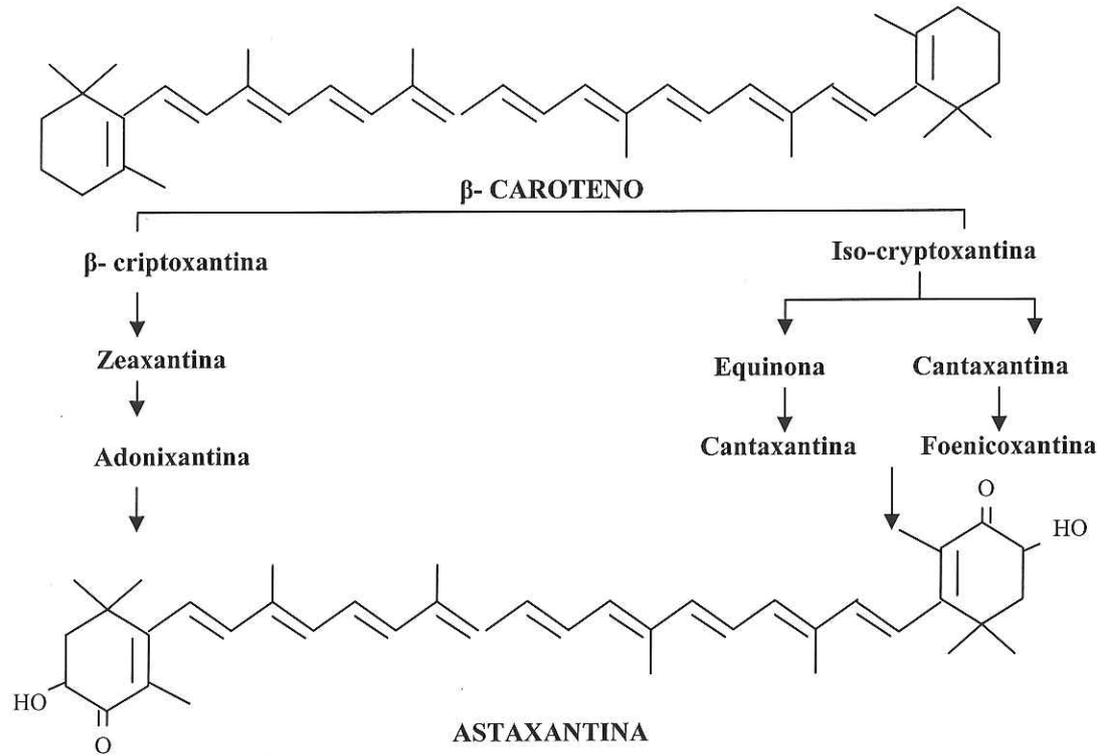
De acuerdo a Lastcha (1989) en peneidos el pigmento más importante es la astaxantina (Fig. 1), siendo el carotenoide principal y más abundante en el integumento, la glándula digestiva y el ovario de los crustáceos (Yamada *et al.*, 1990). Al respecto, los estudios realizados por (Sagi *et al.*, 1995; Dall, 1995; Petit *et al.*, 1997; Meyers y Lastcha, 1997) han demostrado que los carotenoides sólo pueden ser sintetizados *de novo* en plantas,

debido a ello la astaxantina y sus precursores deben ser obtenidos por los crustáceos a través de la dieta (Paniagua *et al.*, 2000).

Estudios realizados con *Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon* y *Litopenaeus vannamei* han demostrado y reconocido la capacidad de estos camarones para oxidar y convertir los carotenoides ingeridos como el  $\beta$ -caroteno en astaxantina, siendo este último el más importante y además comprende el 90% de los pigmentos totales en *Marsupenaeus japonicus* (Ishikawa *et al.*, 1996) y del 86-98% en *Penaeus monodon* (Okada *et al.*, 1994) y en *L. vannamei* comprende el 65% (Arango, 1996). La eficiencia de conversión de los carotenoides en astaxantina, es realizada a través de la siguiente ruta de biosíntesis. La ruta metabólica de  $\beta$ -caroteno a astaxantina en los camarones, las langostas y los cangrejos es a través de la conversión de criptoxantina a equinona, y ésta a su vez, en cantaxantina hasta llegar a la astaxantina (figura 2) (Katayama *et al.*, 1971, 1972, Tanaka *et al.*, 1976).



**Figura 1.** Forma molecular de la astaxantina



**Figura 2.** Ruta de bioconversión de carotenoides en peneidos propuesta por Meyers y Latscha (1997).

Los crustáceos poseen la capacidad de metabolizar la astaxantina por diferentes vías desde precursores lejanos como el  $\beta$ -caroteno, aunque su depositación se eficientiza cuando es metabolizada desde precursores cercanos como la zeaxantina en el caso de *Penaeus japonicus*, *Penaeus orientalis*, *Litopenaeus stylirostris* y *Litopenaeus vannamei* (Katayama, *et al.*, 1971, 1972; Tanaka, 1976; Castillo *et al.*, 1981; Katagiri *et al.*, 1987; Okada, 1994, Garza y Aguirre, 1998).

La naturaleza y el origen de la astaxantina son algunas de las cualidades importantes que pueden ser asociadas a los problemas de digestibilidad de esta molécula en la dieta; ya que se ha demostrado en pruebas de laboratorio que es metabolizada eficientemente cuando se obtiene a partir de fuentes naturales. (Cruz-Suárez, Ricque-M y Peña, 1998; Garza y Aguirre, 1998).

Una de las características más importantes que otorga esta molécula, en camarones peneidos es el aumento en la resistencia al estrés osmótico cuando las postlarvas (PL) son expuestas a salinidades bajas y son alimentadas con una dieta rica en astaxantina (Darachai *et al.*, 1998; Merchie *et al.*, 1998). Paralelo a ello se ha relacionado a la astaxantina con posibles efectos inmuno modulatorios en crustáceos y se ha demostrado que incrementa la resistencia de los organismos cuando son expuestos a pruebas de estrés (Merchie, *et al.*, 1998; Scholz, *et al.*, 1999).

Estudios realizados por Chien *et al.*, (2003) indican que el aumento de la capacidad antioxidante en los camarones, fue debido a que se les proporcionó astaxantina en la dieta y como consecuencia los organismos mostraron un aumento en la recuperación del estrés osmótico y térmico al que fueron expuestos. En la tabla 1 se presentan los efectos de la astaxantina al utilizarla en la dieta de peneidos.

Se ha reportado la capacidad de varias especies de crustáceos, incluyendo camarones peneidos, para tolerar cambios de salinidad (Kutty *et al.*, 1971; Venkataramiah *et al.*, 1974; Bishop *et al.*, 1980; Gaudy y Sloane, 1981; Guerin y Stickle, 1992; Rosas *et al.*, 1997,

1999a; Díaz *et al.*, 2001; Re *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2004). Rosas *et al.*, (1999b), encontraron que las postlarvas PL<sub>10</sub> y PL<sub>14</sub> de *Litopenaeus setiferus* pueden tolerar medios diluidos (5‰). Sin embargo Ogle *et al.*, (1992) reportaron que las PL<sub>8</sub> de *Litopenaeus vannamei* son más sensibles a cambios de salinidad respecto a las PL<sub>22</sub>. Esto se debe a que en los estadios de desarrollo temprano, exhiben una baja sobrevivencia en salinidades inferiores a 16‰.

**Tabla I.** Principales efectos de la astaxantina en crustáceos.

<b>Especie</b>	<b>Efecto</b>	<b>Fuente de astaxantina</b>	<b>Referencia.</b>
<i>P. vannamei</i>	Mayor crecimiento	Dieta 50 mg kg <sup>-1</sup>	Arango, (1993)
<i>P. japonicus</i>	Mayor crecimiento	Dieta 60 mg kg <sup>-1</sup>	Petit <i>et al.</i> , (1997)
	Reducción del ciclo de muda		
	Mayor resistencia al estrés de		
<i>P. monodon</i>	PL	Dieta 80 mg kg <sup>-1</sup>	Merchie <i>et al.</i> , (1998)
	Mayor crecimiento		Merchie <i>et al.</i> , (1999)
	Mayor resistencia al estrés		Chien <i>et al.</i> , (2003)
<i>M. japonicus</i>	Mayor resistencia a estrés	Dieta 100 mg kg <sup>-1</sup>	Chien <i>et al.</i> , (2005)
	Y mayor sobrevivencia		

Entendiendo la relación existente entre el metabolismo respiratorio de las especies de peneidos expuestos a bajas salinidades, podemos corroborar el uso de indicadores metabólicos sobre el estado fisiológico de crustáceos que pueden hacer posible la determinación de la cantidad y los requerimientos energéticos para cubrir sus demandas metabólicas. Paralelo a ello (Clifford y Brick, 1979; Gallagher y Mathews, 1987; Nelson *et*

*al.*, 1997) proponen que la medición del consumo de oxígeno y la producción de amonio, son excelentes parámetros fisiológicos que indican la utilización de la energía y proteínas proveniente de la dieta en crustáceos, expuestos a diferentes condiciones ambientales. Otro parámetro fisiológico que nos permite inferir el efecto de los factores ambientales sobre los requerimientos energéticos de los organismos es el análisis de la relación atómica oxígeno-nitrógeno (Mayzaud y Conover, 1998). Esta relación (O: N), es un indicador metabólico que nos permite determinar que tipo de macromoléculas fueron utilizadas como fuente de energía por los organismos, para cubrir sus requerimientos energéticos (Conover y Corner, 1968; Bayne, 1973; Barber y Blake 1985).

El oxígeno, es el último receptor de electrones en la ruta respiratoria y puede ser asociado con la energía que se utiliza para responder a cambios de salinidad. Se ha demostrado que después del ajuste fisiológico por cambios de salinidad dicha ruta respiratoria se encuentra involucrada en el uso de la energía metabólica a través de la activación de enzimas, así como en la regulación hormonal y en la liberación de aminoácidos (Lima *et al.*, 1997). Estudios realizados en peneidos han demostrado que a bajas concentraciones de salinidad, la excreción de amonio y el consumo de oxígeno se incrementan de manera significativa (Chen y Lai, 1993; Villareal *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 2001).

Una de las respuestas fisiológicas que puede ser correlacionada con los cambios en los parámetros ambientales es el consumo de oxígeno, ya que se encuentra relacionado con el trabajo metabólico y la energía que los organismos destinan para realizar el control homeostático (Salvato *et al.*, 2001). La utilización del consumo de oxígeno en los

organismos acuáticos es un método útil y válido para evaluar el efecto de los factores ambientales tales como: la temperatura, salinidad, intensidad de luz y el oxígeno disuelto. Además indica la determinación del costo energético asociado con el estrés fisiológico provocado por estos parámetros sobre el organismo (Kinne, 1971; Villarreal y Rivera, 1993; Brown y Terwilliger, 1999; Lemos *et al.*, 2000; Altinok y Grizzle 2003).

Se ha demostrado que en juveniles de *Penaeus japonicus* el consumo de oxígeno se incrementa de 0.2-0.6 mgO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> cuando se reducen las concentraciones de salinidad de 30-15 u.p.s (Chen y Lai, 1993). La relación existente entre el incremento del consumo de oxígeno, debido a bajas salinidades, se encuentra directamente asociado con el gasto metabólico que realiza el organismo para compensar el estrés osmótico, reflejándose en la disminución del crecimiento (Chen y Lin, 1995).

Se ha demostrado que la excreción de amonio es un indicador metabólico que se utiliza para evaluar el efecto de varios factores ambientales sobre la fisiología de los crustáceos (Jiang *et al.*, 2000). La principal forma de nitrógeno excretado en crustáceos, particularmente en peneidos, es el amonio, alrededor de un (60-70%). En menores cantidades aminoácidos, urea y ácido úrico (Regnault, 1987).

Por otra parte Chen *et al.*, (1995) estudiaron la excreción amoniaca de *P. chinensis*, en donde se encontró que dicha especie incrementó los niveles de excreción de amonio, al disminuir la concentración de salinidad. Para el camarón café *F. aztecus* expuesto a salinidades de 10 a 15‰ Hernández y Díaz (1995) obtuvieron que esas salinidades causaron un incremento significativo en la tasa de excreción de amonio. En *Litopenaeus*

*vannamei* expuesto a salinidades fluctuantes, Díaz *et al.*, (2001) obtuvieron un incremento de la excreción nitrogenada para salinidades de 11‰. El principal proceso involucrado con la salida de productos nitrogenados es por medio de la difusión como  $\text{NH}_3^+$  y/o  $\text{NH}_4^+$  a través del epitelio branquial. El segundo proceso involucrado con la salida de amonio es a través de un intercambio iónico, donde el sodio entra por contrabalance, excretándose así el amonio. Diversos estudios han indicado, que la presencia de un transportador enzimático específico, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasas, es de vital importancia para que se lleve a cabo el intercambio de  $\text{Na}^+$ /  $\text{NH}_4^+$ . Dicho transportador enzimático se encuentra localizado en la parte basal de las células epiteliales de la branquia (Regnault, 1984 y 1987; Hagerman, 1990).

Una de las funciones reguladoras que nos permite conocer la condición fisiológica del organismo es la capacidad osmorreguladora. La cual puede ser definida como la diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa a la del medio externo, (Charmantier *et al.*, 1989). La capacidad osmorreguladora es una herramienta utilizada para evaluar la condición fisiológica de los organismos; así como para detectar los efectos subletales del estrés osmótico en los sistemas de cultivo (Lignot *et al.*, 2000).

Durante las últimas cuatro décadas, la fisiología osmorreguladora de las diferentes especies de peneidos ha sido extensamente estudiada para evaluar las condiciones óptimas para su cultivo, como en: *Farfantepenaeus aztecus* (Bishop *et al.*, 1980; Castille y Lawrence 1981; Howe *et al.*, 1982; Hernández y Díaz 1995) en *L. setiferus*, *L. stilirostris* y *L. vannamei* (Williams 1960; Castille y Lawrence 1981; Rodríguez 1981) en *P. esculentus*,

*Fenneropenaeus merguensis*, *Metapenaeus bennettiae* Dall, (1981); en *F. indicus* (Parado-Esteba *et al.*, 1987); en *P. monodon* (Cawthorne *et al.*, 1983; Ferraris *et al.*, 1986); en *Marsupenaeus japonicus* (Charmantier-Daures *et al.*, 1989); en *Fenneropenaeus chinensis* (Chen y Lin 1994; Chen *et al.*, 1995; Chen y Lin 1998) y *P. semisulcatus* (Clark, 1992). Los procesos de osmorregulación en estos organismos han sido estudiados en regímenes de salinidad constante.

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* fue descrito por (Boone, 1931), el cual se encuentra distribuido a lo largo del Pacífico, desde el Golfo de California hasta el norte de Perú, habita intervalos de salinidad entre 1-2‰ y hasta 40‰ (Menz y Blake 1980) y exhibe un patrón de regulación hiper-osmótica a bajas salinidades e hipo-osmótica a altas salinidades con un punto isosmótico de 712 a 777 mOsm kg<sup>-1</sup> es equivalente a 25-27‰ (Castille y Lawrence, 1981; Díaz *et al.*, 2001). Es la especie de camarón que se cultiva con mayor frecuencia en el este del hemisferio norte y comprende el 30% de la producción de peneidos en el mundo (Pérez-Farfante y Kensley, 1997). Es una de las especies de crustáceos que ha tenido una expansión comercial considerable en aguas marinas. La amplia tolerancia a la salinidad de *Litopenaeus vannamei*, debido a su capacidad para mantener una efectiva regulación osmótica y iónica así como la alta incidencia de enfermedades epidérmicas en las áreas costeras han llevado a incursionar el cultivo de esta especie en aguas de baja salinidad y recientemente se ha iniciado en América, Ecuador y Tailandia (Jiang y Gong 2002; McGraw *et al.*, 2002; Soud *et al.*, 2003).

Estudios realizados por Davis *et al.*, (2002), encontraron que la composición iónica del agua parece ser más importante que la salinidad, para lograr mejores resultados en la sobrevivencia y el crecimiento de *L. vannamei* aclimatado a baja salinidad. Sin embargo Soud *et al.*, (2003), confirman que *L. vannamei* puede ser cultivado exitosamente en salinidades de 2-10‰, obteniendo resultados satisfactorios en el crecimiento de esta especie. Paralelo a ello (Lamore *et al.*, 2001 y McGraw *et al.*, 2002) corroboraron que el cultivo de *L. vannamei* a bajas salinidades tiene un efecto directo sobre el crecimiento y la sobrevivencia manifestándose mayormente en estadios de desarrollo temprano y en periodos largos de aclimatación.

La situación actual de la camaronicultura a escala mundial se encuentra en pleno crecimiento y expansión comercial, particularmente para *L. vannamei*. Esta industria ha proporcionado la entrada de divisas en todo el mundo. Sin embargo, se desconoce la combinación adecuada de los factores físicos y químicos; así como las respuestas fisiológicas involucradas en el cultivo del camarón blanco en aguas de baja salinidad, y con ello optimizar su cultivo. En nuestro país, son escasos los estudios relacionados con el efecto de las bajas concentraciones de salinidad sobre la respuestas fisiológicas y el crecimiento en *L. vannamei*.

## II. OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar en *Litopenaeus vannamei* aclimatado a baja salinidad el efecto de distintas concentraciones de astaxantina adicionada en la dieta, sobre el consumo de oxígeno, la excreción de amonio, la relación O: N, la capacidad osmorreguladora, el crecimiento, la frecuencia de muda y la sobrevivencia.

## III OBJETIVOS PARTICULARES

1. Medir la tasa del consumo de oxígeno y excreción nitrogenada de *L. vannamei*, mantenido a baja salinidad y alimentado con una dieta con diferentes niveles de astaxantina.

2. Calcular la relación atómica O: N en juveniles de *L. vannamei* expuestos a baja salinidad y alimentado con una dieta adicionada con diferentes dosis de astaxantina

3. Determinar la capacidad osmorreguladora de *L. vannamei* aclimatado a baja salinidad y alimentado con una dieta con diferentes concentraciones de astaxantina.

4. Cuantificar el crecimiento, la sobrevivencia y la frecuencia de muda de *L. vannamei* mantenido en baja salinidad y alimentado con una dieta con diferentes dosis de astaxantina.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV. 1 Mantenimiento de los organismos

Se utilizaron 10,000 postlarvas PL<sub>21</sub> de *L. vannamei* provenientes del laboratorio de producción Aquapacific ubicado en Mazatlán, Sinaloa, México, las cuales fueron colocadas en tres estanques de 2000 L provistos con agua de mar, aireación constante, recambio diario de agua y mantenidos a una temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Durante el periodo de aclimatación, los organismos se alimentaron diariamente dos veces al día en raciones equivalentes al 10% de su peso húmedo con una dieta basal Rangen® libre de carotenoides, con 40% de proteína, hasta alcanzar la talla y el peso deseado.

**Tabla II.** Composición proximal de la dieta comercial Rangen® suministrada a los organismos.

Componente	Base seca (%)
Proteína cruda	40.18
Lípidos	8.27
Carbohidratos	30.23
Cenizas	9.48
Fibra	8.27

#### **IV. 2 Reducción de la salinidad**

La aclimatación de los organismos a baja salinidad se llevó a cabo de manera extendida en un periodo de 10 días, los primeros cinco días se utilizó una tasa de reducción de  $6\% \text{ día}^{-1}$  a partir de una salinidad de 35‰ hasta llegar a una salinidad de 5‰. Durante los días restantes, la tasa de reducción empleada fue de  $0.4\% \text{ día}^{-1}$  hasta llegar a 3‰. Durante esta fase la temperatura se mantuvo en  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , aireación constante y fotoperiodo controlado 12 h luz-12 h oscuridad. En el proceso de reducción de la salinidad, se emplearon 500 juveniles de *L. vannamei* con un peso húmedo de  $2.0 \pm 0.5\text{g}$ .

El monitoreo de la salinidad se realizó mediante un salinómetro YSI modelo Y30 (Yellow Springs Instruments Co.). Una vez que los organismos fueron aclimatados a la salinidad de 3‰ se colocaron en los estanques experimentales, de manera individual, en 25 cubetas de plástico de 3 L que a su vez, fueron introducidas en estanques de 500 L; se realizaron dos repeticiones por tratamiento.

#### **IV. 3 Reformulación de la dieta**

Para la reformulación de la dieta se utilizó como alimento base, la dieta comercial Rangen®, con un contenido de proteína del 40%, adicionándole, tres niveles de astaxantina Nutrabiote (carophyll pink 8%) marca Roche en proporciones de inclusión de 40, 80 y 150  $\text{mg kg}^{-1}$  (Tabla 3).

Para iniciar con la reformulación de la dieta, el alimento basal con 40% de proteína fue procesado de acuerdo con las características del programa de balanceo MIXIT-WIN3. La dieta se reformuló, mezclando los ingredientes: gluten, alimento basal, aceite de pescado y por último el pigmento, agregando a la mezcla 30% de agua tibia para una mejor incorporación del pigmento. Posteriormente la mezcla fue trasladada a un molino usando un dado con orificios de 1.8 mm, para la producción de los pellets que se colocaron en charolas de aluminio para su secado.

Una vez preparada la dieta, ésta se proporcionó a los organismos al 3% de su peso húmedo por un periodo de 45 días, utilizando como control una dieta libre de astaxantina. La dieta control fue identificada como tratamiento A; la dieta con 40 mg kg<sup>-1</sup> del pigmento fue el tratamiento B; la dieta con 80 mg kg<sup>-1</sup> del pigmento fue el tratamiento C y por último la dieta con 150 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina fue denominada tratamiento D. Se realizaron dos repeticiones para cada uno de los tratamientos.

**Tabla III.** Ingredientes adicionados a la dieta durante la reformulación.

<b>Combinación</b>	<b>Control (A)</b>	<b>40 mg kg<sup>-1</sup> (B)</b>	<b>80 mg kg<sup>-1</sup> (C)</b>	<b>150mg kg<sup>-1</sup> (D)</b>
Rangen	855 g	855 g	850 g	850 g
Astaxantina	0	4.14 g	9.6 g	18 g
Aceite de pescado	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Gluten	90.4 g	90 g	90 g	90 g

Para determinar los porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos contenidos en la dieta adicionada con diferentes concentraciones de astaxantina y al alimento basal, se realizó el análisis bromatológico utilizando las técnicas propuestas por la (AOAC), en el Laboratorio de Nutrición de la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la UABC en Mexicali Baja California (Tabla IV).

**Tabla IV.** Análisis bromatológico de la dieta basal, control y las adicionadas con astaxantina.

<b>Análisis</b>	<b>Basal</b>	<b>Control (A)</b>	<b>40 mg Kg-1 (B)</b>	<b>80 mg Kg-1 (C)</b>	<b>150 mg Kg-1 (D)</b>
Materia seca	94.75	90.26	88.56	91.26	89.34
Humedad	5.25	9.74	11.44	8.74	10.66
Ceniza	8.98	7.07	6.94	7.12	6.95
Proteína cruda	45.26	45.38	44.97	45.19	44.88
Extracto etéreo	7.94	10.24	10.3	10.35	10.29
Fibra ácido detergente	3.81	3.34	3.48	5.85	4.56
Extracto libre de nitrógeno	28.86	24.22	22.87	22.75	22.66

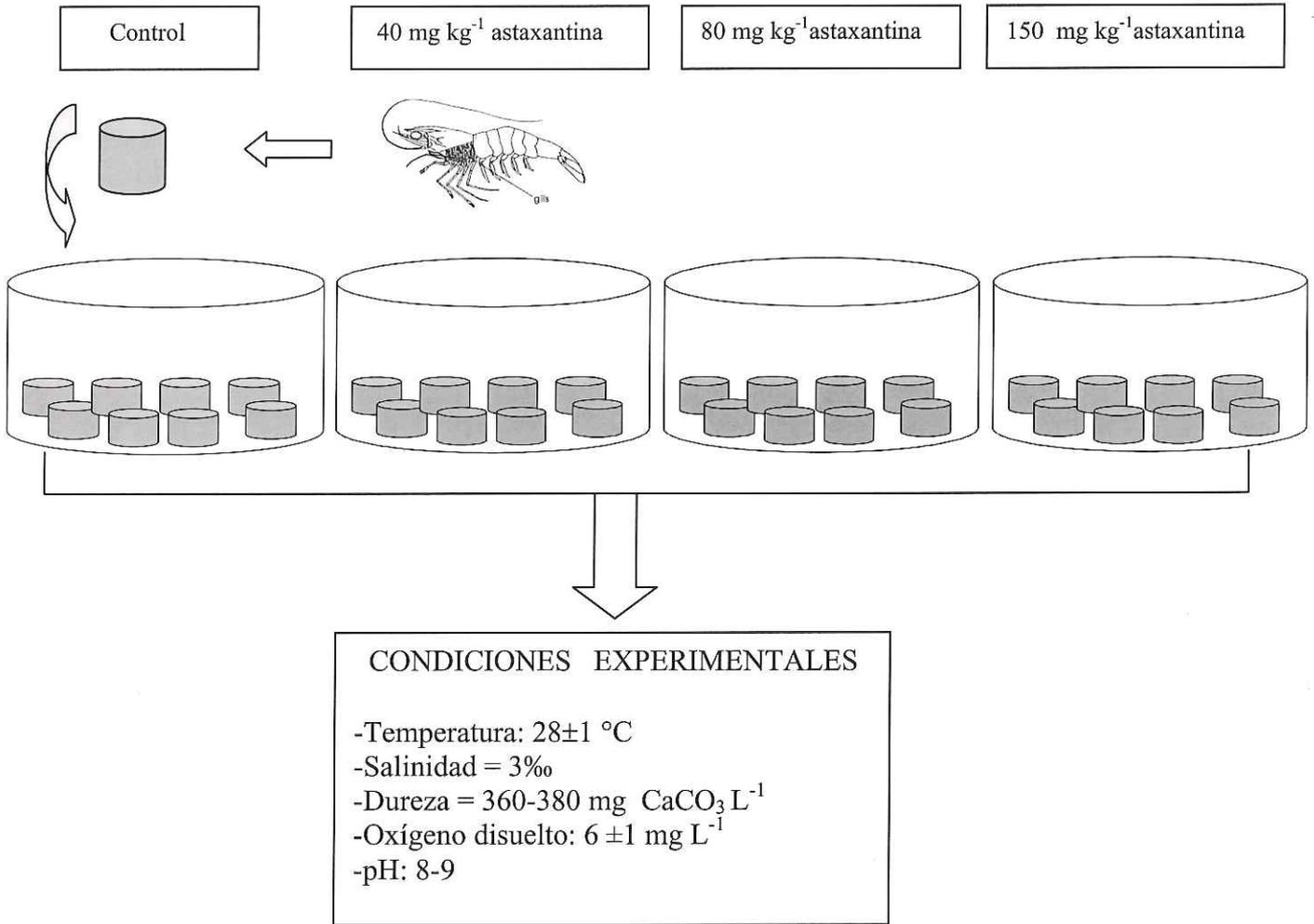
#### **IV. 4 Condiciones experimentales**

Se seleccionaron 200 organismos con un peso húmedo de  $4 \pm 0.05$  g, que se mantuvieron durante la fase del experimento por un periodo de 45 días en 200 cubetas de plástico de 3 L, introducidas en los estanques de 500 L. Los organismos fueron alimentados diariamente con una ración equivalente al 3% de su peso húmedo, el alimento se dejó por una hora y

posteriormente fue retirado por medio de un sifón. Los organismos fueron pesados semanalmente para determinar el coeficiente de crecimiento diario.

La temperatura de los estanques fue controlada mediante reguladores Medusa® y mantenida con calentadores sumergibles de 1000 watts a una temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Cada condición experimental fue realizada por duplicado, la figura 3 presenta el diseño experimental realizado en los juveniles de camarón blanco, alimentado con diferentes dosificaciones de astaxantina en la dieta.

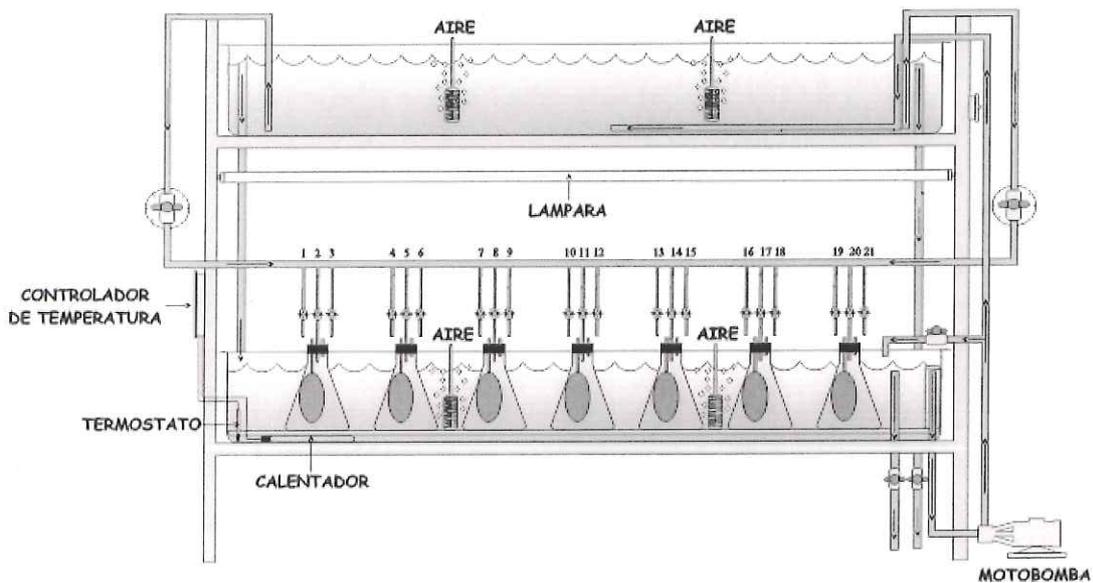
Al término de la fase experimental, los organismos fueron trasladados al sistema respirométrico (figura 4) 24 horas antes de realizar las mediciones del consumo de oxígeno y la excreción amoniaca.



**Figura 3.** Esquema del diseño experimental, realizado en camarones juveniles *L. vannamei*, alimentados con una dieta adicionada con diferentes niveles de astaxantina.

#### IV. 5 Medición del consumo de oxígeno y excreción de amonio

La determinación del consumo de oxígeno ( $QO_2 = \text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ p.s.}$ ) y excreción de amonio ( $\text{mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ p.s.}$ ) se llevó a cabo en una instalación respirométrica semiabierta provista de 20 cámaras de 1000 ml conectadas a un sistema de recirculación de agua, descrita por Díaz *et al.*, (1989) (figura 4). Los organismos fueron colocados de manera individual y al azar 24 horas antes de realizar las mediciones correspondientes para la aclimatación de los organismos al sistema. Durante este tiempo no se alimentaron.



**Figura 4.** Esquema del sistema respirométrico utilizado para determinar el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los juveniles de *L. vannamei*. Descrito por Díaz *et al.*, (1989).

Se colocaron 20 organismos en el sistema, 1 por cámara de 1000 ml, así como una cámara (control) sin organismos para determinar el consumo de oxígeno y excreción nitrogenada realizada por los microorganismos presentes en el sistema y con ello realizar las correcciones pertinentes. Una vez completadas las 24 horas de aclimatación al sistema por los organismos, se tomó una muestra inicial de agua de cada una de las cámaras para medir la concentración inicial de oxígeno disuelto y de amonio. Posteriormente el sistema de recirculación de cada una de las cámaras fue cerrado durante 1 ½ hora. Una vez completada la hora y media se tomó la muestra final de agua para cuantificar la concentración final de oxígeno y de amonio. De acuerdo a Stern *et al.*, (1984), 1 ½ hora es el tiempo adecuado para que la concentración del oxígeno disuelto no disminuya por debajo del 30%, con lo que se evita que se produzca estrés en los organismos.

Para realizar la medición del oxígeno disuelto en las cámaras respirométricas, se utilizó un oxímetro YSI 52 equipado con un sensor polarográfico, a partir de un volumen de muestra de 10 ml, provenientes de cada cámara.

Para la cuantificación de la excreción amoniaca, se utilizó el método colorimétrico del azul de indofenol (Rodier, 1981). Este método consiste en la determinación colorimétrica del ion amonio presente en la muestra, tratados por una solución oxidante (hipoclorito sódico) nitroprusiato sódico y de fenol, la coloración azul de indofenol fue directamente proporcional a la concentración de amonio. Se prepararon los estándares correspondientes para construir una curva de calibración de la concentración conocida de amonio. Las muestras fueron evaluadas en celdas de plástico (semimicro de metilato) de 1.5 ml mediante un espectrofotómetro marca ELYPTICA modelo ELY 2000, a una longitud de

onda de 640nm; la absorbancia fue directamente proporcional a la concentración de amonio.

#### **IV.6 Razón atómica (O: N)**

La razón atómica fue calculada a partir de los resultados obtenidos del consumo de oxígeno y excreción amoniacal de los organismos transformados a sus equivalentes atómicos (Mayzaud y Conover, 1988). Este índice fue utilizado para determinar que tipo de macromoléculas, fueron utilizadas como fuente de energía por los organismos provenientes de cada condición experimental. Considerando los valores 7-9.3 que indican una oxidación proteica, valores superiores a 9.3 indican un catabolismo de lípidos y carbohidratos (Conover y Corner, 1968; Bayne, 1973) y valores mayores a 24 muestran el uso de los carbohidratos (Mayzaud, 1973; Barber y Blake 1985).

#### **IV.7 Determinación de la capacidad osmorreguladora**

Para la medición de la osmolaridad de la hemolinfa, se tomaron 15 organismos antes de la reducción y 15 organismos después de la reducción de la salinidad, como controles. Posteriormente, una vez concluida la fase experimental, la osmolaridad de la hemolinfa se midió de manera individual en los camarones provenientes de cada condición experimental (A, B, C y D).

Los organismos fueron colocados en recipientes de plástico a una temperatura de 18 °C, con el propósito de minimizar los posibles efectos causados por la manipulación. A cada uno de los camarones se les efectuó una punción en la membrana torácico-abdominal,

previamente secados con papel absorbente para evitar una posible contaminación de la hemolinfa con el agua del medio. La hemolinfa fue extraída con una micropipeta de 10 $\mu$ l, la muestra fue colocada en un osmómetro de vapor Wescor® modelo 5520, la presión osmótica del medio interno y el externo fue expresada en mOsmo Kg<sup>-1</sup>. Para evaluar la capacidad osmorreguladora de los organismos provenientes de cada tratamiento, ésta se calculó a partir de la siguiente fórmula: CO = concentración del medio interno – concentración del medio externo (Charmantier *et al.*, 1989).

#### **IV.8 Crecimiento y duración del periodo de muda**

Para determinar el crecimiento como incremento de biomasa de los organismos, éstos fueron pesados semanalmente usando una balanza OAHUS® Para evaluar el crecimiento se utilizó la fórmula de coeficiente diario de crecimiento propuesta por Bureau *et al.*, (2000).

$$\text{Coeficiente Diario de Crecimiento (DGC)} = 100 \times (\text{FBW}^{1/3} - \text{IBW}^{1/3}) / D$$

En donde:

FWB = Es el peso final de los organismos (g)

IBW = El peso inicial de los organismos (g)

D = número de días que duró el experimento

Las mudas de cada uno de los organismos provenientes de las diferentes condiciones experimentales se recolectaron de manera individual, se anotó la fecha y se calculó la

frecuencia, como el promedio del número de días entre una muda y otra, durante toda la fase experimental

#### **IV.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad e independencia al 95% de significancia, de los datos de consumo de oxígeno, excreción nitrogenada, capacidad osmorreguladora, crecimiento y muda para los organismos provenientes de cada una de las concentraciones de astaxantina aplicadas en la dieta. Se utilizó el análisis de varianza de una sola vía por rangos (Kruskall-Wallis), teniendo como variable independiente las concentraciones de astaxantina en la dieta y como variables dependientes el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada y la capacidad osmorreguladora, con el fin de identificar diferencias significativas causadas por los tratamientos.

El crecimiento fue transformado mediante el arcoseno, para poder aplicarle la prueba de Kruskall-Wallis, (Tukey 1977).

Los datos de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada de los organismos provenientes de cada condición experimental se procesaron mediante el análisis exploratorio de datos (Tukey, 1977) y se representaron en cajas en paralelo.

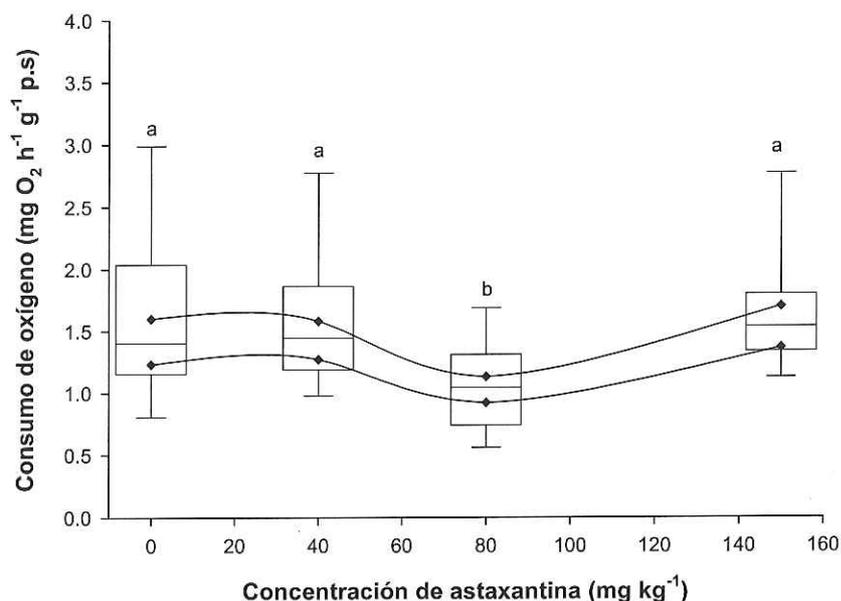
Se realizaron pruebas a *posteriori*: (Tukey) al consumo de oxígeno, la de (Dunnett's) para el coeficiente de crecimiento diario, (Dunn's) para la excreción nitrogenada y la capacidad osmorreguladora. Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas de estadística Sigma Stat versión 3.1 y Sigma Plot versión 9.0.

## VI RESULTADOS

### IV.1 Consumo de oxígeno y excreción nitrogenada

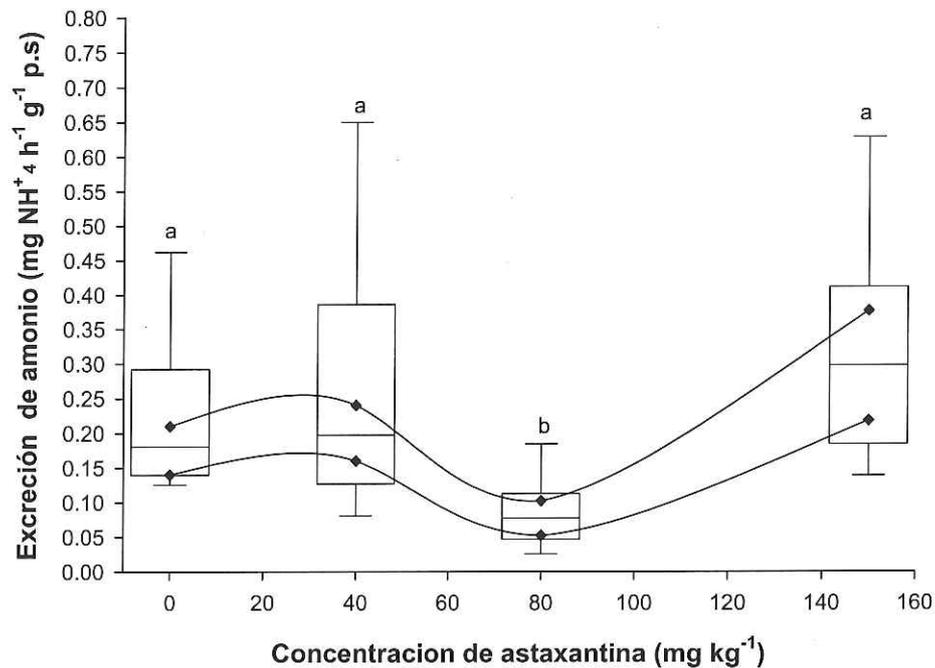
El consumo de oxígeno de *L. vannamei* aclimatados a baja salinidad (3‰) y alimentados con diferentes concentraciones de astaxantina en el alimento, se presenta en la figura 5.

Los organismos provenientes del tratamiento control (A), consumieron  $1.40 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  p.s. No mostrando diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con los camarones provenientes del tratamiento (B). Por el contrario el consumo de oxígeno de los organismos alimentados con los tratamientos A y B difirieron significativamente en los organismos alimentados con el tratamiento (C) ( $P < 0.05$ ). La tasa de consumo de oxígeno de los organismos alimentados con el tratamiento (C), fue significativamente más baja ( $\text{QO}_2 = 1.05 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  p.s) que en los tratamientos A, B y D (figura 5).



**Figura 5.** Consumo de oxígeno ( $\text{QO}_2 = \text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  p.s) de los juveniles de *L. vannamei* alimentados con una dieta con diferentes niveles de astaxantina. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

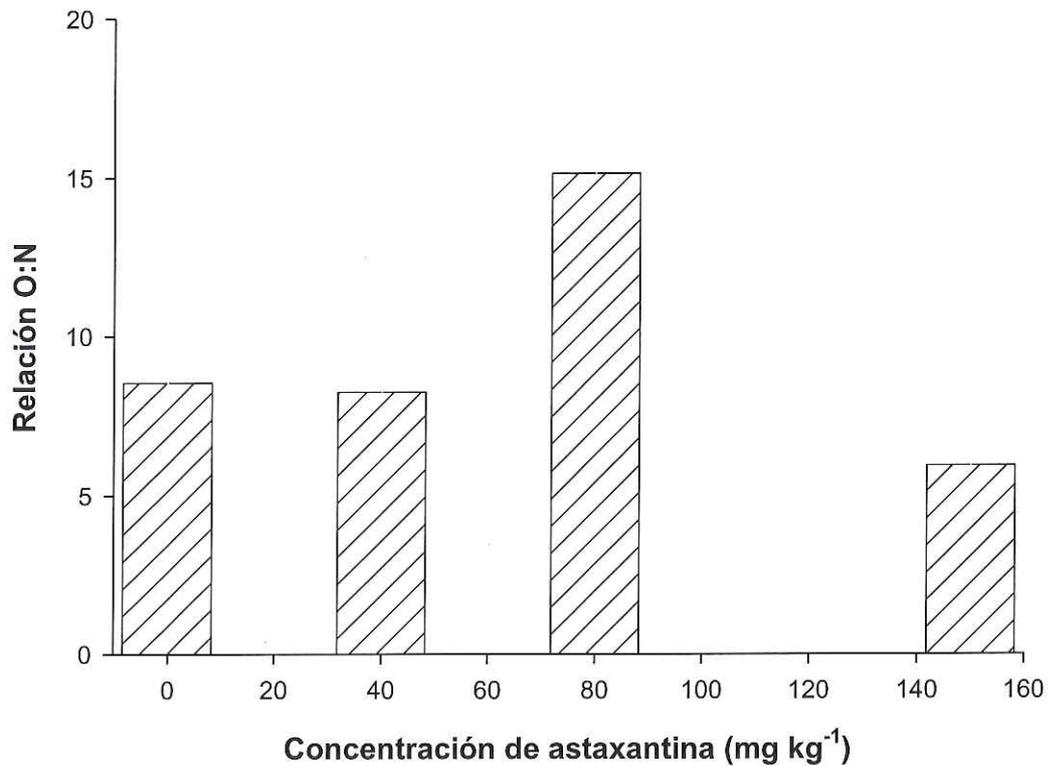
La excreción nitrogenada de los juveniles de *L. vannamei* durante la fase experimental en los distintos tratamientos se presenta en la figura 6. La excreción amoniaca de los organismos del tratamiento control (A) no mostró diferencias significativas con respecto a la excreción amoniaca de los organismos alimentados con el tratamiento (B) ( $P>0.05$ ). Por otro lado, la excreción amoniaca de los organismos que fueron alimentados con el tratamiento (C), fue significativamente más baja ( $0.070 \text{ mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ p.s}$ ) que la excreción amoniaca de los organismos provenientes de los tratamientos A, B y D respectivamente (figura 6).



**Figura 6.** Excreción de amonio ( $\text{mg NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de p.s) en juveniles de *L. vannamei*, alimentados con diferentes concentraciones de astaxantina. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

## VI.2 Relación O: N

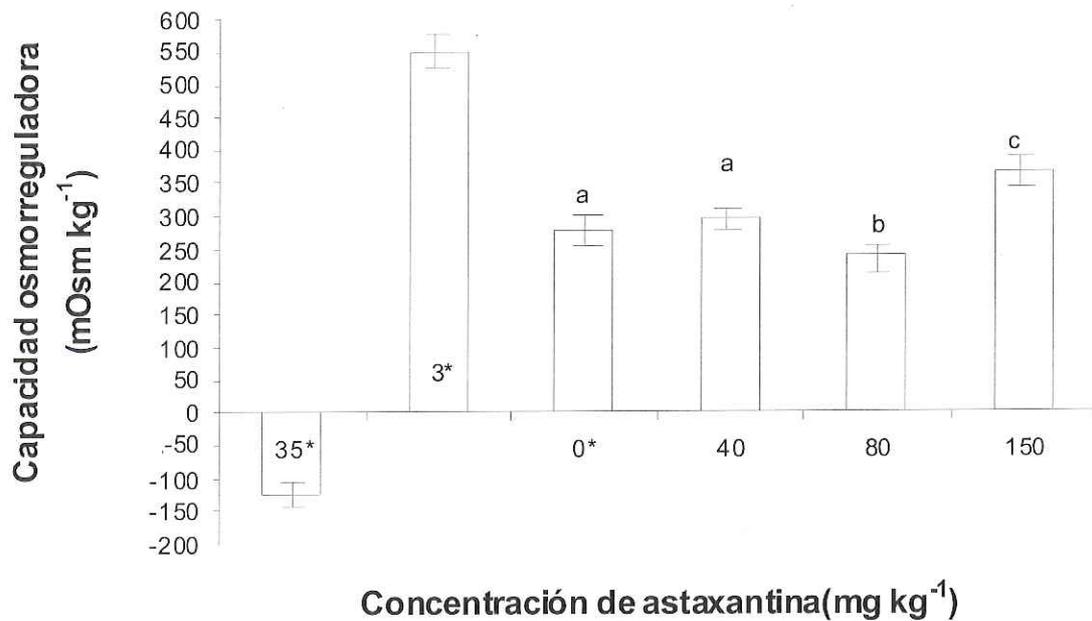
La relación atómica obtenida para los organismos alimentados con la dieta control (A) fue de 8.54, mientras que para los organismos provenientes del tratamiento (B) fue de 8.25. Para los organismos alimentados con 80 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina el valor de la relación fue de 15.14 (C) y para el tratamiento (D) fue de 5.93 (figura 7).



**Figura 7.** Relación atómica O: N de juveniles del camarón blanco *L. vannamei*, alimentados con una dieta con diferentes concentraciones de astaxantina.

### VI.3 Capacidad osmorreguladora.

La capacidad osmorreguladora de los juveniles de *L. vannamei*, mantenidos a una salinidad de 34‰, fue de  $-127 \text{ mOsm kg}^{-1}$ . Los organismos después de la reducción de la salinidad (3‰) tuvieron una capacidad osmoreguladora de  $550 \text{ mOsm kg}^{-1}$  (figura 8).



**Figura 8.** Capacidad osmorreguladora en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, alimentados con diferentes dosis de astaxantina. El asterisco indica que estos organismos fueron alimentados con una dieta basal libre de carotenoides. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

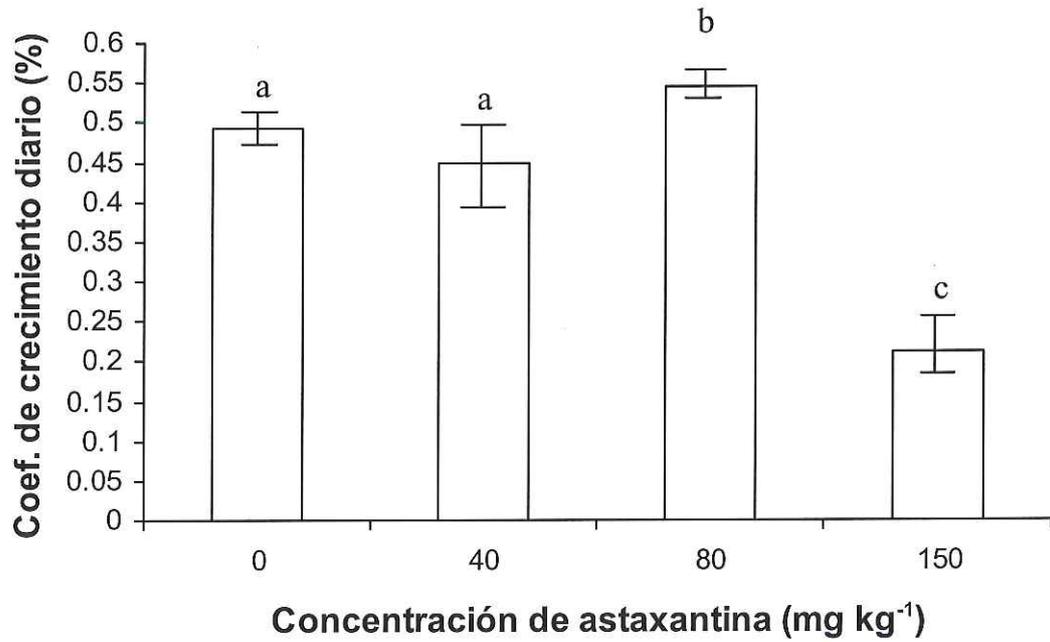
En los organismos alimentados con el tratamiento (A) presentaron una capacidad osmorreguladora de 278 mOsm kg<sup>-1</sup>. No se obtuvieron diferencias significativas con la capacidad osmorreguladora para los organismos alimentados con el tratamiento (B). La capacidad osmorreguladora de los organismos provenientes del tratamiento (C), fue significativamente menor (250 mOsm kg<sup>-1</sup>) (P< 0.05) cuando fue comparado con la capacidad osmorreguladora de los organismos alimentados con los tratamientos (A, B y D) (figura 8).

#### **IV.4 Crecimiento, frecuencia de muda y sobrevivencia**

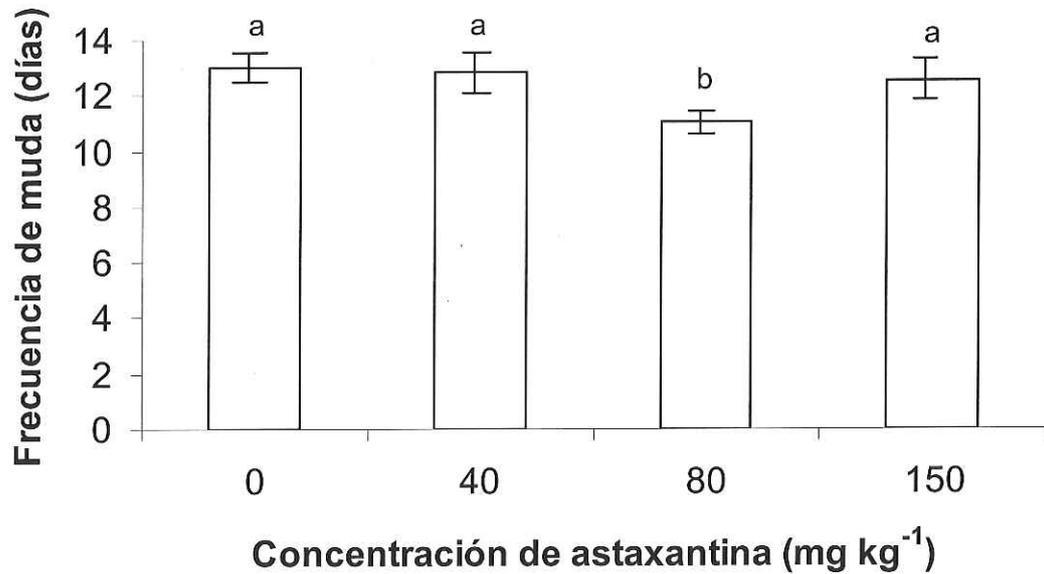
El coeficiente de crecimiento diario de los juveniles de *L. vannamei* alimentados con las diferentes concentraciones de astaxantina adicionadas en el alimento se presentan en la figura 9. En esta figura se observa que el coeficiente de crecimiento de los organismos alimentados con el tratamiento (C), fue significativamente más alto (0.55%) respecto al coeficiente de crecimiento calculado para los organismos provenientes de los demás tratamientos.

La frecuencia de muda, obtenida en cada uno de los tratamientos, revelo que los organismos alimentados con el tratamiento (C), exhibieron una frecuencia 15% menor de muda, respecto a los organismos provenientes de los demás tratamientos. (Figura 10).

La sobrevivencia obtenida de cada condición experimental, indicó que los organismos alimentados con el tratamiento (C), tuvieron la mayor sobrevivencia; seguidos por los organismos alimentados con el tratamiento (B). Los organismos alimentados con el tratamiento (D) exhibieron un menor porcentaje de sobrevivencia (tabla 4).



**Figura 9.** Coeficiente de crecimiento diario, de los juveniles de camarón blanco, durante la fase experimental alimentados con diferentes dosis de astaxantina. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.



**Figura 10.** Frecuencia de muda de los juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, provenientes de cada condición experimental. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla IV.** Número inicial de organismos y la sobrevivencia, en los juveniles de camarón blanco, *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de astaxantina.

	TRATAMIENTOS			
	Control (A)	40 mg kg <sup>-1</sup> (B)	80 mg kg <sup>-1</sup> (C)	150 mg kg <sup>-1</sup> (D)
Número inicial	50	50	50	50
Sobrevivencia (%)	76	78	80	70

## V. DISCUSIÓN

El consumo de oxígeno de *L. vannamei*, aclimatado a baja salinidad fue modificado debido al efecto de las diferentes concentraciones de astaxantina adicionadas en la dieta. Se obtuvo que los organismos alimentados con el tratamiento (C) 80 mg kg<sup>-1</sup> astaxantina, tuvieron una tasa respiratoria de 1.03 mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> p.s. Siendo ésta significativamente menor que la obtenida para los organismos alimentados con los tratamientos A, B y D. Al comparar los resultados del QO<sub>2</sub> para *L. vannamei* alimentado con el tratamiento (C) y el consumo de oxígeno reportado por Taboada *et al.*, (1998) en juveniles de *Penaeus setiferus* (1.0 mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> p.s) mantenidos a 34‰ y aclimatados a 28°C. En *L.vannamei* Rosas *et al.*, (2001), mantenidos a 34‰ y en 24°C reportaron una tasa respiratoria de (1.31 mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> p.s.) y Comoglio *et al.*, (2004) en juveniles de *L. vannamei* reportaron un consumo de oxígeno de (1.13 mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> p.s) mantenidos a 34‰ y en 25°C. Se obtuvo que el consumo de oxígeno de los juveniles de *L.vannamei* a los que se les suministró el tratamiento (C) con 80 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina y aclimatados a aguas de baja salinidad, tuvieron una tasa respiratoria similar a la reportada, para diferentes especies de camarones mantenidos en salinidades marinas.

Al respecto, Chien *et al.*, (2003) mencionaron que al adicionar una concentración de 80 mg kg<sup>-1</sup> astaxantina en la dieta de *P. monodon*, obtuvieron un incremento en la resistencia al estrés osmótico de los organismos, cuando fueron comparados con el grupo control. Esta molécula otorgó, un aumento en la capacidad antioxidante en los juveniles expuestos a baja salinidad cuando fue adicionada en la dieta. Como consecuencia, los organismos exhibieron una recuperación al estrés osmótico al que fueron expuestos manifestado esto en una reducción de la tasa respiratoria en los organismos alimentados con el tratamiento (C).

Lo anterior puede sugerir que las propiedades antioxidantes que otorgó la molécula de astaxantina al ser incorporada en la dieta ayudó al organismo a realizar el ajuste fisiológico (tasa de consumo de oxígeno baja) en condición no habitual para esta especie de aguas de baja salinidad. Sin embargo no existen evidencias claras, acerca del funcionamiento y nivel de acción de la astaxantina en la resistencia al estrés salino y en la disminución del consumo de oxígeno de los organismos acuáticos (Merchie *et al.*, 1998).

Los organismos alimentados con 80 mg Kg<sup>-1</sup> de astaxantina tratamiento (C), excretaron una concentración de amonio de (0.07 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> p.s) siendo significativamente menor con respecto a los camarones provenientes de los demás tratamientos aplicados en la dieta. Al comparar los resultados en la excreción amoniacal de *L. vannamei* alimentados con 80 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina tratamiento (C). Con los obtenidos en camarones alimentados con una dieta comercial carente de carotenoides por Taboada *et al.*, (1998) en *L. stylirostris* mantenidos a 34‰ y aclimatados a 28°C reportaron una tasa de excreción (0.06 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> p.s), en *L. vannamei* Comoglio *et al.*, (2004) encontraron valores de (0.08 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> p.s) aclimatados a 25°C y 34‰. Díaz *et al.*, (2004) encontraron para *L. stylirostris* que la excreción de amonio fue de (0.08 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> p.s) mantenidos a 32‰ y en 28°C. Por lo que se puede afirmar que los valores de la tasa de excreción de amonio de *L. vannamei* aclimatado a agua de baja salinidad y alimentado con 80 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina, estuvieron dentro de los valores reportados, en camarones mantenidos en agua de mar. Esto demuestra que los camarones que recibieron el tratamiento (C) mantuvieron un comportamiento en la excreción de amonio, similar al de camarones que se encuentran en agua de mar; lo que indicó que la astaxantina ayudo a realizar el ajuste fisiológico (baja

excreción de amonio) y redujo el estrés osmótico de los camarones aclimatados a baja salinidad. La tasa de excreción de amonio estuvo directamente relacionada con el proceso de osmorregulación, ya que la excreción de amonio de los camarones alimentados con el tratamiento (C) fue menor, respecto a los camarones de los demás tratamientos siendo los camarones que tuvieron la capacidad osmorreguladora más baja.

Por su parte, Chen *et al.*, (1995) estudiaron la excreción amoniaca de *P. chinensis*, en donde encontraron que dicha especie incrementó los niveles de excreción de amonio, cuando la salinidad fue reducida. Lo anterior debido a que en medios diluidos los organismos utilizaron para favorecer la captación de sodio, el funcionamiento de las bombas de intercambio de  $\text{Na}^+/\text{NH}^{+4}$  para balancear la concentración osmótica de la hemolinfa y con ello ajustar al mismo tiempo la capacidad osmorreguladora. (Spaargaren *et al.*, 1977; Regnault 1987 y Jiang *et al.*, 2000).

Los camarones alimentados con el tratamiento (C)  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de astaxantina fueron los organismos que tuvieron los valores del consumo de oxígeno y excreción amoniaca similares a los niveles reportados por otros autores que trabajaron con camarones mantenidos en salinidades marinas, siendo los camarones que mejor realizaron los ajustes fisiológicos en la condición ambiental de agua de baja salinidad, en la cual fueron mantenidos. Lo anterior fue debido, a que se ha demostrado en estudios realizados por Chen, 1998; Rosas *et al.*, (2001) y Salvato *et al.*, (2001), que la excreción amoniaca y el consumo de oxígeno se encuentran relacionados con el trabajo metabólico y con la energía que los organismos destinan para realizar el control homeostático, en relación a los

cambios en los parámetros ambientales. Lo cual puede sugerir que la astaxantina le ayudó a *L. vannamei* a controlar y modificar sus parámetros fisiológicos ( $QO_2$  y excreción de  $NH_4^+$ ) y además permitió que estos camarones destinaran una menor cantidad de energía para cubrir el gasto metabólico ocasionado por el estrés a baja salinidad.

La relación atómica O: N no sólo revela el tipo de sustrato metabólico que está siendo oxidado por el organismo cuando interactúan varios factores como estadio de desarrollo, estado fisiológico y el tipo de dieta. En los camarones ha sido demostrado que el componente de reserva más importante son las proteínas; ya que los lípidos y los carbohidratos los organismos los utilizan como sustrato metabólico cuando se encuentran en condiciones ambientales favorables (Rosas *et al.*, 1995).

La razón O: N estimada para los juveniles de *L.vannamei* aclimatados a baja salinidad y alimentados con  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  astaxantina en la dieta, demostró que utilizaron como sustrato metabólico una mezcla de los lípidos y carbohidratos. Esto indica una ventaja energética para los organismos alimentados con este tratamiento, ya que la transformación de lípidos y carbohidratos es de bajo costo energético, comparado con la degradación de las proteínas (Hochachka, 1991). Sugiriendo esto que los organismos alimentados con  $80 \text{ mg Kg}^{-1}$  de astaxantina y aclimatado a baja salinidad, las proteínas obtenidas de la dieta pudieron ser utilizadas para la formación de tejido. Por el contrario, los organismos alimentados con los tratamientos A, B y D presentaron valores de 5.9, 8.3 y 8.5 respectivamente, indicando esto un catabolismo netamente protéico, lo que evidencia que esas condiciones causaron un

estrés adicional a los organismos (Conover y Corner, 1968; Bayne, 1973; Mayzaud, 1973; Barber y Blake 1985).

La capacidad osmorreguladora de los organismos aclimatados a agua de baja salinidad fue relacionada directamente a la adición en el alimento de las diferentes concentraciones de astaxantina. De acuerdo con los resultados en la capacidad osmorreguladora de los juveniles de camarón blanco antes y después de la reducción de la salinidad, éstos fueron hiperreguladores cuando la salinidad se disminuyó a 3‰. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Díaz *et al.*, (2001), en juveniles de camarón blanco expuestos a bajas salinidades. La tasa de excreción de amonio de los juveniles de *L. vannamei* en este experimento estuvo relacionada con el proceso de osmorregulación, ya que la excreción de amonio aumentó cuando los camarones fueron hiper-reguladores y se redujo cuando fueron hipo-reguladores.

En el presente estudio, la capacidad osmorreguladora de los organismos antes de la reducción de la salinidad (34‰) fue de  $-187 \text{ mOsm K}^{-1}$  con patrón de regulación hipo-osmótica. Después de la reducción de la salinidad la capacidad osmorreguladora de los camarones fue de  $(528 \text{ mOsm kg}^{-1})$  a una salinidad de 3‰, obteniéndose un patrón de regulación hiper-osmótico. Este patrón de osmorregulación se presenta en diversas especies de crustáceos que se encuentran en el medio natural (Vernberg y Vernberg, 1972; Mantel y Farmer, 1983). En este sentido, los camarones que fueron alimentados con el tratamiento (C)  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de astaxantina, presentaron la capacidad osmorreguladora más baja ( $240 \text{ mOsm kg}^{-1}$ ) y cercano al (0). Gong *et al.*, (2004) reportaron que al adicionar iones en el

alimento de *L. vannamei* cultivado en el desierto de Arizona y mantenido a una salinidad de 5‰, demostró ser un factor importante para mejorar la capacidad osmorreguladora de los camarones ( $462 \text{ mOsm kg}^{-1}$ ), que ellos consideraron como la más adecuada. En esta investigación los camarones alimentados con el tratamiento (C)  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de astaxantina y aclimatado a baja salinidad, presentaron una capacidad osmorreguladora mas baja y cercano al (0) a la obtenida por Gong *et al.*, (2004). Lo que sugiere que los camarones alimentados con el tratamiento (C) tuvieron un menor gasto energético para llevar a cabo los mecanismos de osmorregulación, reflejándose en un menor consumo de oxígeno y menor excreción de amonio para mantener la capacidad osmorreguladora baja.

En relación a la duración de la frecuencia del ciclo de muda de los organismos provenientes del tratamiento con  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de astaxantina, se encontró que fue la más corta, respecto a los camarones provenientes de los demás tratamientos. Resultados similares han sido encontrados por Arango, (1993) y Petit *et al.*, (1997) cuando adicionaron  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  en la dieta de *P. japonicus* y 50 ppm de astaxantina en *L. vannamei*. De acuerdo a Petit *et al.*, (1997) la presencia de la astaxantina en la dieta en niveles de inclusión de 50-80  $\text{mg kg}^{-1}$  de astaxantina, se encuentra involucrada con algunas interacciones metabólicas en los organismos que permiten el incremento de los niveles de ecdisteroides en la hemolinfa (hormona estimuladora de la muda) y por lo tanto se incrementó la frecuencia de la muda en los juveniles de *L. vannamei*, alimentados con  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de astaxantina suplementado en la dieta.

El coeficiente de crecimiento diario cuantificado para los organismos alimentados con 80 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina, mostró diferencias significativas respecto a los demás tratamientos (P<0.05). Thongrod *et al.*, (1995), encontraron un incremento en el crecimiento de *P. monodon* al incrementar la concentración de astaxantina en el alimento (5-300 mg kg<sup>-1</sup>) durante treinta días. Por su parte Arango (1996) adicionó en la dieta (50 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina) logrando un mayor crecimiento (30%) en *Litopenaeus vannamei* mantenido en agua de mar. Petit *et al.*, (1997), adicionó en la dieta de post larvas de *P. japonicus* 60 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina, obteniendo buenos resultados en el crecimiento en diferentes estadios de *P. japonicus*. Estudios realizados por McGraw y Scarpa (2004), han reconocido que al incrementar el periodo de aclimatación, se incrementa la tolerancia de *L. vannamei* a bajas salinidades; reflejándose esto en una mayor sobrevivencia y por ende un incremento del crecimiento. Resultados similares se encontraron en este estudio, en los camarones provenientes del tratamiento (C); ya que mostraron un coeficiente de crecimiento diario (0.54) mayor respecto a los demás tratamientos a los que fueron expuestos los juveniles de camarón blanco.

En esta investigación, los organismos a los que se les proporcionó el tratamiento (C) exhibieron una sobrevivencia del 80%. Esta dosis de astaxantina incluida en el alimento fue mayor que la utilizada por Yamada, (1990) (50 mg kg<sup>-1</sup>). Con la que obtuvo una sobrevivencia (90%) en *P. monodon* mantenido en agua de mar, comparados con el control (57%). Por su parte Chien y Jeng, (1992), reportaron una sobrevivencia de *P. japonicus* del 87% alimentados con 50 mg kg<sup>-1</sup> mantenidos en agua de mar y encontraron una relación positiva entre la sobrevivencia y la concentración óptima del pigmento. Cabe destacar que

el periodo de aclimatación a bajas salinidades se encuentra asociado directamente con la capacidad osmorreguladora de los organismos. Van Wyk *et al.*, (1999) sugirieron para *L. vannamei*, que la reducción de la salinidad, en las primeras 8 horas debe ser de  $2\% \text{ h}^{-1}$  y las últimas 8 horas, de  $0.063\% \text{ h}^{-1}$  durante un periodo de 48 horas, esto reduce el estrés osmorregulatorio en los camarones y da como resultado un alto porcentaje de sobrevivencia, demostrando esto la importancia de un periodo de aclimatación extendida a bajas salinidades. Los resultados de estos autores coinciden con los obtenidos en este estudio, ya que la sobrevivencia de *L. vannamei* en el periodo de reducción de la salinidad fue del (98%). La aclimatación se realizó de manera extendida durante 10 días, utilizando dos tasas de recambio. Los primeros 5 días fue de  $6\% \text{ día}^{-1}$  a partir de una salinidad de 35‰ hasta llegar a una salinidad de 5‰. Durante los días restantes, la tasa de reducción empleada fue de  $0.4\% \text{ día}^{-1}$  hasta llegar a 3‰. Corroborando esto que la aclimatación extendida se reflejó en una alta sobrevivencia de los organismos aclimatados a baja salinidad. Los resultados obtenidos en el tratamiento (C)  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de astaxantina mostraron una mejor recuperación a estrés osmótico y sobrevivencia (80%), revelando que esta concentración promovió un efecto positivo en la sobrevivencia de *L. vannamei* mantenido a baja salinidad.

Los organismos alimentados con el tratamiento (C), presentaron una tasa respiratoria y excreción amoniacal similar a la reportada para camarones mantenidos en agua de mar, ya que consumieron significativamente menos oxígeno, así como una menor producción de amonio y por lo tanto utilizaron a los lípidos y a los carbohidratos como principal sustrato energético y se obtuvieron los valores menores en la capacidad osmorreguladora,

reflejándose en un incremento en el crecimiento de los organismos provenientes de esta condición.

Por el contrario los camarones provenientes del tratamiento (D) (150 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina) exhibieron valores en el QO<sub>2</sub> y excreción amoniacal por arriba de los valores reportados por Taboada *et al.*, (1998); Díaz *et al.*, (2004) y Comoglio *et al.*, (2004). Presentaron la relación O: N más baja y la capacidad osmorreguladora fue la más lejana al punto isosmótico; así como también presentaron valores significativamente menores en el coeficiente de crecimiento diario. Fueron los camarones que tuvieron menor porcentaje de sobrevivencia (70%). Estas respuestas en su conjunto pueden sugerir que esa concentración de astaxantina adicionada en la dieta, excedió el punto de saturación del pigmento y por lo tanto el camarón se mantuvo en un estrés adicional. Al respecto Herring, (1973) menciona que cuando el pigmento es absorbido en exceso por el organismo, éste lo excreta, lo cual puede ocasionar un mayor gasto energético en la distribución y excreción del exceso del pigmento.

Los resultados de la presente investigación sugieren que la dieta adicionada con 80 mg kg<sup>-1</sup> de astaxantina es la adecuada para el cultivo de *L. vannamei* a baja salinidad. Esta concentración le proporcionó al organismo los requerimientos nutrimentales necesarios para mantener la homeostasis y permitió que los organismos destinaran la energía suficiente en condiciones no habituales, para cubrir sus demandas energéticas y crecer (Harrison 1980; Darachai *et al.*, 1998; Merchie *et al.*, 1998 y Scholz, *et al.*, 1999). Ya que ha sido demostrado que cuando el organismo se encuentra en condiciones ambientales

favorables, la energía es canalizada directamente hacia la biosíntesis de tejido, dando como resultado el crecimiento del organismo (Lucas, 1996). Sin embargo se hace evidente la necesidad de desarrollar otras investigaciones que eluciden la función de la astaxantina con los parámetros fisiológicos estudiados.

Una propuesta para optimizar el cultivo de camarón a baja salinidad en condiciones controladas, es la utilización de la astaxantina como fuente principal en el alimento. Ya que cada una de las condiciones fisiológicas estudiadas, indicó que la dosis adecuada en este experimento fue la de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de astaxantina, siendo la concentración que mayor favoreció al organismo en estudio.

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación son a nivel experimental, sugiriendo la realización de este experimento en granjas piloto, que nos permitirá establecer con mayor precisión el crecimiento y la sobrevivencia a nivel de granjas de producción.

**Bibliografía:**

- Altinok, I. y J. M. Grizzle. 2003. Effect of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish. *J. World Aquac. Soc.* 34:113-117.
- Anger, K., J. Harms, C., Puschel y B. Seeger. 1989. Effects of reduced salinities on development of a brachyuran crab reared under constant conditions in the laboratory. *Helgol Meeresunters*, 43: 225-244.
- Anger, K., E. Spivak y T. Lupii. 1988. Effects of reduced salinities on development and bioenergetics of early larval shore crab, *carcinus maenas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 220: 287-304.
- Arango, J. I. 1993. Evaluación comercial del uso de Astaxantina en alimento para camarones (*Penaeus vannamei*). Primer Seminario Internacional Roche de Acuicultura. Proyecto Caropyll Pink en Camarones. Propellets- Promarisco-Aquanova-Ecuaroche. San Antonio, Provincia de Guayas. Guayaquil, Ecuador. 18 de Octubre de 1996.
- Bachere, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*.191: 3-11.
- Barber, B. J y N. J. Blake. 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RQ physiological indexes. *Mar. Biol.* 87: 13-18.

- Bayne, B. 1973. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. Neth, J. Sea Res. 7: 399-410.
- Bishop, J. M., J. G. Gosselink y J. H. Stone. 1980. Oxygen consumption and hemolymph osmolality of brown shrimp *Penaeus aztecus*. Fish. Bull. 78: 741-757.
- Brown, A. C. y N. B. Terwilliger. 1999. Developmental changes in oxygen uptake in *Cancer magister* (Dana) in response to changes in salinity and temperature. J. Exp. Mar. Bio. Eco. 241: 179-192.
- Bureau, D. P., P.A. Azevedo., M. Tapia-Salazar y G. Cuzón. 2000. Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: Potential implications and applications. Avances en Nutricion Acuicola V: 111-140.
- Castille, F. L y A. L Lawrence. 1981. The effect of salinity on the osmotic and chloride concentration in the haemolymph of eurihalyne shrimp of the genus *Penaeus*. Comp. Biochem. Physiol. 122: 741-757.
- Castillo, R., G. Negre-Sadargues y R. Lenel. 1981. General survey of the carotenoids in crustacea. En: Carotenoids chemistry and biochemistry. Briton G. And T.W. Goodwin eds. Proceedings of the 6 th International Symposium on Carotenoids. Liverpool, U.K., Pergamon Press. 399-403.

- Cawthorne, D. F., T. Beard, J. Davenport y J. F. Wickins. 1983. Responses of juvenile *Penaeus monodon* Fabricius to natural and artificial seawaters of low salinity. *Aquaculture* 32:165-174.
- Chang, C. F., H. Y. Cheng., M. S. Su y I-C. Liao. 2000. Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1, 3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Pennaesus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 505-514.
- Charmantier, G., N. Bouaricha., M. Charmantier-Daures., P. Thuet y J. P. Trilles.1989. Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicador of the physiological state of penaeid shrimps. *Eur. Aquacult. Soc. Spec. Publ.* 10: 65-66.
- Chen, J. C y S. H. Lai.1993. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 165: 161-170.
- Chen, J. C. y C. Y. Lin. 1994. Responses of osmotic and chloride concentrations of *Penaeus chinensis* Osbeck subadults acclimated to different salinity and temperature levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 179:267-278.

- Chen, J. C y C. Y. Lin. 1995. Responses of oxygen consumption and ammonia-N excretion and Urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture*, 136: 243-255.
- Chen, J. C., M. N. Lin, Y. Y. Ting y J. N. Lin. 1995. Survival haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A:253–258.
- Chen, J. C. y C. Y. Lin. 1998. Osmotic concentration and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles reared at different salinity and temperature levels. *Aquaculture* 164:173–181.
- Cheng, J y I. Liao. 1986. The effect of salinity on the osmotic and ionic concentrations in the haemolymph of *Penaeus monodon* and *P. penicillatus*. In Maclean, J. L., Dizon, L. B., Hosillos, L. V. (Editorial), *The firsts Asia Fisheries Society*, Manila, Philippines, 633-636.
- Chien, Y. H., I.M. Chen., C.H. Pan y K. Kurmaly. 1999. Oxygen depletion stress on mortality and lethal course of juvenile tiger prawn *Penaeus monodon* fed high level of dietary astaxanthin. *J. Fish. Soc.* 26: 85-93.
- Chien, Y. H., C-H. Pan y B. Hunter. 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture* 216: 177-191.

- Chien Y. H y W. C. Shiau. 2005. The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 318: 201-211.
- Clark, J. V. 1992. Physiological responses of adult *Penaeus semisulcatus* (De Hann) to change in salinity. Comp. Biochem. Physiol. 101A:117-119.
- Clifford, H. C y R. W. Brick. 1978. Protein utilisation in the freshwater shrimp *Macrobranchium rosenbergii*. En: Proceedings World Mariculture Society. 9: 195-208.
- Comoglio, L. I. G. Gaxiola., A. Roque., G. Cuzon y O. Amin. 2004. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. Shell. Research.23: 243-249.
- Conover, R. J y E. D. S. Corner. 1968. Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. J. Mar. Biol. Ass. 48: 49-75.
- Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-M y L. O. Peña. 1998. Bioensayo nutricional para evaluar la cinética de fijación del pigmento Hi-Zea (30 000 mg kg<sup>-1</sup>; 75% zeaxantina) de la compañía Industrial Orgánica S. A. de C. V. en camarones *Penaeus stylirostris* (Super

- shrimp) y *P. vannamei*. 1998. Informe final. Departamento de Investigaciones Científicas y tecnológicas de la Universidad de Sonora. UNISON. 57 pp.
- Dall, W., 1981. Osmoregulatory ability and juvenile habitat preference in some penaeid prawns. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 54: 55-64.
- Dall, W., B.J. Hill., P.C. Rothlisberg y D.J. Staples. 1990. The biology of Penaeidae. *Advances in Marine Biology.* 27: 1-489.
- Dall, W., 1995. Carotenoids versus retinoids (vitamin A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). *Mar. Biol.* 124: 209-213
- Darachai, J., S. Piyatiratitivorakul., P. Kittakoop., C. Nitithamyong y P. Menasveta. 1998. Effects of astaxanthin on larval growth and survival of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. En: Flegel, T.W. (Ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 117– 12.
- Davis, D.A., Soud, I.P, Mc Graw, W.J., Rouse, D. B. 2002. Considerations for *Litopenaeus vannamei* reared in inland low salinity waters. En: Cruz-Suarez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortes, M.G., Simoes, N. (Editorial). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 3 al 6 septiembre del 2002. Cancún Quintana Roo, México.

- Díaz, F., S. Espina., C. Rosas., A. Sánchez., C. Vanegas y E Díaz Iglesias. 1989. Ritmo respiratorio y amplitud metabólica del camarón café *Penaeus aztecus* con ablación de los pedúnculos oculares. Rev. Inv. Mar X: 27-39.
- Díaz, F., C. Farfan., E Sierra, y A. D Re. 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation in juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. Mar. Freshwat Behav. Physiol. 34: 93-104.
- Díaz, F., A.D Re., E Sierra y E. Díaz-Iglesias. 2004. Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulation on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). J. Shell. Research. 23:1-8.
- Ferraris, R. P., F. E. Parado-Esteba, J. M. Ladja y E. G. De Jesús. 1986. Effect of salinity on the osmotic, chloride total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). Comp. Biochem. Physiol. 83A:701-708.
- Gallagher, M. L., y Mathews A. M. 1987. Oxygen consumption and ammonia excretion of the American *Anguilla rostrata* fed diets with varying protein energy ratios and protein levels. J. World Aquacult. Soc. 18: 107-112.
- Garza-Aguirre, M. del C y E. Aguirre-Hinojosa. 1998. Evaluación del uso del producto comercial Hi-Zea elaborado a base de carotenoides, en la pigmentación del camarón

- blanco *Penaeus vannamei*. Informe final. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. UNISON. 57 pp.
- Gaudy, R., y L. Sloane. 1981. Effect of salinity on oxygen consumption in postlarvae of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus stylirostris* without and with acclimatation. Mar. Biol. 65: 297-301.
- Guerin, J. L y W. B. Stickle. 1992. Effects of salinity gradients on the tolerance and bioenergetics of juvenile blue crabs (*Callinectes sapidus*) from waters of different enviromental salinities. Mar. Biol. 114: 391-396.
- Harrison K. E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. Vol 9, pp, 1-27, Department of Biology, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada.
- Hagerman, L., T. Søndergaard., K. Weile., D. Hoise y R.R Uglow. 1990. Aspects of blood physiology and ammonia excretion in *Nephrops norvegicus* under hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. 97 A (1): 51-55.
- Hernández, R. M., y H. F. Díaz. 1995. Interaccion de la temperatura y la salinidad sobre la excreción de amonio y osmoregulación en *Penaeus aztecus* (Crustacea: Penaeidae) Caribb J. Sci 31(3-4): 284-28.

- Herring, P. J. 1973. Depth distribution of the carotenoids pigments and lipids of some oceanic organisms. *J. Mar. Biol. Ass.* 53: 359-562.
- Hochcachka, P. W. 1991. Design of energy metabolism. En: *Comp. Animal Physiology*. 4ta Edición. (C. L. Prosser, ed.). 325-351. Wiley-Liss, N.Y.
- Howe, N. R., W. D. Quast & L. M. Cooper. 1982. Lethal and sublethal effects of a simulated salt brine effluent on adults and subadults of the shrimps *Penaeus setiferus* and *P. aztecus*. *Mar. Biol.* 68:37-47.
- Ishikawa, W., L Miyake y S. Yasuie. 1996. Chromatophores and carotenoids in cultured kuruma-prawn, *Penaeus japonicus* Bate, of different body colours. *Bulletin of Fishery Experimental Station Okayama Prefecture* 5: 18-24.
- Jiang, D. H., A. L. Lawrence, W. H. Nelly y H. Gong. 2000. Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol.* 253: 193-209.
- Katagiri, K., Y. Koshimo., T. Maoki y T. Matsuno. 1987. Occurrence of pirardexantin derivatives in the prawn *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87:161-163.

Katayama, T., K. Hirata y C. O. Chichester. 1971. The biosynthesis of astaxanthin-IV. The carotenoids in the prawn *Penaeus japonicus* Bate (Part 1.). Bull. Japan. Soc. Sci Fish. 37: 614-620.

Katayama, T., T. Kamata., M. Shimaya., O. Deshimaru y C. O. Chichester. 1972. The biosynthesis of astaxanthin –VIII. The conversion of labelled  $\beta$ -carotene-15, 15'- $^3\text{H}_2$  into astaxanthin in prawn *Penaeus japonicus*. Bate. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 38: 1171-1175.

Kinne, O.1971. Invertebrates. En: Kine, O. (Ed.), Marine Ecology part 2, Chap. 4, vol 1, Wiley-Interscience, New York 122-124.

Kontara, E. K. M., G. Merchie., P. Lavens., H. Nelis., A. Leenheer y P. Sorgeloos. 1995. Improved larvaiculture oustputs of postlarval shrimp *Penaeus vannamei* trough supplementation of L-ascorbil-2-polyphosphate in the diet. Eur. Aquac. Soc. Special Publication, 24, 230-233.

Kureshy N y D. A. Davis. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 204, 125-143

- Kutty, M. N., G. Murugapoopathy y T. S. Krishan. 1971. Influence of salinity and temperature on oxygen consumption in young juveniles of the Indian prawn *Penaeus indicus*. Mar. Biol. 11: 125-131.
- Lamore, S., C.R. Lamore y J. Scarpa. 2001. Effect of low salinity on growth and survival of postlarvae and juvenile *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 32:4, 385-392.
- Lastcha, T. 1989. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. Adv. Trop. Aquacult. Aquacop. INFREMER, actes colloque 9: 319-325.
- Lemos, D., J.M. Ezquerria y F. L. Garcia-Carreño. 2000. Protein digestion in penaeid shrimps: digestive, proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. Aquaculture 186: 89-105.
- Lemos, D., V.N. Phan, G. Alvarez. 2001. Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Perez-Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 261: 55-74.
- Lemos, D., R.L.V. Jorge, V.N. Phan. 2003. Simultaneous measurements of oxygen consumption and ammonia-N excretion in embryos and larvae of marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. Part A 136: 321-328

- Lightner, D. V., 1999. The penaeid Shrimp Viruses TSV, IHHNV, WSSV y YHV: Current Status in the Americas, Available Diagnostic Methods, and Management Strategies. *J. Aquacult.* 9:2
- Lignot J.H., J.C. Cochrad., C. Soyez., P. Lemaire y G. Charmantier. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weigh in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*.170: 79-92.
- Lignot J.H., C. Spanings-Pierrot y G. Charmantier. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of the stress on crustaceans. *Aquaculture*. 170: 79-92.
- Lima, A. G., J.C. McNamara y W. R Terra. 1997. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na/K ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 215: 81-91.
- Lucas, A. 1996. Bioenergetics of aquatic animals. Taylor and Francis, London. 169 pp.
- Mantel, L.H. y L.L. Farmer, 1983. Osmotic and ionic regulation. *The Biology of Crustacea*. En: Bliss, D.E., Mantel, L.H. (Eds). *Internal Anatomy and Physiological Regulation* vol. 5 Academic Press. New York. 53-161.

- Mayzaud, P. y R. J. Conover. 1988. O: N atomic ratio as a tool to describe zooplankton Metabolism. Mar. Ecol. Prog. Ser. 45: 289-302.
- Menz, A y B. F. Blake. 1980. Experiments on the growth of *Penaeus vannamei* Boone. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 48: 99-111.
- Merchie, G., E. Kontara., P. Lavens., R. Robles., K. Kurmaly y P. Sorgeloos. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture Research 29, 579-585.
- McGraw, W. J., E. A. Davis., D. Teichert-Coddington y D.B. Rouse. 2002. Acclimatation of *Litopenaeus vannamei* Postlarvae to low salinity: influence to age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. J. World Aquac. Soc. 33:1, 78-84.
- McKay, C. 1987. The effectiveness of dietary supplement of astaxanthin in relation to the pigmentation and growth of the American lobster *Homarus Americanus*. BSc Honors degree, Dalhousie University, Biology Department, Halifax.
- Merchie, G., E. K. M. Kontara., P. Lavens., R. Robles., K. Kurmaly y P. Sogeloos. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture Research, 29: 579-585.

- Nelson, S. G., A. W. Knight y H. W. Li. 1997. The metabolic cost of food utilisation and ammonia production juvenile *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Palaemonidae) *Comp. Biochem. Physiol.* 57A, 67-72.
- Ogle, J. T., K. Beaugez y J. M. Lotz. 1992. Effects of salinity on survival and growth postlarval *Penaeus vannamei*. *Gulf Research Reports*, 8: 415-421.
- Okada, S., S.A. Nur-E-Borhan y K. Yamaguchi 1994. Carotenoids composition in the commercial black tiger prawns. *Fisheries Science*, 60: 213-215.
- Paniagua-Michel J y M. A. Liñan-Cabello 2003. Carotenoids and retinoids metabolites as precursors of receptors-specific bioactive compounds. *Aquaculture Nutrition*: 9-303-389.
- Pantastico, J. B., Oliveros, E. N. 1980. Acclimatation of *Peneus monodon* postlarvae to fresh water. *Fish. Res. Philipp.* 5: 33-38
- Parado-Estapa, F. D., R. P Ferraris., J. Ladja., E. G. M. de Jesús. 1987. Response of intermolt *Penaeus indicus* to large fluctuations in environmental salinity. *Aquaculture* 64: 175-184.
- Pascual C., E. Zenteno, G. Cuzon, A. Sanchez, G. Gaxiola, G. Taboada, J. Suarez, T. Maldonado, C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*. 236: 431-450 p.

- Pascual C., A. Sanchez, E. Zenteno, G. Cuzon, G. Gaxiola, R. Brito, R. Gelabert, E. Hidalgo, C. Rosas., 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 251: 416-429
- Péqueux, A y R.Gilles 1981. Na<sup>+</sup> fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *J. Exp. Biol.* 92: 173-186.
- Perez-Farfante, I. P y B. Kensley 1997. Penaeid and sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses. *Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle*. Tome 175, Editions Du Muséum Paris, 233 pp.
- Petit H., G. Nègre-Sadargues., R. Castillo y R. P. Trilles. 1997. The effects of dietary astaxanthin on growth and moulting cycle of postlarval stages of the prawn, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol.* 117A: 4, 539-544.
- Petit H., G. Nègre-Sadargues, R. Castillo, S. Valin, J-P Trilles. 1998. The effects of dietary astaxanthin on the carotenoid pattern of the prawn *Penaeus japonicus* during postlarval development. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A: 523-527 p.
- Racotta I. S., R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A: 437-443 p.

- Rasmussen, A y P. Bjerard. 1995. The effect of salinity and calcium concentration on the apparent water permeability of *Cherax destructor*, *Astacus astacus*, and *Carcinus maenas* (Decapoda: Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol.* 111A: 171-175.
- Re, A. D., F. Díaz, E. Sierra, M. Aguilar y A. Granados. 2000. Efecto de la salinidad sobre la temperatura preferida y la tolerancia térmica de *Litopenaeus stylirostris*. Stimpson. 5to Congreso de Ciencias del Mar, Marcuba 2000. Res. 36 pp.
- Re, A. D., F. Díaz., E. Sierra y S. Gómez- Jiménez. 2004. Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity. *Ciencias Marinas*. 30 (3): 443-453.
- Regnault, M. 1984. Salinity induced changes in ammonia excretion rate of the shrimp *Crangon crangon* over a winter tidal cycle. *Marine Ecology. Prog. Ser.* 20: 119-125.
- Regnault, M., 1987. Nitrogen excretion in marine of freshwater crustacea, *Biology Review*, 62: 1-24.
- Robinson, G. D. 1982. Water fluxes and urine production in the blue crabs (*Callinectes sapidus*) as a function of environmental salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* 71A: 407-412.

- Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas: naturales, aguas residuales y aguas del mar Ed. Omega. Barcelona 138-140.
- Rodríguez, G. A. 1981. Osmoregulation and total serum proteins of two species of penaeidean shrimps from the pacific coast of México. *J. Crustacean Biol* 1:392–400.
- Rodriguez, J. y G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 191: 109-119.
- Rosas, C. R. Gaxiola., R. Brito., A. Sanchez y L. A. Soto 1999<sup>a</sup>. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234: 41-57.
- Rosas, C., L Ocampo., R Gaxiola., A.Sanchez y L. A Soto. 1999b. Effect of salinity on survival, growth and oxygen consumption of postlarvae *Litopenaeus setiferus*. *J. Crust. Biol.* 19 (2): 244-251.
- Rosas, C., A. Sanchez., E. Díaz., L. A. Soto., R Gaxiola y R. Brito. 1996. Effect of dietary protein level on aparent heat increment in post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duodarum*, *P. notialis* postlarvae. *J. World Aqua. Soc.* 27:92-102.

- Rosas, C., G. Cuzon., L. Arena., P. Lemaire., C. Soyez y A. Van Wormhoudt. 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 249: 181-198.
- Sagi, A., M. Rise., K. Isam y S. Arad. 1995. Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*. Comp. Biochem. Physiol. 112B, 309-313.
- Salvato, B., V. Cuomo., P. Di Muro y M. Beltramini. 2001. Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four murine invertebrates: a comparative factorial study. Mar. Biol. 138: 659-668.
- Saoud I.P., D.A. Davis, D.B. Rouse. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. Aquaculture. 217: 373-383 p
- Scott, R. W. 1999. "Marketing bioactive ingredients in food products" Food Technology. Vol 53: 53-69
- Scholz, U., G. García-Díaz., D. Ricque., L. E. Cruz-Suárez., F. Vargas-Albores y J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture 176, 271-283.

- Snow, N. B y P. J. Le B. Williams. 1971. A simple method to determine the O: N ratio of small marine animals. *J. Mar. Biol. Ass.* 51:105-109.
- Spaargaren, D.H., 1977. On the metabolic adaptation of *Carcinus maenas* to reduced oxygen tension in the enviroment. *Neth. J. Sea Res*, 11, 325-333.
- Spanopoulos, M., C. A. Martínez., R. C. Venegas., C. Rosas y L.G. Ross. 2005. The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture*. 244: 341-348.
- Stern, S., A. Borut y D. Cohen. 1984. The effect of salinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobranchium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.*79A. 271-274.
- Taboada, G., G. Gaxiola., T. García., R. Pedroza., A. Sánchez., L. A. Soto y C. Rosas. 1998. Oxygen consumption and amonnia-N- excretion related to protein requirements for growth of *Penaeus setifeus* juveniles. *Aquaculture Research*. 29: 1-11.
- Tanaka, Y., H. Matsuguchi., T. Katayama., K. I. Simpson y C.O. Chinchester. 1976. The biosynthesis of astaxanthin-XVIII. The metabolism of the carotenoids in the prawn *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*42: 197-202.

- Thongrod, S., A. Tansutapanich y O. J. Torrissen. 1995. Effect of dietary astaxanthin supplementation on accumulation, Fabricius. En: Lavens, P., E. Jaspers., E. Roelants I. (Eds.), Larvi 95'-fish and Shellfish Larviculture Symposium. Eur. Aquacult. Soc. Special Publication No. 24, Gent, Belgium, 1995. 251-254.
- Tukey, J. W. 1977. Exploratory data análisis, Massachusetts: Adisson-Wesley. 688pp.
- Van Wyk, P., M. Davis-Hodkings., C. R. Lamore., K. Main., J. Mountain y J. Scarpa. 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater productions systems: a practical manua. FDACS Contract # 4520. Florida Department of Agriculture Consumer Services, Tallahassee, FL.
- Venkataramiah, A., G. Lakshmi, y J. Gunter. 1974. Studies on the effects of salinity and temperature on the commercial shrimp *Penaeus aztecus* Ives, with special regard to survival limits, growth, oxygen consumption and ionic regulation. U. S Army Engineer. Waterways Experiment Station, Vicksburg, Mississipi, USA. Contract Report H-74-2/AD - 777 - 794. 134.
- Vernberg, B. W. y F. J. Vernberg. 1972. Environmental physiology of marine animals. New York: Springer-Verlag. 346pp.

Villareal, H., y R, Rivera. 1993. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus californiensis*. Comp. Biochem. Phisiol. 106A: 103-107.

Wasieleski, W.1999. Produção do camarão marinho *Penaeus paulensis* no sul do Brasil: cultivo em estruturas alternativas. En: CNPq (Ed.) Prêmio jovem cientista 1997: publicação resumida dos trabalhos vencedores. CNPq, Fundação Roberto Marinho, Grupo Gerdau, Rio de Janeiro, Brazil 53-106.

Wedderburn, J., V. Cheung., S. Bamber., M. Bloxham y M.H. Depledge. 1998. Biomarkers of biochemical and cellular stress in *Carcinus maenas*: an in situ field study. Marine Enviromental Research, 46: 1-5.

Williams, A. B. 1960. The influence of temperature on osmotic regulation in two species of estuarine shrimps (*Penaeus*). Biol. Bull. 119:560-571.

Yamada, S., Y. Tanaka., M. Sameshima. y Y. Ito. 1990. Pigmentation of prawn *Penaeus japonicus* with carotenoids. I. Effect of dietary astaxanthin.  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on pigmentation. Aquaculture, 87: 323-330.