

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



**EFFECTO DE LA ACCION COMBINADA DEL ACIDO
ASCORBICO (AA) Y ASTAXANTINA (AX) EN LA
RESISTENCIA DEL CAMARON BLANCO *Litopenaeus*
vannamei SOMETIDOS A CONDICIONES DE ESTRES**

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

HILDA LORENA FRAIRE ASTRAIN

Ensenada, Baja California, Mexico. Junio de 2001.

TESIS DEFENDIDA POR

HILDA LORENA FRAIRE ASTRAIN

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



M. en C. Manuel de Jesús Acosta Ruiz
Director del Comité



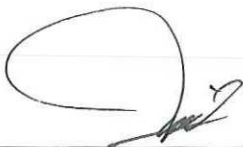
M. en C. Ana Denise Re Araujo
Miembro del Comité



Dr. Benjamín Barón Sevilla
Miembro del Comité



Dr. Helmut Maske Rubach
Miembro del Comité



Dr. Jorge Cáceres Martínez
Jefe del Depto. de Acuicultura



Dr. Luis Alberto Delgado Argote
Director de Estudios de Posgrado

29 de Junio del 2001

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



CICese

**DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA**

EFECTO DE LA ACCIÓN COMBINADA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) Y ASTAXANTINA
(AX) EN LA RESISTENCIA DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* SOMETIDOS
A CONDICIONES DE ESTRÉS.

TESIS

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

Presenta:

HILDA LORENA FRAIRE ASTRAIN

Ensenada, Baja California a junio 2001

RESUMEN de la Tesis de **HILDA LORENA FRAIRE ASTRAIN**, presentada como requisito parcial, para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con especialidad en **ACUICULTURA**, Ensenada, Baja California, México, Junio del 2001.

EFFECTO DE LA ACCIÓN COMBINADA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) Y ASTAXANTINA (AX) EN LA RESISTENCIA DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* SOMETIDOS A CONDICIONES DE ESTRÉS.

Resumen aprobado por:


M. en C. Manuel de Jesús Acosta Ruiz
Director de Tesis

El campo nutricional es determinante en la habilidad del organismo para resistir enfermedades. El ácido ascórbico y los carotenoides en su forma reducida (astaxantina) funcionan como antioxidantes que inactivan los radicales libres dañinos producidos por la actividad normal celular y de múltiples estresores (Chew, 1995) promoviendo el crecimiento del camarón e incrementando su calidad física (Qingyn *et al.*, 1995). Es por ello que se formuló una dieta basal para camarón blanco *Litopenaeus vannamei* enriquecida con 6 diferentes combinaciones de ácido ascórbico (AA) y astaxantina (AX). Se realizó el análisis proximal y contenido energético de la dieta. La evaluación biológica se implementó con organismos de 0.08 gr y una densidad de siembra de 24 org l⁻¹, los cuales fueron alimentados *ad libitum*. Los organismos alimentados con la dieta 1 presentaron mayor crecimiento en longitud (3.61 ± 0.53 cm) comparados con los que se alimentaron con la control (3.41 ± 0.63 cm) y mayor peso con los alimentados con la dieta 2 (0.24 ± 0.10 gr) que con la dieta control (0.20 ± 0.11 gr). La mejor sobrevivencia se obtuvo con los organismos alimentados con la dieta 5 (69.44 %), comparados con los organismos alimentados con la dieta control (48.60 %). Se presentó mayor número de mudas en los que se alimentaron con la dieta 6 (13) y el mínimo con la dieta 2 (3).

Los organismos expuestos a una concentración de 15.50 ± 0.782 mg l⁻¹ de amonio total no registraron más del 50 % de mortalidad. La dieta 7 presentó una mortalidad de 33.33 % a 96 h de exposición y el menor porcentaje con las dietas 2 y 5 (8.33 %). Se realizó una segunda prueba de resistencia con una concentración de 48.121 ± 3.404 mg l⁻¹ de amonio total. La mortalidad del 50 % se presentó en los organismos alimentados con la dieta control a las 9 h de exposición y los alimentados con la dieta 1 presentaron 65.5 % a las 20 h. Se presentó 100 % de mortalidad para todos los tratamientos a las 24 h de exposición.

La inclusión de vitamina "C" y astaxantina en la dieta influyó positivamente en el crecimiento, sobrevivencia y resistencia al estrés por amonio en *L. vannamei*, por lo que se recomienda su uso en la formulación de alimentos.

Palabras claves: Vitamina "C", astaxantina, estrés, camarón

ABSTRACT of the thesis of **HILDA LORENA FRAIRE ASTRAIN**, presented as partial requirement to obtain the **MASTER ON SCIENCE** degree in **AQUACULTURE**. Ensenada Baja California, México, November 2000.

EFFECT OF THE COMBINED ACTION OF ACID ASCÓRBICO (AA) AND ASTAXANTINA (AX) IN THE RESISTANCE OF THE WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*, PUT UNDER CONDITIONS OF STRESS.

Abstract approved by:


M. en C. Manuel de Jesús Acosta Ruiz
Director of thesis

The nutritional field is determining in the ability of the organism to resist diseases. The ascorbic acid and the carotenoid ones in their reduced form (astaxantina) work like antirust which they inactivate the harmful radicals free produced by estresses the cellular activity normal and of manifold (Chew, 1995) promoting the growth of the shrimp and increasing their physical quality (Qingyn *et al.* 1995). A basal diet for white shrimp *Litopenaeus vannamei* was formulated enriched with 6 different combinations from ascorbic acid (AA) and astaxantina (AX). It was made the proximal analysis and power content of the diet. The biological evaluation implemented with organisms of 0,08 gr. and one density of 24 org l⁻¹, which were fed ad libitum. The organisms fed with the diet diet 1 presented greater growth in length ($3.61 \pm 0,53$ cm) compared with which they were fed with control ($3.41 \pm 0,63$ cm) and greater weight with the fed ones with diet 2 (0.24 ± 0.10 gr.) that with the diet control ($0.20 \pm 0,11$ gr.). The best survive was obtained with the organisms fed with diet 5 (69,44 %), compared with the organisms fed with the diet control (48,60 %). Greater number of ecdysis in which they were fed with diet 6 (13) and the minimum with diet 2 appeared (3).

The organisms exposed to a concentration of 15.50? 0,782 mg l⁻¹ of total ammonium did not register more of 50 % of mortality. Diet 7 presented/displayed a mortality from 33,33 % to 96 exhibition h and the smaller percentage with diets 2 and 5 (8,33 %). Se made one second test of resistance with a concentration of 48.121? 3,404 mg l⁻¹ of total ammonium. The mortality of 50 % appeared in the organisms fed with the diet control 9 exhibition h and the fed ones with 20 diet 1 presented/displayed 65,5 % to h. appeared 100 % of mortality for all the 24 processings to exhibition h.

The inclusion of vitamin " C " and astaxantina in the diet influenced positively in the growth, sobreexperience and resistance to stress by ammonium in *L. vannamei*, reason why its use in the food formulation is recommended. Key words: Vitamin " C ", astaxantina, stress, shrimp

Key words: Vitamin " C ", astaxantina, stress, shrimp.

DEDICATORIA

A TI DIOS QUE SIN TU AYUDA NO ESTARÍA NI SERÍA LO QUE SOY...

A JESUS MI PAPÁ, POR DARMER EL EJEMPLO DE LA TENACIDAD EN LA VIDA Y SER UN HOMBRE HONESTO Y TRABAJADOR...

A MI MADRE MARIA POR QUE LA ADMIRO POR SU INTELIGENCIA Y EJEMPLO Y QUE AMARÉ POR EL RESTO DE MI VIDA ...

MIS HERMANOS: ALVARO, LUIS, NOEL, RUBEN Y A TI NINFA (Y SUS RESPECTIVOS) POR SU EJEMPLO CONTINUO DEL AMOR A LA FAMILIA...

A TI GORDO POR SER ESA PERSONA QUE SIEMPRE ESTA AHÍ CUANDO NECESITO AMOR, CONFIANZA Y SEGURIDAD EN LOS CAMBIOS DE LA VIDA... Y POR QUE TE ADMIRO Y AMO SIEMPRE!

Y POR SUPUESTO A MIS HIJAS ASTERY Y MILERY POR SER MI MOTIVO DE VIVIR Y SENTIR ...

Y POR ÚLTIMO PERO NO POR ESO MENOS IMPORTANTE A MI COMPLEMENTO DE FAMILIA ESTEFANY, MIYOVA, MAURO Y MI SUEGRA CARMEN... POR QUE SE QUE CONTARÉ CON ELLOS EN LAS BUENAS Y MALAS

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), a Depto. de Acuicultura y Biotecnología Marina por su apoyo incondicional y facilidades brindadas en el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca crédito otorgada para la realización de este trabajo.

A mi Director de tesis, MANUEL DE JESÚS ACOSTA RUIZ, por su apoyo durante el tiempo requerido para terminar.

A BENJAMÍN BARÓN SEVILLA por ser mi "sinodal" amigo y ejemplo a seguir...

A FERNANDO BUCKLE por su apoyo de equipo de laboratorio y confianza prestada a mi persona...

A mis sinodales HELMUT MASKE Y DENISE RE por sus observaciones y mejoras para este trabajo...

A mis mejores amigos Luis (EL MOCHIS) y su hemanita PATO y fam., BILLY, OSO (ay!! perdón candidato a Dr. Eduardo Talamás) NALLELY Y GABRIEL, con quienes disfruté y espero disfrutar de su amistad donde sea que nos encontremos...

A mis compañeros de generación y los que no son tambien... Gissel, Gisela, Galdy, Darla, Yessy, Daniel, Raúl (Lobo), Tatanka, Raquel, Asunción, Silvia, Juan Carlos, Lalo, Roberto, Cuquita, Alejandro, Lizza y los que me faltan...

A Ma. Elena, Cecy, Biby y Alejandrina primeramente por su amistad y disponibilidad de tiempo y apoyo en todo momento.

Y que dijiste Negrito (mi sobrino), por supuesto a ti que me ayudaste muchísimo en la realización de mi experimento...

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN

I.1 GENERALIDADES	1
I.2 ANTECEDENTES	2
I.3 OBJETIVOS	10
I.4 HIPÓTESIS	10

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 ABASTECIMIENTO DE JUVENILES	11
II.2 FORMULACIÓN DEL ALIMENTO BASAL	11
II.3 DISEÑO DEL EXPERIMENTO	14
II.4 SISTEMA DE CULTIVO	16
II.5 PRUEBA DE ESTRÉS	17
II.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18

III. RESULTADOS

III.1 FORMULACIÓN DEL ALIMENTO	19
III.2 PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS	21
III.3 EFECTO DE LAS DIETAS	23
III.3.1 CRECIMIENTO	23
III.3.2 SOBREVIVENCIA	29
III.3.3 FRECUENCIA DE MUDAS	30
III.4 RESISTENCIA AL ESTRÉS	31

CONTENIDO (Continuación)

IV. DISCUSIONES	38
IV.I SISTEMA DE CULTIVO	38
IV.II ELABORACION DE LAS DIETAS	38
IV.III EFECTO DE LAS DIETAS	40
V. CONCLUSIONES	49

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Unidad experimental utilizada durante el ensayo de alimentación de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	16
2	Unidad experimental utilizada en la prueba de resistencia (LT ₅₀)	18
3	Concentración de amonio, durante la fase de alimentación de <i>L. vannamei</i> .	22
4	Crecimiento en longitud total de <i>L. vannamei</i> .	25
5	Crecimiento en peso total de <i>L. vannamei</i>	27
6	Relación de la longitud y el peso de los juveniles de <i>L. Vannamei</i>	30
7	Número total de mudas registradas durante el período de alimentación de <i>L. vannamei</i> con las 7 dietas.	31
8	Concentración de amonio total (15.50 mg/l NH ₃ -N) durante la prueba de resistencia LT ₅₀ - 96 h.	33
9	Concentración de amonio total (48.121 mg/l NH ₃ -N) durante la prueba de resistencia LT ₅₀ - 96 h	35

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Ingredientes utilizados en la elaboración del alimento basal suministrado a los juveniles de <i>L. vannamei</i> .	13
II	Concentraciones de vitamina C y Astaxantina incluidos en la dieta basal.	14
III	Análisis bromatológico de la dieta basal.	19
IV	Composición de amonoácidos de la dieta basal (proteína 43.19 %)	20
V	Valores promedio de lo parámetros del agua de mar en los cultivos de <i>L. vannamei</i> (desviación estándar)	21
VI	Análisis de varianza para la longitud final de <i>L. vannamei</i>	24
VII	Promedio del crecimiento en longitud de <i>L.vannamei</i> alimentado con las 7 dietas experimentales durante 5 semanas.	24
VIII	Análisis de varianza para el peso de camarón blanco <i>L. vannamei</i> .	26
IX	Crecimiento de <i>L.itopenaeus vannamei</i> expresado en peso.	26
X	Análisis de varianza realizado a los datos de sobrevivencia <i>Litopenaeus vannamei</i> .	29
XI	Sobrevivencia de juveniles de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	30
XII	Mortalidad presentada durante la exposición de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> durante la prueba de resistencia LT ₅₀ -96 h expuestos a 15.50 mg/l NH ₃ -N (0.93 mg/l NH ₃).	34
XIII	Mortalidad presentada durante la exposición de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> durante la prueba de resistencia LT ₅₀ -96 h expuestos a 48.121 mg/l NH ₃ -N (2.88 mg/l NH ₃)	36
XIV	Análisis de varianza realizada a los datos de resistencia al estrés por amonio expuestos a 48.121 mg/l NH ₃ -N (2.88 mg/l NH ₃)	37
XV	Tiempo letal medio (LT ₅₀ - 96 h) a 48.121 mg/l NH ₃ -N (2.88 mg/l NH ₃)	37

EFFECTO DE LA ACCIÓN COMBINADA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) Y ASTAXANTINA (AX) EN LA RESISTENCIA DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*, SOMETIDOS A CONDICIONES DE ESTRÉS.

INTRODUCCIÓN

I.1 GENERALIDADES

La acuicultura es una de las actividades de mayor expansión en el mundo, con un crecimiento anual aproximado del 12% desde 1984 (Smith *et al.* 2000). La producción total de este sector fue 39.4 millones de toneladas incluyendo 1.5 millones de toneladas de los cuales corresponden a los crustáceos y constituyen 4.0 % de la producción acuícola total desde 1998 (FAO, 2000). Esta expansión se mantendrá conforme aumente la demanda y la población humana mundial se incremente, por lo tanto, será necesario implementar sistemas de cultivo más eficientes en términos del uso de los recursos y del impacto ambiental que esta actividad genera.

En los cultivos de camarón la alimentación adecuada es aquella que cubre todas las funciones vitales y proporciona la energía para que los organismos alcancen el máximo crecimiento posible, sin llegar a repercutir en la calidad del agua (FAO, 2000).

En una empresa acuícola, el alimento suministrado representa entre el 30 y el 60 % de los costos de producción (Zendejas-Hernández, 1998), por esto, es importante que el alimento no sólo sea nutrimentalmente completo y de fácil consumo, además, deberá ser más económico. Para cumplir con estas premisas es necesario una definición precisa de los requerimientos nutricionales de los organismos bajo cultivo; así como una mejor caracterización y procesamiento de los ingredientes utilizados en la elaboración de alimentos. Condición que lleva a una selección estricta de los ingredientes, no sólo desde el punto de vista de su calidad química, también de su calidad sanitaria y

biológica, ya que la salud y el crecimiento del camarón cultivado dependen directamente de la disponibilidad de alimentos adecuados (Qingyn *et al.*, 1995).

No es sorprendente que en las últimas décadas la nutrición del camarón se haya convertido en una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes dentro de la acuicultura (Tacon, 1999)

1.2 ANTECEDENTES

En Japón, Fujinaga (1934) inició los experimentos para el cultivo controlado de camarón y no fue hasta 1959 cuando bajo su dirección empiezan a operar las primeras granjas de cultivo de ciclo completo de este crustáceo (Orbe y Arias, 1987). Su técnica consistió en criar los camarones desde huevos hasta adultos, proporcionándoles en cada fase de su desarrollo los alimentos necesarios y adecuados para su buen desarrollo.

En México el cultivo de camarón es reciente, ya que inició en la década de los años setenta en la Universidad de Sonora; sus objetivos se concentraron en el cultivo del camarón café y azul, (*L. californiensis*, *L. stylirostris*), tratando de adaptar la tecnología japonesa a nuestras especies y con las condiciones imperantes en México.

El cultivo de camarones peneidos que se ha desarrollado en México abarca tres niveles: extensivo, semi-intensivo e intensivo. La clasificación de estas técnicas obedece fundamentalmente al número de organismos por unidad de superficie y al grado de control que se tiene del sistema y de las características del mismo; entre más intenso es el cultivo se debe ejercer un mayor control de la calidad del agua en donde se desarrollan los organismos, la cantidad y calidad del alimento.

Hoy en día, la estrategia para la expansión de la camaronicultura consiste en aprovechar extensiones de tierra que no pueden ser dedicadas a la agricultura o la ganadería, por lo que se han implementado métodos de cultivo intensivo, donde la forma predominante de nitrógeno inorgánico que entra al sistema es el amonio producto del metabolismo de los camarones y que cuando se concentran en un cultivo intensivo afecta el crecimiento y causan la mortalidad de los animales en cultivo (Colt y Armstrong, 1981).

1.2.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Las necesidades nutricionales para los organismos peneidos en términos de proteínas, energía, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales han sido ampliamente estudiados (Lim y Akiyama, 1998).

Los requerimientos de proteína dietaria para el camarón son del 30 al 60 %, y dependen de diversos factores como la especie, talla, fuente de proteína, contenido energético total y manejo del alimento. Los lípidos sirven como transportadores de vitaminas liposolubles y proveen otros compuestos como esteroides y fosfolípidos, que son esenciales para las funciones metabólicas del camarón. Los niveles óptimos de lípidos incluidos en una dieta varían en un intervalo de 6 a 10%. Las vitaminas son compuestos orgánicos complejos que se requieren en cantidades mínimas para el crecimiento normal, el metabolismo y la reproducción (Tacon, 1999).

Los minerales participan como constituyentes del exoesqueleto, en el balance de la presión osmótica, de los tejidos en la transmisión de los impulsos nerviosos y en la contracción de los músculos, entre otras funciones (Lim y Akiyama, 1998).

I.2.2 IMPORTANCIA DE LA UTILIZACION DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA "C") Y LA ASTAXANTINA EN NUTRICIÓN.

El estado nutricional del organismo determina su habilidad para resistir a las enfermedades. La vitamina "C" y los carotenoides en su forma reducida (astaxantina) funcionan como antioxidantes que inactivan los radicales libres dañinos producidos por la actividad normal celular y en respuesta a múltiples estresores (Chew, 1995) y de esta manera promueven el crecimiento del camarón e incrementan su calidad física. La función antioxidante de estos micronutrientes contribuye a fortificar la capacidad inmunológica de los organismos, y en consecuencia proveer una integridad funcional y estructural a las células que constituyen el sistema inmune de los camarones (Qingyn *et al.*, 1995).

Los requerimientos de ácido ascórbico para los camarones varían entre 100 y 200 mg kg⁻¹, sin embargo, los niveles de suplementación de vitamina "C" recubierta (para evitar lixiviación) y de sus derivados son 1200 mg kg⁻¹ y 2500 mg kg⁻¹, respectivamente (Akiyama *et al.*, 1993).

Otra de las funciones importantes de la vitamina "C" en el camarón, es su participación en la formación de colágeno, un componente esencial de los vasos capilares y de tejido conectivo, también participa en la síntesis de hormonas esteroideas (*op.cit*). Además, contribuye a regular la producción de cortisona, la hormona responsable de la adaptación metabólica al estrés, lo que permite a los organismos un óptimo desarrollo (Kitabayashi *et al.*, 1971).

La vitamina "C" es un nutrimento esencial para los camarones peneidos, su deficiencia se traduce en un crecimiento pobre, una baja conversión alimenticia, una

reducción en la frecuencia de muda o muda incompleta, la disminución de la resistencia al estrés, la disminución en la síntesis de colágeno, la melanización del exoesqueleto y la ocurrencia de grandes mortalidades (Medina-Reyna, 2000).

Según Merchie *et al.* (1995), algunas funciones biológicas y fisiológicas (crecimiento, sobrevivencia, frecuencia de muda, resistencia al estrés) se pueden mejorar durante el cultivo larval con el suplemento de vitamina "C" en la dieta. Todas las especies de camarones investigadas hasta hoy, requieren de una fuente de ácido ascórbico (vitamina "C") durante los diferentes estadios de desarrollo (D'abramo y Conklin, 1995). No obstante, los requerimientos específicos aún no se han establecido para los camarones; y su concentración en los alimentos depende de las características de la fuente del ácido ascórbico.

Las formas no protegidas de vitamina "C" no son muy utilizadas en la producción de alimento por que son muy sensibles al calor y al oxígeno, son solubles en agua y el alcohol etílico, pero insolubles en otros solventes orgánicos. También, durante el almacenaje del alimento, aproximadamente el 90 % de esta vitamina puede ser destruida (Cho *et al.*, 1985; Steffens, 1987., Lovell, 1987., Halver, 1988 y Kurmaly *et al.*, 1993).

En la última década se observó un incremento sustancial en el número de trabajos publicados en relación con la nutrición de camarones y se han enfocado a conocer los requerimientos de los principales nutrientes en diferentes especies y fases del proceso de producción. En particular, en los últimos ocho años, se ha estudiado el uso de un carotenoide la astaxantina, como pigmento o como nutriente en diferentes especies de *Penaeus* (Arango G. 1993, Arango *et al.* 1994, 1995, Chien y Jeng, 1992).

Los crustáceos son incapaces de sintetizar la astaxantina, pero pueden oxidar y convertir el β -caroteno, la zeaxantina y otros pigmentos en astaxantina, por lo cual dependen de un suministro adecuado de este nutriente a través de la dieta. Sin embargo, la producción de astaxantina en un proceso metabólico muy complicado que requiere una cantidad extremadamente alta de astaxantina (Latscha 1989 y 1991a).

Estas moléculas tienen funciones metabólicas muy importantes como la fotoprotección, la actividad antioxidante y la estimulación del sistema inmune. Varios trabajos describen alteraciones en el comportamiento inmunológico después de la administración de carotenoides. Aún no se sabe como es que los pigmentos de tipo carotenoide pueden funcionar en esta estimulación, lo que si se conoce es que el daño oxidativo a las membranas limita la respuesta inmune y posiblemente los carotenoides evitan su oxidación (Rodríguez, 1998).

En *L. vannamei*, aproximadamente el 65 % de los carotenoides depositados en el cuerpo corresponden a la astaxantina, el 5 % es 7,8 dihidroastaxantina y el 30 % es una mezcla de varios carotenoides. Se conocen diferentes funciones fisiológicas y fenológicas para los carotenoides. En diferentes especies de camarones cultivados la astaxantina incrementa la tolerancia al estrés, mejorando la respuesta inmune y estabilizando la pared celular. También puede ser una reserva intracelular de oxígeno y puede funcionar como protector intracelular al inactivar los radicales libres (Menseveta, 1993).

1.2.3 PRUEBA DE TOXICIDAD

El estado fisiológico de los organismos se puede medir a través de la sobrevivencia, la tasa de crecimiento y la tasa respiratoria entre otras (Sprague, 1971; Hughes, 1981). Una de las aplicaciones de las pruebas de toxicidad es el estudio de la determinación de los umbrales de toxicidad de algunas sustancias (Pickering, 1988). El uso de estas pruebas concentración letal media, tiempo letal medio, concentración efectiva media se remonta a algunas décadas, pero el desarrollo de la metodología actual ha permitido conseguir gran precisión y reproducción de los resultados. (USEPA, 1989).

Los crustáceos como otros organismos acuáticos están continuamente sometidos al producto de los cambios de los parámetros del ambiente (temperatura, salinidad, nivel de oxígeno, fluctuación del pH; concentración del amonio, nitritos y nitratos; y diferentes contaminantes), es por ello, que el estudio de las respuestas compensadoras a los cambios ambientales que involucra el estado fisiológico de los organismos pueden ser una medida de su capacidad de respuesta, que se observa en su sobrevivencia. Estos estados o condiciones están relacionados con la tolerancia, la resistencia y el estrés (Planas, 1993).

La tolerancia es el resultado eficaz de las medidas que adopta un organismo frente a un cambio ambiental, con las cuales asegura su funcionamiento normal y su supervivencia. La resistencia es la capacidad de soportar cambios ambientales pero con daño de las actividades vitales, y el límite está marcado por la mortalidad.

El estrés se ha definido en varias formas, en términos fisiológicos, la suma de todas las respuestas con las cuales un organismo intenta mantener o reestablecer su homeostasis. El estresor es una alteración ambiental y el estrés es la respuesta del

organismo (Wedemeyer y McLeay, 1981); Estrés también se define como el cambio fisiológico adaptativo resultado de una serie de estresores ambientales (Selye, 1956); o como una desviación de la energía metabólica que un animal dedica a sus actividades normales dirigida a procesos de compensación (Barton y Schreck, 1987). El estrés también se traduce en la alteración de una o más variables fisiológicas, al grado de que la supervivencia a largo plazo puede ser reducida (Bayne, 1985); o bien, se puede concebir como una alteración ambiental pueda provocar al prolongar o estabilizar los procesos homeostáticos más allá de sus límites normales (Esch y Hazen, 1978).

Los carotenoides, son considerados nutrientes esenciales en las dietas artificiales para los crustáceos, ya que por su actividad provitamina A, sus propiedades antioxidantes y protección celular de daños fotodinámicos intervienen en los procesos fisiológicos de muda, reproducción y maduración. Debido al gran desarrollo a nivel mundial en la acuicultura del camarón el énfasis en los aspectos nutricionales se ha incrementado y consecuentemente también es importante en conocer los efectos de la astaxantina en el metabolismo, la sobrevivencia, el crecimiento y en el incremento de su calidad como producto de consumo (Meyers, 1994).

El principal problema de los cultivos intensivos de camarón es el deterioro de la calidad del agua, especialmente en lo que se refiere al ciclo del nitrógeno (Hopkins et al. 1993). El amonio es el principal producto de excreción de los crustáceos y se presenta en solución acuosa en forma ionizada (NH_4^+) y no ionizada (NH_3) (Kinne, 1976). En el agua de mar existe un equilibrio entre la forma no ionizada (NH_3) y la forma ionizada (NH_4^+) del amonio. Este equilibrio depende de la salinidad, la temperatura y del pH. Los altos valores de estos dos parámetros favorecen el incremento de la forma

no ionizada (NH_3) (Whitfield, 1978), por ejemplo a pH 7 y 10 °C existe un 0.3 % de NH_3 , a pH 9 y 20 °C existe un 62.1 % de NH_3 (Spotte, 1970). El amonio es uno de los causales de lento crecimiento y las altas mortalidades en postlarvas de camarón. Es por ello que se estudiará el efecto que diferentes combinaciones de ácido ascórbico y astaxantina tienen en el crecimiento, la sobrevivencia y la resistencia al estrés por efecto del amonio de *L. vannamei*.

I.3 OBJETIVOS

I.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de una dieta enriquecida con diferentes concentraciones de ácido ascórbico (AA) y astaxantina (AX), sobre el crecimiento, la sobrevivencia y la resistencia al estrés por amonio en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

I.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

I.4.2.1 Elaborar y caracterizar bioquimicamente una dieta basal con los requerimientos nutricionales para juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, incluyendo seis combinaciones de ácido ascórbico y astaxantina.

I.3.2.2 Evaluar el porcentaje de sobrevivencia, crecimiento total (talla y peso) y frecuencia de muda, para los organismos alimentados con las diferentes dietas formuladas con diferentes combinaciones de ácido ascórbico y astaxantina.

I.3.2.3 Medir la resistencia de los juveniles de *Litopenaeus vannamei*, alimentados con diferentes dietas formuladas con diferentes combinaciones de ácido ascórbico y astaxantina mediante una prueba de estrés inducida por amonio.

I.4 HIPÓTESIS

Los juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* alimentándolos con niveles altos de ácido ascórbico y astaxantina tendrán mayor crecimiento, sobrevivencia y una mayor resistencia al estrés.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 ABASTECIMIENTO DE JUVENILES

Los juveniles de camarón blanco *L. vannamei* se obtuvieron del laboratorio de producción comercial de camarón Genética y Sistemas de Puerto Peñasco, Sonora "Génesis". Los juveniles se acondicionaron durante una semana en un estanque circular de 500 l, el oxígeno y la temperatura del agua se mantuvieron entre 6-7 mg l⁻¹ y 28 °C respectivamente.

II.2 FORMULACIÓN DEL ALIMENTO BASAL

La formulación de la dieta se realizó en base a los requerimientos nutricionales para juveniles de camarón (tabla I) según Kanazawa *et al.*, (1985), Akiyama (1989), Lim y Akiyama (1998), estos fueron elaboradas en el laboratorio de nutrición del departamento de acuicultura- CICESE. En la tabla II se puede observar los niveles de inclusión de vitamina "C" (ácido ascórbico) y astaxantina que fueron utilizados.

Todos los ingredientes fueron pesados en una balanza electrónica de 200 g de capacidad ± 0.01 de precisión. Los ingredientes de mayor concentración como la harina de pescado, harina de maíz, harina de trigo, semolina, harina de camarón y gluten de trigo, así como la harina de sangre se pasaron por un tamiz de 250 micras y se mezclaron en una batidora Kitchen Aid de 4 litros de capacidad. Los ingredientes menores se agregaron poco a poco a la mezcla, el aceite de pescado se adicionó previamente calentado a 25 °C. Posteriormente se agregó la vitamina "C" a 1.0 g de alginato de calcio macerado y disuelto en 250 ml de agua como microligante. Se

preparó una solución de astaxantina y vitamina “C” para cada dieta y se asperjó sobre las harinas (tabla II).

Se procedió a la fabricación de los pellets utilizando el método de extrusión húmeda en un molino marca Hobart, equipado con una placa con perforaciones de 2 mm de diámetro, , inmediatamente se colocó el alimento granulado en un secador de convección de calor durante dos horas a 45°C.

Por último el alimento elaborado se colocó en bolsas de polietileno previamente etiquetadas, en un congelador a una temperatura de -20 °C, para su uso posterior.

Para el análisis proximal de la dieta se tomó una muestra de 100 gr, el cual se realizó en el laboratorio de control de calidad de la empresa PROESA, S.A. de C.V. Para estimar el contenido de proteínas se utilizó el método Kjeldahl ($N \times 6.25$), el método de Soxhlet para extracción de grasas. El contenido de carbohidratos se estimó indirectamente, Para conocer el contenido de cenizas por calcinación se utilizó una mufla a 460°C. El contenido de humedad del alimento se midió por desecación en estufa de secación a 60°C por 24 horas y así eliminar el exceso de humedad. La energía disponible se calculó usando los factores de conversión 18.0, 35.2 y 17.2 kJg^{-1} en base seca para las proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente (Mourete y Rodriguez, 1997). El perfil de aminoácidos se analizó en el Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo, A. C., (C.I.A.D.) en Hermosillo, Sonora.

Tabla I. Ingredientes utilizados en la elaboración del alimento basal suministrado a los juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

INGREDIENTES	PORCENTAJE (%)
Harina de pescado ^a	45
Harina de maíz ^b	16
Harina de trigo ^c	15
Semolina ^d	10
Harina de camarón ^e	3.5
Aceite de pescado ^a	3
Gluten de trigo ^f	2.6
Harina de calamar ^g	1.5
Harina de sangre ^g	1.5
Caseína ^h	0.5
Alginato de calcio ⁱ	0.10
Premezcla de vit. y minerales ^j	0.22

^aPROESA, producida en Ensenada, B. C., México.

^bMAZECA, producida en México

^cBONFIL, producida en S. L. R. C., Son., México.

^dEL ROSAL, producida en Tijuana, B. C., México.

^eGRANJA DE CAMARON, LOS PAREDONES, producida en Sin., México.

^fDO-PEP, producido en Australia.

^gCICESE, producida en el laboratorio de nutrición, B.C., México.

^hSIGMA BIOCHEMICAL, producida en EE. UU.

ⁱSPECTRUM, producido en EE. UU.

^jGREEN SOURCE, producida en EE. UU.

Tabla II.-Concentraciones de vitamina C y astaxantina incluidos en la dieta basal.

Vitamina C ^a (mg kg ⁻¹)	Astaxantina ^b (mg kg ⁻¹)	
	0	1000
0	Dieta 7	
500	Dieta 1	Dieta 2
1000	Dieta 3	Dieta 4
1500	Dieta 5	Dieta 6

^aSIGMA, producida en EE. UU.

^bALEXIS, producida en EE.UU.

II.3 DISEÑO DE EXPERIMENTO

El peso inicial de los organismos fue de 0.078 ($\pm$ 0.013) gramos. Se colocaron 24 organismos/acuario (2org l⁻¹). aleatoriamente en 21 acuarios de 12 l, los organismos fueron alimentados al 10% de su peso corporal tres veces al día, durante la primer semana, 15% la segunda y finalmente *ad libitum*, es decir en cantidad suficiente como para que queden restos en cantidad mínima al día siguiente. Cada mañana en cada acuario se registraron los restos de alimento, mudas y el número de individuos. Para cada acuario, el crecimiento se determinó mediante la longitud total, donde se midieron los organismos desde la base de la escotadura post-orbital hasta el borde posterior del telson y el peso se tomó como referencia el peso húmedo, la sobrevivencia se estimó con la diferencia de sobrevivencia final menos la inicial.

Las condiciones físico-químicas del agua fueron controladas durante las 5 semanas que duró el ensayo, la temperatura del agua se mantuvo a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con ayuda

de un calentador de placa de 1000 watts, marca Sayno, con regulador electrónico independiente. Las lecturas se tomaron con un termómetro de mercurio de precisión de ± 0.1 °C. La salinidad se mantuvo a 28 ‰ y se midió con un refractómetro marca Fisher brand modelo 8601. El volumen de agua que se mantuvo en recirculación fue de 464 l con ayuda de una motobomba marca lifegard de 1 HP y una tasa de recambio diario de 300 %. El sistema de filtración, consistió de 6 unidades de cartucho de 20 μm colocados en paralelos y una lámpara U.V de 40 watts de irradiación, cada acuario mantenía un control de flujo de agua., el pH se mantuvo 8.1 el cual se determinó con un potenciómetro tipo pH-30 marca Corning con una resolución de ± 0.01

Para mantener el oxígeno disuelto en los acuarios entre 6 y 7 mg^{-1} se utilizó un sistema de abastecimiento de aire con tubería de PVC de 6.35 cm de diámetro donde se insertaron válvulas de PVC de 0.476 cm de diámetro. Se utilizaron piedras de aireación de 5.08 x 1.27 cm y se midió con un oxímetro marca YSI 52 provisto de un sensor polarográfico.

En la parte central de cada acuario se colocó un tubo de PVC de 1.27 cm para mantener el nivel de agua que se drenaba por rebosamiento. Los productos de la excreción de los organismos, se transportaron al estanque principal por medio de una manguera poliducto de 1.27 cm.

El amonio se determinó por el método de azul de indofenol descrito por Rodier (1981), que tiene como principio mantener en un medio alcalino en presencia de nitroprusiato, que actúa como catalizador, los iones amonio tratados por una solución de hipoclorito sódico y de fenol dando una coloración de azul que resulta susceptible a la

determinación colorimétrica, medida con un espectrofotómetro marca ELIPTICA 2000 a una longitud de onda de 640 nm.

II.4 SISTEMA DE CULTIVO

El área total de la unidad experimental fue de 3.87 m², la cual consistió de una bomba impulsora, filtración mecánica y esterilización con rayos U.V. (Figura 1).

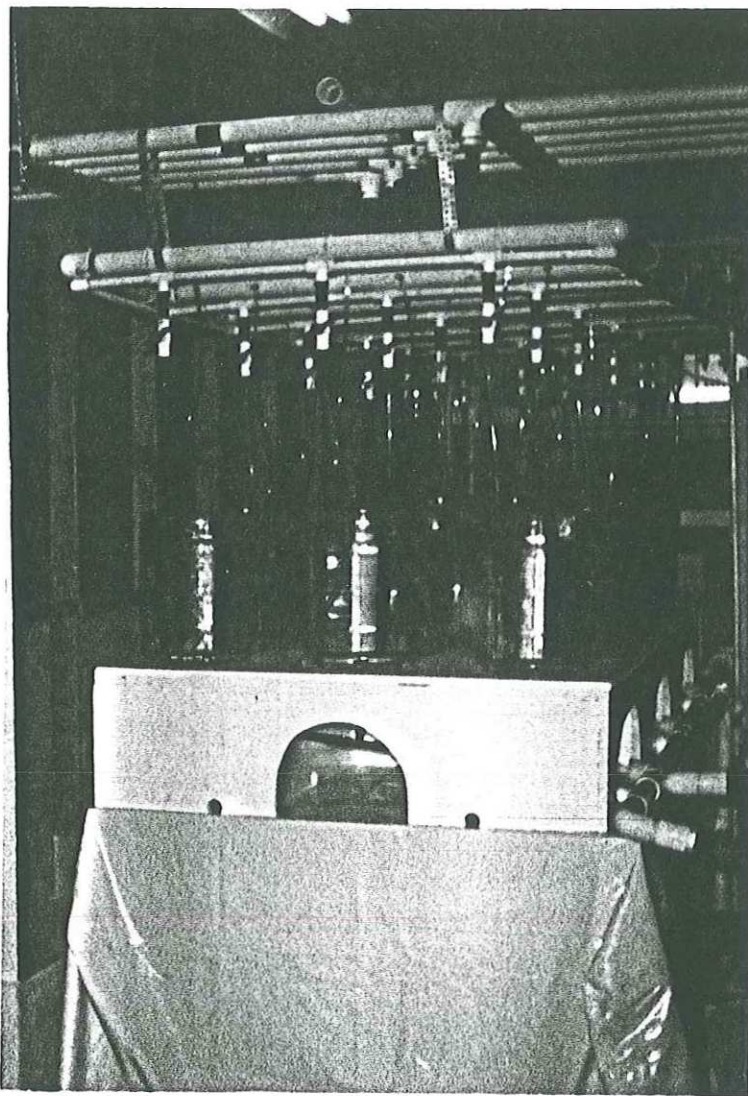


Figura 1.- Unidad experimental utilizada durante el ensayo de alimentación de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

II.5 PRUEBA DE ESTRÉS

Transcurridas 5 semanas de alimentación se colocaron 12 camarones (2 org/l) en 14 acuarios de vidrio con 6 l de agua de mar (Figura 2). Las condiciones físico – químicas del agua se mantuvieron en las mismas condiciones que en la fase de alimentación. (Salinidad 28‰, temperatura de 28 °C, oxígeno entre 6-7 mg l⁻¹ y pH 8.1). El método utilizado en esta prueba fue la exposición de los camarones a concentraciones tóxicas de amonio (15 mg l⁻¹ y 48 mg l⁻¹) y se calculó el tiempo letal medio (LT₅₀). registramos el tiempo donde se moría el 50 % de los organismos expuestos a esas concentraciones de amonio.

Se preparó una solución de NH₄Cl₂ a 5.921 ppm, agregándose a cada acuario 100 ml cada 5 minutos para que la concentración de amonio aumentara paulatinamente en cada acuario. Cada hora se midió al azar la concentración de amonio en 6 de los acuarios de los 14 con la finalidad de corroborar la concentración final del amonio. Se utilizó el método del azul de indofenol. Las lecturas fueron tomadas cada 8 horas hasta las 96 horas que duró la prueba. Cada 15 minutos se revisaban los acuarios para observar la mortalidad de los camarones, durante un período de 24 horas, posteriormente se realizó cada 2 horas.

Se efectuó un segundo ensayo para conocer la concentración letal (CL₅₀) con una concentración superior de NH₃-N de 0.084 ppm. Se mantuvo una densidad de 5 org/12 l para cada acuario, y se midió la concentración de amonio con el método de azul de indofenol, para determinar la mortalidad para cada condición experimental se estimularon los camarones con una varilla de vidrio para asegurarse de que estaban

muertos. Al inicio de la prueba se efectuaron observaciones en todos los acuarios cada 15 minutos, hasta las 24 horas que fue cuando se presentó el 100 % de mortalidad.

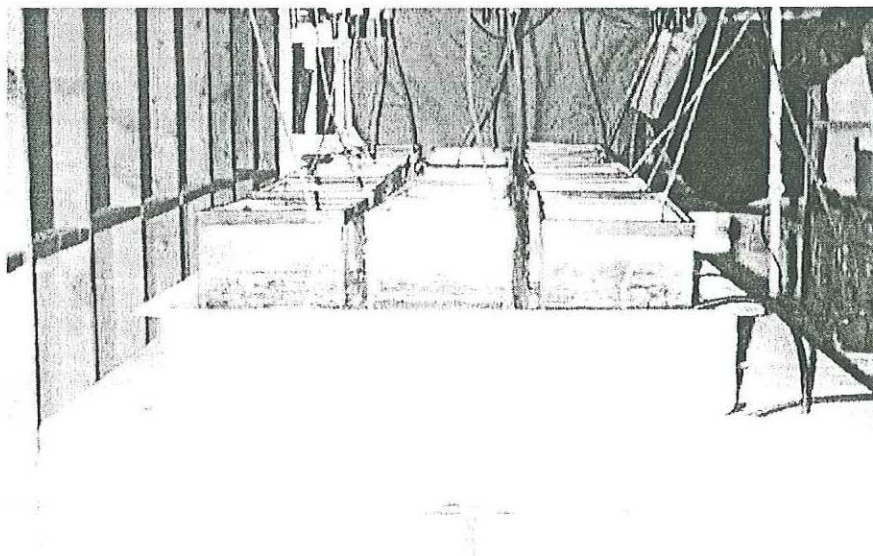


Figura 2.- Unidad experimental utilizada en la prueba de resistencia (LT_{50}) con juveniles de camarón blanco *L. vannamei*

II.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los datos de talla, peso y sobrevivencia, se les aplicaron pruebas de normalidad y homocedasticidad de varianza, al cumplir con estos requisitos se aplicó un análisis de varianzas de una vía (ANOVA), en los casos que no se cumplieron los supuestos se utilizó una prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para todos los casos, el nivel de significancia nominal fue del 5%.

Los datos de mortalidad obtenidos en las pruebas de resistencia (LT_{50-96} h) se ajustaron a un modelo matemático Spearman/LC50 IBM PC versión 1.0 .

III. RESULTADOS

III.1 FORMULACIÓN DE ALIMENTO

La dieta basal analizada presentó un valor proteico de 43.19 % , una concentración superior a la recomendada para esta especie (30 %). El contenido de lípidos fue de 8.32 % y el de carbohidratos de 35.2%. Las cenizas y la humedad fueron el 7.86 y 5 %, respectivamente (Tabla IV). La composición de aminoácidos para la dieta basal utilizada resultó similar a la reportada para otras especies de crustáceos (Tabla V).

Tabla III. - Análisis bromatológico de la dieta basal elaborada para alimentar a los juveniles del camarón blanco *L. vannamei*

COMPONENTE	(%)
Proteína (N * 6.25)	43.19
Lípidos	8.32
Carbohidratos	35.63
Humedad	5.00
Cenizas	7.86
Peso seco	95.00
Energía	4.66 kcal g ⁻¹

Tabla IV.- Composición de aminoácidos de la dieta basal elaborada para alimentar a los juveniles del camarón blanco *L. vannamei* en un 43.19 % de proteína.

Aminoácidos	g/100g proteína
Aspártico	6.80
Glutámico	16.60
Serina	3.66
Histidina	5.25
Glicina	10.95
Treonina	3.16
Arginina	9.12
Alanina	4.99
Tirosina	2.37
Metionina	3.76
Valina	9.36
Fenilalanina	7.00
Isoleucina	5.05
Leucina	7.79
Lisina	4.06
Total	99.92

III.2 PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS

Los juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se mantuvieron bajo las condiciones físicoquímicas del agua favorables para el crecimiento de esta especie, resultando similares para todos los tratamientos y sus repeticiones, no se encontraron diferencias significativas entre los valores medidos (Tabla III ($\pm$ SD)). El amonio se mantuvo en niveles recomendados para juveniles de camarón, oscilando entre 0.008 y 0.043 mg/l de $\text{NH}_3\text{-N}$ (Figura 3) .

Tabla V. Valores promedios de los parámetros del agua de mar en los cultivos de *Litopenaeus vannamei*. (desviación estándar).

PARÁMETRO	PROMEDIO
SALINIDAD (‰)	28.2 ($\pm$ 2.5)
PH	7.4 ($\pm$ 0.5)
OXÍGENO (mg/l)	6.8 ($\pm$ 0.3)
TEMPERATURA (°C)	27.5 ($\pm$ 2.2)
AMONIO ($\text{NH}_3\text{-N}$) (mg/l)	0.016($\pm$ 0.017)

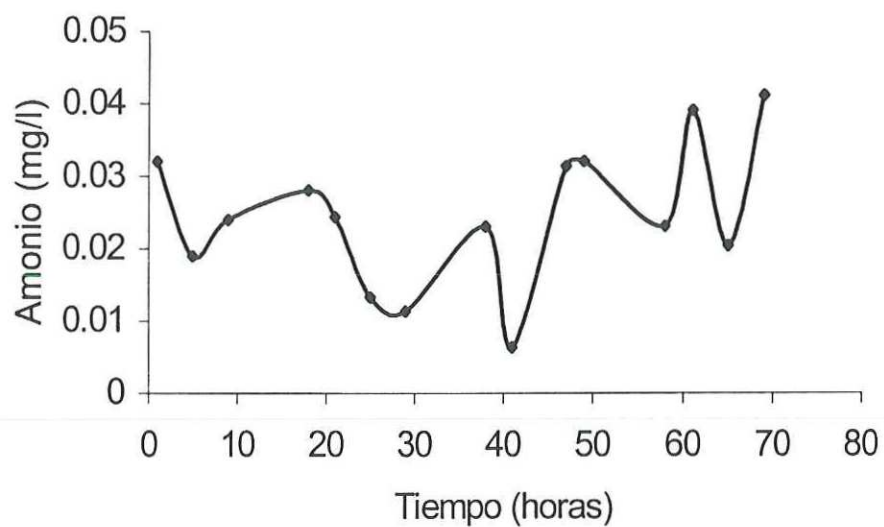
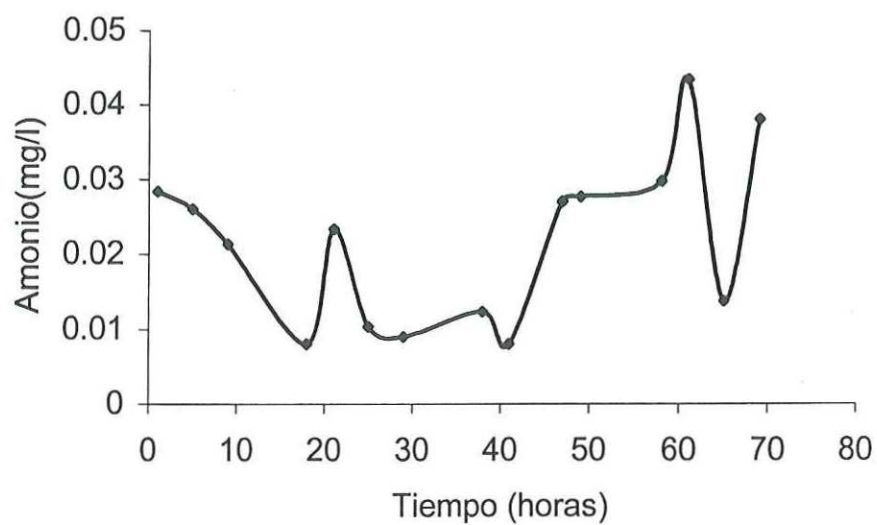


Figura 3. Concentración de amonio, durante la fase de alimentación de los juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. A) Entrada del sistema B) Salida del sistema.

III.3 EFECTO DE LAS DIETAS

En los camarones al igual que en todos los crustáceos, el proceso de crecimiento se produce de forma discontinua y cíclica debido al proceso de la muda o ecdisis. Cada vez que el organismo está preparado para aumentar de talla y peso, el exoesqueleto es liberado rápidamente y se produce una nueva capa quitinosa que se tenderá a endurecer hasta adquirir la consistencia y dureza del exoesqueleto anterior. Durante este proceso el cuerpo del camarón ha absorbido agua y la división celular se ve favorecida provocando el incremento de volumen y peso del animal.

III.3.1 CRECIMIENTO

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($P=0.493$) (tabla VI y fig 2). Sin embargo, los organismos alimentados con la dieta 1 tuvieron un crecimiento mayor (3.61 ± 0.53 cm) un incremento semanal de 0.27 ± 0.05 cm, seguidos por los que se alimentaron con la dieta 2 y 4 que presentaron una longitud final de 3.45 ± 0.51 cm y 3.53 ± 0.70 cm respectivamente, con incrementos semanales de 0.21 ± 0.01 cm y 0.23 ± 0.08 cm respectivamente. Los organismos que presentaron un crecimiento menor fueron los que se alimentaron con la dieta 3 y alcanzaron una longitud de 3.38 ± 0.48 cm y un incremento semanal de 0.22 ± 0.03 cm (tabla VII).

Tabla VI. Análisis de varianza para la longitud final de *Litopenaeus vannamei* después de un período de alimentación de 5 semanas.

ANOVA		RESUMEN DE TODOS LOS EFECTOS DE LA DIETA					
EFFECTO	GRADOS LIBERTAD	VARIANZA	ERROR GRADOS LIBERTAD	DE DE	VARIANZA DEL ERROR	F	PROB
1	6	0.073	14		.077	.947	.493

Tabla VII. Promedio del crecimiento en longitud de *Litopenaeus vannamei* alimentado con las 7 dietas experimentales durante 5 semanas.

TRATAMIENTO	LONG. INICIAL (cm)	LONG. FINAL (cm)	CRECIMIENTO SEMANAL (cm)
DIETA 1	2.24 ± 0.30	3.61 ± 0.53	0.27 ± 0.05
DIETA 2	2.41 ± 0.46	3.45 ± 0.51	0.21 ± 0.01
DIETA 3	2.30 ± 0.34	3.38 ± 0.48	0.22 ± 0.03
DIETA 4	2.37 ± 0.37	3.53 ± 0.70	0.23 ± 0.08
DIETA 5	2.37 ± 0.29	3.47 ± 0.57	0.22 ± 0.07
DIETA 6	2.34 ± 0.30	3.43 ± 0.50	0.22 ± 0.05
CONTROL	2.36 ± 0.40	3.41 ± 0.63	0.21 ± 0.05

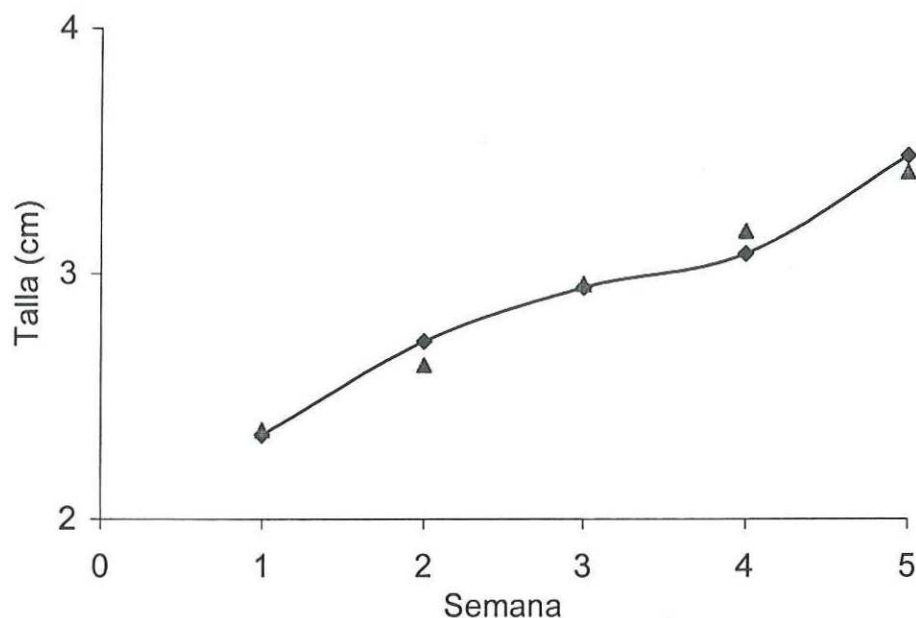


Figura 4. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei* en longitud total alimentados por las dietas experimentales y el control, durante 5 semanas.

El crecimiento expresado como el incremento en peso no fue diferente ($P=0.371$) entre los tratamientos ni comparados con la dieta control (tabla VIII y figura 3). No obstante, los organismos alimentados con la dieta 2 pesaron 0.24 ± 0.10 gr y los alimentados con la dieta 1 pesaron 0.23 ± 0.09 gr. Valores superiores a los obtenidos con la dieta control (0.020 ± 0.11 gr), Los organismos que se alimentaron con las dietas 3 y 5 (0.21 ± 0.08 gr), ganaron menos peso que el control a una tasa de 0.026 ± 0.01 gr por semana (tabla IX).

Tabla VIII Análisis de varianza para el peso final de juveniles de camarón blanco
Litopenaeus vannamei

ANOVA		RESUMEN DE TODOS LOS EFECTOS DE LA DIETA				
EFFECTO	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA	ERROR DE GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA DEL RROR	F	PROB
1	6	0.028	266	0.014	1.906	0.080

Tabla IX. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei* expresado en peso, alimentados con las 7 dietas experimentales durante 5 semanas $\pm$ desviación estándar

TRATAMIENTO	PESO INICIAL (gr)	PESO FINAL (gr)	CRECIMIENTO SEMANAL (gr)
DIETA 1	0.07 ± 0.04	0.23 ± 0.09	0.032 ± 0.01
DIETA 2	0.10 ± 0.06	0.24 ± 0.10	0.028 ± 0.01
DIETA 3	0.08 ± 0.03	0.21 ± 0.08	0.026 ± 0.01
DIETA 4	0.08 ± 0.04	0.22 ± 0.13	0.028 ± 0.02
DIETA 5	0.08 ± 0.03	0.21 ± 0.10	0.026 ± 0.01
DIETA 6	0.08 ± 0.03	0.22 ± 0.08	0.028 ± 0.01
CONTROL	0.08 ± 0.04	0.20 ± 0.11	0.024 ± 0.01

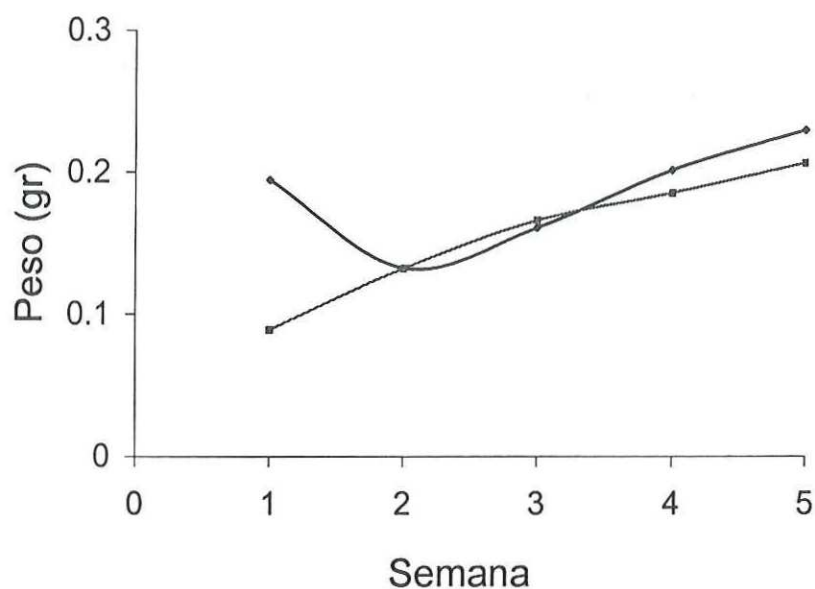


Figura 5. Crecimiento en peso total de *Litopenaeus vannamei* alimentados con las dietas experimentales y el control, durante 5 semanas.

La relación biológica de longitud y peso nos muestra que todas las condiciones experimentales presentaron un crecimiento alométrico, Por que el incremento en longitud no es proporcional al incremento en volumen. En todas las condiciones experimentales se calcularon valores inferiores a 3 para el exponente de la relación (fig. 6).

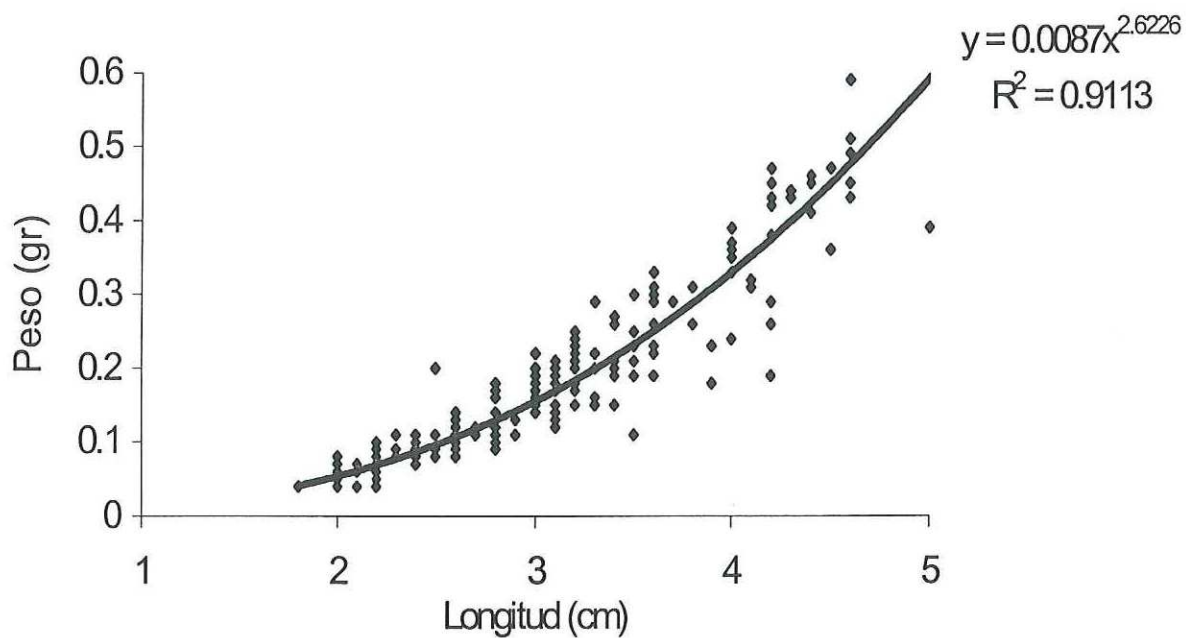


Figura 6. Relación de la longitud y el peso de los juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* alimentados con las 7 dietas experimentales, durante 5 semanas.

III.3.2 SOBREVIVENCIA

El porcentaje de sobrevivencia, es una estimación de cambio en el número de organismos por acuario en un período de tiempo (Brock, 1992). Las sobrevivencias se calcularon como el promedio de las 3 repeticiones de cada tratamiento, no se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia final para los diferentes tratamientos y el control (tabla X). Durante la primer semana del bioensayo no se registró mortalidad en ninguna de las condiciones experimentales, para la segunda semana se registró la menor sobrevivencia en los organismos alimentados con la dieta 2 (91.66 %). La mayor sobrevivencia se registró en los organismos alimentados con las dietas 1 y el control (97.08%). Durante las semanas 3 y 4 se observó la misma tendencia, pero al final del experimento se obtuvo una sobrevivencia menor para los organismos alimentados con la dieta 7 (48 %) y una mayor sobrevivencia 69.44 % (Fig. 5 y 6).menor para los organismos alimentados con la dieta control (48 %) y resultó mayor sobrevivencia con la dieta 5.

Tabla X. Análisis de varianza realizado a los datos de sobrevivencia de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

ANOVA		RESUMEN DE TODOS LOS EFECTOS DE LA DIETA				
EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA	ERROR DE GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA DEL ERROR	F	PROB
1	6	42.20	27	35.11	1.20	0.03

Tabla XI. Sobrevivencia (%) de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, alimentados con las 7 dietas experimentales, durante 5 semanas.

Dieta	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	100	97.0	90.2	86.0	59.7
2	100	94.4	77.7	75.0	59.7
3	100	94.4	77.7	77.7	60.9
4	100	94.4	75.0	70.8	59.7
5	100	94.4	88.8	86.0	69.4
6	100	91.6	77.7	75.0	63.8
7	100	97.8	90.2	86.0	48.6

III.3.3 FRECUENCIA DE MUDAS

El mayor número de mudas registrado durante el período de alimentación, fue para los organismos alimentados con la dieta 6, con un total de 13; seguidas por la dieta control con 10 mudas. Los organismos que presentaron un número menor fue los alimentados con la dieta 2, donde se registraron 2 mudas durante el transcurso del bioensayo (Figura 9).

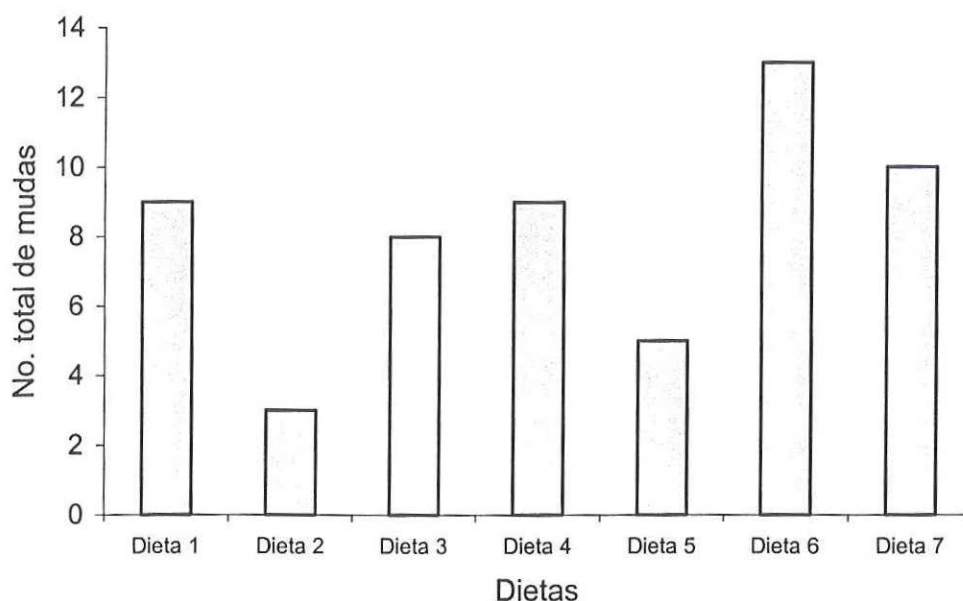


Figura 7.- Número total de mudas registradss durante el período de alimentación de *L. vannamei* con las 7 dietas.

III.4 RESISTENCIA AL ESTRÉS

Para probar las bondades de las dietas ricas en ácido ascórbico y astaxantina se realizó una prueba de resistencia, los camarones se expusieron a una concentración de amonio total de $15.50 \pm 0.782 \text{ mg l}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ (Figura 7). Después de 96 horas no se observó más del 50 % de mortalidad para los organismos alimentados con la dieta control que presentó una mortalidad (33.33 %) y el menor porcentaje (8.33) se registró en los organismos alimentados con las dietas 2 y 5. Los camarones aliementasdos con las dietas 1 y 3 con 12.49 % cada uno, (tabla XIV, figura 8). Se realizó una segunda prueba de resistencia con una concentración promedio de $48.121 \pm 3.404 \text{ mg l}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ (Figura 9). Se registró una mortalidad del 50 % en los organismos alimentados con la dieta control a las 9 h de exposición, un 33.30 % en los organismos alimentados con la

dieta 2 y un 29.99 % con los alimentados con la dieta 1, el menor porcentaje de mortalidad se presentó con los organismos alimentados con la dieta 4 de 11.10 %, a las 13 horas de exposición los que se alimentaron con la dieta 2, 5 y 6 presentaron 44.44 % de mortalidad y los alimentados con la dieta 4 presentaron menor porcentaje con 33.33 %. Los camarones alimentados con la dieta 3 presentaron el mayor porcentaje de mortalidad (66.66 %), a las 15 h comparados con los alimentados con la dieta 2 (46%). A las 24 h de exposición se encontró un 100 % de mortalidad para todos los tratamientos, para los valores de LT_{50} no se encontraron diferencias significativas para los 6 tratamientos y el control ($P=0.85$) (tabla XV).

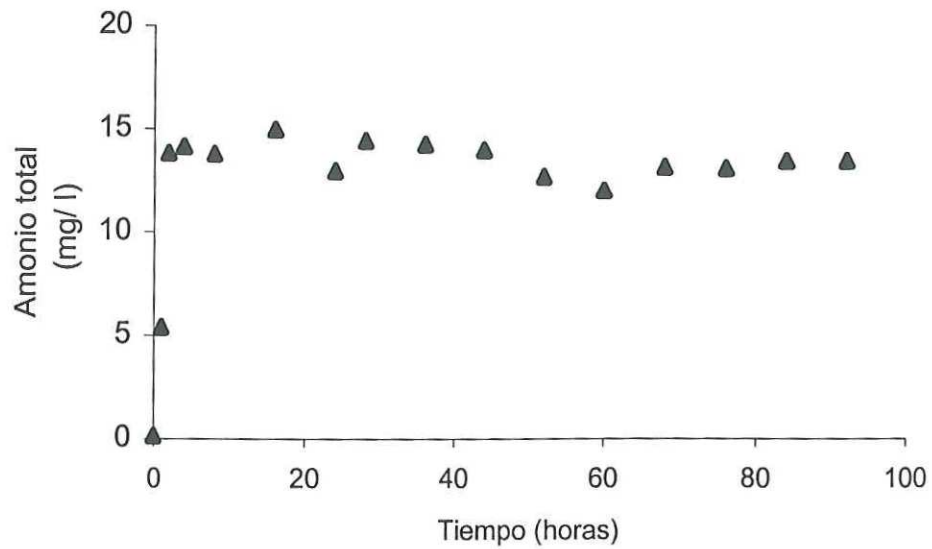


Figura 8.- Concentración de amonio total (15.50 mg/l) a la que se expusieron los juveniles de camarón blanco *L. vannamei* durante la prueba de resistencia LT₅₀-96 h.

Tabla XII.- Porcentaje de mortalidad de los juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante la prueba de resistencia LT_{50} -96 h expuestos a $15.50 \text{ mg l}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ (0.93 NH_3) para cada condición experimental (%).

TIEMPO	DIETA 1	DIETA2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5	DIETA 6	DIETA 7
16	4.1	4.1	0	0	0	8.3	16.6
24	4.1	4.1	0	0	0	12.4	16.6
32	8.3	4.1	0	0	0	12.4	16.6
40	8.3	4.1	4.1	8.3	8.3	16.6	16.6
48	8.3	4.1	4.1	8.3	8.3	16.6	16.6
56	8.3	4.1	4.1	8.3	8.3	16.6	16.6
64	8.3	4.1	4.1	8.3	8.3	16.6	16.6
72	8.3	4.1	4.1	8.3	8.3	16.6	20.8
80	8.3	8.3	4.1	8.3	8.3	29.1	25.0
88	8.3	8.3	8.3	16.6	8.3	29.1	29.1
96	12.4	8.3	12.4	16.6	8.3	29.1	33.3

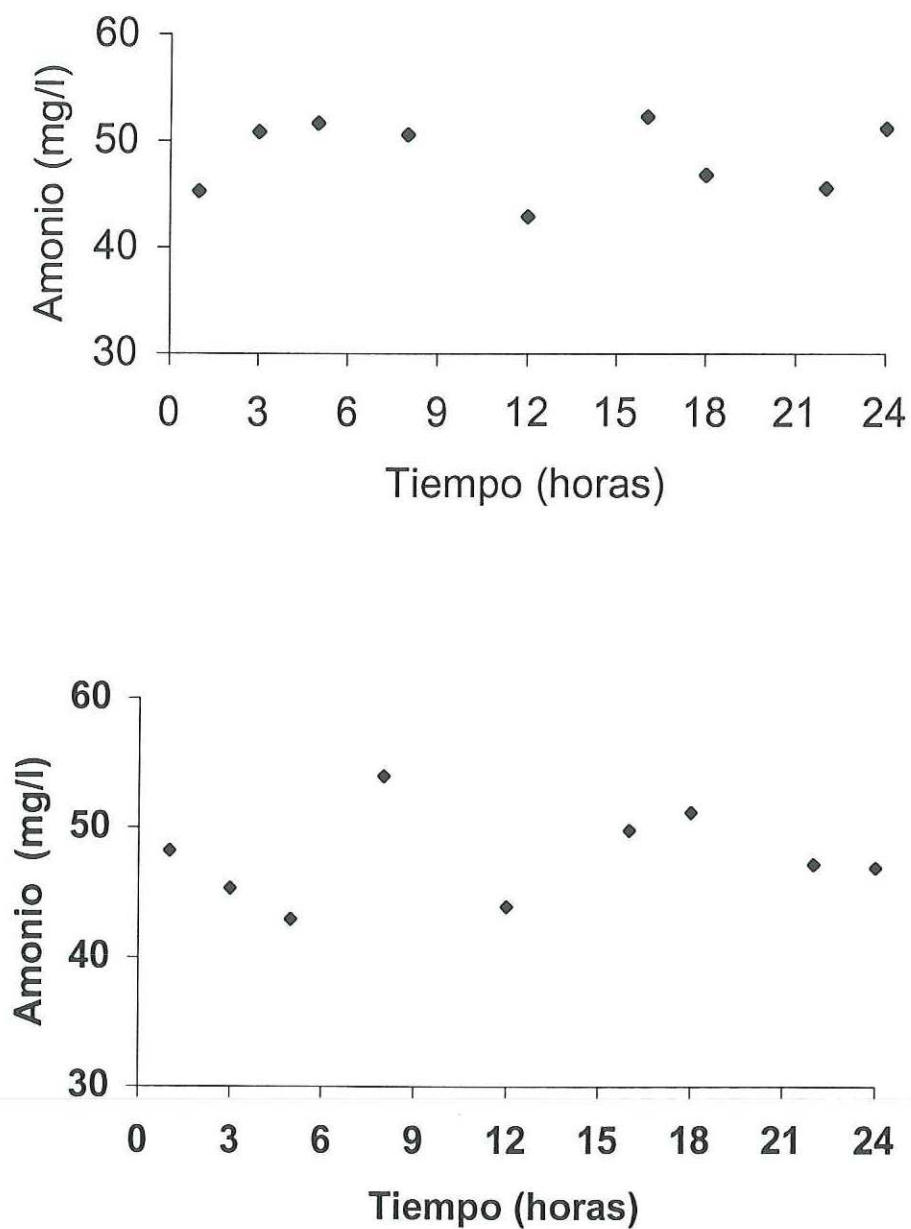


Figura 9. Concentración de amonio total (48,12 mg/l) a la que se expusieron los juveniles de camarón blanco *L. vannamei* durante la prueba de resistencia LT₅₀-96 h.

Tabla XIII. Porcentaje de mortalidad de los juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante la prueba de resistencia LT_{50-96} h expuestos a $48.121 \pm 3.404 \text{ mg l}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ para cada condición experimental (%).

TIEMPO	DIETA 1	DIETA2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5	DIETA 6	DIETA 7
0	0	0	0	0	0	0	0
2	6.6	16.6	11.1	0	0	5.5	30.0
4	12.2	22.2	16.6	5.5	0	11.1	30.0
6	24.4	27.7	16.6	5.5	5.5	22.2	30.0
9	29.9	33.3	22.2	11.1	22.2	27.7	50.0
11	35.5	33.3	27.7	22.2	33.3	38.8	50.0
13	35.5	44.4	38.8	33.3	44.4	44.4	50.0
15	58.8	46.0	66.6	49.9	61.1	55.5	60.0
20	65.5	83.3	94.4	88.8	83.3	94.4	90.0
24	100	100	100	100	100	100	100

Tabla XIV. Análisis de varianza realizado a los datos de resistencia al estrés por amonio de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

ANOVA		RESUMEN DE TODOS LOS EFECTOS DE LA DIETA				
EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA	ERROR DE GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA DEL ERROR	F	PROB
1	19	42.20	16	35.11	2.64	0.85

Tabla XV. Tiempo Letal medio (LT_{50}) obtenido de las curvas de mortalidad de *Litopenaeus vannamei* expuestos a una concentración de $48.25 \text{ mg l}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ ($2.89 \text{ mg l}^{-1} \text{ NH}_3$), alimentados con las 7 dietas experimentales durante 5 semanas.

DIETA	LT_{50}
1	10.53 ± 1.65
2	10.60 ± 2.89
3	11.17 ± 4.39
4	12.30 ± 2.81
5	11.56 ± 0.93
6	10.41 ± 2.85
7	8.03 ± 1.62

IV. DISCUSIÓN

IV.1 SISTEMA DE CULTIVO

El estudio de la nutrición de los crustáceos debe comenzar con un sistema de cultivo que no genere confusión en la respuesta al factor nutricional a investigar. Una de las decisiones principales reside en la fuente de agua usada para el cultivo ya que contaminantes como pesticidas, metales pesados, amonio y nitritos pueden causar estrés y/o disminuir el crecimiento. Es por esto que los parámetros del agua de mar se mantuvieron bajo condiciones físico-químicas controladas, para juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con una salinidad de 28.222 ± 2.538 ‰, 7.487 ± 0.557 de pH, oxígeno disuelto total de 6.855 ± 0.312 y una temperatura de 27.564 ± 2.258 °C resultando similares y favorables para el crecimiento de esta especie (Akiyama *et al.* 1991). El amonio no ionizado se mantuvo en niveles recomendados para juveniles de camarón, en el intervalos de $0.008 - 0.043$ mg l⁻¹ (Chen J.C. y Kou Y.Z., 1992), $0.006 - 0.045$ mg l⁻¹ (Treece y Fox. 1993), $0.05 - 0.1$ mg l⁻¹ (Cruz - Suárez L.E., 2000)

IV.2 ELABORACIÓN DE LAS DIETAS

Las materias primas con que se formuló la dieta basal utilizada en este estudio, son comparativas a las utilizadas por otros autores para esta y otras especies de peneidos (Akiyama *et al.*, 1993), Tacon y Akiyama 1997, Tacon 1999), así como las condiciones generales de los bioensayos nutricionales fueron satisfactorias y cumplieron con las reglas propuestos por Akiyama (1991).

Los niveles recomendados para la harina de pescado oscilan entre 10 - 45 %, cuyo límite de inclusión no es de tipo nutricional sino económico.

Diferentes autores han estudiado el efecto del nivel de proteína dietaria sobre el crecimiento y la tasa de conversión en peneidos. Recomendando niveles de proteína altos: para camarones de 0.1 a 3 gr. Tacon (1989a) recomienda 40 % de proteína, y Akiyama *et al.* (1993) niveles de 40 a 45 %. Para *L. vannamei*, Colvin y Brand (1977) proponen como óptimo 30-35 % de proteínas en dietas para postlarvas, y menos de 30 % de intermedios entre postlarvas y juvenil. Cousin *et al.* (1993) encontraron como óptimo 30 % de proteína en dietas con una relación de proteína/energía de 100 mg kcal^{-1} , es decir en dietas con menor contenido energético (3 kcal g^{-1}) en este estudio, la dieta que se utilizó en este bioensayo presentó 43.19 % de proteína y presenta un valor energético 4.66 kcal g^{-1} con una relación de proteína/energía = $92.48 \text{ kcal mg}^{-1}$, mientras que Cruz Suárez *et al.* (2000) obtuvieron una dieta de 30 % de proteína y un contenido energético de 4.2 kcal g^{-1} una relación de proteína energía de 70 mg kcal^{-1}

Aranyakaranda y Lawrence (1999) mostraron que se puede reducir el nivel de proteína hasta 15 % sin repercusión de crecimiento en comparación con el crecimiento obtenido para las dietas más ricas en proteína. En este caso, la bondad de la dieta está asociada con la fuente de proteínas de alta calidad muy palatables relativamente ricas en energía (4.3 kcal g^{-1}), característica muy similar a la encontrada en el presente estudio.

Para la elaboración de la dieta experimental se utilizó el método descrito por D'Abramo y Castell (1994), principalmente en lo que se refiere al mezclado de los ingredientes, pero en el proceso de fabricación, se tomó cuenta la posible pérdida de nutrientes termolábiles, como la vitamina "C", en este estudio se utilizó el proceso de microligado con alginato de calcio. Sin embargo, estudios realizados por Goldblatt *et*

al. (1979) advierten que el método de aglutinación con el gluten de trigo y alginato de calcio no fue eficaz para reducir la tasa de lixiviación del ácido ascórbico.

IV.3 EFECTO DE LAS DIETAS

IV.3.1 VITAMINA "C"

Akiyama D. M. *et al.* (1993) mencionan que existen 11 vitaminas hidrosolubles y 4 liposolubles que son necesarias para el camarón, entre ellas la vitamina "C" que es estructuralmente simple, soluble en agua y en alcohol etílico, pero insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Esta es un antioxidante importante pero fácilmente oxidable, es rápidamente destruida durante el peletizado y extrusión del alimento, promediando entre el 40-60 % y el 50-80 %, respectivamente.

En la elaboración de las dietas experimentales se utilizó la vitamina "C" polifosfato (R_x Stay C), forma física recomendada para procesamientos agresivos, tales como el peletizado y extrudizados que se utilizan durante el proceso de elaboración de dietas para camarón. Se reporta como relativamente estable con un 20 % de destrucción (op. cit).

Qingyn *et al.* (1995) encontraron que altas dosis de vitamina "C" en la dieta promovieron el crecimiento del camarón blanco e incrementaron su calidad física. De la misma manera Merchie *et al.* (1995), encontraron que algunas funciones biológicas y fisiológicas (crecimiento, sobrevivencia, frecuencia de muda, resistencia al estrés) se favorecen al incrementar los niveles de esta vitamina. Merchie *et al.* (1997) estimó que dietas conteniendo por arriba de 1500 mg k⁻¹ de este nutriente mejora la resistencia al estrés y a las enfermedades de los camarones peneidos.

Cuando las postlarvas camarón tigre (*P. monodon*) son alimentadas con 1700 3400 mg k⁻¹ de vitamina "C" crecen mejor (7.49 y 7.83 mg) que al alimentarlas con 100 mg k⁻¹ (6.49 mg) (Merchie *et al.* 1998). En cambio al utilizar concentraciones de 500, 1000 y 1500 mg k⁻¹ no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los juveniles del camarón blanco (*L. vannamei*) en el presente estudio (tabla VI y VII).

Es posible mejorar la sobrevivencia cuando se incorporan al alimento para postlarvas de *P. vannamei* 49 mg de ácido ascórbico por kilogramo de dieta (Merchie *et al.* 1997). Merchie *et al.* (1998) al alimentar a postlarvas de *P. monodon* con 1700 y 3400 mg k⁻¹ de vitamina "C" encontró diferencias significativas con respecto a las alimentadas con 100 mg k⁻¹ 82.2. % y 77.8 % vs 73.9 %. Medina Reyna *et al.* (2000) encontró mayor sobrevivencia de *L. vannamei* alimentados con 100 mg de ácido ascórbico, por el contrario de nuestro caso al alimentar los juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) con 500, 1000 y 1500 mg k⁻¹ no se observaron diferencias significativas (tablaVIII).

Merchie *et al.*, (1997) encontraron un efecto significante para la sensibilidad al estrés para *P. monodon* y *L. vannamei* con altos niveles de ácido ascórbico y alta resistencia a la infección con *Vibrio harveyi*. Se ha demostrado un efecto positivo en la inclusión de vitamina "C" extra en la dieta de los camarones para la resistencia al estrés salino para *P. monodon* y *vannamei* alimentando con 200 y 1500 mg de AA k⁻¹ de dieta, repectivamente. (Kontara *et al.*, 1997; Lavens *et al.*, 1998).

Merchie *et al.* (1998) encontraron diferencias significativas al alimentar larvas de *P. monodon* con 1700 mg k⁻¹ de vitamina "C" y exponerlas a estrés salino. Sin embargo, al alimentar larvas de camarón blanco *L. vannamei*, con altas concentraciones

de vitamina "C".(tabla II) y exponerlos a concentraciones de 2.89 mg l⁻¹ de amonio no ionizado, no se encontraron diferencias significativas (tabla X) al evaluar el tiempo letal medio (LT₅₀) a pesar que se obtuvo el 50 % de mortalidad en los organismos alimentados con la dieta control (exenta de vitamina "C") más pronto que con las otras dietas (9 h), mientras que los que se alimentaron con altas concentraciones de vitamina "C" alcanzaron el 50 % de mortalidad a las 15 h (tabla XV). Esto puede ser debido a que no se incrementó significativamente la incorporación de la vitamina "C" en el cuerpo de los organismos o posiblemente a la pérdida de este compuesto en el proceso de la elaboración de la dieta.

IV.3.2 ASTAXANTINA

El alimento comercial puede ser un nutriente que estimule el buen crecimiento y alta frecuencia de muda al ser aplicarse en los sistemas de cultivo (Tacon, 1999) siendo necesario añadir astaxantina en la formulación de los mismos, ya que los crustáceos son incapaces de sintetizar estos pigmentos, por lo que dependen exclusivamente de los obtenidos durante la ingestión que se originan del almacenamiento selecto o indiscriminado de los carotenoides dietéticos o de sus modificaciones metabólicas (Dall *et al.* 1995). En la elaboración de la dieta basal, para este experimento se utilizó harina de cabeza de camarón, incluyendo cantidades importantes de carotenoides, sin embargo, debido a su procesamiento y a su disponibilidad en forma libre, son bajos o ausentes, careciendo en su mayor parte de estos antioxidantes. (Simpson *et al.* 1981) .

Dall *et al.*, (1995) sugieren que la conversión de β -carotenos a astaxantina ocurre rápidamente después de la ingestión. Yepiz (1999) encontró que los alimentos de 50 mg de β -carotenos y 100 mg, contenían 500 y 1000 ppm de β -carotenos, respectivamente,

no reportando pérdidas de este compuesto, pero menciona que en condiciones de procesamiento industrial si ocurren pérdidas por los volúmenes que se manejan.

Varios trabajos como los citados por Chen y Jeng (1992), Cortés (1993), Menasveta *et al.*, (1993), Negre Sedargue *et al.*, (1993), favorecen la inclusión de astaxantina directamente en las dietas, bajo el supuesto de mayor eficiencia de asimilación, así mismo Menasveta *et al.*, (1994) asegura que los camarones pueden convertir los carotenoides a astaxantina, pero la suplementación directa asegura una absorción efectiva de la dieta y depósito en los tejidos, bajo este supuesto, la inclusión de la astaxantina en nuestras dietas experimentales se realizó directamente.

Chen Y. y Jeng S.C. (1992). Indica que carotenoides en las dietas no influye en el crecimiento de *P. japonicus*, así como Mc Kay (1987) para *H. americanus* no encontró efecto significativo al alimentarlas con dietas suplementadas con astaxantina.

Arango (1993) reportó un incremento en crecimiento de *P. vannamei* alimentados con 50 mg k^{-1} , así mismo, Arango (1993), Arango *et al* (1994), Arango *et al* (1995) y Pedraza *et al* (1996) ratificaron los beneficios productivos de la astaxantina en *P. vannamei*.

Arango *et al* (1994) en condiciones semintensivas con densidad de 24.4 camarones/ m^2 alimentando con 50 mg de astaxantina no encontraron diferencias significativas para los índices productivos (peso final, crecimiento semanal, conversión alimenticia y sobrevivencia).

Menasveta (1994) encontró que el crecimiento de camarón tigre *P. monodon* alimentados con 50 y 75 mg k^{-1} de astaxantina fue significativamente diferente a los

alimentados con la dieta control (sin astaxantina). Del mismo modo, encontró que a altas concentraciones de astaxantina se observa un mayor porcentaje de muda.

Thongrod *et al.* (1995), observaron que el crecimiento y la sobrevivencia de postlarvas de *P. monodon* incrementaron de acuerdo al aumento de astaxantina a niveles de suplementación de 60 y 300 mg k⁻¹, respectivamente.

En el presente experimento al alimentar juveniles de camarón blanco *L. vannamei* con concentraciones de astaxantina de 250 y 1000 mg k⁻¹ (tabla II) no se obtuvieron diferencias significativas en crecimiento (tabla VII)

Yamada *et al* (1990) encontraron una mejor sobrevivencia cuando se alimentaron camarones *P. monodon* con 50 mg k⁻¹ de astaxantina (90%) comparadas con la dieta control (57%). Chien y Jeng (1992) reportaron un incremento en la sobrevivencia superior al 30 % y un mejor crecimiento de *P. japonicus* suplementados con 50 mg k⁻¹ de astaxantina.

Kurmaly *et al* (1993, 1994, 1995) evaluaron y confirmaron los beneficios de la astaxantina en producción de camarones en Asia. La inclusión de astaxantina 50 mg k en alimento para camarones de *P. monodon*, mejoró significativamente la sobrevivencia, de un 9% a un 25 %.

Thongrod *et al* (1995) reportaron diferencias significativas en sobrevivencia de postlarvas de *P. monodon* al alimentarlas con concentraciones de 0, 5, 15 ,60 y 300 mg k⁻¹ de astaxantina. Petit H. *et al.* (1997) encontraron que alimentando a juveniles de *P.japonicus* con 60 mg k⁻¹ de astaxantina no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de crecimiento.

Merchie *et al* (1998) reportó una mayor sobrevivencia y resistencia al estrés salino de postlarvas de *P. monodon* alimentadas con suplemento de estos dos compuestos, sin embargo, los resultados de este experimento, al alimentar juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) con altas concentraciones de astaxantina (250 y 1000 mg k^{-1}) no se encontraron diferencias significativas respecto a la sobrevivencia (tabla VIII). Ya que la modificación y absorción de la astaxantina está muy relacionada con la duración del experimento y depende del grado de evolución del organismo teniendo una relación directa con el efecto en su crecimiento y sobrevivencia (Negre-Sardagues *et al.* 1993).

Se han realizado estudios para demostrar que la combinación de la vitamina "C" y astaxantina en la respuesta inmune es favorable, Kontara *et al.*, (1997). Merchie *et al.*, (1998) reportaron resistencia al estrés para camarón blanco incrementando la astaxantina en la dieta y en el cuerpo del camarón suplementos de 1700 mg k^{-1} .

Merchie *et al.*, (1998) reportaron ganancia en peso de *P. monodon* mayores para los organismos alimentados con dietas suplementadas con 230 mg k^{-1} y 810 mg k^{-1} astaxantina en combinación con 3400 mg k^{-1} de ácido ascórbico y no encontraron diferencias significativas entre las combinaciones de 810 mg K^{-1} de astaxantina con 230, 1700 y 3400 mg k^{-1} de ácido ascórbico, pero si diferencia significativa con la combinación de 230 mg k^{-1} de astaxantina con 100 mg k^{-1} de ácido ascórbico. Así mismo encontraron diferencias significativas para el porcentaje de sobrevivencia en la combinación de 810 mg k^{-1} de astaxantina con 1700 mg k^{-1} de ácido ascórbico, diferente a 230 mg k^{-1} de astaxantina con 100 mg k^{-1} de ácido ascórbico.

Existen pocos estudios referentes a la acción de los carotenoides sobre el ciclo de muda en crustáceos. Petit *et al* (1997) encontró que postlarvas de *P. japonicus* alimentadas con dietas suplementadas con astaxantina redujeron su ciclo de muda. Gilgan M. W. (1980) encontró evidencias de que elevadas concentraciones de astaxantina presentan interacciones metabólicas que permiten elevar las concentraciones de ecdysteroides y como consecuencias se reducen el ciclo de la muda, en el presente estudio no se observó diferencias en el registro de número de mudas, entre los organismos que se alimentaron con astaxantina y exenta de ella (tabla XII).

IV.3.3 PRUEBA DE TOXICIDAD (LT_{50})

En revisiones realizadas sobre la estandarización de dietas en estudios toxicológicos con peces y crustáceos, Bengtson *et al* (1985), anotaron que las diferencias de nutrición pueden resultar en diferencias de hasta 5 veces en el tiempo letal medio de algunos tóxicos.

La pérdida de equilibrio es una respuesta dependiente del sistema nervioso (Prosser, 1991) y el amonio es un compuesto neurotóxico que causa fallas neurotransmisoras (Meijer *et al.*, 1990), estos compuestos pueden interferir con la función nerviosa normal, puede ser posible que el efecto neurotóxico, pueda causar desorden relacionado con el nado errático y pérdida del equilibrio. Efecto observado en el transcurso del experimento.

Kurmaly y Guo (1995) evaluaron el efecto de diferentes tipos de estrés (altas concentraciones de amonio, bajo oxígeno disuelto y bajas temperaturas) en la movilización de astaxantina en el cuerpo de camarones *P. monodon*. Los autores reportaron una disminución significativa, en el depósito de astaxantina en el cuerpo,

hepatopáncreas y ojo de camarones, después de someterlos a estrés por bajas temperaturas y bajas concentraciones de oxígeno disuelto, no encontraron diferencias significativas en el estrés por altas concentraciones de amonio.

Wickins (1976) reportó como tiempo letal medio (LT_{50}) promedio a una concentración de 1.29 mg l^{-1} de amonio no ionizado ($\text{NH}_3\text{-N}$) de 48 h. así como también encontró que para varias especies de peneidos (*P. Aztecus*, *japonicus*, *occidentalis*, *orientalis* y *setiferus*) expuestos a una concentración de 1.44 mg l^{-1} es de 48 h.

Los juveniles de 0.21 gr (peso húmedo) de camarón blanco *L. vannamei* expuestos a 0.93 mg l^{-1} , en el presente experimento no mostraron un 50 % de mortalidad. Al exponerlos a una concentración de 2.89 mg l^{-1} de ($\text{NH}_3\text{-N}$) mostraron un LT_{50} de 9 h para los organismos alimentados con la dieta control (exentos de astaxantina y vitamina "C") seguidos por los organismos alimentados con la combinación de 1000 gr de vitamina "C" y 250 gr de astaxantina, en general los organismos que se alimentaron con bajas dosis de astaxantina presentaron menor resistencia al estrés, mientras que los organismos alimentados con dosis de altas de vitamina "C" y astaxantina presentaron un LT_{50} de 15 h. Mientras que Colt y Armstrong (1981) reportaron un LT_{50} de 96 h para una concentración que oscila entre 0.40 a 2.31 mg l^{-1} de ($\text{NH}_3\text{-N}$) para *L. vannamei*. Por otro lado, Frías E. (1999) reporta que organismos de 0.99 gr de la misma especie mostró un LT_{50} de 120 h a una concentración de 3.6 mg l^{-1} de ($\text{NH}_3\text{-N}$), esto tal vez se deba a que los organismos más grandes son menos sensibles a tóxicos (Buikema *et al.*, 1982, Allan *et al.*, 1990, Chen *et al.*, 1990).

Frías E. (2000) reportó que al exponer a postlarvas de camarón blanco *L. vannamei* de 9.25 mg a una concentración de 0.30 mg l^{-1} de ($\text{NH}_3\text{-N}$), no se registró una

mortalidad del 50 % al exponerlas durante 96 h, presentando los mismos resultados de este experimento ya que al exponer los organismos de 210 mg a una concentración de 0.93 mg l^{-1} de $(\text{NH}_3\text{-N})$ durante 96 h., no se registró mortalidad del 50 %.

Es importante para los acuicultores estimar los tiempos letales medios en los que los organismos, presenten mortalidades que rebasen el 50 %, ya que su producción está íntimamente relacionado con los productos amoniacales (Fría E., 1999)

V. CONCLUSIONES

- ◆ La incorporación de ácido ascórbico y astaxantina, influyeron positivamente en el crecimiento (longitud y peso) del camarón blanco *L. vannamei*.
- ◆ La sobrevivencia del camarón blanco *L. vannamei* resultó menor en la dieta que no se incluyó ácido ascórbico y astaxantina.
- ◆ El ácido ascórbico y astaxantina no interfieren en la frecuencia de muda de *L. vannamei*.
- ◆ La resistencia del camarón blanco *L. vannamei* expuestos al amonio resultó mejor para los organismos que se alimentaron con altas dosis de ácido ascórbico.
- ◆ Se detectó que el incluir astaxantina en las dietas influye positivamente en la resistencia del camarón blanco *L. vannamei* expuestos a amonio.
- ◆ Se observó un LT_{50} menor para los organismos que se alimentaron con la dieta control (sin vitamina "C" y astaxantina).

LITERATURA CITADA

- Alcaraz G. 1999. "Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. Journal of the world aquaculture society. Vol. 30 (1):90-96.
- Allan G. L., Maguire G. B., Hopkins S. J. 1990. "Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved - oxygen levels. Aquaculture 91:265-280.
- Akiyama, D.M; Dominy, W. G; A. L. Lawrence. 1989. "Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry". American Soybean Association MCP 15/1/89 vol. 3 AQ 18 1989/7/8 50 p.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G. y Lawrence A.L. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: Revised. American Soybean Association. 80-98 p.
- Akiyama, D. M., G. Dominy y A. L. Lawrence. 1993. "Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales". pp 43-79 en L.E. Cruz S., D. Ricque M. y R. Mendoza A. (Eds). Memorias del primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Arango G., J.I. 1993. Evaluación comercial del uso de Astaxantina en alimento para camarones (*Litopenaeus vannamei*). Primer Seminario Internacional Roche de Acuicultura. Proyecto Carophyll pink en camarones. Propellets-Promarisco-Aquanova-Ecuaroche. San Antonio, Provincia de Guayas, Guayaquil, Ecuador. Por publicar.
- Arango G. J.I., Mora O. y Zuñiga A. 1994. "Evaluación del uso de Astaxantina (Carophyll Pink 8% en la alimentación de camarones, *Litopenaeus vannamei*".

Primer Seminario internacional Roche de Acuicultura. Proyecto Carophyll Pink en camarones. Alimetsa-Camaronera Deli-Roche. Guayaquil, Ecuador. Por publicar.

Arango G., Jose Ignacio., Mora O., y Zuñiga A. 1995. Evaluación de niveles crecientes de astaxantina (0,50,100, 150 ppm) en dietas para camarones, *P. vannamei*. Primer Seminario Internacional Roche de acuicultura, Proyecto Carophyll Pink en camarones. Alimento-Camaronera Deli-roche Ecuador. Isla Puna. Ecuador. Por publicar.

Aranyakananda, P., Lawrence, A.L., 1999. Efectos de la tasa de ingestión sobre los requerimientos alimenticios en proteína y energía y la relación óptima de proteína-energía para *P. vannamei*. In: Mendoza-Alfaro R., Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie D. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola II. Memorias del Segundo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, Monterrey, N.L., 7-10 Noviembre de 1994 (reimpresión). Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, México, ISBN # 968-7808-61-6, 157-170.

Aquacop, 1992." Review of ten year of Sandifer, P. A., J. S. Hopkins y A. P. Stokes. 1986. "The potencial for intensive culture of *Penaeus vannamei* in South Carolina". Presentado en 17 reunión de la World Aquaculture Society. Reno E. U. Enero 19-23 p.

Barton, B. A. y C. B. Schreck. 1987. " Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead. Trans. Am. Fish. Soc. 116:257-263.

Bayne, B. L. 1985. "Responses to environmental stress: tolerance, resistance and adaptation" pp. 331-349

- Bengtson, D. A. 1993. "A comprehensive program for the evaluation of artificial diets". J. World Aquaculture. Soc. 24(2):285-293.
- Brock, J. 1992. "Current diagnostic methods for agents and diseases of farmed marine shrimp". In: Fulks, W. and K.L. Main (Eds) Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States . The Oceanic Institute , Honolulu, Hawaii. pp. 209-231.
- Buikema A.L. niederlehner R. Cairns J. 1982. Biological monitoring Part IV. Toxicity testing. Water Res 16:239-262.
- Chen, J.C., P.C. Liu y Y. T. Lin. 1988. "Super intensive culture of red tailed shrimp *Penaeus penicillatus*". J of the World Aquaculture Society 19(3): 127-131.
- Chen J. C., P.C Liu., S. C Lei.1990. "toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. Aquaculture 89:127-137.
- Chen, J. C., S. H. Lai. 1992. "Oxygen consumption and ammonia -N excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia .Comparative Biochemistry and Physiology 102:C (!):129-133.
- Chen, J.C. y Y. Z Kou., 1992. "Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles".Aquaculture 104: 249-260.
- Chen , J. C. y S. Y. Cheng. 1993. " Haemolymph osmolality, acid-base balance and shift of ammonotelic to uretelic excretory pattern of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. Compartaive Biochemistry and Physiology 106 C(3):733-737.
- Chen Y. H. and Jeng S. C. 1992. "Pigmentation of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes" Aquaculture 102:333-346.

- Chen J.C. y Y.Z. Kuo. 1993. Accumulation of ammonia in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 109: 177-185.
- Chen J.C. y J. N. Lin. 1991. Lethal doses of ammonia on *Penaeus japonicus* larvae. *Bulletin of the Institute of Zoology. Academy Sinica* 30(4):289-297.
- Chin T. S., y Chen J. C. 1987. "Acute toxicity of ammonia to larvae *Penaeus setiferus*. *Aquaculture*, 66:247-253.
- Chew, B.P. 1995. Antioxidant vitamins effect food animal immunity and health. *Journal of nutrition*. 125, 1804S-1808S.
- Cho, C. Y; C. B. Cowey y T. Watanabe. 1985. *Finfish Nutrition in Asia. Methodological Approaches to Research and Development Nutrition and Feeding in Fish*. Ottawa, Canada, International Development Research Centre. 151 p.
- Colt J.E. y Armstrong D. A. 1981. "Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. *Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture Section of the American Fisheries Society (FCS Publ.1:34-47)*.
- Colvin y Brand, 1977. The protein requeriment of peneid shrimp at various life cycle stages in controlled enviroment systems. *J. World Mariculture. Soc.* 8:21.
- Cortés C., R. 1993. "Vitaminas en la nutrición del camarón. pp 101-106 en L.E. Cruz S., D. Ricque M. y R. Mendoza A. (Eds). *Memorias del primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Cousin, M., G. Cuzon, E. Blanchet, F. Ruelle and AQUACOP. 1993. Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ratio for *P. vannamei* juveniles. Pages 599 – 606.

Cruz-Suárez , L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., 2000.

Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. . In: Cruz - Suárez, .E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R.,(Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000.Mérida, Yucatán.1

D'Abramo, L. R. y D. E. Conklin. 1995. New developments in the understanding of the nutrition of penaeid and caridean species of shrimp. Pags. 95-107 en C.L. Browdy y J. S. Hopkins (Eds).Swimminf trough troubled water proceedings of the special session on shrimp farming. The World Aquaculture Society, san Diego, California, USA.

D'Abramo, L.R. y Castell, J.D. 1994. Metodología para la investigación nutricional. En: "Memorias del Segundo Simp. Intern. De Nutric. Y Tecnol. Del alimento para Acuicultura". UANL. Pp 103-121.

Dall, W., smith, d.M. and Moore, L.E. 1995. Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation. Mar. Biol., 123:435-441.

Emberson, G. R. y M. S. K. Lyum. 1986. "Intensive pond culture of *Penaeus vannamei* in Hawai". En: Memorias del primer congreso inter americano de Acuicultura. Brazil. Septiembre 14-21.

Esch, G. W. Y T.C. Hazen. 1978. " Thermal ecology and stress: a case history for red-sore disease in large mouth bass. DOE (U.S. Department of Energy) Symposium Series 48: 331-362.

FAO. 2000. Yearbook of Fishery Statistics 1998. Vol 86/2. Aquaculture production. FAO Statistics Series No. 154 and Fisheries Series No. 56, Rome, FAO. 182 p.

-
- Frías E. M. G., Harfush- Meléndez M., Osuna L. J. ,Pérez O. 1999. "Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *P. vannamei* Boone. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62:646-652.
- Genovive, N. S. , Castillo R., Petit H., Sance S., Gómez M., Milicua J. C., Choubert G., Trilles J. 1993. "Utilization of synthetic carotenoids by the prawn *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions". Aquaculture. Vol. 110:151-159
- Gilgan, M. W. 1980. The inhibition of normal molting in the adult male lobster (*H. americanus*) by ecdysteroid treatment. Com. Biochem. Physiol. 65:207-209.
- Halver. J. E. 1988. Fish Nutrition. San Diego California USA. 798 p.
- Hen, H., Lawrence A. L. 1993. "Vitamin C requeriment of the shrimp *Penaeus vannamei*". Aquaculture, Vol. 114:305-316.
- Hopkins, J.S., Hamilton, II R.D., Sandifer, P.A., Browdy, C.L., Stokes, A.D., 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. J. World Aquacult. Soc. 24, 304–320.
- Kanazawa, A.; Teshima, S.; Sakamoto, M. 1985. "Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae". Aquaculture, 50: 39-49.
- Kine O. 19976. Cultivation of marine organism: water quality management and technology. In: Marine Ecology. Vol. III. Part 1 (ed by O. Kinner). Pp. 79-300. Wiley-Interscience, New York.

- Kitabayashi K., Shudo K., Nakamura K., and Tshikawa S. 1971. Studies on formula feed for kuruma prawn. On the utilization value of glucose. Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory 65: 109-118.
- Kontara E. K., Meerchie G., Lavens P., Robles R., Nelis H., De Leenheer A. y Sorgeloos P. 1997) Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *P. vannamei* through supplementation of l-ascorbyl-2- polyphosphate in the diet. Aquaculture International 5, 127-136.
- Kurmaly K.P.; Menasveta; S. Piyatiratitivorakul; M. Gadiant y E. Schai. 1993. Advances in vitamin nutrition for aquatic species stability, leaching and bioavailability of ascorbic acid. Feed production tomorrow II., Bangkok-Thailand. 25-27 p.
- Kurmaly K., and Latscha T. 1993. Health and nutrition complete with astaxanthin Part I. Physiological functions. Aquaculture News 1(1):3.
- Kurmaly K. 1994. Commercial trials result with Carophyll Pink (Astaxanthin) fed to *Penaeus monodon* in Chantaburi, Thailand. Aquaculture News, 3(1):1.
- Kurmaly K. 1995. Astaxanthin: Principal aspects in use of astaxanthin in shrimp nutrition. In: Vitamin C y Astaxanthin en la nutrición de camarones. 23 de marzo de 1995, salón los Candelabros, Hotel Continental. Guayaquil, Ecuador.
- Kurmaly K., y Guo F.C. 1995. " Effect of environmental stressors; High ammonia, low dissolved oxygen, low salinity, high salinity and low temperature shock on vitamin "C" and astaxanthin content of shrimp tissues. Roche Aquaculture Centre Far East (RACFE). Rovithai Ltd.

- Latscha T. 1989. "The role of astaxanthin in shrimp pigmentation". Advances in tropical Aquaculture. Acuacop. IFREMER. Actes de Colleeue. Vol. 9:319-325
- Latscha T. 1991. "Crustacean pigments". Crustacean Nutrition Newsletter. Vol. 7(1):53-60.
- Latscha T. 1991A. "Carotenoids in aquatic animal nutrition"Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. D. M. Akiyama and R. K. H. Tan Eds. American soybean Association. 68-79 p.
- Lavens P. , Merchie G., Ramos X., Leon H. K., Van Hauwaert., Pedrazzoli A., Nelis H. y De Leenheer A.1998. Suplementation of ascorbic acid 2- phosphate during the early postlarval stage of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition, in press.
- Lim, C. and D. M. Akiyama. 1998. "Nutrients requirements of penaeidae shrimp". Tropical Aquaculture Research Unit, Hawaii. American Soybean Association. 60-72 p.p.
- Lin H., P. Thuet J. P. trilles, R. Mounet-Guillaume y g. charmantier. 1993. "Effects of ammonia on survival and psmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. Marine Biology 117: 591-598.
- Lovell, R. T. 1987. Requerimientos Vitamínicos de los peces, 245-279 p. En Nutrición en acuicultura II, Espinosa y Labarta (Eds). CAICYT. Madrid. 318 p.
- Mc Kay. C. 1987. The effectiveness of a dietary supplement of astaxanthin in relation to the pigmentation ang growth of the american lobster *Homarus americanus*. BSc Honors degree, Dalhousie University, Biology Department, Halifax.

- Medina-Reyna C.; Chavéz-Sánchez, C.; Martínez-Palacios, R.; Pedroza-Islas, R.; Acosta Ruiz, M.; and Zc. Gy. Papp. 2000a. Supplemental levels of ascorbyl 2 - polyphosphate (APP) for the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae fed with a partial replacement of algae and artificial diet. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera- Cerecedo, R. , (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Meijer, A. J., Lamers W. H., Cammuleau, F. M. 1990. "Nitrogen metabolism and ornithine cycle function . *Physiol. Rev.* 70 (3), 701-748.
- Merchie, G., P. Lavens, J. Radull, H. Nelis, A. De-Leenheer y P. Sorgeloos. 1995. "Evaluation of vitamin C-enriched *Artemia* nauplii for larvae of the giant freshwater prawn". *Aquaculture International* Vol. 3:355-363.
- Merchie, G., P. Lavens, J. Radull, H. Nelis, A. De-Leenheer y P. Sorgeloos. 1997. "Evaluation of vitamin "C" for larvae de *P. monodon* y *P. vannamei* ". *Aquaculture International* . vol. 26:394-410.
- Merchie, G., Kontara E., Lavens P., Robles R., Kurmaly K. & Sorgeloos P. 1998. "Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Peneaeus monodon* (Fabricius)". *Aquaculture*. Vol. 29:579-585.
- Menasveta P. 1993. Biological benefits of carotenoids: astaxanthin. Feed production tomorrow. II: Animal nutrition victam international. Bangkok, Thailand, 18 p.

-
- Menasveta. P. J. Choosuwan, I. Butler, W. Schierle and T. Latscha .1994. Effect of Dietary Astaxanthin and Canthaxanthin on the pigmentation of Giant tiger Prawn , (*Penaeus monodon fabricius*) The third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Meyers, S. P. 1994. "Developments in world aquaculture, feed formulations and role of carotenoids. Pure. Appl. Chem. 66(5): 1069-1076.
- Negre-Sadargues, G., Castillo, R., Petit, H., Sancé, S., Gomez Martínez, R., Milicua, J-C. G., Choubert, G. and Trilles, J-P., 1993. Utilization of synthetic carotenoids by prawns *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions. *Aquaculture*, 110: 151-159.
- Ocean Garden Inc. 1993. "Comportamiento del mercado del camarón. Boletín. Año 10 No. 58 San Diego, California, E. U.
- Orbe, M. a. y A. Arias. 1987. "Métodos de cultivo del camarón en México". Secretaría de Pesca. México. 28 pp.
- Ostrensky, A., Marchiori, M. A. y Poersh, L.H. 1992. " Toxicidade aguda da amonia no processo produtivo de pos larvas de *Penaeus paulensis*. An acad. Bras. Ceinc., 64:383-389.
- Ostrensky A. y Wasielesky W. 1995. "Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Sao Paulo shrimp, *P. paulensis* Perez Farfante, *Aquaculture* 132: 339-347.
- Petit H., Negre-Sadargues G., Castillo R., and Jean- Paul Trilles. 1997." The effect of dietary astaxanthin on growth and moulting cycle of postlarval stages of the prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda)". Elsevier Science Inc. Vol. 117 A, No. 4, pp 539-544.

- Pedraza., L., J. C., Rey H. y Arango G. J>I>1996. "Efecto de la astaxantina en la producción de camarones, *P. vannamei*, a dos densidades de siembra". In. Proyecto Carophyll Pink en camarones. Océanos- Productos Roche Colombia-Roche Ecuador, Cartagena Colombia.
- Planas, M. J. 1993. "El estrés en los peces. Pp. 563-573. In F. Castelló-Orvay, Coord. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Universidad de Barcelona.
- Prosser, C. L. 1991. "Oxygen: respiration and metabolism. In: Prosser C. L. (Ed.), Comparative Animal Physiology. Wiley-Liss, New York, pp 109-165.
- Qingyn, W., Y. Conghai y Y. Jia. 1995. "The shrimp farming industry in China: Past development, present status and perspectives on the future P. 1-12 en C.L. Browdy y J. S Reyes, Quintero, T. y J. Reyes Moreno. 1996. "Esquemas de financiamiento y apoyo a la camaronicultura en México. Memorias de Camaronicultura '96, Foro Internacional", Mazatlán, Sinaloa, México, 1-3 Agosto. pp 1-10.
- Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar. Omega. Barcelona. 138-140.
- Rodríguez, R., Ruiz B., Sánchez S. 1998. "Los carotenoides en la salud". Instituto de Investigaciones Biomédicas (BEB). 17:(3) 115-121 p.
- Sandifer, P. A., J. S. Hopkins y A. P. Stokes. 1986. "The potencial for intensive culture of *Penaeus vannamei* in South Carolina". Presentado en 17 reunión de la World Aquaculture Society. Reno E. U. Enero 19-23.
- Selye, H. 1956. "The Stress of life" McGraw-Hill, New York.

- Shigeno, K. 1985. "Intensive culture and feed development in *Penaeus japonicus*. En: Proceeding of the first international conference of the culture prawns/ shrimp (Taki Y., J. H. Primavera y J.A. Llobera)". ed. Iloilo, Filipinas.
- Shi-Yen, S., Tsai S. H. 1994. "Vitamin C requirement of grass shrimp *Penaeus monodon*, as determined with 1-ascorbyl-2-monophosphate". *Aquaculture*. Vol. 122:347-357
- Shoji, Y., Tanaka Y., Sameshima M., Ito Y. 1989. "Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. I effect of dietary astaxanthin, β -carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*. Vol. 87:323-330.
- Simpson, K.L. and Chichester C.O. 1981. "Metabolism and nutritional significance of carotenoids". *Ann. Rev. Nutr.*, 1:351-374.
- Smith, D.M., Allan, G.L., Williams, K.C. and Barlow, C. 2000. Fishmeal replacement research for shrimp feed in Australia. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. A. y Civera - Cerecedo, R.,(Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V Memorias del V Symposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Spotte, S. 1970. "Fish and Invertebrate Culture. Wiley-Interscience". New York, NY, 145 p
- Sprague J. B. 1971. "Measurement of pollutants toxicity to fish III. Sublethal effects and "safe" concentrations". *Water research* 5, pp 245-266
- Steffen, W. 1987. "Principios fundamentales de la alimentación de los peces". Zaragoza, España. 275 p.
- Tacón, A. 1989. "Nutrición y Alimentación de Peces y Camarones Cultivados Manual de Capacitación." Torno 1: Nutrientes Esenciales. Documento preparado por la FAO

- para el proyecto GCP/RLA/102/ITA como apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para América Latina y el Caribe. Brasilia, Brasil. 324 pp.
- Tacon, A.G.S., Akiyama, D., 1997. "Feed ingredients. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Volume 6, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 71-84.
- Tacon, A.G.S., 1999. "Trends in global aquaculture and aquafeed production: 1984-1996 highlights". In: Brufau, J., Tacon, A. (Eds.). Feed manufacturing in the Mediterranean region. Recent advances in research and technology, CIHEAM/IAMZ, Zaragoza Spain, Vol 37, pp. 107-122.
- Thongrod S., Tansutapanich A. y torrisen O. J. 1995. "Effect of dietary astaxanthin supplementation on accumulation, survival and growth in postlarvae of *Penaeus monodon* In: Larvi'95 - Fish and shellfish Larviculture Symposium (ed by P. Lavens, E. Jaspers and L. Roelants). pp. 251-254. Special publication No. 24, European Aquaculture Society, Gent.
- Wedemeyer, G. A. y D.J. Mcleay. 1981. "Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors" pp. 247-275. In A.D. Pickering, editor. Stress and fish. Academic Press, New York.
- Weidner, D. y M. Wildman. 1992. "World overview of shrimp culture. Aquaculture Magazine 18 (6) 37-41.
- Wickins J. F. 1976. "The tolerance of warm water prawns to recirculated water." Aquaculture 9, 19-37.

-
- Whitfield M. 1978. "The hydrolisis of ammonium ions in sea water - experiment confirmation of predicted constants at one atmosphere pressure". Journal of the Marine Biology Associations UK 58, 781-787.
- Yamada S., Y. Tanaka., M. Sameshima and Y. Ito. 1990. "Pigmentation of prawns (*P. japonicus* with carotedoids.I. Effect of dietary astaxanthin, beta-carotene and cantaxanthin pigmentation". Aquaculture. 87:323-330.
- Yépiz V. R. 1999. "Adición de dos niveles de β -carotenos en la alimentación del camarón blanco *L. vannamei*". Tesis Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera. Ensenada, B. C. 58 p.
- Zendejas H. 1998. "Avances y tendencias de la nutrición en la Acuicultura. II simposium Internacional de Acucultura '98, Mazatlán, Sinaloa, México, 1-3 octubre. pp 119-134.

