

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA.

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN ALIMENTO NEBULIZADO PARA LA
LARVICULTURA DE CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus vannamei*.**

TESIS

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

CARLOS ENRIQUE MEDINA REYNA

Ensenada, Baja California, México. Noviembre de 1998.

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

**DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA**

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN ALIMENTO NEBULIZADO PARA LA
LARVICULTURA DE CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus vannamei*.**

TESIS

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

CARLOS ENRIQUE MEDINA REYNA

Ensenada, Baja California, México. Noviembre de 1998.

RESUMEN de la Tesis del **C. CARLOS ENRIQUE MEDINA REYNA**, presentado como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México, Noviembre de 1998.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN ALIMENTO NEBULIZADO PARA LA LARVICULTURA DEL CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus vannamei*.

Resumen aprobado por:

Este trabajo evalúa el desempeño de un alimento nebulizado (AN) ligado con dos ficocoloides (κ -Carragenano y Alginato de Calcio) en la producción de larvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). La disolución media de sólidos de los alimentos producidos con la técnica de secado por aspersion depende de la concentración del ficocoloide y tiempo, resultando menor en la concentración de 5% y 2%, en base seca, para el κ -Carragenano (KAR) y Alginato de Calcio (ALGIN), respectivamente. En ambos casos se formaron microesferas con tamaños medios de partícula que variaron de 8.45 a 27.28 μm . La evaluación biológica se realizó sembrando 100 nauplios por litro en matraces redondos de 1.5 L. Se adicionó una dosis única inicial de microalgas vivas (SDLA) que consistió de 70 cél mL^{-1} de *Chaetoceros muelleri* y 30 cél mL^{-1} de *Isochrysis galbana*. La ración diaria de alimento nebulizado varió de 6 a 16 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ cada cuatro horas de 08:00 a 20:00. No se realizó recambio de agua durante los 10 días del experimento. El alimento control consistió del régimen convencional de microalgas y *Artemia*. Con el alimento nebulizado con KAR las postlarvas tuvieron la mayor sobrevivencia ($61 \pm 4.6 \%$), peso seco individual medio ($104 \pm 20.9 \mu\text{g}$) y una elevada tasa metamórfica ($81 \pm 14 \%$), seguido por el alimento con ALGIN y sin ligante. Sin embargo, el alimento nebulizado con KAR resultó equivalente al alimento vivo ($p < 0.05$), salvo en la tasa metamórfica. Los alimentos nebulizados produjeron más amoníaco y nitrito en el agua que el alimento vivo, aunque no rebasaron los límites de toxicidad recomendados.

Palabras claves : Diseño, alimento nebulizado, larvicultura, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT of the Thesis of **CARLOS ENRIQUE MEDINA-REYNA**, presented as partial fulfillment to obtain the degree of **MASTER OF SCIENCE** in **MARINE ECOLOGY**. Ensenada, Baja California, Mexico. November 1998.

**DESIGN AND EVALUATION OF A SPRAY-DRIED FEED FOR
THE LARVICULTURE OF WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*.**

ABSTRACT

The present work evaluates the effectiveness of several formulations of spray-dried feed (SDF) manufactured with either one of two phycocolloids, Ca-Alginate (ALGIN) or Kappa-Carrageenan (KAR), or no binder at all (SL) for the commercial larviculture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Mean solid dissolution of SDFs was time and phycocolloid concentration dependent. Mean solid dissolution of SDFs indicated that optimum levels of KAR and ALGIN were 5% and 2%, dry weight basis, respectively. Mean particle size of microspheres ranged from 8.45 to 27.28 μm . Feeding trials were carried out with larvae from captive breeders. One hundred nauplii per liter were stocked in 1.5 liter, round-bottom flasks. To stimulate larval digestive enzymatic activity, *Chaetoceros muelleri* (70 cell μL^{-1}) and *Isochrysis galbana* (30 cell μL^{-1}) were added live, in a single dose at Nauplius VI stage. The larvae were fed 6 to 16 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ every four hours from 8 :00 am to 8 :00 pm for 10 days, without water changes. The control treatment consisted of live *Chaetoceros muelleri* (100 cell μL^{-1}), *Tetraselmis suecica* (20 cell μL^{-1}) and newly-hatched *Artemia* nauplii (5 mL^{-1}), the typical conventional food in hatcheries. The SDF with KAR yielded the highest postlarval survival rates (61 \pm 4.6 %), individual dry weight within the normal range (104 \pm 20.9 μg) and the highest metamorphic rate (81 \pm 14 %). Although the KAR formulation was not significantly different ($p>0.05$) from the control as far as survival rate and individual dry weight are concerned, it yielded higher metamorphic rates than the control. Treatments with SDFs produced more unionised ammonia and nitrite than the control, but did not exceed toxic levels established for larval penaeids.

Keywords : Design, spray-dried feed, larviculture, *Litopenaeus vannamei*.

DEDICATORIA

Sin más.

A Montserrat y Carlos Alfonso, motivo constante de mi existencia;

A Korina, mi siempre compañera de esta aventura-pesadilla-realización;

A mis padres, mis aliados.

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas participaron directa e indirectamente en la realización de este trabajo así como en la formación de su servidor.

A Manuel Acosta, quien creyó y confió en mi; Carlos Martínez, Cristina Chávez y Ruth Pedroza les agradezco por habernos comprometido en este trabajo. Beatriz Cordero por su especial apoyo y amistad. A Fernando Díaz, Victor Wong, Facundo Marquez por sus observaciones. A Jaime Farber por su apoyo. A Luis Gradilla por su asistencia en la presentación.

A Ana Calero, Cecilia Flores, León Olivera, Norberto y Pati, por su amistad y compañerismo en CICESE.

A mis profesores, amigos, alumnos y compañeros de Ensenada, Mazatlán y Puerto Angel.

A Irma Martínez, Blanca González, Ana Puello, Ravinder Singh Sangha, Nuno Simões, Patricia Domínguez, Rosa Medina, Omar Calvario, Marisol Morales, y Crisantema Hernández, todos del CIAD-MZT.

A Máximo Raymundo Leyva, Samuel Zarate y los demás pesqueros de Salina Cruz en Mazatlán.

A Amelia Chávez, Blanca Muñoz, Lupita Morales y Cecilia González por hacer mas sencillo la nutrición bibliotecaria.

Al Dr. Rubén Ricárdez, por su apoyo en UMAR, Dra. Beatriz Avalos y Dr. Jesús Ponce Palafox por sus comentarios.

Al CONACYT, por mantenerme a dieta de procuración durante este lapso que se llamó maestría.

A mis padres, que afortunadamente me complementaron esa dieta del CONACYT.

RECONOCIMIENTOS

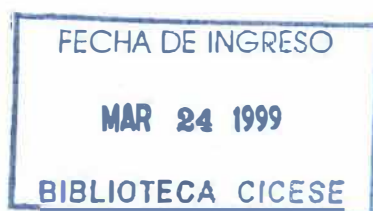
Este trabajo fue posible gracias al apoyo de los proyectos: "Evaluación de la capacidad digestiva de las larvas de camarón *Penaeus vannamei* frente a los diferentes constituyentes de la dieta, mediante estudios zootécnicos, bioquímicos e histológicos" registro CONACyT No. 0556P-N9506 y "Efecto de diferentes niveles de vitamina C en microencapsulados y dietas vivas en larvas de camarón blanco *Penaeus vannamei*" registro CONACyT No. 0718P-T9506, otorgados a Dr. Carlos A. Martínez Palacios y a la Dra. Cristina Chávez Sanchez, respectivamente, ambos del CIAD-Unidad Mazatlán.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. La alimentación artificial en el larvicultivo del camarón	2
I.2. Objetivos	5
I.3. Establecimiento de las hipótesis de trabajo	6
II. MATERIALES Y MÉTODOS	7
II.1. Esquema metodológico	7
II.2. Diseño del alimento nebulizado	7
II.2.1. Requerimientos nutricionales de las larvas de camarón	8
II.2.2. Selección de ingredientes	8
II.2.3. Formulación basal del alimento	10
II.2.4. Uso de ficocoloides como ligantes	12
II.2.5. Definición de los parámetros del proceso de nebulización	13
II.3. Evaluación fisicoquímica del alimento nebulizado (AN)	16
II.3.1. Disolución de sólidos y morfología	17
II.3.2. Análisis de distribución de tamaños	17
II.3.3. Análisis proximal	18
II.3.4. Análisis de datos	18
II.4. Uso de alimento nebulizado en la cría larvaria de camarón blanco	19
II.4.1. Abastecimiento de nauplios	19
II.4.2. Unidades experimentales	20
II.4.3. Procedimiento de la cría larvaria del camarón blanco	20
II.4.4. Calidad de agua	22
II.4.5. Análisis de datos	22

CONTENIDO (Continuación)

	Página
III. RESULTADOS	23
III.1. Evaluación fisicoquímica del alimento nebulizado	23
III.1.1. Disolución de sólidos	23
III.1.1.1. Alimento ligado con κ -Carragenano (KAR)	23
III.1.1.2. Alimento ligado con Alginato de Calcio (ALGIN)	26
III.1.2. Morfología	29
III.1.2.1. Alimento ligado con κ -Carragenano (KAR)	29
III.1.2.2. Alimento ligado con Alginato de Calcio (ALGIN)	29
III.1.3. Análisis de distribución de tamaño	32
III.1.4. Análisis proximal	32
III.2. Evaluación biológica del alimento nebulizado	33
III.3. Acumulación y remoción estimada de metabolitos tóxicos durante la evaluación biológica del alimento nebulizado	35
IV. DISCUSIÓN	38
IV.1. Evaluación fisicoquímica del alimento nebulizado	38
IV.2. Evaluación biológica del alimento nebulizado	43
IV.3. Producción de metabolitos durante la crianza larvaria	48
V. CONCLUSIONES	51
LITERATURA CITADA	53



LISTAS DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>		<u>Página</u>
1	Proceso diagramático de la elaboración del alimento nebulizado.	15
2	Efecto de la concentración de κ -Carragenano (1, 2.5, y 5%) y el tiempo (15, 30, 60, y 90 minutos) en la disolución media de sólidos del alimento nebulizado con este ficocoloide. Los puntos indican la media \pm D. E.	24
3	Efecto de las variables descritas en la Tabla III y el tiempo (15, 30, 60 y 90 minutos) en la disolución media de sólidos del alimento nebulizado con Alginato de Calcio. Los puntos indican la media \pm D. E.	28
4	Microesferas nebulizadas conteniendo diferentes proporciones, en base seca, de κ -Carragenano. A : 1%, B : 2.5% y C : 5%.	30
5	Microesferas nebulizadas a diferentes condiciones (Tabla III) empleando Alginato de Calcio como ligante y seleccionadas a partir de la disolución de sólidos. A : AF1, B : AF2, C : AF5 y D : AF7.	31

LISTA DE TABLAS

<u>TABLA</u>		<u>Página</u>
I	Composición proximal media (n=3, % en base seca) de los subproductos pesqueros preseleccionados en el Puerto de Mazatlán, Sinaloa. ELN : Extracto libre de Nitrógeno.	9
II	Composición de ingredientes (g Kg^{-1}) de la dieta (CIAD-DME-03) para larvas de camarón blanco, <i>Litopenaeus vannamei</i> .	11
III	Diseño experimental para seleccionar la condición óptima de ALGIN para la nebulización del alimento.	16
IV	Análisis de Varianza factorial de medidas repetidas (Modelo I) del efecto de la concentración de κ -Carragenano (A :1, 2.5, y 5%), tiempo (B : 15, 30, 60, y 90 minutos) e interacciones sobre la disolución de sólidos del alimento nebulizado con KAR. Nombre individual de los tratamientos como en el texto.	25
V	Análisis de Varianza factorial de medidas repetidas (Modelo I) del efecto de la concentración de CaCl_2 como gelificador (A : 80 y 280 mg), pH (B : 3 y 7), concentración de Alginato de Calcio (C : 2 y 4 g), tiempo (D : 15, 30, 60, y 90 minutos) e interacciones sobre la disolución de sólidos del alimento nebulizado con ALGIN. Los nombres de los tratamientos como en la Tabla III.	27

LISTA DE TABLAS (CONTINUACIÓN)

- VI Características del tamaño de partícula (μm) de los mejores tratamientos obtenidos en la nebulización del alimento. 32
- VII Valores medios del Peso seco (% PS) composición proximal (% con base en PS) y nivel de energía (kJ g^{-1} PS) de los alimentos seleccionados con base en su caracterización fisicoquímica. Los datos son medias \pm D. E. ($n=3$). 33
- VIII Valores medios de sobrevivencia, peso seco individual, longitud del caparazón y tasa metamórfica de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con alimento nebulizado ligado con diferentes tipos de polímeros. D. E. : Desviación estandar en paréntesis. 34
- IX Acumulación y remoción estimada de nitrito (mg L^{-1} N- NO_2) y amoníaco (mg L^{-1} N- NH_3) durante la crianza larval de camarón blanco. P_A : Producción de amonio por alimento. R_A : Consumo de amoníaco. 37

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN ALIMENTO NEBULIZADO PARA LA LARVICULTURA DE CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus vannamei*.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es el sector acuícola de mayor crecimiento a nivel mundial (Phillips *et al.*, 1993) debido a los incentivos de un alto precio, generación de empleos, entrada de divisas extranjeras, desarrollo de tecnología de cultivo, y la disponibilidad de larvas de laboratorio (Chitravadivelu, 1992). Esta tendencia se ha presentado en México, en donde de 2 000 toneladas producidas en 1985 se ha llegado a 15 867 ton. en 1995 (Reyes-Quintero y Reyes-Moreno, 1996), por lo que es el segundo productor latinoamericano y décimo a nivel mundial (Sierra, 1996). Los niveles de producción de esta biotecnología están basados en la operación de 200 granjas de engorda y de 18 laboratorios de producción larvaria o LPL (Rosenberry, 1997).

La producción comercial de camarón se basa en la siembra de postlarvas (Maugle, 1993), la cual tiene dos fuentes de abastecimiento: larvicultivos y medio silvestre. Cualquiera que sea el origen de las postlarvas, el factor que determina el fracaso de una operación comercial de engorda es su calidad (Hernández-González, 1997).

En México, la producción de postlarvas por los larvicultivos solo llega a cubrir el 30% de la demanda, por lo que 3 736 millones de postlarvas deben capturarse del medio natural o adquirirse en el extranjero (Sierra, 1996).

Recientemente, Kraus (1996) demostró en Ecuador que el éxito del cultivo de camarón debe basarse en la capacidad de siembra en cualquier época del año, es decir no

depender de la producción silvestre de postlarvas, de tal manera que se incremente la disponibilidad de camarón para cualquier mercado. Esta capacidad se adquiere exclusivamente con el desarrollo biotecnológico que los larvicultivos logran y que permiten la permanencia en el mercado (Chamberlain, 1995). La oferta de los LPL esta determinada por múltiples factores biotécnicos, siendo la alimentación y enfermedades, los más sobresalientes (Sorgeloos y Léger, 1992 ; Jones *et al.*, 1993).

El reto del larvicultivo es la producción de organismos que sean semejantes a los producidos en la naturaleza (Bengtson, 1993), aunque como se mencionó anteriormente, la alimentación y enfermedades hacen que la mortalidad comúnmente sea muy alta. La alternativa para controlar estos factores de la producción masiva, es el uso de alimento de alta calidad que mantenga un ambiente saludable, reduzca el riesgo de enfermedades y que permita una sustancial disminución en los altos costos del alimento vivo, que a menudo presenta una alta variabilidad nutricional (Yúfera y Lubián, 1990 ; Brown *et al.*, 1997 ; Cordero-Esquivel *et al.*, 1996).

I.1. La alimentación artificial en el larvicultivo del camarón

La larvicultura consiste en la crianza de larvas planctotróficas que pasan por varios estadios, los cuales poseen distintas estrategias de alimentación. En la naturaleza, las larvas dependen básicamente de diatomeas y zooplancton (Preston *et al.*, 1992) que les brindan todos sus requerimientos nutricionales. En laboratorio, se trata de emular la alimentación natural a través de cultivos masivos monoalgales y de *Artemia*. Dichos cultivos presentan

una alta variabilidad en su producción y calidad (Brown *et al.*, 1997; Mourente y Rodríguez, 1997) por lo que los beneficios obtenidos por esos organismos deja mucho que desear (Benneman, 1992). Como paliativo a esta situación, se ha desarrollado el alimento artificial, cuya aplicación radica en el reemplazo parcial o total del alimento vivo (Sorgeloos y Léger, 1992; Muir y Sutton, 1994). El alimento artificial puede clasificarse, de acuerdo a su presentación, en alimento seco y alimento líquido. Los alimentos secos gozan de gran popularidad por ser los primeros en ser lanzados al mercado. Jones *et al.* (1974), modificaron la técnica de polimerización interfacial de Chang *et al.* (1966) y obtuvieron una microcápsula que se probó experimentalmente para larvas de camarón, langostino y *Artemia* (Jones *et al.*, 1975, 1979, 1987). Posteriormente, Kanazawa *et al.* (1982), describieron la preparación de alimento microligado y microcubierto para larvas de camarón, como una alternativa sencilla a la microencapsulación (Teshima *et al.*, 1983; Teshima y Kanazawa, 1983; Bautista *et al.*, 1989; Koshio *et al.*, 1989). Como una medida para disminuir los problemas de lixiviación y estabilidad, problemas comunes con alimentos secos, Villamar y Langdon (1993), sofisticaron la preparación del alimento microencapsulado mediante la creación de una doble capa que cubre el núcleo de las cápsulas. Recientemente, el alimento líquido entra al mercado del alimento artificial por medio de lipoesferas hidroestabilizadas y microemulsiones estables (D. F. Villamar, Cargill Feeds, Inc.)

A pesar de que al inicio de esta industria, el principal problema a vencer era de índole tecnológica (Jones *et al.*, 1975), actualmente la investigación se centra en la

búsqueda de ingredientes digeribles y asimilables que promuevan “un ambiente amistoso” con las larvas (Jones, 1995), sin olvidar el factor económico, ya que este siempre dicta el uso proporcional del alimento. Bajo este contexto, las técnicas para elaborar alimento seco se han adecuado paulatinamente conforme el mercado se va diversificando. Una de las técnicas que ha sido poco explorada para este fin es la del secado por aspersión o spray drying, con gran potencial para ingredientes frescos y lábiles pues el producto obtenido presenta poca modificación química debido a la rapidez del proceso (Dziezack, 1988 ; Biedenbach *et al.*, 1990 ; Mourente y Rodríguez, 1997).

Jones *et al.* (1997b), manifestaron que existe poca información sobre la nutrición larvaria de camarones y que esta es una gran limitación en el desarrollo de las dietas artificiales. Sin embargo, el reemplazo del alimento vivo puede hacerse mejorando la dieta basandose en estudios de la fisiología digestiva de las larvas o modificando las estrategias de alimentación y el ambiente larvario (Jones *et al.*, 1997c).

El conocimiento de la fisiología digestiva de las larvas ha permitido explicar las carencias de la alimentación artificial y de las deficiencias de los regímenes de alimentación existentes (Abubakr y Jones, 1992; Jones *et al.* 1997a; Kumlu y Jones, 1995, 1997; Jones, 1998) pero ha servido para delimitar el grado de éxito de otros compuestos que intervienen en la digestibilidad de la dieta. Ante esta tendencia, Puello-Cruz (1996) basada en la actividad de las enzimas proteolíticas encontró que, para las especies del Pacífico mexicano sujetas a cultivo, las larvas presentan una tendencia carnívora. En estrecha relación a lo anterior, Jones *et al.* (1997a) señalaron que ante la imposibilidad fisiológica de las larvas

carnívoras y omnívoras de aumentar los niveles enzimáticos en respuesta a dietas artificiales, el uso de alimento vivo es el único método de cultivo, de tal manera, que el reemplazo parcial de microalgas más una dieta de proteína fácilmente digerible proporcionará los mejores resultados para especies que exhiban ese comportamiento fisiológico.

I.2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es diseñar y evaluar un alimento nebulizado para el larvicultivo de camarón blanco induciendo la producción de enzimas digestivas a través de una dosis única inicial de microalgas vivas.

Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

- 1.- Seleccionar macro-ingredientes disponibles regionalmente para la formulación de una dieta semipurificada para larvas de camarón blanco.
- 2.- Emplear el proceso de nebulización en la elaboración del alimento.
- 3.- Seleccionar y determinar la concentración adecuada de los polímeros, Alginato de Calcio (ALGIN) y κ -Carragenano (KAR), empleando como parámetros la disolución de sólidos y morfología del alimento obtenido.
- 4.- Evaluar el alimento producido con las concentraciones adecuadas de polímeros empleando el análisis de distribución de tamaño de partícula y análisis proximal.

5.- Evaluar los alimentos obtenidos en base a lo anterior en el larvicultivo de camarón blanco empleando la dosis única inicial de microalgas vivas como estimuladores de la actividad enzimática.

6.- Determinar la producción de amonio no ionizado y nitrito de cada tipo de alimento producido.

I.3. Establecimiento de las hipótesis de trabajo

Para el presente estudio se establecieron tres hipótesis que predicen que :

H₁: La disolución de sólidos de los alimentos elaborados con cada polímero no es diferente en las concentraciones y/o condiciones a probar.

H₂: Los alimentos producidos con la concentración adecuada de cada polímero proporciona una sobrevivencia, crecimiento y tasa metamórfica equivalente al alimento vivo durante la cría larvaria del camarón blanco.

H₃: La producción de amonio no ionizado y nitrito es igual entre los alimentos desarrollados y el alimento vivo durante el larvicultivo de camarón blanco.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. Esquema metodológico

La idea detrás de este estudio fue proporcionar al sector camaronícola un alimento tecnológicamente factible que permita, por un lado, disminuir los altos costos en la producción de larvas de camarón, y , por otro, incidir en estudios que optimicen la calidad de las postlarvas mediante la administración oral de nutrientes específicos. Para esto, la metodología descrita en esta sección adopta un mecanismo reduccionista basado en aspectos tecnológicos desarrollados desde 1980. Este estudio, busca en el apartado II.2 y II.3, determinar la condición óptima de dos ficocoloides para la preparación de microesferas mediante el proceso de nebulización (Apartado II.2.5.) para después evaluarlo en la crianza larvaria de camarón empleando un régimen alimenticio recientemente descrito (Apartado II.4)

II.2. Diseño del alimento nebulizado

Se siguió, en la medida de lo posible, el protocolo recomendado por Tacon (1987) para la preparación de alimento artificial para peces y crustáceos. La siguiente metodología es una modificación debida a los modos de alimentación planctotrófica de las larvas de la especie involucrada en este estudio.

II.2.1. Requerimientos nutricionales de las larvas de camarón

No existen trabajos que evalúen sistemáticamente los requerimientos nutricionales de los estadios tempranos de vida de las diferentes especies de camarón (Dall *et al.*, 1990). El enfoque empleado para intuir estos requerimientos es imitar la composición proximal de las presas naturales de las larvas de camarón (Preston *et al.*, 1992). En base al perfil de los alimentos usados en cultivos de larvas y a los requerimientos nutricionales inferidos de los ensayos de mantenimiento larvario (Jones *et al.*, 1997b), para este estudio se manejó el siguiente requerimiento nutricional: 50% de proteínas, 15% de lípidos, y 15% de carbohidratos, con un contenido calórico de 16.86 KJ g⁻¹. Se empleó la adición de las premezclas de vitaminas y minerales para larvas carnívoras presentada por Tacon (1987) y recomendado por Puello-Cruz (1998).

II.2.2. Selección de ingredientes

Los macroingredientes para la dieta analizados en este estudio fueron seleccionados por su calidad nutricional, costo, y disponibilidad en el área de Mazatlán, Sinaloa. Para esto, los productos preseleccionados fueron: pulpa de camarón (*Litopenaeus vannamei*), pulpa de pescado (*Polylepis* sp), manto de calamar (*Loligo opalescens*), pulpa cocida de jaiba (*Callinectes toxota*), gonada de atún (*Thunus albacares*), y pulpa de ostión (*Crassostrea iridescens*). A cada subproducto se le realizó el análisis proximal, descrito en el apartado II.3.3. Los resultados de este análisis se presenta en la Tabla I.

Tabla I. Composición proximal media (n=3, % en base seca) de los subproductos pesqueros preseleccionados en el Puerto de Mazatlán, Sinaloa. ELN: Extracto libre de Nitrógeno.

Subproducto	Proteína	Lípidos	ELN	Cenizas
Pulpa de camarón	75.92	3.31	4.00	5.81
Pulpa de pescado	88.92	1.56	6.51	2.9
Manto de calamar	68.07	4.36	6.05	6.91
Pulpa de jaiba	80.84	1.32	5.45	5.73
Gonada de atún	63.33	16.67	6.83	5.17
Pulpa de ostión	40.52	13.54	9.00	6.51

Pese a su alto valor protéico, se descartó a la pulpa de camarón por ser vehículo potencial de enfermedades virales, vía transmisión horizontal, presentes en las costas de Sinaloa (Martínez-Palacios, C. A. Com. pers. CIAD-Mazatlán, Sin.) y su alto precio.

La pulpa de pescado se descartó por su mala calidad, derivada de un mal manejo del producto, y su bajo contenido lipídico.

II.2.3. Formulación basal del alimento

En base a los puntos anteriores se realizó el balance de alimentos empleando la técnica de tanteo mediante la aplicación del algoritmo lineal diseñado en CIAD-Mazatlán. Brevemente, el algoritmo tiene como datos de entrada los requerimientos nutricionales de la especie, el porcentaje de inclusión de los macroingredientes y el análisis proximal de los mismos. Como salida tiene una fórmula para preparar 100 g de alimento. Para este estudio, la fórmula basal, CIAD-DME-03, se presenta en la Tabla II.

Tabla II. Composición de ingredientes (g kg^{-1}) de la dieta (CIAD-DME-03) para larvas de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

Pulpa de ostión de placer	370.2
Carne de atún aleta amarilla	118.4
Pulpa de jaiba azul	92.8
Manto de calamar	183.6
Aceite de girasol	15.2
Aceite de hígado de Bacalao ¹	52.8
Almidón de maíz ²	107.0
Lecitina de soya ¹	10.0
Colesterol ³	5.0
Premezcla de vitaminas ^{4a}	1.0
Premezcla de minerales ^{4b}	2.0
Rovimix Stay C 25 ⁵	2.0
Ligante	Descrito en texto
Energía de (kJg^{-1}):	
Proteínas	9.00
Carbohidratos	2.58
Lípidos	5.28
Total	16.86

¹ Drogeria Cosmopolita SA de CV. México DF.

² Aranal SA de CV. México DF

³ Sigma Chemicals, St. Louis, MO. USA.

⁴ Tacon, 1987. ^aPremezcla de vitaminas (mg/Kg o IU/Kg por Kg de dieta): mononitrato de tiamina 90 mg ; riboflavina 90 mg ; D-pantotenato de calcio 300 mg ; biotina 0.75 mg ; ácido fólico 18 g ; cianocobalamina 0.12 g ; niacina 450 mg ; piridoxina HCL 90 mg ; cloruro de colina 3200 mg ; mio-inositol 2100 mg ; acetato de retinol 12000 mg ; colecalciferol 4000 mg ; acetato de DL-tocoferol 400 mg ; bisulfito de sodio menadiona (k) 14 mg ; BHT 25 mg ; Etoxiquina 100 mg .

^bPremezcla de minerales (mg/Kg de dieta): 100 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 120 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 12 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.2 CoSO_4 ; 60 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.0 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 6 CaIO_3 ; 0.25 Se .

⁵ Hoffinan-La Roche, Basilea, Suiza.

II.2.4. Uso de ficocoloides como ligantes

Las gomás o hidrocoloides de macroalgas (ficocoloides) son carbohidratos, polímeros de azúcares y/o ácidos urónicos. Los ácidos 1,4,β-D-Manurónico y α-L-Gulurónico forman polímeros de alginatos (Heyraud *et al.*, 1990) obtenidos de *Macrocystis pyrifera*. Los dímeros alternantes de α-1,3 y β-1,4-Galactosa forman la estructura de los polímeros de los carragenanos (Guist, 1990), obtenidos por *Gelidium* sp. y *Gigartina* (*Chondracanthus*) sp.

Debido a su disponibilidad regional y su aplicación comercial en la industria alimenticia como adelgazantes, geles, estabilizadores y/o emulsificantes, se seleccionó al Alginato de Calcio y κ-Carragenano como ligantes en la fabricación del alimento nebulizado.

La inclusión del κ-Carragenano ha sido ampliamente usado en la elaboración de alimento para larvas de camarón (Kanazawa *et al.*, 1977; Kanazawa *et al.*, 1982; Teshima y Kanazawa, 1983; Teshima *et al.*, 1983; Galgani y AQUACOP, 1989; Bautista *et al.*, 1989; Kanazawa, 1990; Koshio *et al.*, 1989; Teshima *et al.*, 1991; Koshio *et al.*, 1992; García-Prisco y Báez-Dueñas, 1994; López-Alvarado *et al.*, 1994). En todos esos estudios, el nivel de inclusión fue del 5%.

El uso de Alginato de Calcio en la preparación de alimento artificial para larvas de camarón no es común aunque se reporta su utilización en la cría de otros crustáceos (Levine *et al.*, 1983 ; Villamar y Brusca, 1987 ; Cary *et al.*, 1992 ; Polk *et al.*, 1994).

II.2.5. Definición de los parámetros del proceso de la nebulización

La nebulización o secado por aspersión (Spray drying) es una tecnología muy empleada en la industria farmacéutica, química y alimenticia (Dziezak, 1988). El principio reside en la atomización de una solución por aire comprimido en una cámara de desecación, y secado por una corriente de aire caliente. Este proceso tiene cuatro fases separadas (Masters, 1985): 1) Nebulización de la solución en forma de aerosol, 2) Contacto del aerosol con aire caliente, 3) Secado del aerosol y 4) Separación del producto seco y el aire cargado con el solvente

El secado por aspersión proporciona dos tipos de productos que dependen de la concentración y características del polímero: microcapsulas, en las cuales es evidente una pared y un núcleo, y microesferas, creadas dentro de sistemas matriciales que parten de mezclas complejas de líquidos que comprenden un principio activo disuelto con un polímero en un solvente orgánico (Benoit *et al.*, 1996).

Los sistemas de nebulización existentes son de dos tipos (Masters, 1985): a) Turbina: La nebulización se realiza por un disco rotatorio, y b) Atomizador: La nebulización se realiza por aire comprimido a través de un aspersor.

En la actualidad existen diversos equipos para el secado por aspersión que varían desde el nivel laboratorio hasta la escala piloto y comercial. Benoit *et al.* (1996) recomiendan el uso de aparatos a escala piloto ya que minimizan la variabilidad de los resultados obtenidos con equipos de laboratorio.

El uso experimental del secado por aspersión en México se inició con la aplicación de la goma de mesquite en la encapsulación de aceites esenciales (Vernon-Carter y

Sherman, 1980). Debido al potencial de este polímero como agente encapsulante se incidió en la microencapsulación de alimento para larvas de langostino con relativo éxito (Ponce-Palafox *et al.*, 1995). Recientemente, Pedroza-Islas *et al.* (en prensa) reportan la microencapsulación de dietas para larvas de camarón empleando mezclas de polímeros como goma de mesquite, goma arábica, y maltodextrina. En base a las experiencias de esos trabajos, se empleó el proceso descrito en la Figura 1.

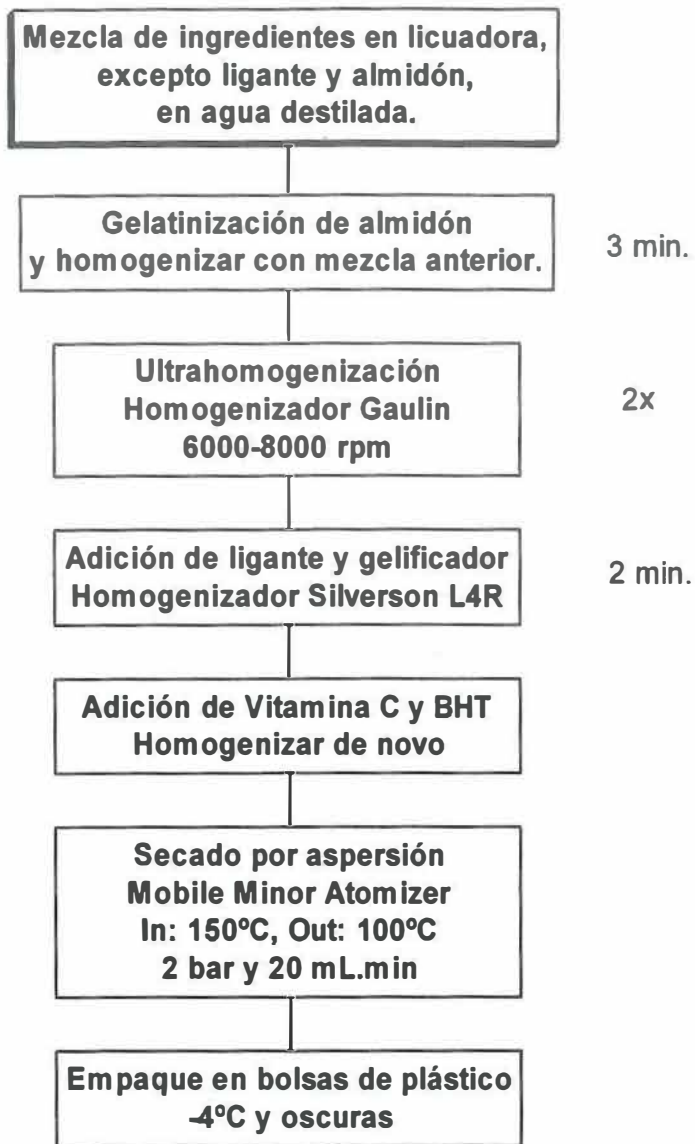


Figura 1. Proceso diagramático para la preparación del alimento nebulizado

II.3. Evaluación fisicoquímica del alimento nebulizado (AN)

Para la elaboración del AN con κ -Carragenano (KAR) se probaron tres concentraciones, con respecto a la base seca de los ingredientes : 1, 2.5 y 5%, denominadas, en lo sucesivo, CF1, CF2 y CF3, respectivamente.

En el caso del uso del Alginato de Calcio (ALGIN) en la preparación del AN se diseñaron ocho formulaciones derivadas de dos concentraciones de agente gelificante (CaCl_2), dos pH y dos concentraciones de ALGIN (Tabla III).

Tabla III. Diseño experimental para seleccionar la condición óptima de ALGIN en la nebulización del alimento.

Tratamiento	[CaCl_2] mg	pH	[ALGIN] g
AF1	80	3.5	2
AF2	80	3.5	4
AF3	80	7	2
AF4	80	7	4
AF5	280	3.5	2
AF6	280	3.5	4
AF7	280	7	2
AF8	280	7	4

El enfoque empleado en este apartado es determinar, en base a la disolución de sólidos y morfología, que tratamiento de cada ficocoloide es el mejor para la preparación

del AN. Una vez realizado lo anterior, se evaluó la distribución de tamaño y análisis proximal con el fin de continuar con su evaluación biológica.

II.3.1. Disolución de sólidos y morfología

La técnica para la determinación del lavado residió en pesar una muestra de alimento y colocarla en un tubo de ensayo previamente pesado. Posteriormente se le agregó al tubo de ensayo 25 mL de agua de mar y se incubó sin agitación a 29°C durante 15, 30, 60 y 90 min. Después de la incubación se filtró la muestra de alimento a través de un filtro Whatman 40, previamente secado y pesado. El material filtrado se seco a 70°C por 36 h. Se hizo un blanco de 25 mL de agua de mar. Esta prueba se realizó por duplicado.

Para examinar la estructura externa y la forma del AN, estos se cubrieron con grafito por medio de un evaporador de metales JEOL. El AN cubierto se observó con un microscopio electrónico de barrido (JEOL modelo JSM-35CF). Las características por observar fueron: forma, pared, dimples, fracturas, y caps (Rosemberg *et al.*, 1988).

II.3.2. Análisis de distribución de tamaños

Se obtuvieron distribuciones volumétricas (volumen de partículas de cada clase de diámetro) y acumulativas de tamaño del AN con un analizador de tamaños de partículas Malvern modelo 2600 SBOD (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra), usando un modelo lognormal (Másters, 1985). Este equipo proporciona un estimado del valor medio del diámetro al 50% de la fracción acumulativa de volumen (FAV). El diámetro medio

(d_{50}) y la desviación estándar aritmética ($\sigma_a=0.5 [d_{84}-d_{16}]$) se calculó a partir de la curva de distribución acumulativa (Alexakis *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1995).

II.3.3. Análisis proximal

Los macro-ingredientes y la dieta basal se analizaron para formular y confirmar su perfil bromatológico. La humedad se determinó por desecación en estufa. Las cenizas se calcularon a partir de calcinación en mufla eléctrica. El extracto etéreo se estimó con el método Soxhlet. La proteína cruda se cuantificó con el método Kjeldahl-Gunning empleando un analizador TECATOR[®]. Todas estas marchas son procedimientos aprobados por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC), 1990. La energía disponible se calculó usando los factores de conversión 18.0, 35.2 y 17.2 kJ g⁻¹ en base seca para las proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente (Mourente y Rodríguez, 1997).

II.3.4. Análisis de datos

Los datos se exploraron con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) como bondad de ajuste a la distribución normal; así como la prueba de Bartlett que determina la igualdad de variancias (Zar, 1984; Sokal y Rohlf, 1995).

Los datos provenientes de la prueba de disolución de sólidos fueron comparados a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) factorial de medidas repetidas (Steel y Torrie, 1960, Damon y Harvey, 1987) siguiendo el siguiente modelo general:

$$L = \mu + F_1 + d_1 + T_2 + F_1T_2 + e_{12}$$

siendo

L : disolución de sólidos

μ : media

F₁ : factor 1 (entre factores)

T₂ : tiempo

d₁ : error entre factores

e₁₂ : error dentro de medidas repetidas

Para cada ficocoloide empleado en la preparación del AN, se descartó a aquellos tratamientos que a los 30 min de incubación rindieron un 50% de lavado, ya que de acuerdo a Jones *et al.* (1997b), éste es el tiempo de gastroevacuación en las larvas de peneidos y al cabo de este ocurre otra ingestión. Se realizaron comparaciones planeadas mediante contrastes ortogonales (Day y Quinn, 1989) con dichos tratamientos empleando el paquete de computo STATISTICA.

II.4. Uso del alimento nebulizado en la crianza larvaria de camarón blanco

II.4.1. Abastecimiento de nauplios

Se adquirieron por donación 10,000 nauplios (NIII) de camarón blanco fototácticamente activos provenientes de diferentes progenitores cautivos del laboratorio de producción de postlarvas de la empresa Maricultura del Pacífico S. A. de C. V. (Walamo, Sin.). Una vez en el laboratorio húmedo del área de Nutrición del CIAD (Mazatlán, Sin.) se procedió a aclimatarlos a 29°C mediante el recambio parcial y paulatino de agua de mar filtrada a 5 μ m. Después de la aclimatación se colocó todo el lote de nauplios en un estanque rectangular de fibra de vidrio en donde por medio de la luz se realizó la selección

para la siembra de los organismos en las unidades experimentales, previa inspección ocular en búsqueda de síntomas patógenos y determinación de la calidad del lote (Treece y Fox, 1993). El estadio de siembra fue nauplio V.

II.4.2 Unidades experimentales

El diseño de las unidades experimentales (UE) está basado en el descrito por Kumlu y Jones (1995) y otorgan mejores condiciones para el cultivo y manejo de los camarones que el recomendado por Wilkenfeld *et al.*, 1985 y Smith *et al.*, 1992. Se usaron 25 recipientes de vidrio de 1.9 litros de fondo esférico equipados con sendos tubos de vidrio que proveen una suave aireación (2-3 burbujas de aire por segundo), circulación constante de agua y saturación de oxígeno disuelto. Los matraces se colocaron en un baño de agua termostáticamente controlado a 29°C. El agua de cultivo fue agua de mar doblemente filtrada con un filtro de papel de 5 µm a una presión menor de 10 psi. No existió recambio de agua durante los experimentos (Jones *et al.*, 1997c). La intensidad luminosa durante el experimento se mantuvo a 0.3×10^{14} quantas $s^{-1} cm^{-2}$.

II.4.3. Procedimiento de la cría larvaria de camarón blanco

Se tomaron nauplios activos a la luz del tanque de aclimatación y se sembraron en las UE a una densidad de 100 nauplii por litro. Las UE se llenaron a 1.5 litros. La asignación de los tratamientos y sus repeticiones fueron aleatorios dentro del baño de agua (Simões, N Com. pers. SOS-UCNW, Bangor, UK). A cada matraz de cultivo se inoculó una dosis única de microalgas vivas (SDLA) en fase exponencial a una concentración de

100 cel μL^{-1} (Jones *et al.*, 1997c), obtenidas del cultivo de microalgas del CIAD y crecidas en medios f/2 con doble ración de silicatos, para el caso de diatomeas. La SDLA estuvo constituida por 70% de *Chaetoceros muelleri* y 30% de *Isochrysis galbana*. La identificación de los estadios larvales se basó en las descripciones de Kitani (1986) y fue determinada diariamente mediante la inspección ocular de los matraces testigos que ofrecen una magnificación por su forma esférica.

Las microdietas artificiales se hidrataron por 3 minutos y fueron proporcionados a los organismos a las 0800, 1200, 1600, y 2000 h. Los niveles de alimentación son similares a los usados en los laboratorios: 8 mg/L por día para Zoea, 12 mg/L por día para Mysis y 16 mg/L por día para M3-PL5, calculados en base a peso seco total (Kumlu y Jones, 1995). El tratamiento control, que debe ser alimento vivo en este tipo de estudio (Bengtson, 1993), consistió en la adición de 80-120 cél μL^{-1} de SDLA diaria, en la misma proporción que los tratamiento con AN, durante los estadios de zoea. A partir de mysis I se agregó 3-5 nauplios recién eclosionados de *Artemia* sp.(cepa GSL, Aquafauna Biomarine Inc. Hawthorne, CA.) más 20 cél μL^{-1} de *Tetraselmis suecica*.

Al llegar al subestadio PL1 o día 10 de cultivo se dió por terminado el ensayo. Se determinó el número de sobrevivientes de cada réplica. Se tomaron aleatoriamente 10-15 ejemplares de cada matraz para medir la longitud del caparazón (L.C.), incluyendo el rostro, y determinar el número de PL1, previa fijación en formol al 4%. Se calculó el peso seco individual por triplicado en muestras de 5-15 organismos de cada repetición secados a 60°C por 24 horas.

II.4.4. Calidad de agua

Se determinó la calidad del agua de cultivo al inicio, al quinto y al décimo día (final) del bioensayo con el fin de describir el efecto de la adición de alimento artificial en las UE. Los metabolitos determinados fueron nitrito (N-NO_2) y nitrógeno amoniacal total o NAT (N-NH_4). En ambos casos se siguieron las técnicas descritas por Parsons *et al.*, 1984. Para el cálculo de la fracción no ionizada del NAT (amoniacal), se empleó la conversión propuesta por Huguenin y Colt (1989). Se empleó la ecuación de balance de masa (EBM) para estimar la remoción de amoniacal por microorganismos (Losordo y Westers, 1994).

II.4.5. Análisis de datos

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) como bondad de ajuste a la distribución normal, y la prueba de Bartlett que evalúa la igualdad de variancias (Zar, 1984; Sokal y Rohlf, 1995). En el caso en donde no se cumplieron estas premisas del modelo general lineal aditivo (Steel y Torrie, 1960), se empleó la transformación logarítmica ($\log(X+1)$) y arco seno $\sqrt{\text{arc sen } \sqrt{X}}$ según el caso.

La significancia de las diferencias en los tratamientos se determinó usando un análisis de variancia (ANOVA) Se compararon todas las medias por pares siguiendo el método de Tukey. En la última prueba, el error de la comparación global se controló via Bonferroni (Wilkinson, 1987; Day y Quinn, 1989).

Para todos los casos, el nivel de significancia nominal fue del 5%. Estos cálculos estadísticos se desarrollaron con el paquete de computo SYSTAT[®].

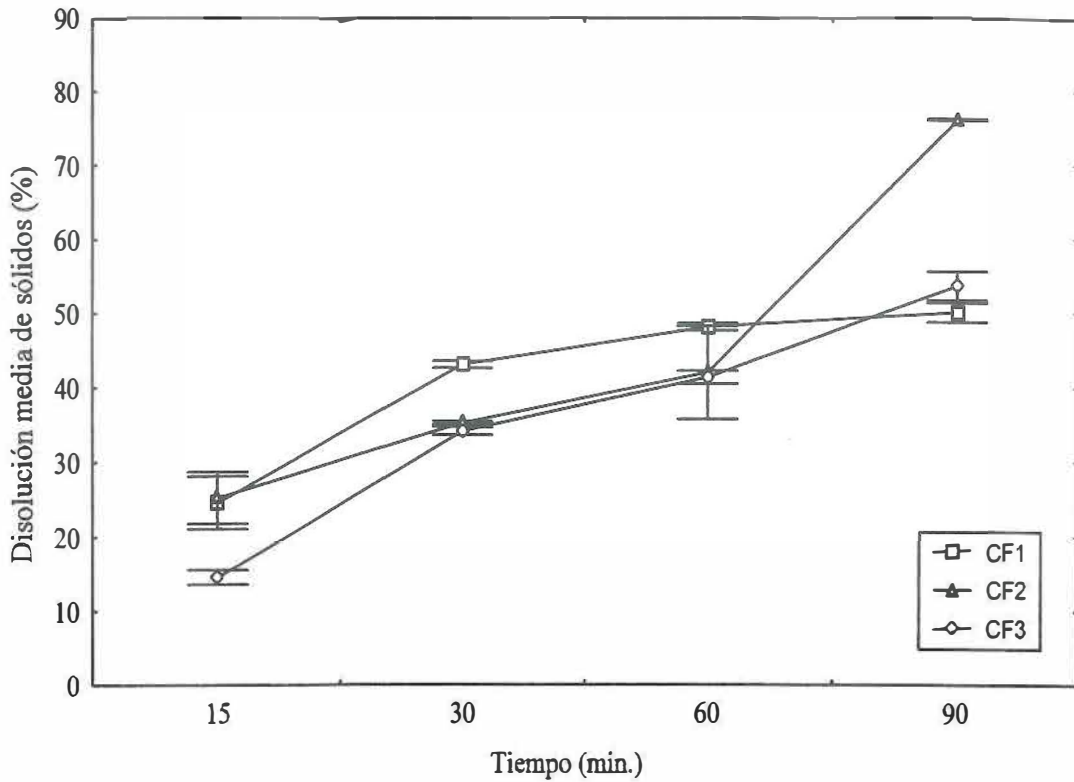


Figura 2. Efecto de la concentración de κ -Carragenano (1, 2.5 y 5%) y el tiempo (15, 30, 60, y 90 minutos) en la disolución media de sólidos del alimento nebulizado con este ficocoloide. Los puntos indican la media \pm D. E.

Tabla IV. Análisis de varianza factorial de medidas repetidas (Modelo I) del efecto de la concentración de κ -Carragenano (A : 1, 2.5 y 5%), tiempo (B : 15, 30, 60, 90 min.) e interacciones sobre la disolución de sólidos del alimento nebulizado con KAR. Nombre individual de los tratamientos como en el texto.

Fuente	g. l.	S. C.	C. M.	F	<i>p</i>
Entre A	6	329.48			
A	2	319.98	159.99	50.43	0.004
Error a	3	9.52	3.17		
Dentro de B	18	5407.91			
B	3	4568.91	1522.98	223.67	<0.001
AB	6	777.73	129.62	19.03	<0.001
Error b	9	61.27	6.80		
Contrastes a 60 min					
CF3 vs. CF1	1	55.72	55.72	4.17	0.13
CF3 vs. CF2	1	0.42	0.42	0.03	0.87
error	3	40.09	13.36		
Contrastes a 90 min					
CF3 vs. CF1	1	12.71	12.71	7.06	0.07
CF3 vs. CF2	1	504.45	504.45	280.56	<0.001
error	3	5.93	1.79		

III.1.1.2. Alimento ligado con Alginato de Calcio (ALGIN)

La disolución media de los alimentos diseñados con Alginato de Calcio (ALGIN) variaron de 8 a 94 %. La menor tasa de disolución fué obtenida con el alimento AF7 (0.11 \% min^{-1}) y la mayor con el AF3 (0.84 \% min^{-1}).

La disolución media del alimento nebulizado resultó homogénea a las dos concentraciones del agente gelificante (CaCl_2) y a los dos pH probados (Tabla V). Las variables que tuvieron un efecto en la disolución media fueron la concentración de ALGIN y el tiempo (Tabla V). Se encontraron fuertes evidencias estadísticas que indicaron que el efecto de los factores probados depende de la concentración de ellos mismos, si los tomamos como las interacciones de primer, segundo y tercer orden (Tabla V). Los alimentos con mayor disolución ($>50 \text{ \%}$) a los 30 minutos fueron AF2, AF4, AF6 y AF8, por lo cual fueron excluidos de los análisis *a posteriori*. El resto de los alimentos presentaron ese nivel de disolución después de los 60 minutos, siendo el tratamiento AF5 el menos lavado durante los tiempos analizados (Figura 3), por lo que se consideró como el mejor.

Tabla V. Análisis de varianza factorial de medidas repetidas (Modelo I) del efecto de la concentración de la concentración del CaCl₂ como gelificador (A : 80 y 280 mg), pH (B : 3 y 7), concentración de Alginato de Calcio (C : 2 y 4 g), tiempo (T : 15, 30, 60, 90 min.) e interacciones sobre la disolución de sólidos del alimento nebulizado con ALGIN. Los nombres de los tratamientos como en Tabla III.

Fuente	g. l.	S. C.	C. M.	F	<i>p</i>
Entre factores	15	19532.73			
A	1	20.28	20.28	0.50	0.49
B	1	46.29	3.17	1.15	0.31
C	1	13020.24	13020.24	323.53	<0.001
AB	1	3667.00	3667.00	86.14	<0.001
AC	1	481.86	481.86	11.97	0.008
BC	1	1238.78	1238.78	30.78	<0.001
ABC	1	1058.28	1058.28	26.29	<0.001
error d	8	321.92	40.24		
Dentro de tiempo	48	4298.32			
T	3	9103.32	3034.44	253.33	<0.001
AT	3	1249.41	416.47	34.77	<0.001
BT	3	140.01	46.67	3.89	0.021
CT	3	326.52	108.84	9.08	<0.001
ABT	3	445.05	148.35	12.38	<0.001
ACT	3	515.01	171.67	14.33	<0.001
BCT	3	850.59	283.53	23.67	<0.001
ABCT	3	229.14	76.38	6.37	0.002
Error e	24	287.28	11.97		
Contrastes a 60 min					
AF5 vs. AF1	1	11.02	11.02	0.46	0.51
AF5 vs. AF3	1	187.41	187.41	7.89	0.02
AF5 vs. AF7	1	497.73	497.73	20.93	0.001
error	8	190.22	23.78		

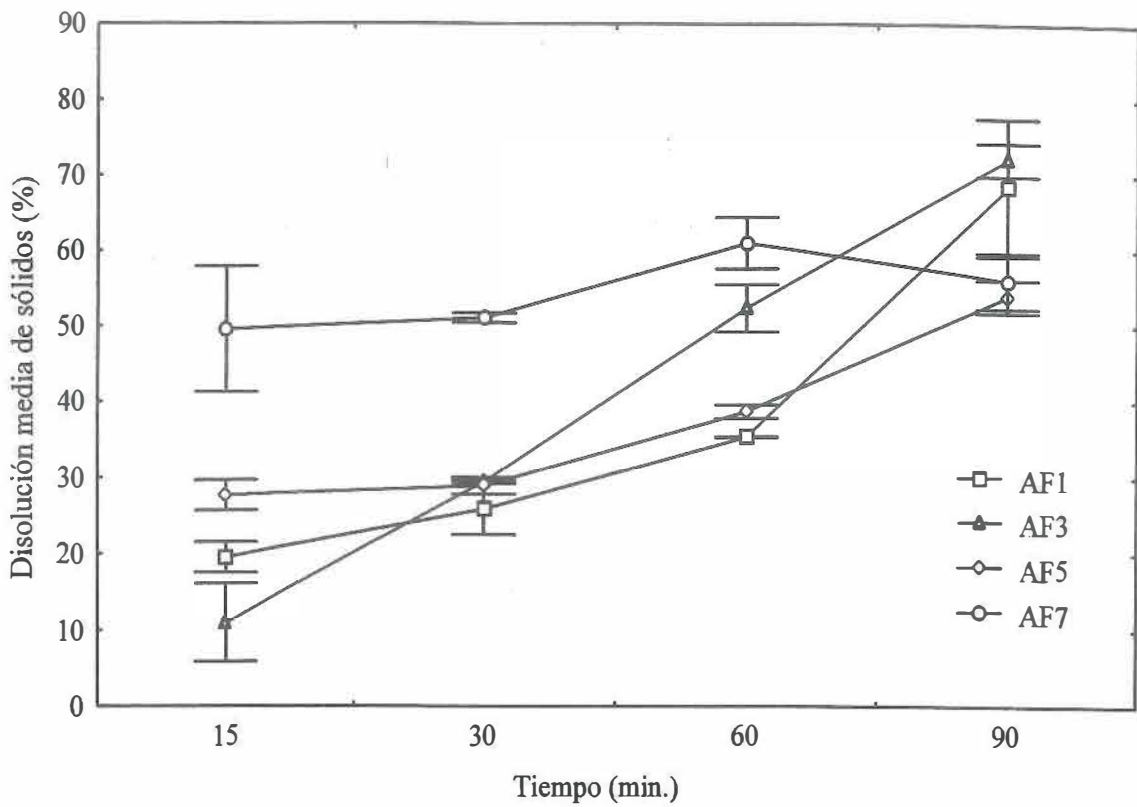


Figura 3. Efecto de las variables descritas en la Tabla III y el tiempo (15, 30, 60 y 90 minutos) en la disolución media de sólidos del alimento nebulizado con Alginato de Calcio. Los puntos indican la media \pm D. E.

III.1.2. Morfología

III.1.2.1. Alimento ligado con κ -Carragenano (KAR)

Las microesferas ligadas con κ -Carragenano (KAR) exhibieron la geometría externa de partículas esféricas con indentaciones algo profundas o dimples (Figura 4). La característica recurrente en las partículas fueron las cápsulas adheridas a la pared (caps) de la microesfera, siendo mayor en la concentración de 2.5% de KAR (Figura 4b). La presencia de poros se reveló en los tres tratamientos, siendo más notorio en la concentración de 2.5%. La presencia de una pared en las micropartículas producidas no fue observado, sin embargo, es evidente un recubrimiento externo en todas la microesferas. El tratamiento CF3 se caracterizó por presentar dimples pero escasa presencia de rugosidades y poros en la pared (Figura 4c).

III.1.2.2. Alimento ligado con Alginato de Calcio (ALGIN)

El alimento preparado con este polímero presento distintas formas que comprenden desde ovoides hasta elongamientos, aunque dominaron las partículas esféricas (Figura 5). Las características comunes entre los tratamientos fueron las dimples y las caps. En último término, la presencia de poros fue visible. Las caps observadas en su mayoría fueron captadas durante su fase de formación, lo que representan poros o inicios de fractura, que con la hidratación pueden llegar a desprenderse. El tratamiento AF5, presentó más dimples rugosidad en la pared, sin embargo, la presencia de poros es menor que en los otros tratamientos (Figura 5).

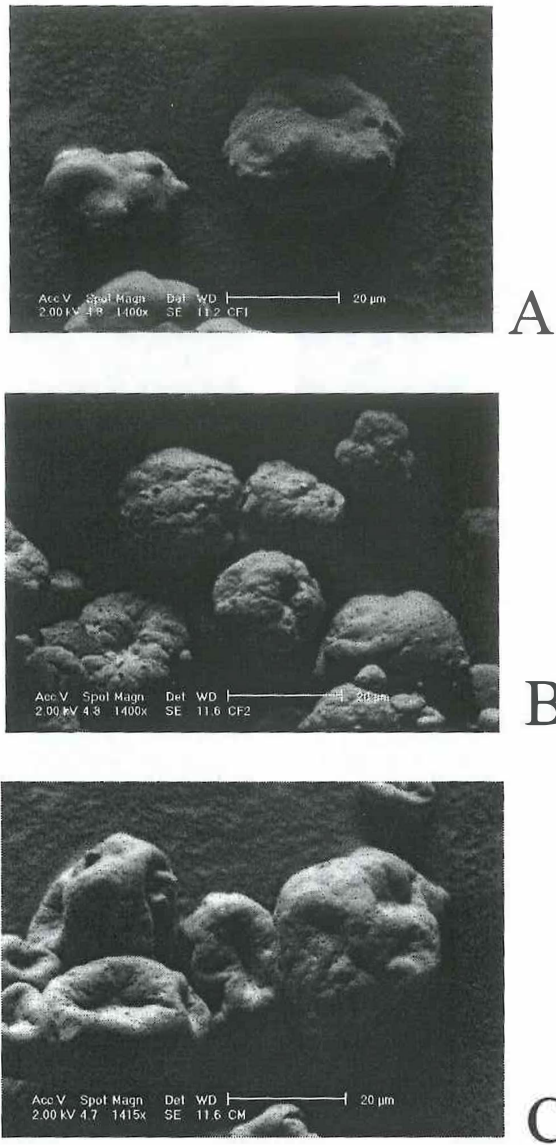
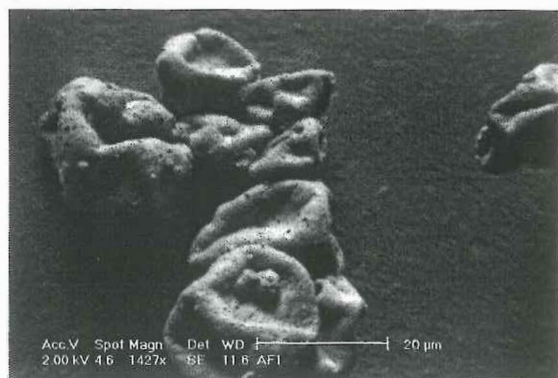
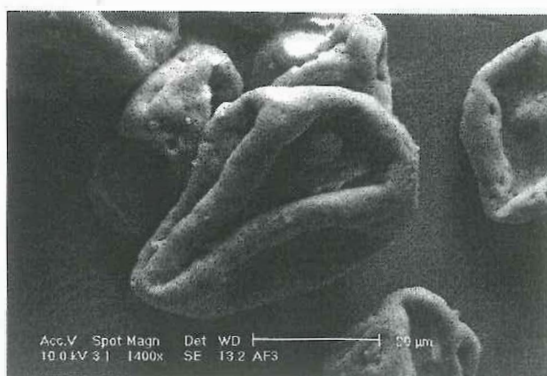


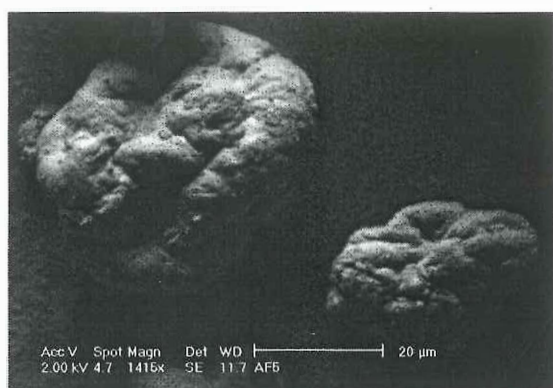
Figura 4. Microesferas nebulizadas conteniendo diferentes proporciones en base seca, de k-Carragenano. A: 1%, B: 2.5% y C:5%.



A



B



C



D

Figura 5. Microesferas nebulizadas a diferentes condiciones (Tabla III) empleando Alginato de Calcio como ligante y seleccionadas a partir de la disolución de sólidos. A: AF1, B: AF3, C: AF5, D: AF7.

III. 1.3. Análisis de distribución de tamaño

Las partículas seleccionadas a partir de la sección III.1.1 y III.1.2. presentaron una típica distribución log-normal con diámetros medios que variaron de $8.45 \pm 10.35 \mu\text{m}$ a $27.28 \pm 34.5 \mu\text{m}$ (Tabla VI). En este análisis se incluyó un tratamiento extra que consistió en el homogenizado fresco de ingredientes sin ligante (SL). El menor tamaño medio de partícula lo presentó el tratamiento SL, seguido por CF3 y AF5 (Tabla VI)

Tabla VI. Características del tamaño de partícula (μm) de los mejores tratamientos obtenidos en la elaboración del alimento nebulizado. d: décil.

Tratamiento	Diámetro medio	Desviación estandar	d ₁₀	d ₉₀	Coefficiente de variación
CF3	13.28	15.65	3.93	44.00	117
AF5	27.28	34.5	5.78	104.42	126
SL	8.45	10.35	2.52	28.35	122

III.1.4. Análisis proximal

La composición proximal y contenido energético de los tres alimentos se presentan en la Tabla VII. Existió una mayor diferencia entre el contenido energético calculado (Tabla II) y el obtenido después del proceso de nebulización (Tabla VII), sobre todo con los lípidos (5.28 vs 6.86) y carbohidratos (2.58 vs 3.77).

Tabla VII. Valores medios del peso seco (% PS), composición proximal (% con base en PS) y nivel de energía (kJ g⁻¹ PS) de los alimentos seleccionados en base a su caracterización fisicoquímica. Los datos son medias \pm D. E. (n=3).

	Composición	Contenido energético
Peso seco	92.44 \pm 1.3	
Proteína	51.78 \pm 1.24	9.31 \pm 0.22
Lípidos	19.50 \pm 0.40	6.86 \pm 0.14
Carbohidratos	21.95 \pm 1.20	3.77 \pm 0.25
Cenizas	6.76 \pm 0.76	
Total		19.94 \pm 0.30

III.2. Evaluación biológica del alimento nebulizado

La sobrevivencia media de los camarones al final del experimento varió de 49.2 a 61.0 %, siendo mayor con el tratamiento CF3, pero no significativamente diferente al alimento AF5 ni al alimento control. La menor sobrevivencia de los organismos fue con el tratamiento SL (Tabla VIII).

El peso seco individual medio (PSIM) de las postlarvas varió de 79.3 a 114.0 μ g . El mayor PSIM observado resultó con el tratamiento control, el cuál fue significativamente mayor al alimento con ALGIN y no diferente al resto de los alimentos utilizados. Los PSIM de los camarones que fueron mayores a 100 μ g se obtuvieron con el alimento vivo (Control) y alimento nebulizado CF3 (Tabla VIII).

El crecimiento larvario de los camarones como incremento de longitud fue obtenido a través de la medición de la longitud media del caparazón (LMC). Esta varió de 1.275 a 1.340 mm, siendo mayor en las postlarvas alimentadas con el control. Sin embargo, el alimento vivo no fue estadísticamente diferente al AF5. La menor LMC obtenida de los camarones resultó del tratamiento CF3, el cuál no fue significativamente diferente al alimento SL (Tabla VIII).

La tasa metamórfica media (TMM) de las larvas de camarón estuvo dentro del intervalo de 52 a 81 %. La TMM fue significativamente mayor con el alimento CF3 pero no diferente al resto de los alimentos, con excepción del control, aunque este no resulto diferente al alimento ligado con AF5 ni al SL (Tabla VIII).

Tabla VIII. Valores medios de sobrevivencia, peso seco individual, longitud del caparazón y tasa metamórfica de las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con alimento nebulizado ligado con diferentes tipos de polímeros. D. E : Desviación estandar en paréntesis.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)	Peso seco individual (μg)	Longitud del caparazón (mm)	Tasa metamórfica* (%)
AF5	56.9(4.1)	79.3(12.2) ^c	1.318(0.058) ^{a,b,c}	65 (10)
CF3	61.0(4.6) ^a	104.6(20.9) ^b	1.275(0.060) ^d	81 (14) ^a
S L	49.2(6.2) ^b	95.6(20.6)	1.287(0.051) ^{c,d}	76 (12) ^a
Alimento vivo	51.3(7.9)	114.0(25.9) ^{a,b}	1.340(0.056) ^a	52 (8) ^b

Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

*Tasa metamórfica es el porcentaje de larvas que llegaron a PL1.

III.3. Acumulación y remoción estimada de metabolitos tóxicos durante la evaluación biológica del alimento nebulizado

Los niveles detectados de la concentración de nitrito (N-NO_2) y nitrógeno amoniacal total ($\text{N-NH}_3+\text{NH}_4$) o NAT en el agua al inicio del bioensayo fueron 0.01 y 0.004 mg L^{-1} , respectivamente (Tabla IX).

Al quinto día de cultivo, la concentración de nitrito en el agua se triplicó en todos los tratamientos, siendo mayor en el tratamiento con alimento vivo. Al final del experimento, los niveles acumulados de la concentración de este metabolito aumentaron un orden de magnitud, quedando cercanos al nivel recomendado por Treece y Fox (1993), sólo para los alimentos CF3 y SL; mientras que el alimento AF5 y control aumentaron en diez veces su concentración, superando los niveles recomendados (Tabla IX).

La acumulación de amoniaco o amonio no ionizado en el agua al quinto día mostró un incremento similar (seis veces) entre los tratamientos con AN, siendo dos veces mayor que en el alimento vivo (Tabla IX). Al final del experimento, la acumulación de este metabolito exhibió una mayor variabilidad, la cual estuvo dentro del intervalo de 0.074 a 0.092 mg L^{-1} para los alimentos con AN, mientras que para el alimento vivo fue de 0.045 mg L^{-1} . La acumulación de este producto de excreción en el agua presentó un incremento de seis veces del inicio al quinto día y posteriormente un ligero incremento de tres veces del quinto al décimo día; en tanto, la acumulación de amonio por efecto del alimento vivo presentó un aumento constante (tres veces) en los mismos lapsos (Tabla IX).

Como una estimación indirecta del papel de la comunidad bacteriana mantenida en el agua de cultivo larvario con cada alimento, se tomó a la ecuación de balance de masa

(EBM) descrita por Losordo y Westers (1994) como una predicción de la remoción o consumo de Amoniaco.

La EBM asume, para el caso de sistemas de flujo cerrado de agua en ambientes aeróbicos, que :

$$\text{Acumulación} = \text{Generación} - \text{Remoción}$$

o mejor dicho

$$C_{to-ti} = P_{NAT} - R_{NAT} \dots\dots\dots(1)$$

siendo

$$P_{NAT} = (A) (P) (0.102) \dots\dots\dots(2)$$

en donde

A : Alimento total suministrado

P : Porcentaje de proteínas del alimento

0.102 : Estimado de NAT producido por la actividad metabólica de organismos acuáticos (Losordo y Westers, 1994)

C_{to-ti} : Acumulación actual medida del tiempo to a ti .

Despejando R_{NAT}

$$R_{NAT} = P_{TAN} - C_{to-ti} \dots\dots\dots(3)$$

Si se transforma el NAT a amoniaco y si se considera que este compuesto gaseoso mantuvo una difusión constante ya que la aireación fue igual en todos los tratamientos, por lo tanto, R_{NAT} reflejará el consumo o remoción por bacterias heterotróficas e inclusive por microalgas o protozoos. Estos parámetros se presentan en la Tabla IX. Si las suposiciones de la EBM son validas y considerando una producción de 0.13 mg L⁻¹ de amoniaco por el

alimento vivo, entonces éste presentó el mayor consumo de este compuesto siendo diez, cinco y tres veces superior que los alimentos SL, CF3 y AF5 respectivamente.

Tabla IX. Acumulación y remoción estimada de nitrito ($\text{mg L}^{-1} \text{N-NO}_2$) y amoníaco ($\text{mg L}^{-1} \text{N-NH}_3$ -) durante la crianza larval de camarón blanco. P_A : Producción de amoníaco por alimento. R_A : Consumo de amoníaco.

Tratamiento	CF3		AF5		S L		Alimento vivo	
	NO_2	NH_3	NO_2	NH_3	NO_2	NH_3	NO_2	NH_3
Tiempo Inicio	0.01	0.004	0.01	0.004	0.01	0.004	0.01	0.004
Día 5	0.03	0.021	0.02	0.027	0.03	0.028	0.04	0.013
Día 10	0.13	0.083	0.22	0.074	0.14	0.092	0.37	0.045
P_A		0.101		0.101		0.101		0.13
R_A		0.017		0.026		0.008		0.085

Niveles seguros recomendado por Treece y Fox (1993). $\text{NO}_2\text{-N} : 0.1 \text{ mg L}^{-1}$
 $\text{NH}_3\text{-N} : 0.1 \text{ mg L}^{-1}$

IV. DISCUSION

IV.1. Evaluación fisicoquímica del alimento nebulizado

La tecnología de la nebulización o spray drying es bien conocida y es común en la industria alimentaria. Los productos obtenidos con ella tienen su exitosa aplicación en la medida de que se logre una alta retención de los materiales durante el proceso, almacenamiento y aplicación. En el caso del presente estudio, la retención tiene un papel muy importante ya que las partículas nebulizadas entran en contacto con el agua de mar por espacio de 10 minutos y son ingeridas por los organismos en el lapso de 20-30 minutos (Jones *et al.*, 1997a,b). Lo anterior justifica la estimación de la retención o lavado de materiales dentro de ese tiempo (Bengtson,1993 ; López-Alvarado *et al.*, 1994).

El proceso de emulsificación, previo a la nebulización, estuvo determinado por la calidad de los macroingredientes, que de una u otra forma promovieron la adsorción de la molécula de proteína a la interfase aceite-agua. Esta adsorción pudo afectar la emulsificación de la fase aceite, la naturaleza de la pared y las propiedades coloidales de las micropartículas recién formadas (Magdassi y Vinetsky, 1996). Estos macroingredientes fueron la pulpa de ostión, gónada de atún y maño de calamar, de entre los cuales la vitelogenina y colágeno fueron las proteínas predominantes. Éstas proteínas indirectamente demostraron tener una actividad superficial en términos de adsorción inicial y reducción de tensión superficial, que determinó la característica de la mezcla emulsificada y la formación de una pared alrededor de la dieta rindiendo microesferas dentro de una matriz de ficocoloide (Magdassi y Vinetsky, 1996).

Dado lo anterior, la disolución de sólidos refleja el lavado de las partículas elaboradas con estos ingredientes bajo el marco tecnológico de la nebulización.

Bajo este contexto, la disolución media de los alimentos nebulizados fue diferente en las tres concentraciones de κ -Carragenano (Tabla IV) resultando menor a una concentración de 5 % (Figura 4). Esta concentración es usualmente empleada para aglutinar alimento microparticulado (Kanazawa *et al.*, 1982) y está basado en la capacidad de reactividad de la proteína. Esta propiedad es debida a la presencia de grupos de esteres sulfatados del polisacárido y de los grupos cargados de las proteínas (Guist, 1990). Una explicación al aumento de la disolución media después de 60 minutos es la fragmentación de los caps en la pared de las microesferas debido a la hidratación con agua de mar (Figura 2).

La disolución de sólidos del alimento nebulizado ligado con Alginato de Calcio (ALGIN) permitió evaluar tres parámetros: concentración de CaCl_2 como agente gelificante, pH y la concentración de ALGIN. Estas tres variables caracterizan a este ficocoloide como térmicamente irreversible (Guist, 1990). Sin embargo, éstas a su vez dependen de la composición del ALGIN, es decir, de la proporción de ácido manurónico y gulurónico, siendo este último, el responsable de la formación del gel y el que rinde mejores propiedades mecánicas (Heyraud *et al.*, 1990). En este estudio, se encontró que la disolución media de sólidos fue homogénea a las dos concentraciones de agente gelificante y a los dos pH probados (Tabla V). Lo anterior coincide con lo descrito por Heyraud *et al.*, 1990, pues como se mencionó anteriormente, el factor determinante en la gelificación es la concentración del ácido alginico, el cuál incidió directamente en la formación de la matriz

donde se incluyeron los macroingredientes (Tabla V). Por otro lado, el tiempo de exposición al agua de mar tiene un efecto en la disolución media ya que el alginato absorbe agua rápidamente (Guist, 1990) y esta produce como consecuencia la fracturación y escisión de los caps y permeabilidad a través de los poros (Figura 3).

Dado el modelo estadístico empleado en el diseño experimental, se encontró que las interacciones de primer, segundo y tercer orden fueron significativas, es decir, hubo dependencia entre los factores probados, no existió paralelismo dado el análisis de las interacciones por separado (Tabla V). Sin embargo, existieron alimentos con disolución de sólidos a los 30 minutos mayores de 50% (Figura 5) siendo estos valores elevados como para considerarlos posteriormente en los análisis de morfología. El hecho de escoger al alimento AF5 se basó en presentar una menor disolución de sólidos a los 60 minutos (Figura 5).

La morfología en general de todos los alimentos analizados fue similar. La geometría externa recurrente fue de partículas esféricas con indentaciones poco profundas, propias de la nebulización (Rosemberg *et al.*, 1988). En la mayoría de las microesferas existió la presencia de caps, escasa formación de poros y fracturas (Figura 2 y 3). Rosemberg *et al.*, 1988, reportaron que la formación de los dimples o indentaciones son el resultado de la pérdida de agua de las gotas deshidratadas en las primeras fases del proceso. La formación de éstas estructuras está ligada también a la aparición de caps, una característica recurrente en este estudio. Para éstas, un enfriamiento lento pero con temperatura interna mayor pudo ser el proceso de formación, esto es, el calentamiento de

gas o vapor atrapado dentro de la esfera es muy rápido y el crecimiento externo del cap es más rápido que el encogimiento debido a la pérdida de agua.

La caracterización fisicoquímica permitió reducir los alimentos, que hasta este punto son el CF3y AF5, para el caso del carragenano y alginato, respectivamente. Sin embargo, como se estableció anteriormente, se consideró interesante agregar al tratamiento SL o sin ligante, pues se encontró que éste presentó una viscosidad adecuada y la misma proporción de sólidos y proteínas que los otros alimentos. Aunque este trabajo no identificó a la proteína causante de la emulsificación, es probable que la vitelogenina presente en la gónada de atún y ostión, así como el colágeno presente en el calamar y jaiba actuaron para propiciar el sistema de emulsión estabilizada (Magdassi y Vinetsky, 1996). Precisamente, éstas propiedades permiten explicar las distribuciones de tamaño de partículas. Al respecto, Benoit *et al.* (1996) mencionan que la presión del aire comprimido, el diámetro interno del atomizador, la viscosidad y la tasa de flujo de la solución a nebulizar producen una distribución gaussiana monodispersa. En este estudio, todas esas condiciones se mantuvieron constantes, salvo la viscosidad. Por lo que este parámetro, así como la configuración en solución de los ficocoloides permitió explicar los resultados. De hecho, el alimento SL presentó el menor tamaño seguido por el CF3 y, por último, el AF5 (Tabla VI). Los dos primeros presentaron una distribución mesokurtica, ya que los deciles de 90% no pasaron de 50 μm , mientras que el tratamiento AF5 resultó en una distribución platikurtica (Tabla VI). El peso molecular de los ficocoloides puede servir como una estimación de la viscosidad a través de la ecuación de Mark-Houwink, por lo que para KAR y ALGIN, se reporta el intervalo de 100 000 a 500 000 (Heyraud *et al.*, 1990), teniendo

mayor viscosidad intrínseca el KAR. De esta manera, el tratamiento SL, sin ficocoloides, presenta una menor viscosidad, comparada a los otros alimentos, por lo que al momento de la atomización, la turbina proyectó partículas más finas (Benoit *et al.*, 1996). En el caso de KAR, no se empleó iones para producir la gelificación, pues se ha visto que este polielectrolito forma complejos proteinizados (Guist *et al.*, 1990). De esta forma, la conformación de KAR en solución es la de dímeros helicoidales que con temperaturas altas puede mantenerse. Así, en el proceso, el tratamiento con KAR pudo presentar menor viscosidad y facilitar la nebulización, produciendo partículas cercanas a 10 μm . En el caso de ALGIN, la gelificación con CaCl_2 permitió la formación del llamado modelo de caja de huevos, en donde los segmentos de la cadena de Poliguluronato envuelven a los iones Calcio, como "huevos" en "cajas de huevos" (Heyraud *et al.*, 1990). Estos geles de alginato forman agregados voluminosos que aumentan la viscosidad y volumen. Como consecuencia al proceso empleado en este trabajo, la gelificación del alginato pudo producir los tamaños de partículas más grandes.

El análisis proximal y contenido de energía del alimento nebulizado mostro una mayor proporción de proteínas, lípidos y carbohidratos que la formula basal, siendo más evidente para los segundos (Tabla II y VII). Estos resultados son coherentes pues forman parte de la incertidumbre de las técnicas empleadas. El alimento presentó un adecuado nivel de energía derivada de las proteínas pues es similar al reportado para alimento artificial, *Artemia* y suplementos alimenticios. Sin embargo, el nivel energético producido por los lípidos es muy inferior al referido para *Artemia* y microalgas, pero mayor para el alimento artificial comercial. La discrepancia de la alta proporción de carbohidratos se debe a que

se estima a partir del extracto libre de Nitrógeno, que es producto de la sustracción de las determinaciones de proteínas, lípidos y cenizas.

IV.2. Evaluación biológica del alimento nebulizado

De acuerdo a Sorgeloos y Léger (1992), Bentgson (1993) y Jones *et al.* (1993), el reto del larvicultivo es la producción de organismos que sean similares a los de la naturaleza. Las técnicas actuales de larvicultivo residen en el mantenimiento de organismos a altas densidades en donde se puede ocasionar altas mortalidades derivadas por el deterioro de la calidad de agua y problemas ocasionados por la llamadas etapas críticas, causando grandes pérdidas económicas. Para esto, el desarrollo de dietas artificiales pueden potencialmente disminuir la mala calidad de agua y problemas patológicos, así como reducir los altos costos del alimento vivo (Wilkenfeld, 1992).

Bajo este enfoque, es digno mencionar que este estudio abordó un esquema que ya se había planteado desde los trabajos de Hudinaga (1942) y que se le denominó el método de cultivo en comunidad (Simon, 1978, Mohamed *et al.*, 1982; Kontara *et al.*, 1986), el cuál Jones *et al.* (1997c) modificaron imponiéndole restricciones como tratamiento previo de agua, inoculación de una sola dosis de microalgas vivas, no recambio de agua y dosificación controlada del alimento. El esquema de este último trabajo tiene la premisa de estimular la actividad enzimática del intestino primitivo de la larvas para la adecuada digestión de la proteína proporcionada por el alimento artificial (Abubakr y Jones, 1992; Jones *et al.*, 1993; Le-Vay *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1994; Kumlu y Jones, 1995; 1997; Jones *et al.*, 1997a,b; Puello-Cruz, 1996). En particular dos puntos se deben tocar al

respecto de las larvas de camarón blanco: i) Según Puello-Cruz, 1996 y Jones *et al.*, 1997a, las larvas de esta especie tiene tendencias carnívoras por lo que la adición de compuestos que estimulen la actividad enzimática es imprescindible para la digestión de alimento artificial y ii) que las enzimas digestivas están adaptadas a las fuentes de proteínas y a la calidad de los carbohidratos, por lo que su inducción a la calidad del alimento en las larvas es independiente del desempeño del crecimiento (Le-Moullac *et al.*, 1994). En la evaluación realizada se agregó $100 \text{ cél } \mu\text{L}^{-1}$ como dosis única de microalgas vivas, que representa 3.3 veces más por lo recomendado por Jones *et al.* (1997c), con el fin de lograr una adecuada inducción de enzimas digestivas de las zoeas de camarón (Puello-Cruz, 1996) y proporcionar alimentos a las larvas que presentaron atraso en su última muda naupliar.

Los indicadores objetivos de la calidad de las postlarvas criadas bajo el esquema de esta investigación (Tabla VIII), toman criterios como sobrevivencia, duración del ciclo larval y peso seco, probados por Kuban *et al.* (1983) y Castille *et al.* (1993) para no causar confusión con las pruebas de estrés (Hernández-González, 1997). Así, la sobrevivencia obtenida con los alimentos probados fueron equivalentes al control, aunque entre ellos el mejor fue el tratamiento CF3 (Tabla VIII). Lo anterior es un resultado esperado pues esta igualdad ha sido reportada por otros investigadores en crianzas semejantes con otros peneidos (Kanazawa *et al.*, 1982; Jones *et al.*, 1987; Galgani y AQUACOP, 1989; Bautista *et al.*, 1989; Kurmaly *et al.*, 1989; Teshima *et al.*, 1991; Amjad y Jones, 1992 a,b; Le-Vay *et al.*, 1993; Teshima *et al.*, 1993; Kumlu y Jones, 1995). La sobrevivencia media obtenida con el alimento control (algas + artemia) es baja pero dentro del intervalo de la especie (51.3 ± 12 vs. 83.86 ± 7.9 %) según lo reportado por Smith *et al.*, 1992. La variabilidad se

puede deber a la calidad nutricional y la concentración de las especies de microalgas empleadas (Simon, 1978; Brown *et al.*, 1997). En cuanto a la sobrevivencia obtenida con los alimentos elaborados es probable que el tamaño del alimento jugó un papel importante al finalizar los subestadios mysiales. En el caso del tratamiento SL que presentó el menor tamaño de partícula (Tabla VI), es probable que se incrementó el grado de dificultad de la captura raptorial de las microesferas, esto es, la larva debió invertir mayor gasto energético para poder atrapar una mayor cantidad de partículas alimenticias lo que ocasiona un desgaste del punto de saturación de reserva (PSR) y conduce a una muda no muy exitosa (Gore, 1985). Esto se traduce en una sobrevivencia baja (Angers y Dawirs, 1981), ya que ésta es prioritaria para la distribución de la energía asimilada para la muda (Knowlton, 1974).

Como se mencionó anteriormente, se puede encontrar equivalencia en la sobrevivencia entre alimentación artificial y vivo, pero en crecimiento es común hallar desigualdad. En este sentido, las larvas mantenidas con el alimento vivo presentaron mejor crecimiento en peso y longitud, aunque para el primer caso sólo fue significativamente diferente al tratamiento SL (Tabla VIII). Kuban *et al.*, 1985 concluyeron que el peso seco de los organismos es el mejor indicador del valor nutricional de una dieta larvaria. Bajo este contexto, Smith *et al.*, 1992 indicaron que el intervalo del peso seco de decapoditos de esta especie es de 100 a 150 μg , con un promedio de $127.5 \pm 17.58 \mu\text{g}$, por lo tanto, los alimentos CF3, SL y control están dentro del intervalo reportado. El crecimiento en longitud presentó el mismo patrón arriba descrito para los organismos a los que se les proporcionó alimento vivo. Sin embargo, sólo el tratamiento AF5 lo igualó (Tabla VIII).

Esta discrepancia del crecimiento puede explicarse no por razones nutricionales sino por factores externos. Kitani (1993) reveló que los decapoditos de esta especie capturadas en el mar presentan rostros más cortos que los criados en laboratorio; mientras que Kuban *et al.*, 1985 y Lester, 1988 atribuyeron a factores genéticos y maternos las diferencias en las tasas de crecimiento de las larvas de esta especie. Es posible que los factores descritos por esos autores hayan intervenido en el crecimiento en longitud, aunque también es probable el error en la medición de la longitud del caparazón de los animales.

Galgani y AQUACOP, 1989; Castille *et al.*, 1993 y Jones *et al.*, 1997c coincidieron en mencionar que la duración del ciclo larval es un indicador de la calidad de la postlarva. La duración del ciclo larval puede durar 9 a 12 días, aunque 10 días es el tiempo recurrente bajo el régimen de alimentación natural (Op. Cit., L. Ottogalli, Com. pers. Aquanova SA de CV, Mazatlán, Sin.). Jones *et al.* (1997c) reportaron 12 días de duración del cultivo larvario cuando emplearon alimento microencapsulado (MED) más *Artemia*, y un decremento de un día cuando utilizaron extractos de microalgas incorporados en el alimento microencapsulado en comparación contra MED sólo. En este trabajo, se observaron decapoditos a partir del día 9 de cultivo y se prefirió suspenderlo en la mañana del día siguiente por efecto del canibalismo. La última muda larval sucedió en la noche y se prolongó durante el décimo día. Los resultados indican que los tratamientos con alimento artificial abreviaron la última muda larval mejor que el alimento vivo (Tabla VIII). Al respecto, la calidad y cantidad de lípidos incorporados en el alimento artificial pudieron haber jugado un papel importante en la cronología del desarrollo larvario (Teshima *et al.*, 1983a,b, 1991; Kanazawa *et al.*, 1985; Koshio *et al.*, 1992). McConaughy (1985)

mencionó que estos compuestos forman parte muy importante de lo que se denomina PSR o el punto en el desarrollo larval en donde se acumulan reservas nutricionales que permiten la muda al siguiente estadio (Angers y Dawirs, 1981). Aplicando éstas hipótesis al presente estudio, se deduce la relación directa entre el PSR y tasa metamórfica, basado en que mientras más rápido se alcance el PSR mínimo, independientemente de la concentración de alimento, el animal entra en el ciclo de muda, un paso obligado para el crecimiento a largo plazo (McConaughy, 1985), esto es, los alimentos artificiales probados alcanzaron el PSR mínimo antes que el alimento vivo, de tal manera, que aceleraron el ciclo de muda y esta pudo ser la causa de la tasa metamórfica encontrada en este ensayo.

Los resultados, aquí obtenidos, coinciden con lo reportado para otras especies de peneidos en donde el uso de carragenano al 5% como ligante es considerado como el mejor (Bautista *et al.*, 1989 ; Koshio *et al.*, 1989). Las micropartículas así desarrolladas para larvas de peneidos no son sujetas a una selectividad (Marín-Magán y Cañavate, 1995) por lo que no representan un problema en la ingestión del alimento (Villamar y Brusca, 1987). Por otro lado, la digestibilidad de la matriz de carragenano pudo mejorarse debido a la presencia de carragenasas, que son sintetizadas sólo por bacterias marinas presentes en el intestino, de ahí que este ligante es apropiado para especies marinas o salobres (Gawlicka *et al.*, 1996). Lo anterior pudo haber jugado un papel muy importante durante la evaluación biológica y determinado el grado de éxito de la dieta artificial ligada con carragenano.

III.3. Producción de metabolitos durante la crianza larvaria

En sistemas intensivos de ciclo cerrado, en donde el alimento es el constituyente más importante de entrada de energía, la descomposición de los compuestos nitrogenados es de particular importancia ya que el amoníaco, nitrito, y nitrato son tóxicos para los organismos (Muir y Sutton, 1994)

Jones *et al.* (1997c), demostraron que el agua de mar filtrada a 5 μm ., con el fin de excluir microalgas pero incluir bacterias, es útil en el reemplazo de microalgas con alimento microencapsulado (MED) a nivel laboratorio y comercial. De hecho, Ottogalli, 1991, 1992 ha reportado crianzas larvarias exitosas mantenidas sólo con MED y agua oceánica de excelente calidad en Nueva Caledonia. La estrategia empleada en este estudio utiliza el enfoque planteado por Jones *et al.* (1997c), con el fin de mejorar el balance de la comunidad microautotrófica del agua de cultivo a través de la adición de la dosis única inicial de microalgas vivas, el alimento artificial, y sin recambio de agua. El balance de la comunidad de microorganismos definirá el grado de acumulación o remoción de las formas nitrogenadas más tóxicas en el agua.

La concentración de nitrito se incrementó de manera constante en todos los alimentos al cabo de cinco días. Esto demuestra el grado de oxidación del amoníaco, logrado por las comunidades desarrolladas en las unidades experimentales. Al final del experimento, la concentración de este metabolito se incrementó en un orden de magnitud siendo mayor en los tratamientos AF5 y alimento vivo (Tabla IX) rebasando los niveles seguros recomendados para la especie (Treece y Fox, 1993) pero sin llegar a los niveles incipientes letales (Frias-Espericueta *et al.*, 1998). La concentración de nitrito a este tiempo

puede referirse al grado de conversión de amonio a nitrito alcanzado por los procesos autotróficos allí realizados (Muir y Sutton, 1994).

La acumulación del amoniaco, el compuesto principal del metabolismo de las proteínas en organismos acuáticos, depende del pH y la temperatura. La concentración de amoniaco se comportó igual que el nitrito a los cinco días del experimento: el amoniaco mantuvo una concentración equivalente en los tratamientos con alimento superiores al alimento control (Tabla IX) denotando con ello que se produjo uniformemente en tales alimentos. Dicho patrón se mantuvo al final del ensayo. Los incrementos observados para los tratamientos con alimento artificial, 6 veces en los estadios de zoea y 3 veces en las mysis, hacen suponer que la actividad de las enzimas digestivas proteolíticas del intestino medio de las larvas inducida por la alta concentración de microalgas fue eficiente, es decir, la dieta fue metabolizada exitosamente su totalidad. Si se compara la acumulación de amoniaco en el alimento vivo, es evidente que su tasa de acumulación fue constante, 3 veces en cada estadio larval, lo que significa que en el estadio zoea, las proteínas de las microalgas fueron igualmente digeridas que las de la *Artemia*, un patrón digestivo propio de las especies carnívoras (Puello-Cruz, 1996 ; Jones *et al.*, 1997a)

La ecuación de balance de masa para sistemas cerrados, empleado como una estimación burda de la remoción de amoniaco por la comunidad bacteriana durante el ensayo indicó que en el tratamiento alimento vivo, bajo las suposiciones ya planteadas, se presentó el mayor consumo de este metabolito seguido por el tratamiento AF5 y CF3. Ante la imposibilidad de no consumir al amoniaco en la tasa encontrada para el alimento vivo y producir una sobrevivencia ligeramente mayor que el alimento control, es probable que

realizar un sólo recambio de agua después del quinto día sea recomendable al emplear este régimen alimenticio.

7. CONCLUSIONES

.- La disolución media de sólidos del alimento nebulizado con κ -Carragenano depende de la concentración de este ficocoloide y tiempo. La incorporación de 5% en base seca de este hidocoloide disminuye la disolución media de sólidos.

.- La disolución media de sólidos del alimento nebulizado con Alginato de Calcio depende de la concentración de este ficocoloide, y de las interacciones entre el agente gelificante (CaCl_2), pH y tiempo. La incorporación de 2.0% en base seca de este hidocoloide un pH de 3.5 y 280 mg de CaCl_2 proporcionó la menor disolución media de sólidos.

.- La morfología general de las partículas fue esférica con indentaciones poco profundas con un intervalo medio de 8.45 a 27.28 μm . Los alimentos presentaron el siguiente perfil, en base seca : 1.78 % de proteínas, 19.50% de lípidos, y 21.95 % de carbohidratos.

.- La sobrevivencia de las postlarvas mantenidas con los alimentos nebulizados con ficocoloides fue igual a las alimentadas con el alimento vivo. El crecimiento en peso de las postlarvas resultó semejante entre el alimento vivo y alimento nebulizado con κ -Carragenano, sin embargo, el crecimiento en longitud fue lo contrario. La tasa metamórfica fue superior en las larvas mantenidas con alimento artificial. En base a esto, el alimento nebulizado con κ -Carragenano al % se considero el mejor régimen.

5.- Los alimentos nebulizados produjeron mas amonio que el alimento vivo, aunque no superaron los niveles seguros recomendados para la especie.

LITERATURA CITADA

- Abubakr, M .A. y D . A . Jones. 1992. Functional morphology and ultrastructure of the anterior midgut diverticulae of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978) larvae. *Crustaceana* 62 :142-158.
- Alexakis, T., D. K. Boadi, O. Qoung, A. Groboillot, I. O. Neill, D. Poncelet y R. J. Neufeld. 1995. Microencapsulation of DNA within Alginate microspheres and crosslinked Chitosan membranes for in vivo application. *Applied Biochem. And Biotech.* 50 : 93-106.
- Amjad, S. y D. A. Jones. 1992a. An Evaluation of Artificial Larval Diets Used in the Culture of Penaeid Shrimp Larvae *Penaeus monodon* (Fabricius). *Pakistan J. Zool.* 24(2):135-142.
- Amjad, S. y D. A. Jones. 1992b. A Review of Shrimp Nutrition and Artificial Larval Diets. *Marine Res. (India).* 1(1):97-110.
- Anger, K. y B. R. Dawirs. 1981. Influence of starvation on the larval development of *Hyas arenaeus* (Decapoda, Majidae). *Helgol. Wiss. Meer.* 32 :36-54.
- Association of Official Analytical Chemist. 1990. *Official Methods of Analysis*. Vol. I. 15 edition. Washington, D. C. 69-88 p.
- Bautista, M. N., Millamena, O. M., y Kanazawa, A. 1989. Use of Kappa-Carrageenan microbound diet (C-MBD) as feed for *Penaeus monodon* larvae. *Mar. Biol.* 103:169-173.

- Bengtson, D. A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. J. World Aquacult. Soc. 24(2):285-293.
- Benoit, J. P., H. Marchais, H. Rolland y V. Van-Velde. 1996. Biodegradable microspheres: Advances in production technology. En: S. Benita (Ed.). Microencapsulation: Methods and Industrial Applications. Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA. 35-62 p.
- Benneman, J. R. 1992. Microalgae aquaculture feeds. J. Applied Phycol. 4 :233-245.
- Biedenbach, J. M., L. L. Smith, A. L. Lawrence. 1990. Use of a new spray-dried algal product in penaeid larviculture. Aquaculture 86 :249-257.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman y G. A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151: 315-331.
- Cary, S. C., J. T. Lovette, P. J. Perl y M. E. Huntley. 1992. A microencapsulation technique for introducing pure compounds in zooplankton diets. Limnol. Oceanogr. 37(2): 404-413.
- Castille, F, L., Samocha, T. M., Lawrence, A. L., He, H., Frelier, P., y Jaenike, F. 1993. Variability in growth and survival of early postlarval (*Penaeus vannamei* Boone 1931). Aquaculture 113: 65-81.
- Chamberlain, G. W. 1995. Frontiers in shrimp nutrition research. p. 108-117. En: C. L. Browdy y J. S. Hopkins (Eds.). Swimming through troubled waters. Proc. of the spec. session on shrimp farming. World Aquacult. Soc. San Diego, CA.

- Chang, T. M. S., F. C. McIntosh y S. C. Mason. 1966. Semipermeable aqueous microcapsules I. Preparation and properties. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 44: 115-128.
- Chitravadivelu, K. 1992. Artificial penaeid larval diets. *J. Nat. Sci. Coun. Sri Lanka* 20(1):1-6.
- Chu, K. H. 1991. Larval rearing of the shrimp *Metapenaeus ensis* (de Hann) and *Penaeus chinensis* (Osbeck) on artificial feeds. *Aquaculture and Fish. Manage.* 22:473-479.
- Cordero-Esquivel, B. y D. Voltolina. 1996. Nutritional value of preserved microalgae for subadults *Mytilus galloprovincialis*. *J. World Aquaculture Soc.* 27(1): 113-118.
- Cruz-Rique, L. E. y J. Guillaume. 1987. Squid protein effect on growth of four penaeids shrimps. *J. World Aquaculture Soc.* 18(4): 209-217.
- Dall, W., B. J. Hill, P. C. Rothlisberg y D. J. Staples. 1990. The biology of the Penaeidae. *Adv. Mar. Biol.* 27:1-489.
- Damon, R. A. y W. R. Harvey. 1987. Experimental designs, ANOVA and regressions. Harper and Row Pub. New York, N. Y. U. S. A. 508 p.
- Day, R. W., y G. P. Quinn. 1989. Comparisons of treatments after an analysis of variance in Ecology. *Ecol. Monogr.* 59(4): 433-463.
- Dziezack, J. D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology* 42:136-148
- Frías-Espericueta, M. G., F. Paéz-Osuna y M. R. Harfush-Melendez. 1998. Determinación de la LC50 por amonio (NH₄ y NH₃) en postlarvas de *Penaeus vannamei*. Abstract.

- Mem. Del XI Congr. Nal. De Oceanografía. 26-30 abril, 1998. Ensenada, B. C, México.
- Galgani, M. L. y AQUACOP. 1989. Essais de substitution des algues vivantes par des microparticules inertes pour l'alimentation des larves Zoé de crevettes péneídes. *Aquaculture* 69: 115-127.
- García-Prisco, L., y M. C. Baéz-Dueñas. 1994. Diseño y evaluación de un alimento artificial para larvas de camarón azul. *Oceanología* 2: 25-41.
- Gawlicka, A., L. McLaughlin, S. S. O. Hung y J. De-la-Noe. 1996. Limitations of carrageenan microbound diets for feeding white sturgeon, *Acipenser trasmontanus*, larvae. *Aquaculture* 141: 245-265.
- Gore, R. H. 1985. Molting and growth in decapod larvae. En : A : M. Wenner (Ed.) *Larval Growth*. A. A. Balkema. Rotterdam, Netherland. 1-66 p.
- Guist, G. G. 1990. Applications for seaweed hydrocolloids in prepared foods. En: I. Akatsuka (Ed.). *Introduction to Applied Phycol.* SPB Academic Pub. The Hague, The Netherlands. 391-400p.
- Hernández-González, C. 1997. Determinación de la calidad de las postlarvas de camarón de diferente edad producidas en un laboratorio comercial. Tesis de Maestria. Facultad de Ciencias del Mar. USA. Mazatlán, Sin. 114 p.
- Heyraud, A., M. Rinaudo y C. Rochas. 1990. Physical and chemical properties of phycocolloids. En: I. Akatsuka (Ed.). *Introduction to Applied Phycol.* SPB Academic Pub. The Hague, The Netherlands. 151-176 p.

- Hudinaga, M. 1942. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus*. Jap. J. of Zoology X: 305-393.
- Huguenin, J. E. y J. Colt. 1989. Design and operations guide for aquaculture seawater systems. Dev. In Aquaculture and Fish. Sci. 20 : Elsevier sci. Pub. Amsterdam, The Netherlands.
- Jones, D. A. 1995. Frippak-The facts. A response to the article by P. R. Muir and D. C. Sutton. J. World Aquaculture Soc. 26(2): 220-222.
- Jones, D. A. 1998. Crustacean larval microparticulate diets. Rev. in Fish. Sci. 6(1-2):41-54.
- Jones, D. A., J. G. Munford y P. A. Gabbott. 1974. Microcapsules as artificial particles for aquatic filter feeders. Nature 247:233-235.
- Jones, D. A., T. H. Moller, R. J. Campbell, J. G. Munford y P. A. Gabbott. 1975. Studies on the design and acceptability of micro-encapsulated diets for marine particle feeders. I. Crustacea. 10th Eur. Symp. On Marine Biology. Ostend, Belgium. 17-23 Sept. 1975. Vol I : 229-239.
- Jones, D. A. A. Kanazawa y S. Abdel-Rahman. 1979. Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus*. Aquaculture 17:33-43
- Jones, D. A., K. Kurmaly y A. Arshad. 1987. Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. Aquaculture 64 : 133-146.
- Jones, D. A., M. S. Kamarudin y L. Le-Vay. 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. J. World Aquaculture Soc. 24(2) : 199-210.

- Jones, D. A., M. Kumlu, L. Le-Vay y D. J. Fletcher. 1997a. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae : a review. *Aquaculture* 155 :285-295.
- Jones, D. A., A. Yule y D. L. Holland. 1997b. Larval Nutrition. En : D. Conklin, L. R. D'abramo y D. M. Akiyama (Eds.) *Crustacean Nutrition. Adv. In World Aquaculture Vol. 6.* World Aquaculture Soc. Baton Rouge, LA. USA.
- Jones, D. A., P. Bridson, M. Freeman, J. Latchford, C. A. Martinez-Palacios, N. Misciatelli, F. A. L. T. Ribeiro, S. Sirvas-Rowlands y F. Simoes. 1997c. Progress in the Use of Artificial Feeds in Penaeid Larval Cultures. *J. Mar. Biotechnology.* In press.
- Kanazawa, A. 1990. Microparticulate Feeds for Penaeid Larvae. *Aquacop-IFREMER. Actes de Coll.* 9:395-404.
- Kanazawa, A., S. Teshima y S. Tokiwa. 1977. Nutritional requirement of prawn. VII. Effect of dietary lipids on growth. *Nippon Suisan Gakkaishi* 43 : 849-856.
- Kanazawa, A., S. Teshima, H. Sasada y S. Abdel-Rhaman. 1982. Culture of the prawn larvae with microparticulate diets. *Bull. Of the Jap. Soc. of Sci. Fish.* 48(29) : 195-199.
- Kanazawa, A., Teshima, S., y Sasada, H. 1983. Nutritive Value of Dietary Cholesterol and other Sterols to Larval Prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 31:159-167.
- Kanazawa, A., S. Teshima y M. Sakamoto. 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50 : 39-49.

- Kitani, H. 1986. Larval Development of the White Shrimp *Penaeus vannamei* BOONE Reared in the Laboratory and the Statistical Observations of its Naupliar Stages. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 52(7):1131-1139.
- Kitani, H. 1993. Morphology of postlarvae of the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. Nippon Suisan Gakkaishi 59(2) : 223-227.
- Knowlton, R. E. 1974. Larval development processes and controlling factors in decapod Crustacea with emphasis on Caridea. Thalassia Jugosl. 10 : 138-158.
- Kontara, E. K., W. H. Setyatim y Harsito. 1986. The effects of various artificial plankton in combination with *Tetraselmis chuii* in the growth and survival of *Penaeus monodon* larvae. Bull. Brackishwater Aquacul. Dev. Center 8(2) : 86-93.
- Koshio, S., A. Kanazawa, S. Teshima y J. D. Castell. 1989. Nutritional evaluation of crab protein for larval *Penaeus japonicus* fed microparticulate diets. Aquaculture 81 : 145-154.
- Koshio, S., A. Kanazawa y S. Teshima. 1992. Search for effective protein combination with crab protein for the larval kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Nippon Suisan Gakkaishi 58(6) : 1083-1089.
- Kraus, N. 1996. Experiencias del cultivo de camarón en Ecuador. Mem. del Foro Int. Camaricultura '96. Mazatlán, Sin., Agosto 1996.
- Kuban, F. D., J. S. Wilkenfeld y A. L. Lawrence. 1983. Survival and growth of *Penaeus setiferus* L. and *Penaeus aztecus* Ives larvae fed *Artemia* beginning at the protozoa-two substage versus the mysis-one substage. J. World Aquaculture Soc. 14 : 38-48.

- Kuban, F. D., A. L. Lawrence y J. S. Wilkenfeld. 1985. Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. *Aquaculture* 47 : 151-162.
- Kumlu, M. y D. A. Jones. 1995. The Effect of Live and Artificial Diets on Growth, Survival, and Trypsin Activity in Larvae of *Penaeus indicus*. *J. of the World Aquaculture Soc.* 26(4):406-415.
- Kumlu, M. y D. A. Jones. 1997. Digestive protease activity in planktonic crustacean feeding at different trophic levels. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 77(1) : 159-165.
- Kurmaly, K., D. A. Jones, A. B. Yule y J. East. 1989. Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa I to postlarva I, on live feeds, artificial diets and on combinations of both. *Aquaculture* 81 : 27-45.
- Le-Moullac, G., A. Van-Wormhoudt y AQUACOP. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Res.* 7 : 203-210.
- Lester, L. J. 1988. Differences in larval growth among families of *Penaeus stylirostris* Stimpson and *Penaeus vannamei* Boone. *Aquacul. And Fish, Management* 19 : 243-251.
- Le-Vay, L., A. Rodríguez, M. S. Kamarudin y D. A. Jones. 1993. Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture* 118 : 287-297.

- Levine, D. M., S. D. Sulkin y L. Van-Heukelem. 1983. The design and development of microencapsulated diets for the study of nutritional requirements of brachyuran crab larval. En : C. J. Berg (Ed.). *The Culture of Marine Invertebrates : Selected readings*. Hutchinson Ross, 193-203 p.
- Losordo. T. M. y H. Westers. 1994. System carrying capacity and flow estimation. En : M. B. Timmons y T. M. Losordo (Eds.). *Aquaculture water reuse systems : Engineering design and management*. Dev. Aquaculture and Fish. Sci. 27. Elsevier Sci. Pub. The Hague, The Netherlands. 101-124 p.
- López-Alvarado, J., C. J. Langdon, S. Teshima y A. Kanazawa. 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline aminoacids on leaching in larval feeds. *Aquaculture* 122 : 335-346.
- Magdassi, S. y Y. Vinetsky, 1996. Microencapsulation of oil-in-water emulsions by proteins. En: S. Benita (Ed.). *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA. 21-27 p.
- Marín-Magán, V. y J. P. Cañavate. 1995. Fluorometric determination of selectivity between live and inert food by *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture* 134 : 307-311.
- Masters, K. 1985. *Spray Drying Handbook*. 4th. ed. John Wiley y Sons. New York, NY. USA.
- Maugle, P. D. 1993. Enhancement of postlarval shrimp survival from capture to pond in Ecuador and Panama. p. 211-253. En: J. P. McVey (Ed.). *CRC Handbook of mariculture 2nd*. Ed. Vol. I. Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Raton, FLA, USA.

- McConaughy, J. R. 1985. Nutrition and Larval Growth. En : A : M. Wenner (Ed.) Larval Growth. A. A. Balkema. Rotterdam, Netherland. 127-154 p.
- Mohamed, K. H., M. S. Muthu, N. N. Pillai, S. A. Ali y S. K. Pandian. 1982. A simplified hatchery technique for mass production of penaeid prawn seed using formula feed. Bull. CMFRI ? : 321-332.
- Mourente, G. y A. Rodríguez. 1997. Effects of salinity and dietary DHA (22:6n-3) content on lipid composition and performance of *Penaeus kerathurus* postlarvae. Mar. Biol. 128:289-298.
- Muir, P. R. y D. C. Sutton. 1994. Bacterial degradation of microencapsulated feed used in larval culture. J. World Aquaculture Soc. 25(3) : 371-379.
- Ottogalli, L. 1991. Total substitution of microparticles for algae for *Penaeus stylirostris* larval rearing in New Caledonia. . J. World Aquaculture Soc. 22 : 46A.
- Ottogalli, L. 1992. Nueva gestión del agua en las crías de Peneidos en la Nueva Caledonia. Mem. Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 87-91.
- Parsons, T. R., Y. Maita y C. M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press Ltd. pp. 173. Oxford, England.
- Pedroza-Islas, R., E. J. Carter-Vernon, C. Durán, G. González y E. E. Aguilar. En prensa. Wall microstructure and characteristics of encapsulated crustacean diet by mesquite, arabic and maltodextrin mixtures. Aquacul. Eng.
- Phillips, M. J., C. Kwei y M. C. M. Beveridge. 1993. Shrimp culture and the environment: Lessons from the world's most rapidly expanding warmwater aquaculture sector.

- En: R. S. V. Pullin, H. Rosenthal y J. L. MacClean (Eds.). Environment and Aquaculture in Developing Countries. ICLARM Conf. Proc. 31:171-197.
- Ponce-Palafox, J. T., J. Vernon-Carter, J. López-Munguía, T. Castro-Barrera y E. Mazon-Trejo. 1995. Utilización de microparticulas de goma de mesquite (*Prosopis*) en la preparación de dietas para larvas de *Macrobachium rosebergii* (De Man). En : J. Calderón (Ed.). Mem. II Congr. Ecuatoriano de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador. 261-265 p.
- Polk, A. E., B. Amsden, D. J. Scarratt, A. Gonzal, A. O. O. Khamafe y M. F. A. Goosen. 1994. Oral delivery in Aquaculture : Controlled release of proteins from Chitosan-Alginate microcapsules. Aquacul. Eng. 13 : 311-323.
- Preston, N. P., M. A. Burford. I. E. Coman y P. C. Rothlisberg. 1992. Natural diet of larval *Penaeus merguensis* (Decapoda : Penaeidae) and its effect on survival. Mar. Biol. 113 : 181-191.
- Puello-Cruz, A. C. 1996. Trypsin activity during larval development of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* shrimp (Crustacea: Decapoda). M. S. thesis. School of Ocean Sciences. UCNW. Bangor, Wales. UK.
- Puello-Cruz, A. C. 1998. Requerimientos nutricionales de las larvas de camarón. Notas del Curso Int. sobre alimentación de camarón. ASA. USB. UANL. CIAD. Mazatlán, Sin.
- Reyes-Quintero, T. y J. Reyes-Moreno, 1996. Esquemas de financiamiento y apoyo a la camaronicultura en México. Mem. del Foro Int. Camaronicultura '96. Mazatlán, Sin. Agosto, 1996.

- Rodríguez, A., L. Le-Vay, G. Mourente y D. A. Jones. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.* 118 : 45-51.
- Rosemberg, M., Y. Talmon, e I. J. Kopelman. 1988. The microstructure of spray-dried microcapsules. *Food Microstructure* 7:15-23.
- Rosemberg, M., I. J. Kopelman y Y. Talmon. 1990. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *J. Agric. Food. Chem.* 38 : 1288-1294.
- Rosenberry, B. 1997. Report on Mexican shrimp culture production. *Shrimp News*.
- Sierra, R. 1996. Experiencias en el cultivo de camarón cultivado en México. *Mem. del Foro Int. Camaronicultura '96, Mazatlán, Sin. Agosto, 1996.*
- Simon, C. M. 1978. The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use of a food for penaeid protozoa larvae. *Aquaculture* 14 : 105-113.
- Smith, L. L., T. M. Samocha, J. M. Biedenbach y A. L. Lawrence. 1992. Use of One-litter Imhoff Cones used in Larviculture Production. In: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices* (Fast, A. W., y Lester, L. J. eds.) *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 23. pp 287-300. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam, The Netherlands.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf, 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* 3rd. Ed. W. H. Freeman and Co. New York, N. Y. Usa. 881 p.
- Sorgeloos, P. y P. Léger. 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *J. World Aquaculture Soc.* 23(4) : 251-264.

- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie, 1960. Principles and Procedures of Statistics with special reference to the biological sciences. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, N. Y. U. S. A. 481 p.
- Sun, Z. M., D. Poncelet, J. Conway y R. J. Neufeld. 1995. Microencapsulation of lobster carotenoids within poly(vinyl alcohol) and poly(D,L-lactic acid) membranes. J. Microencapsulation.
- Tacon, A. G. J. 1987. The Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. A Training Manual. 1. The essential nutrients. FAO Field Doc. 2/E. GCP/RLA/075/ITA.
- Teshima, S. y A. Kanazawa. 1983a. Effects of several factors on growth and survival of the prawn larvae reared with microparticulate diets. Bull. Of the Jap. Soc. of sci. Fish. 49(2) : 1893-1896.
- Teshima, S., A. Kanazawa y H. Sasada. 1983b. Nutritional value of dietary cholesterol and other sterols to larval prawn, *Penaeus japonicus*, Bate. Aquaculture 31 : 159-167.
- Teshima, S., A. Kanazawa, M. Yamashita y S. Koshio. 1991. Rearing of larval prawn *Penaeus japonicus* with brown fish meal based diet. Nippon Suisan Gakkaishi 57(1) : 175.
- Teshima, S., A. Kanazawa, y S. Koshio. 1993. Recent Developments in the Nutrition and Microparticulate Diets of Larval Prawns. The Israeli J. of Aquaculture 45(4):175-184.
- Thies, C. 1996. A survey on microencapsulation processes. En : S. Benita (Ed.). Microencapsulation: Methods and Industrial Applications. Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA. 1-17 p.

- Trecee, M. y J. M. Fox. 1993. Design, Operation and Training Manual for an Intensive Culture Shrimp Hatchery (with emphasis on *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei*). Texas A & M Sea Grant College Program. Pub. TAMU-SG-93-505. pp. 187. College Station, TX, USA.
- Vernon-Carter, E. J. y P. Sherman. 1980. Rheological properties and application of mesquite tree (*Prosopis juliflora*) gum. J. Texture studies 11(4) :351-366.
- Villamar, D. F. y G. J. Brusca. 1987. Survival and growth of *Crangon nigricauda* (Decapoda, Caridea) raised on experimental diets. J. World Aquaculture Soc. 18 : 11-25.
- Villamar, D. F. y C. J. Langdon. 1993. Delivery of dietary components to larval shrimp (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. Mar. Biol. 115 : 635-642.
- Wilkenfeld, J. S., A. L. Lawrence y F. D. Kuban. 1985. Rearing penaeid shrimp larvae in small-scale system for experimental purposes. Proc. First Int. Biennial Conf. On warmwater aquaculture-Crustacea. BYU Hawaii campus. 9-11 Feb, 1983. 72-81 p.
- Wilkenfeld, J. S. 1992. Commercial Hatchery Status Report: An Industry Panel Viewpoint. In: Wyban, J. (ed.) Proc. Special Shrimp Farming Session. World Aquaculture Soc. Orlando, FLA, USA. 71-83.
- Wilkinson, L. 1987. SYSTAT: The system for statistics. SYSTAT Inc. Evanston, IL.
- Yúfera, M. y L. M. Lubián. 1990. Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture p. 209-227. En: I. Akatsuka (Ed.). Introduction to applied phycology. SPB Academic Pub. The Hague, The Netherlands.

Zar, J. H. 1984. Biostatistical analysis. 2nd Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ. USA.

334 p.