



República de Cuba

**Universidad de Cienfuegos
Facultad de Ciencias Agrarias**

**Alimentación de postlarvas de camarón blanco del
Pacífico *Litopenaeus vannamei* con dos especies de
diatomeas bentónicas, en diferentes concentraciones**

Tesis en opción al título de Ingeniero Agropecuario.

Autor: Xiomara Nelsa Vega Garcés

Tutores: MC. Rafael Curbelo Hernández

MC. Sylvia Leal Lorenzo

Cienfuegos, 2012

Para ver culminado un estudio como este muchas son las personas que entran, salen, bordean y hasta ignoran sus límites. Y todo eso es de agradecer. No se construyen sueños de la nada. Pero enlistar nombres siempre es riesgoso y por eso en este espacio sólo quiero hacer explícito mi reconocimiento a todos los que de una forma u otra contribuyeron.

Para todos, mi modesta pero sincera gratitud. En especial a mis tutores, profesores y compañeros de trabajo que brindaron su apoyo incondicional, así como a la Red Temática “Desarrollo y manejo sustentable de sistemas de producción acuícola” a través del proyecto “Caracterización de organismos acuáticos con potencial para la biorremediación de efluentes acuícolas”, integrada por grupos de investigación y cuerpos académicos de México y Cuba y aprobadas por el PROMEP de la Secretaría de Educación Pública de México, por el apoyo material en el desarrollo de los experimentos.

A todos

Muchas gracias

A mi madre, a mi padre, a mi esposo

En especial a mis hijos, para que le sirva de inspiración en su futuro

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue probar diferentes concentraciones de dos diatomeas bentónicas utilizadas en la alimentación de las primeras postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Las concentraciones ensayadas fueron, para *Navicula* sp. 20, 40, 60 x 10³ cel/mL y para *Amphora* sp. 8, 16, 25 x 10³ cel/mL. Se probaron de postlarvas 3 a 10 y se determinaron índices morfológicos, fisiológicos e inmunológicos, así como la supervivencia. Para el caso de *Navicula* sp. la mejor concentración fue a 40 x 10³ cel/mL que aportó una mayor supervivencia, incremento en peso y buen desarrollo. Los indicadores fisiológicos e inmunológicos no arrojaron diferencias significativas excepto en el caso de la cantidad de óxido nítrico que se vió favorecida con la mayor concentración de la microalga. Esto nos sugiere que a mayores concentraciones del alga hay una mayor defensa por parte de los organismos. En el caso de *Amphora* sp. el mejor porcentaje de supervivencia se observó con la concentración de 16 x 10³ cel/mL. Los niveles de glucosa estuvieron significativamente más altos en la mayor concentración que se probó. El resto de los indicadores, excepto la actividad fenoloxidasa, no tuvo efectos significativos. Debemos destacar que los indicadores inmunológicos fueron siempre más altos en el caso de *Amphora* lo que nos alerta de que esta especie ofrece muy buenas condiciones al sistema inmune de las postlarvas. Se concluye que *Amphora* sp., a 16 x 10³ cel/mL constituye un buen alimento para las postlarvas tempranas del camarón *L. vannamei*, favoreciendo sus indicadores morfológicos, fisiológicos, inmunológicos, supervivencia, así como representa un ahorro económico.

ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
INTRODUCCION.....	2
Problema de investigación.....	4
Hipótesis de Investigación.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.1. Cultivo de microalgas.....	5
1.2. Las diatomeas bentónicas.....	6
1.3. Alimentación de larvas y postlarvas de camarones.....	10
1.4. Indicadores de calidad.....	13
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOS	17
2.1. Especies utilizadas	17
2.2. Ensayos de alimentación	18
2.2.1. Cultivo de microalgas.....	18
2.2.2. Bioensayos con postlarvas.....	19
2.2.3. Indicadores morfológicos.....	22
2.2.4. Supervivencia.....	22
2.3. Análisis económico.....	23
2.7. Análisis estadístico.....	24
CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....	25
3.1. Indicadores morfológicos y supervivencia.....	25
3.2. Indicadores fisiológicos e inmunológicos.....	26
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....	29
4.1. Análisis estadístico.....	32
CONCLUSIONES.....	34
RECOMENDACIONES.....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

INTRODUCCIÓN

Las diatomeas bentónicas se consideran un grupo muy rico en diversas formas, géneros y especies, con un alto potencial para ser usado como fuente de alimento vivo, a organismos que se cultivan con interés comercial y que presenten hábitos bentónicos, al menos, en alguna fase de su ciclo de vida. Las especies más estudiadas están representadas por los géneros *Navicula* y *Nitzschia*, seguidas de *Amphora* (Siqueiros, 1994).

Las diatomeas bentónicas no sólo constituyen un alimento insustituible, en los estadios juveniles tempranos de abulón (Hahn, 1989; Mazón-Suástegui *et al.*, 1992), sino que también juegan un papel muy importante en el asentamiento larval de ellos (Searcy-Bernal *et al.*, 1992; Kawamura *et al.*, 1995; Araya *et al.*, 2010), de los erizos (Rahim *et al.*, 2004) y pepinos de mar (Ito y Kitamura, 1997).

Existen varios trabajos sobre las especies de microalgas bentónicas y las técnicas de su cultivo para moluscos (Roberts, 2001; Simental-Trinidad y Sanchez-Saavedra, 2003; Carbajal-Miranda *et al.*, 2005; Silva-Aciaras y Riquelme, 2008), sin embargo, son escasos los reportes para alimentar postlarvas de camarón que, al iniciar en esa etapa sus hábitos bentónicos, comienzan a alimentarse de estos organismos en su habitat natural e incluso en cautiverio (Sánchez *et al.*, 2002).

El primer reporte que refiere el uso de diatomeas bentónicas en postlarvas de camarón es el de Griffith *et al.* (1992), los de Peterson y Curiel (2002) y Leal *et al.* (2010), con postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, y también el de Curbelo *et al.* (2006) con *L. schmitti*, así como el de Khatoon *et al.* (2007) con postlarvas de *P. monodon*.

De forma general estos autores sugieren que la inclusión de diatomeas bentónicas en la dieta de las postlarvas constituye una valiosa fuente de alimento para estos organismos y su valor nutricional más importante es el alto contenido de lípidos que poseen (Griffith *et al.*, 1992), también pueden ser una alternativa en la sustitución de alimentos

artificiales, ya que se logra un aumento en la calidad del cultivo y con ello la sustitución de importaciones.

Hasta el momento, muchos productores suministran las diatomeas bentónicas de forma cualitativa, confiando en la experiencia y habilidad del cultivador, que la aplica por la coloración del cultivo (Almaguer *et al.*, 2004). Sin embargo Griffith *et al.* (1992) y Curbelo *et al.* (2006) pudieron sustituir el 100% del alimento artificial, ya que son los únicos reportes donde determinaron concentraciones y ajustes de las microalgas en la cría de las primeras postlarvas de camarón. De ahí que conocer sobre el empleo de diferentes diatomeas bentónicas y la concentración más adecuada resultaría de gran importancia, pues sus resultados se verán reflejados en la calidad del producto final.

La **Novedad científica** que aporta esta investigación está vinculada a todos los estudios básicos, que se harán por primera vez para la ciencia, donde se ofrecerán concentraciones adecuadas de estas especies de diatomeas para alimentar postlarvas de camarón, además de que aporta una metodología basada en criterios científicos. La alimentación a postlarvas de camarón *L. vanamei*, con estas diatomeas bentónicas y la caracterización de algunos indicadores bioquímicos por primera vez en Cuba, acrecentará el conocimiento de los productores tan necesarios para el desarrollo y optimización del cultivo de camarón en el mundo y en particular en Cuba.

El **Aporte teórico** se basa en los conocimientos que ofrece a la comunidad científica mundial sobre esta especie, tratada en cultivo para otros fines. Los resultados son de aplicación inmediata para la docencia de postgrado, ya que da elementos nuevos en cuanto a la alimentación de postlarvas de camarón.

La **Importancia práctica** radica en la obtención de metodologías de cultivo, no existentes hasta el momento, que ayudan a optimizar la explotación del cultivo de camarón en Cuba.

Problema de Investigación

¿Qué especie de diatomea bentónica es más idónea y a que concentración se puede emplear en la dieta de postlarvas tempranas de camarón *Litopenaeus vannamei* en cultivo?

Hipótesis de la Investigación

La concentración adecuada en la alimentación de postlarvas tempranas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con diatomeas bentónicas tiene un efecto benéfico en la morfología, fisiología y sistema inmune de estos animales.

Para dar respuesta a la hipótesis de investigación nos trazamos los siguientes objetivos:

Objetivo General

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de dos especies de diatomeas bentónicas en la alimentación de postlarvas tempranas del camarón *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos específicos

Determinar las concentraciones adecuadas de dos especies de diatomeas bentónicas (*Navicula* sp. y *Amphora* sp) para ser utilizadas en la alimentación de las postlarvas tempranas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, comparándolas a través de indicadores morfológicos, fisiológicos e inmunológicos.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Cultivo de microalgas

La importancia del cultivo de microalgas en acuicultura radica en la posición basal que estas ocupan en la pirámide alimenticia, su función fotosintética las hace imprescindible en la producción de alimento. Son el punto de partida biológico para el inicio del flujo de energía en las cadenas alimenticias acuáticas más importantes. A pesar de los múltiples esfuerzos realizados por reemplazar las microalgas por dietas inertes, la acuicultura depende todavía de su producción y utilización como alimento vivo para animales acuáticos comercialmente importantes.

Las microalgas se pueden utilizar directamente en la alimentación de especies de importancia comercial, como alimento vivo o indirectamente como alimento para especies zooplanctónicas, como *Brachionus plicatilis* o *Artemia*, que a su vez son utilizadas en la alimentación de larvas. Como son nutricionalmente suficientes, ellas pueden suplir una mezcla balanceada de nutrientes (Brown *et al.*, 1997).

Aunque en nuestro caso utilizaremos los cultivos de microalgas para la acuicultura, éstas tienen otras aplicaciones no menos importantes como son en biomedicina y farmacología, en la industria química y alimenticia, en el tratamiento de aguas residuales y en la agricultura por lo que cualquier conocimiento en este sentido ayudaría a optimizar su explotación (Abalde *et al.*, 1995)

El problema en el empleo de microalgas vivas radica en el elevado costo por la necesidad de su cultivo *in situ*, las posibilidades de polución con protozoos, hongos y bacterias y las fluctuaciones en el valor nutritivo de las algas lo determinan por las condiciones de cultivo (Almaguer *et al.*, 2004). Por lo que el

valor nutricional de un alga es un factor importante para las dietas de los animales marinos (Knuckel *et al.*, 2002).

La obtención permanente de biomasa microalgal de alta calidad nutricional es primordial para las empresas acuícolas. Obtener excelentes producciones de cultivos unialgales es uno de los puntos críticos y puede representar un "cuello de botella" para el desarrollo de la acuicultura considerando que el cultivo de microalgas puede representar hasta el 40% del costo total de la producción de semillas de ostras o un 30% de la producción de postlarvas del camarón *Penaeus monodon* (Olivera, 2002).

La obtención de microalgas implica un proceso continuo que se inicia en el cepario o stock de inóculos, con un aumento progresivo de volúmenes, para lo cual se varían los métodos de acuerdo a las condiciones climáticas del lugar que influyen sobre los cultivos masivos. La cantidad a producir estará en dependencia de la producción de postlarvas del laboratorio (Alfonso, 1999).

1.2. Las diatomeas bentónicas

Las diatomeas bentónicas han sido cultivadas y utilizadas en la alimentación de los primeros estadios larvales de camarón y de otras especies en cultivo. Siempre se utilizó la misma metodología que se seguía para las demás especies de microalgas y algunas dieron buenos resultados a escala de laboratorio sin que se implementara nunca su uso masivo hasta la última década.

Ellas secretan grandes cantidades de sustancias extracelulares poliméricas, las cuales son ricas en carbohidratos (Staats *et al.*, 1999), los que juegan un importante papel en la alimentación de los invertebrados (Decho, 1990; Kawamura *et al.*, 1995; de Brouwer *et al.*, 2005).

Exámenes microscópicos revelan que estas sustancias extracelulares es una matriz básica para un complejo de microorganismos denominados perifiton, que incluye diatomeas, bacterias, rotíferos, protozoarios, etc. Análisis nutricionales

demonstraron que un conjunto de diatomeas bentónicas y el perifiton asociado es rico en ácidos grasos poliinsaturados y constituyen una fuente de alto valor para la alimentación de las postlarvas (Peterson y Curiel, 2002).

Por otra parte, Griffith *et al.* (1992) plantean que las diatomeas pennales de los géneros *Amphora*, *Cymbella* y *Navicula* son productores primarios predominantes en sedimentos costeros marinos y de agua dulce contribuyendo a la producción de detritus y su valor potencial, en su contenido nutricional, está dado por el contenido lipídico. A tales efectos Tadros y Johansen (1988) demostraron que dos especies de *Navicula* generalmente tienen altos porcentajes de lípidos y poseen más del 47% cuando crecen en condiciones de máximo estrés.

Según Siqueiros (1994) las especies de diatomeas más ampliamente representadas en ambientes bentónicos pertenecen a los géneros de *Navicula* y *Nitzschia*, en proporciones similares, seguidas de *Amphora* con poco más de la mitad de los taxa.

Los métodos de cultivo de diatomeas bentónicas han sido los mismos que los utilizados para otras especies de microalgas. Para su utilización en la alimentación de postlarvas de camarón se pueden hacer florecimientos en los tanques que serán empleados para la cría, como lo aplican en Aquatec, Ltda. de Brasil. Otros cultivadores aplican láminas artificiales para aumentar la superficie, que partiendo de un inóculo inicial, son colonizadas y logran una buena densidad para la alimentación de las postlarvas de camarón (Peterson y Curiel, 2002).

No obstante está poco estudiado y citado el cultivo y uso de las diatomeas bentónicas para alimentar las primeras postlarvas de camarón en cultivo. Recientemente, en nuestro país, Almaguer *et al.* (2004) aisló dos especies de diatomeas bentónicas, identificadas como *Amphora* cf. *marina* y *A.* cf. *terroris* que pudieran utilizarse con fines de alimentación de postlarvas de camarón. Estos autores estudia niveles de clorofila a y c en los cultivos de estas especies

por la dificultad de utilizar la enumeración directa. Al respecto, considera que los niveles de clorofila a resultaron indicadores de crecimiento del cultivo, aunque no exista una relación directa de la concentración de clorofila a con la cuantificación en términos numéricos de las células, ya que no se puede establecer una relación: concentración de clorofila/concentración celular.

Alfonso (1999) afirma que la correspondencia entre la concentración celular y las determinaciones de la cantidad de pigmentos y otros componentes no es constante ya que éstos dependen de diferentes factores como el estado fisiológico de la célula y la fase de crecimiento del cultivo, así como de las condiciones físico-químicas a que están sometidas las células.

Simental-Trinidad *et al.* (2001), estudió el crecimiento poblacional, porcentaje de proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas de tres especies de diatomeas bentónicas, cultivadas en medio f/2 y un medio agrícola convencional, los cuales propusieron este último medio que es menos costoso y se obtiene en las microalgas la misma composición bioquímica que f/2.

Plasencia *et al.* (2004) estudia el cultivo de una de estas especies aisladas (*Amphora cf. marina*) pero utilizando zeolita como enriquecedor del medio de cultivo.

También Curbelo *et al.* (2004) aislaron, identificaron y cultivaron una especie de diatomea bentónica como *Navicula* sp. de aguas de un banco de progenitores de camarón, probando diferentes relaciones N:P del medio Guillard h y salinidades, encontrando que *Navicula* sp. crece bien con una relación N:P de 15:1 del medio Guillard h y a una salinidad de 35 ups.

Ante el problema de la cuantificación de algunas diatomeas bentónicas, Voltolina (1991) estudia diferentes técnicas de dispersión de la diatomea bentónica *Amphora coffeaeformis* debido a que la evaluación que se hace de los cultivos es inapropiada, originada por la separación incompleta de las microalgas de los recipientes experimentales o por la distribución de las células en las muestras.

Destaca que este problema aparece a menudo en trabajos de diatomeas bentónicas como manuales metodológicos, donde sólo se menciona la técnica de dispersión sin ninguna indicación o advertencia. Este autor concluye que el mejor tratamiento para suspender las diatomeas bentónicas en el medio es con tratamiento ultrasónico, que es un método seguro y eficiente para este fin. Este mismo autor, en 1994, cultiva microalgas bentónicas para alimentar postlarvas y juveniles de abulón (*Haliotis* spp.) presentando varios problemas relacionados con las técnicas de cosecha y utilización de la biomasa. Dicho trabajo describe técnicas y criterios de aislamiento, selección y cultivo en forma masiva de diatomeas bentónicas en láminas acanaladas del mismo tipo y dimensiones de las que se usan en establecimientos comerciales, como superficies de asentamiento y de pastoreo de esta especie, durante los primeros meses de cría. Ese estudio le permitió la cosecha de forma semicontinua de las láminas y el uso de las microalgas adheridas al fondo y a las paredes del recipiente como nuevo inóculo.

Tratándose de un proceso productivo continuo y a gran escala, para las diatomeas bentónicas no es práctico realizar determinaciones de pigmentos u otras técnicas de colorimetría. Tampoco es práctico utilizar otras técnicas más sofisticadas para la dispersión de las células para después contarlas, como la expuesta por Voltolina (1991) de aplicación de ultrasonido de baja frecuencia que no daña las células, ya que se hace muy laborioso e incosteable a escala comercial.

Ante este reto de la cuantificación de las microalgas bentónicas que forman grumos y/o biopelículas, Almaguer *et al.*, (2004) propone que en la producción de cultivos masivos para la alimentación de potlarvas en niveles comerciales, el desarrollo de los mismos debe estimarse por la intensidad de la coloración que van adquiriendo en el tiempo, realizando pruebas previas y con el correspondiente entrenamiento del cultivador.

Recientemente Leal *et al.* (2012) demostraron que para centros de producción continua que se emplee diatomeas bentónicas del género *Amphora* y cuando se quiere viabilizar los resultados por conteo directo, lo más rápido y económico es aplicarle a la muestra pentano 5%, que, aunque no logra disolver en su totalidad los grumos de estas microalgas, se puede realizar el conteo con confiabilidad. Este método no es aplicable a todas las especies de microalgas bentónicas porque no todas tienen la misma adhesión al sustrato ni entre ellas (Roberts *et al.*, 2000)

1.3. Alimentación de larvas y postlarvas de camarones.

En la actualidad se prioriza, además de la supervivencia y el tamaño de las larvas, la calidad de los animales como un factor fundamental por la repercusión que ésta tiene posteriormente en la fase de engorde, por lo que la alimentación tiene un papel predominante en este sentido.

Existen una gran cantidad de alimentos que se utilizan en la alimentación de larvas de camarones peneidos, entre los que se destacan los alimentos formulados, algunos que dentro de su formulación contienen inmunoestimulantes, elementos antiestresantes, complemento deshidratados de algas (por ejemplo *Spirulina* y *Chlorella*). Aunque en algunas especies su uso resultó exitoso, cabe señalar que normalmente se utilizan como alimentos emergentes cuando las condiciones de la cría larval son críticas (decremento significativo de la supervivencia durante el desarrollo, baja tasa de ingestión del alimento vivo y alteraciones en las condiciones físico-químicas del agua de cultivo, como, la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto principalmente (Gallardo, 2000).

En general, en la literatura se plantea que una especie de microalga no es capaz de satisfacer todos los requerimientos nutricionales de las larvas por lo que se

utilizan mezclas de varias especies (Alfonso *et al.*, 1993) lográndose un mejor balance nutricional al realizar combinaciones entre diferentes especies de varios grupos, lo cual conlleva al aumento de la velocidad de la metamorfosis y a un mejor desarrollo larval en comparación con dietas monoalgales.

El empleo de alimento artificial no logra la total independencia del alimento vivo, pues en algunos casos, el deficiente desarrollo del sistema digestivo de los estadios larvales de los consumidores, impide la adecuada asimilación del alimento artificial (Holt y Sun, 1991).

Para alimentar larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es necesario la conjugación de dos o más especies de microalgas, así como el empleo de *Artemia salina* como base y alimento artificial de buena calidad, en casos necesarios. Fegan (1992) plantea el uso de alimentos microparticulados, algas (*Chaetoceros* y *Skeletonema*) y *Artemia*, así como también el uso, esporádico, de rotíferos y nemátodos y calcula que el 87% de los “centros de cría”, usan algunas de las dietas suplementarias que existen.

Son insuficientes las investigaciones que se llevan a cabo con el uso de diatomeas bentónicas en la alimentación de postlarvas de camarón. Data de la década de los 90 los trabajos desarrollados en este campo. Esta práctica tuvo su inicio en la fertilización de los estanques donde serían depositadas las postlarvas para su cría con el objetivo de estimular el crecimiento natural de la flora y la fauna. Las fertilizaciones produjeron crecimientos significativos de diatomeas bentónicas que crecían adheridas al sustrato y formaban películas en la superficie, observándose con esto mejores supervivencias.

A partir de julio de 1991, en Ecuador, se utiliza *Amphora* sp. como procedimiento estándar en la cría de larvas de *P. vannamei*, desde postlarva 1 (PL1) hasta postlarva 8 (PL8) con muy buenos resultados, como base alimentaria durante esta etapa del ciclo, sustituyendo el uso de complementarios (Griffith *et al.*, 1992).

Existen lugares, como en Aqua Matsã en Brasil, donde se utilizó *Amphora* sp. y se aplicó a sustratos artificiales que proporcionan un área adicional para el crecimiento de algas de aproximadamente 140 m²/unidad. También proporcionan sustratos de aproximadamente 420 m² para el crecimiento de bacterias beneficiosas (Peterson y Curiel, 2002). Plantean además, que los procesos de larvicultura que utilizan esta combinación aumentaron sus densidades de producción, obtuvieron una mejor tasa de supervivencia y lograron reducir o eliminar el uso de *Artemia*.

En el Laboratorio de Producción de Postlarvas de Camarón "Aquatec, Ltda." de Brasil, se producía masivamente *Amphora* sp. sin cuantificar su crecimiento para ninguno de los pasos que se siguen en el aumento progresivo de volumen debido a la dificultad de enumerar las células presentes, ya que forman grumos o agrupaciones y su desempeño se evalúa considerando la intensidad de la coloración del cultivo a criterio del cultivador (Almaguer *et al.*, 2004).

Brasil y otros países como Ecuador proponen hacer la larvicultura de camarón en dos etapas teniendo en cuenta el comportamiento alimenticio de las postlarvas de un modo pelágico a uno bentónico.

El trabajo pionero que refiere el uso de diatomeas bentónicas en postlarvas de camarón es el de Griffith *et al.* (1992). Ellos trabajan con postlarvas de *Penaeus vannamei* y logran una mejoría en la calidad del cultivo, sin ofrecer datos seguros.

Más recientemente los trabajos de Peterson y Curiel (2002) y Leal *et al.* (2010) ambos también con postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. En esta última investigación se logró, además de mejorar la calidad del cultivo, la sustitución del 50% del alimento artificial (A.A.), por la inclusión en el alimento de la diatomea bentónica *Amphora* sp. al 2% del volumen del recipiente de cultivo.

Otro reporte en el mismo tema lo es el de Curbelo *et al.* (2006) pero con postlarvas de *L. schmitti*. Estos autores logran sustituir el 100% del A.A., por la

diatomea bentónica *Navicula* sp., además de alcanzar una discreta mejoría en la calidad del cultivo, mantienen un alimento vivo estable, de buena calidad y disponible para las primeras postlarvas de camarón.

De forma general estos autores plantean que la inclusión de diatomeas bentónicas en la dieta de las postlarvas constituyen una valiosa fuente de alimento para estos organismos y su valor nutricional más importante es el alto contenido de lípidos que poseen (Griffith *et al.*, 1992), también pueden ser una alternativa en la sustitución de alimentos artificiales, ya que se logra un aumento en la calidad del cultivo y con ello la sustitución de importaciones.

Los trabajos de Griffith *et al.* (1992) y Curbelo *et al.* (2006) fueron los primeros que utilizaron ajustes de la diatomea bentónica para alimentar las postlarvas y los únicos que han reportado mediante estos ajustes la sustitución del 100% del A.A., por lo que pudiera ser este un aspecto de suma importancia para futuras investigaciones en relación al tema.

1.4 Indicadores de calidad

La calidad de los organismos se ha medido de forma cualitativa y cuantitativa. Lo que más se ha utilizado han sido los indicadores morfológicos, donde la talla y el peso nos da una idea de la calidad de las postlarvas. Cuando hablamos de desarrollo muchos trabajos lo que refieren es el Índice de Villegas y Kanazawa (1979) pero más bien se usa para los estadios larvales. Ya en postlarvas se asume el criterio de la cantidad de espinas rostrales y los pares de ramificaciones branquiales.

A finales de la década del 80 se estableció como criterio de calidad de las postlarvas la prueba de stress de salinidad (Soliz *et al.*, 1989; Tackaert *et al.*, 1989) o pH (Arellano *et al.*, 1989) aunque estos mismos autores plantean que

siendo bioensayos que comparan fortaleza *versus* debilidad no siempre son evidentes.

En el camarón *Litopenaeus vannamei*, las proteínas constituyen la fuente de energía más importante y muestran una alta correlación con el estado inmunológico de los animales ya que varias de éstas participan en la respuesta inmune (proteínas de la coagulación, sistema de la profenoloxidasa, entre otras). Por esta razón, Pascual *et al.* (2003a) plantean que los niveles de proteínas en la hemolinfa pudieran reflejar el estado de salud de los camarones y por ende la calidad de las larvas.

En la hemolinfa de los crustáceos han sido descritos varios componentes proteicos mediante análisis electroforéticos, siendo el mayor de ellos el correspondiente a la hemocianina (75-95%) (van de Braak *et al.*, 1996), pigmento respiratorio que contiene cobre en su estructura y que es el encargado de transportar el oxígeno en la hemolinfa hacia el resto de los órganos (Noga, 2001). En orden le siguen la proteína de la coagulación y otros componentes humorales, entre los que se encuentran las moléculas inmunológicas como la proteína de unión a los β -glucanos (β GBP) y la proteína de unión al lipopolisacárido (LPS-BP) (Rodríguez & Le Moullac, 2000).

Se ha reportado que la concentración de proteínas totales en la hemolinfa representan un indicador de la calidad de la dieta (Cedeño *et al.*, 2000).

La glucosa es otro indicador. Es el mayor carbohidrato que se encuentra circulando en la hemolinfa de los crustáceos (Chang and O'Connor, 1983). Los niveles normales varían con la especie, temperatura, estación, salinidad, ritmo circadiano y estado de la muda (Noga, 2000). Las concentraciones de este metabolito son altamente sensibles al contenido de carbohidratos presente en las dietas por lo que el mismo puede ser usado como un indicador del estado

nutricional de los animales mantenidos en estanques de cultivo (Rosas *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003a). Se plantea que sus niveles dependen además de la ruta gluconeogénica y en consecuencia del metabolismo de las proteínas (Pascual *et al.*, 2003b). La glucosa en la hemolinfa se encuentra sujeta al control por la hormona hiperglicémica de crustáceos (CHH), secretada por el complejo de la glándula sinuosa y el órgano X de la médula terminal en los pedúnculos oculares, análoga de los glucocorticoides en vertebrados y que induce la liberación de glucosa de las reservas de glucógeno (Noga, 2001).

La glucosa es otra de las variables reconocidas asociadas al estrés en camarones peneidos (Hall y van Ham, 1998; Racotta y Palacios, 1998). Se considera que en animales no estresados los valores de glucosa están por lo general en el rango de 13-20 mg/dL (Racotta y Palacios, 1998; Racotta *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003a).

Los niveles de glucosa en la hemolinfa también pueden ser usados para indicar el estado nutricional de los camarones, dada su relación con los niveles de carbohidratos en la dieta (Rosas *et al.*, 2000; Rosas *et al.*, 2002). Es por ello que los diferentes niveles de glucosa obtenidos en diversos estudios pudieran estar relacionados con una dieta en particular (Pascual *et al.*, 2003b).

Hall y van Ham (1998) y Racotta y Palacios (1998) sugirieron además que los niveles de glucosa y lactato en hemolinfa pueden ser considerados como indicadores biológicos del estrés para camarones. Un incremento fuerte y rápido de las concentraciones de glucosa en la hemolinfa (hiperglicemia) es una respuesta al estrés en los animales. Dichas concentraciones pueden retornar a la normalidad entre 20-30 mg/dl (Racotta y Palacios, 1998) en animales sanos, una vez que desaparezca el efector estresante.

Los camarones peneidos, al igual que otros crustáceos, poseen un sistema inmune innato para defenderse contra los patógenos. Muchos de los elementos que componen este sistema están bien caracterizados, algunos de forma comparativa, en juveniles y adultos (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000; Cheng y Chen, 2000; Liu *et al.*, 2004; Laria *et al.*, 2005; Tseng *et al.*, 2009). Desafortunadamente se conoce muy poco sobre el sistema inmune en las primeras postlarvas de camarón debido al tamaño tan pequeño de los organismos, lo que dificulta la realización de estudios inmunológicos directos. Sin embargo, desde el punto de vista inmunológico y económico, las larvas y postlarvas representan “casos especiales”, ya que en estos estadios se produce la más elevada mortalidad durante la cría en el cultivo de camarón.

El estado nutricional afecta significativamente el sistema inmune de los camarones peneidos por lo que la determinación de parámetros inmunológicos es utilizada, frecuentemente, para la evaluación del estado nutricional de los mismos (Liu *et al.*, 1996; Le Moullac *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2008).

Entre las técnicas más utilizadas para evaluar los efectores inmunes (celulares y humorales) en camarones de diferentes especies, se encuentra el conteo total y diferencial de hemocitos, cuantificación de proteínas (Rodríguez, 1996; Soderhall y Thorquist, 1997); actividad hemoaglutinante del plasma (Perazzolo *et al.*, 2002; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2001a y b); actividad antibacteriana del plasma y la producción de anión superóxido (Muñoz *et al.*, 2000).

Varios factores externos pueden modificar la respuesta inmune. Entre éstos se ha estudiado la temperatura (Rodríguez-Ramos, *et al.*, 2001b) y las dietas (Cedeño *et al.*, 2000).

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se desarrolló durante los meses de abril y mayo de 2011, en el Centro para el Desove de Camarón “Yaguacam”, del municipio de Cumanayagua, en la provincia de Cienfuegos, Cuba (Fig. 1), en el área de cría de postlarvas de camarón blanco *L. vannamei*. El mismo se ubica en el Consejo Popular “Camilo Cienfuegos”; con los siguientes límites físicos: Al norte carretera Cienfuegos – Trinidad, al sur con el mar Caribe, al este área de pastoreo vacuno perteneciente a la UBPC: Camilo Cienfuegos, de la Empresa Pecuaria “Sierrita” y al oeste con la Unidad de Guardafronteras “Yaguanabo”, perteneciente al MININT.

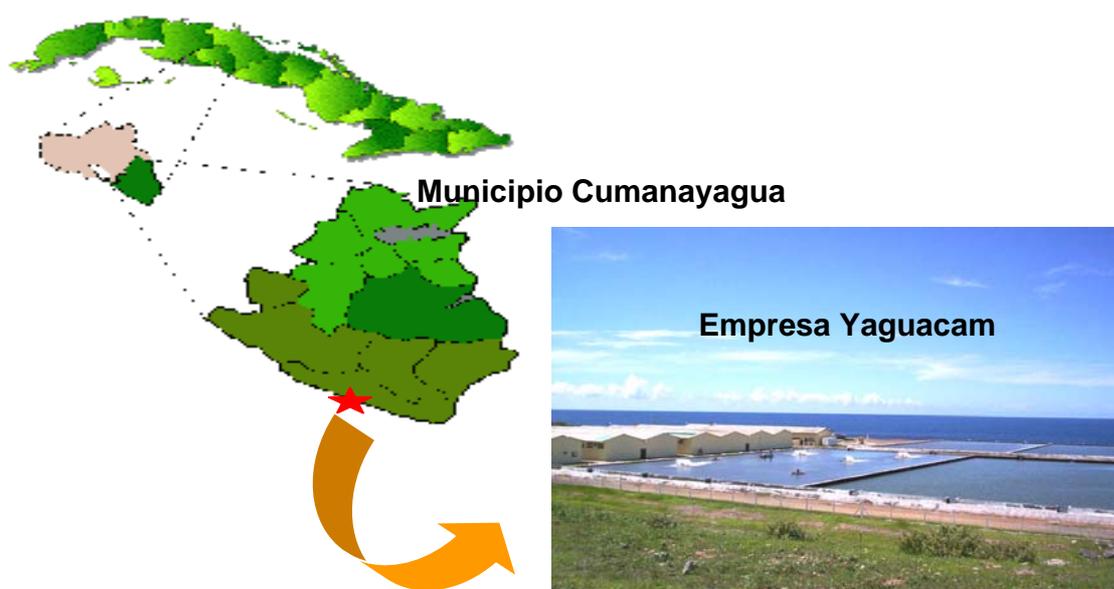


Fig. 1 Ubicación geográfica de la Empresa “Yaguacam”, en la provincia de Cienfuegos, Cuba.

2.1. Especies utilizadas

Las microalgas utilizadas en este estudio fueron: *Navicula* sp. y *Amphora* sp., cuya ubicación taxonómica es la siguiente:

PHYLUM Crysophyta
DIVISIÓN Cromophyta
CLASE Bacillariophyceae
ORDEN Pennales o Pennatae
SUBORDEN Biraphidineae
FAMILIA Cymbellaceae
GÉNERO *Navicula* (Moreno *et al.*, 1996)

DIVISIÓN Bacillariophyta
CLASE Bacillariophyceae
SUBCLASE Bacillariophycidae
ORDEN Naviculales
FAMILIA Catenulaceae
GÉNERO *Amphora* (CG Ehrenberg ex F.T. Kützing, 1844)

La especie de camarón fue *Litopenaeus vannamei* la cual fue clasificada de la forma siguiente por Pérez-Farfante y Kensley (1997):

Phylum: Artropoda
Subphylum: Crustacea
Clase: Malacostraca
Subclase: Eumalacostraca
Superorden: Eucárida
Orden: Decapoda
Superfamilia: Penaeoidea
Familia: Penaeidae
Género: *Litopenaeus*
Especie: *Litopenaeus vannamei*

2.2. Ensayos de alimentación

2.2.1. Cultivos de microalgas

Los cultivos de *Navicula* sp. y *Amphora* sp. se realizaron en el laboratorio de cultivos auxiliares del centro, mediante la técnica del aumento progresivo de volúmenes, hasta 15 litros, en recipientes plásticos (Fig. 2).



Fig. 2. Aumento progresivo de volúmenes.

Las condiciones a que estuvieron los cultivos fueron: temperatura de 23 ± 1 °C proporcionada por los aires acondicionados del local donde se produjeron, salinidad 35‰, iluminación de $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ continua, proveniente de lámparas fluorescente colocadas en los estantes donde se colocaron los recipientes.

El agua de mar utilizada fue filtrada previamente (5, 1, 0.35μ) y tratada con hipoclorito de sodio (25 mg.L^{-1}) para lograr su esterilización (GEDECAM, 2009a). Para lograr el medio de cultivo se fertilizó con los nutrientes correspondientes al medio Guillard h (Guillard, 1975).

Los cultivos fueron contados diariamente y utilizados en la fase exponencial, para establecer y mantener los diferentes tratamientos.

2.2.2. Bioensayos con postlarvas

Las postlarvas (PL) se obtuvieron del laboratorio de cría de larvas, en el estadio de PL3 y se llevaron hasta PL10. Las características morfológicas fueron: una espina rostral (ER), un par de ramificaciones branquiales, 5.53 mm de talla, medida desde el extremo anterior del rostrum hasta el final del telson y 0.375 mg de peso calculado en una balanza analítica con 0.01 mg de precisión.

Las unidades experimentales consistieron en tanquetas cilíndricas traslúcidas de fondo plano, rotuladas cada 1 L, con un volumen de trabajo de 10 L (Fig. 3). El agua utilizada fue filtrada (5, 1µm, y luz ultravioleta) y provenía del área de cría de larvas. Se trató químicamente con hipoclorito de sodio (25 mg.L⁻¹) y a las 24 horas neutralizada con tiosulfato de sodio (25 mg.L⁻¹). La salinidad fue de 25‰. Diariamente se registró la temperatura dos veces al día debido a que el local donde estaban las unidades experimentales no estaba climatizado. La densidad de cultivo fue de 50 PL3.L⁻¹.



Fig. 3. Unidades experimentales

Se mantuvo aireación constante, proveniente del soplador, a través de mangueras de 3-4 mm con difusores, para mantener los niveles de oxígeno y la homogeneidad en el medio.

Se hicieron observaciones micro y macroscópicas de cada unidad experimental para comprobar la vitalidad de las larvas, inspeccionándoles llenura y coloración del tracto digestivo con el objetivo de saber si consumían el alimento suministrado.

Para elegir los tratamientos, que fueron diferentes concentraciones de cada microalga, se tomó como referencia los resultados obtenidos por Curbelo *et al.*, (2006) cuando alimentaron postlarvas tempranas de *Litopenaeus schmitti* a diferentes concentraciones con *Navicula* sp. Para *Amphora* sp. se hizo un ajuste de biomasa teniendo en cuenta que es 2.44 veces mayor que *Navicula* sp. En total eran 3

tratamientos por especie con 3 réplicas de cada uno que sumaban 9 unidades experimentales para cada especie.

Se mantuvo el esquema de alimentación utilizado en el área de precría, para estos estadios (GEDECAM, 2009b) (Tabla 1) sustituyendo las diatomeas planctónicas, que están incluidas en el esquema, por las diatomeas bentónicas sometidas a estudio.

Tabla 1. Proporciones y concentraciones de los diferentes alimentos empleados ($\times 10^6$ PL x volumen x 6 raciones) en el esquema de alimentación de las postlarvas de *L. vannamei*.

ESTADIO	ALIMENTO ARTIFICIAL (g)	Nauplios de Artemia (N/mL)
PL3	1,1	3,0
PL4	1,3	3,0
PL5	1,5	4,0
PL6	1,7	4,0
PL7	2,0	6,0
PL8	2,2	6,0
PL9	2,4	8,0
PL10	2,7	8,0

Las diferentes concentraciones de diatomeas bentónicas probadas fueron:

Navicula sp.: 20, 40 y 60 $\times 10^3$ cel.mL⁻¹ (N20, N40 y N60 respectivamente)

Amphora sp. 8, 16 y 25 $\times 10^3$ cél.mL⁻¹. (A8, A16 y A25 respectivamente)

El alimento artificial (AA) consistió en una mezcla de 50% de pienso ABM 4000, de 400 μ m de tamaño de partícula, marca Biomarine de procedencia norteamericana y 50% de Hojuelas de Artemia, que se suministraron cada 4 horas, de acuerdo al esquema de alimentación expresado en la Tabla 1.

La alimentación con Artemia sp se hizo en forma de nauplios enriquecidos con ácidos grasos poli-insaturados (HUFA), durante 24 horas y posteriormente congelados a -10°C, en diferentes proporciones de acuerdo al subestadio de PL según se muestra en la

tabla 1, adicionándose cada 4 horas al día, ósea la alimentación se realizó cada 2 horas con el AA y nauplios de Artemia alternados.

2.2.3. Indicadores morfológicos

Los indicadores morfológicos medidos fueron:

- o Número de Espinas rostrales (ER).
- o Desarrollo branquial medido por los pares de ramificaciones branquiales (RB.)
- o Talla (mm) (desde el extremo anterior del rostrum hasta el final del telson).
- o Peso (mg).

Ciento cincuenta animales por tratamiento se tomaron para evaluar los parámetros de calidad de el número de espinas rostrales, pares de ramificaciones branquiales y la talla (objetivo milimetrado), tomadas bajo el microscopio biológico, así como esta misma cantidad de PL para el peso en una balanza analítica (± 0.001 g de precisión).

2.2.4. Supervivencia (%)

El total de postlarvas obtenidos se consideró desde el estimado inicial en PL3, hasta que concluyó el experimento al décimo día de estadio de las PL, cuantificándose 8 submuestras para el cálculo del porcentaje de su representatividad, los resultados obtenidos nos permite evaluar la calidad en que se desarrollo el cultivo, considerándose un indicador de la calidad de las postlarvas.

2.2.5. Indicadores fisiológicos e inmunológicos

Para el procesamiento de las muestras y la determinación de los indicadores fisiológicos e inmunológicos, se tomaron 3 muestras de 50 PL₁₀ de cada unidad

experimental, de forma homogénea, guardadas en tubos eppendorf previamente identificadas y conservadas en congelación a -10°C hasta su procesamiento. Las determinaciones fueron realizadas en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana (CIGB).

Se homogenizaron en 10 mL de PBS (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 4.3 mM de Na₂HPO₄·7H₂O, a pH 7.3) por gramo de tejido, utilizando un homogenizador Ultra Turrax T25 (IKA – Labortechnik, Germany). Posteriormente el homogenado se centrifugó a 5000 g/ 15 min. a 4°C. Los sobrenadantes se colectaron y almacenaron a -20°C hasta su uso posterior en cada una de las determinaciones.

Se determinó la concentración de glucosa y proteínas con juegos de reactivos de Biovision, USA, según las indicaciones del fabricante.

La actividad fenoloxidasa se evaluó de acuerdo a la técnica de Hernández-López *et al.*, (1996). Para la capacidad antioxidante también se emplearon juegos de reactivos de Biovision, USA, según las indicaciones del fabricante.

La concentración de óxido nítrico fue estimada según los niveles de nitratos y nitritos en los homogenados. Para ello se realizaron modificaciones a la técnica descrita por Bower y Holm-Hansen (1980).

2.3. Análisis económico

Para realizar el análisis económico se tomó el volumen total de microalgas consumidas en cada tratamiento (*Navicula* sp. y *Amphora* sp.), el precio en CUP y CUC de los reactivos utilizados y demás equipos y materiales necesarios para producir 1 M³ de diatomea bentónica hasta volúmenes mayores.

La cantidad de diatomeas bentónicas (db) suministradas por cada tratamiento se determinó considerando una producción de 10^6 PLs.

Tabla 2. Consumo ($M^3 \times 10^6$ PLs) y costo en CUP y CUC de cada tratamiento en la alimentación de las PLs de *L. vannamei*, *Amphora* sp. y *Navicula* sp.

Ttos.	Consumo de Diatomeas Bentónicas	Consumo ($M^3 \times 10^6$ PLs)	Costo	
			(CUP $\times 10^6$ PLs)	(CUC $\times 10^6$ PLs)
A-8	1078	3,019	7,74	102,19
A-16	2154	4,723	12,10	159,87
A-25	3357	8,904	22,82	301,40
N-20	1809	5,370	13,75	181,67
N-40	3616	8,270	21,20	280,07
N-60	5025	16,860	43,21	570,77

2.4. Análisis estadístico

A todos los datos obtenidos se les determinó la normalidad por los estadígrafos de Kolmogorov – Smirnov y la homogeneidad de varianzas por la prueba de Bartlett Sheskin (2007). Los datos de supervivencia se transformaron como $\arcsen \sqrt{n}$.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos se aplicó análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía) y para los casos de diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey HSD de comparación múltiple de medias, para un nivel de significación de 0.05 (Sheskin, 2007). Toda la información estadística fue procesada con el software SigmaStat 3.5.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

La temperatura osciló entre 25.2 y 26.9°C, registrándose la temperatura más baja a las 6 am y la más alta a las 6 pm.

3.1 Indicadores morfológicos

De los indicadores morfológicos medidos en las postlarvas de camarón *L. vannamei*, alimentadas con la diatomea bentónica *Navicula* sp. las ramificaciones branquiales (RB) y espina rostrales (ER) exhiben sus máximos de 4.1 y 3.1 para N40 y N60, respectivamente (Tabla 3).

Los valores de talla fueron iguales para los tres tratamientos (6.7 mm) y el peso se vio favorecido para N40, con un valor medio de 1.5 mg similar a N20 (1.3 mg) y diferente significativamente de N60 (1.2 mg) ($P < 0.05$). La supervivencia reflejó su máximo (87.0%), para las postlarvas alimentadas con N40, diferente del resto de los tratamientos ($P < 0.05$).

Tabla 3. Indicadores morfológicos y supervivencia (\pm ES) medidos en postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con *Navicula* sp. en diferentes concentraciones (N20, N40, N60). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($a > b$). RB: Ramificaciones branquiales, ER: Espinas rostrales.

Indicadores morfológicos	<i>Navicula</i> sp.			Probabilidad
	N20	N40	N60	
RB(pares)	3.6 \pm 0.301	4.1 \pm 0.182	4.1 \pm 0.547	0.508
ER	3.0 \pm 0.022	3.1 \pm 0.156	3.1 \pm 0.204	0.909
Talla(mm)	6.7 ^a \pm 0.166	6.7 ^a \pm 0.135	6.7 ^a \pm 0.145	0.994
Peso(mg)	1.3 ^{ab} \pm 0.069	1.5 ^a \pm 0.051	1.2 ^b \pm 0.055	0.026*
Supervivencia (%)	67.7 ^{bc} \pm 14.099	87.0 ^a \pm 0.225	59.67 ^c \pm 6.642	<0.001*

En la Tabla 4 se reflejan los indicadores morfológicos medidos en las postlarvas de camarón *L. vannamei* alimentadas con *Amphora* sp., donde no se observaron diferencias significativas en los indicadores medidos, excepto la supervivencia, la que fue mayor en las postlarvas alimentadas con A16, diferente significativamente del resto ($P < 0.05$).

Tabla 4. Indicadores morfológicos y supervivencia (\pm ES) medidos en postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con *Amphora* sp. a diferentes concentraciones (A8, A16, A25, ($P < 0.05$), Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (a>b). RB: Ramificaciones branquiales, ER: Espinas rostrales.

Indicadores morfológicos	<i>Amphora</i> sp.			
	A8	A16	A25	Probabilidad
RB(pares)	3.5 \pm 0.115	3.9 \pm 0.079	3.9 \pm 0.422	0.418
ER	2.9 \pm 0.097	3.3 \pm 0.102	3.2 \pm 0.174	0.198
Talla(mm)	6.6 ^a \pm 0.252	6.5 ^a \pm 0.096	6.8 ^a \pm 0.139	0.500
Peso(mg)	1.52 ^a \pm 0.136	1.37 ^a \pm 0.041	1.51 ^a \pm 0.171	0.687
Supervivencia(%)	71.0 ^b \pm 0.00	91.0 ^a \pm 4.00	75.0 ^b \pm 4.00	0.011*

3.2 Indicadores fisiológicos e inmunológicos

Los resultados obtenidos en los indicadores fisiológicos e inmunológicos medidos a postlarvas de *L. vannamei*, alimentadas con *Navicula* sp., muestran que no se encontraron diferencias significativas en todos los indicadores, excepto para el óxido nítrico donde fue evidente el valor máximo para las postlarvas alimentadas a la mayor concentración de la microalga (183.980/mg proteínas), que difirió estadísticamente del resto de los tratamientos ($P < 0.05$).

Cuando las postlarvas se alimentaron con las diferentes concentraciones de *Amphora* sp. se apreció la presencia de diferencias significativas en algunos de los indicadores determinados (Tabla 6). Tal es el caso de la glucosa,

donde sus valores se incrementan con el aumento de la densidad de la microalga en el tratamiento A25, la que alcanzó valores de 46.770 μM , diferente significativamente del resto ($P < 0.05$).

Tabla 5. Indicadores fisiológicos e inmunológicos ($\pm\text{ES}$) medidos en postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con *Navicula* sp. a diferentes concentraciones (N20, N40, N60). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, $P < 0.05$, ($a > b > c$). P= probabilidad.

	Indicadores fisiológicos		Indicadores inmunológicos		
	Glucosa (μM)	Proteínas (mg.mL^{-1})	Actividad fenoloxidasa	Oxido nítrico (/mg proteínas)	Capacidad antioxidante
N20	19.053 ^a ± 5.342	0.447 ^a ± 0.031	0.0818 ^a ± 0.00769	141.232 ^b ± 6.232	0.431 ^a ± 0.0247
N40	19.285 ^a ± 2.654	0.421 ^a ± 0.0485	0.0688 ^a ± 0.0077	142.963 ^b ± 8.651	0.463 ^a ± 0.0290
N60	21.315 ^a ± 5.342	0.354 ^a ± 0.0352	0.0774 ^a ± 0.00923	183.980 ^a ± 12.737	0.374 ^a ± 0.0240
P	0.102	0.249	0.539	0.010 *	0.076

La actividad fenoloxidasa es una de las más importantes dentro del sistema de defensa de los crustáceos por su función microbicida y en este caso se vio favorecida con las altas concentraciones de 16 y 25 $\times 10^3$ cél. mL^{-1} de esta diatomea, con valores máximos de 0.0797 y 0.0769 respectivamente, los que difieren significativamente de los obtenidos en las postlarvas alimentadas con 8 $\times 10^3$ cél. mL^{-1} ($P < 0.05$). El resto de los indicadores medidos reflejan la ausencia de diferencias significativas entre los valores de los tratamientos estudiados.

Al incrementarse la concentración de *Amphora* sp. en la alimentación de postlarvas de camarón blanco *L. vannamei*, se elevan los niveles de oxido nítrico, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los mismos ($P > 0.05$).

Tabla 6. Indicadores inmunológicos (\pm ES) medidos en postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con *Amphora* sp. a diferentes concentraciones (A8, A16, A25). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. (a>b>c). P=probabilidad.

Ttos	Indicadores fisiológicos		Indicadores inmunológicos		
	Glucosa (μ M)	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	Actividad fenoxidasa	Oxido nítrico (/mg proteínas)	Capacidad antioxidante
A8	28.928 ^{ab} \pm 2.850	0.325 ^a \pm 0.0474	0.0364 ^b \pm 0.00518	167.757 ^a \pm 29.282	0.434 ^a \pm 0.0461
A16	27.330 ^b \pm 7.108	0.369 ^a \pm 0.0693	0.0797 ^a \pm 0.0144	177.766 ^a \pm 16.605	0.524 ^a \pm 0.5620
A25	46.770 ^a \pm 6.262	0.375 ^a \pm 0.0577	0.0769 ^a \pm 0.00513	202.142 ^a \pm 21.039	0.391 ^a \pm 0.0424
P	0.044 *	0.809	0.015 *	0.564	0.193

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

En los primeros años de la producción de postlarvas de laboratorio se buscaba principalmente obtener una buena supervivencia y un tamaño adecuado de los animales. Sin embargo, en la actualidad se prioriza también, como un factor fundamental, la calidad de las postlarvas por la repercusión que éstas tienen, posteriormente, en la fase de engorde.

El desarrollo de las ramificaciones branquiales juega un papel importante en el intercambio de oxígeno de la larva con el medio, así como en la adaptabilidad del animal a los cambios de los factores abióticos. Mientras mayor sea el número de pares de ramificaciones, más resistente será la postlarva para adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo en cautiverio, de ahí que se utilice como criterio de calidad, (GEDECAM, 2009).

La calidad de las postlarvas, evaluadas por el número de espinas rostrales y pares de ramificaciones branquiales, dan una medida del desarrollo que alcanzaron los animales en este experimento los cuales están por encima de lo que se considera una postlarva de buena calidad, muy similares a los obtenidos por Curbelo *et al.* (2006), con postlarvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con *Navicula* sp. y por Leal, *et al.* (2010) con las mismas especies de diatomea bentónica y camarón que las empleadas en este trabajo.

Pocos son los reportes existentes sobre la alimentación de postlarvas tempranas de camarón con diatomeas bentónicas. Según Griffith *et al.* (1992), cuando alimentaron las primeras postlarvas de *Litopenaeus vannamei* con la diatomea *Amphora* sp., desde PL₁ hasta PL₈, obtuvieron un tamaño mejorado respecto al testigo (6.05 vs 5.93 mm) y un ligero incremento en la supervivencia (86.7 vs 76.5%), además de toda la eliminación de las dietas artificiales. Estos resultados en la talla son inferiores al máximo que logró Curbelo *et al.* (2012) de 7.14 mm para la misma especie de camarón y a los de este trabajo con *Navicula* sp. de 6.7 mm, así como entre 6.5 y 6.8 mm cuando se empleó *Amphora* sp. en diferentes proporciones.

Todo lo contrario ocurre para la supervivencia, donde Griffith *et al.* (1992), encontraron mayores porcentajes (76.5%) para el testigo que Curbelo *et al.* (2012). Esta diferencia puede deberse a que las cosechas se realizaron en tiempos diferentes. Sin embargo estos resultados en cuanto a la supervivencia son inferiores a los obtenidos para las postlarvas alimentadas con N40 de 87.0% y A16 de 91.0%, y similares de las alimentadas con A8 y A25 de 71.0 y 75.0% respectivamente, y a los alcanzados por Curbelo *et al.* (2006) para *L. schmitti* y Curbelo *et al.* (2012) para *L. vannamei*.

En este estudio hay una coincidencia, y es relacionada con las bajas supervivencias obtenidas al utilizar concentraciones de N20 y A8, la cual se pudiera atribuir a la carencia del alimento disponible en el medio. Griffith *et al.* (1992) proponen para el uso de *Amphora* sp. la concentración de 10×10^3 cél.mL, obteniendo buenos resultados para *L. vannamei*. La alta concentración probada (N60 y A25) afectó la supervivencia porque empeoró la calidad del agua debido al exceso de alimento.

En los trabajos de Griffith *et al.* (1992) y Curbelo *et al.* (2006) se pudo sustituir el 100% del alimento artificial por la diatomea bentónica, sin embargo Curbelo *et al.* (2012) sólo pudieron sustituir el 50% del alimento artificial. Esto pudo deberse a que los porcentajes de alimentación empleados con *Amphora* sp. no fueron suficientes para satisfacer las necesidades nutricionales de las postlarvas de *L. vannamei*.

Con las dos especies de diatomeas bentónicas de este trabajo no se sustituye, en ninguna medida, el alimento artificial, pero se logró determinar las concentraciones adecuadas de alimentación para postlarvas de camarón *L. vannamei*. Aunque para darle continuidad a este estudio se propone probar diferentes porcentajes de sustitución del alimento artificial con las mejores concentraciones de ambas especies.

Los camarones Peneidos, al igual que otros crustáceos, poseen un sistema inmune innato para defenderse contra los patógenos. Muchos de los elementos que componen este sistema están bien caracterizados, algunos de forma

comparativa, en juveniles y adultos (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000; Cheng y Cheng, 2000; Liu *et al.*, 2004; Laria *et al.*, 2005; Tseng *et al.*, 2009). También hay trabajos que refieren la respuesta inmune ante determinadas dietas o procesos de carácter etiológico (Alpuche *et al.*, 2005; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2008; Shu-Ling *et al.*, 2008; Su- Tuen y Jiannn-Chu, 2008)

Desafortunadamente, se conoce muy poco sobre la fisiología y el sistema inmune en las primeras postlarvas de camarón debido al tamaño tan pequeño de los organismos, lo que dificulta la realización de estudios inmunológicos directos como es la extracción directa de hemolinfa para distintos análisis.

La glucosa es el mayor carbohidrato que se encuentra circulando en la hemolinfa de los crustáceos (Chang and O'Connor, 1983). Los niveles normales varían con la especie, temperatura, estación, salinidad, ritmo cardíaco y estado de la muda (Noga, 2000)

Lo anterior es evidente en este trabajo donde los niveles de glucosa estuvieron significativamente más altos en la mayor concentración que se probó de las dos especies, aspecto éste que atribuimos a que las diatomeas bentónicas, en especial *Amphora* sp, entre otras especies, generan una matriz de sustancias extracelulares poliméricas (Dobretsov, 2010), las cuales son ricas en carbohidratos (Staats *et al.*, 1999). Estos juegan un importante papel en la alimentación de los invertebrados (Decho, 1990; Kawamura *et al.*, 1995; Brouwer *et al.*, 2005), de ahí que son incorporadas directamente en la alimentación de las postlarvas. Las concentraciones de este metabolito son altamente sensibles a la calidad o tipo de carbohidratos presentes en las dietas por lo que el mismo puede ser usado como un indicador del estado nutricional de los animales mantenidos en cultivo (Rosas *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003a), ya que se le atribuye una influencia importante en la salud y en la capacidad de los animales para resistir enfermedades.

Los niveles de glucosa que se obtuvieron son inferiores a los informados por Jaime-Ceballos *et al.* (2008) en postlarvas también de esta misma especie de camarón, las que fueron trasladadas y aclimatadas a diferentes tiempos y

salinidades. De acuerdo con Claybrook (1983) y Racotta & Palacios (1998) cuando los camarones están estresados, la glucosa de la sangre se incrementa para ser usada como una fuente rápida de energía. Bajo tales circunstancias (metabolismo de huida), los niveles de glucosa sanguínea se pueden elevar sobre sus niveles basales.

Entre las enzimas de defensa en los invertebrados la fenoloxidasa es una de las más importantes y más estudiada (Bachère, 2000) por su función microbicida dentro del sistema de defensa de los crustáceos. Ella es responsable del proceso de melanización que ocurre en respuesta a materiales extraños que invaden el hemocele (Hernández-López *et al.*, 1996) como parte de los mecanismos de reconocimiento inmunológico de los crustáceos.

En nuestro caso la actividad fenoloxidasa se vio favorecida con las altas concentraciones de la diatomea.

El óxido nítrico es un radical de nitrógeno, altamente reactivo que es producido por la enzima óxido nítrico sintasa. Tiene una participación activa en la eliminación de patógenos. En crustáceos se ha demostrado la presencia de la enzima en hemocitos y múltiples tejidos. En este trabajo esto nos puede sugerir que a mayores concentraciones del alga hay una mayor defensa por parte de los organismos.

Debemos destacar que los indicadores inmunológicos fueron siempre más altos en el caso de *Amphora* sp. lo que nos alerta de que esta especie ofrece muy buenas condiciones al sistema inmune de las postlarvas.

4.1 Análisis económico

El costo de 1M³ de cultivo de diatomea bentónica es de \$ 2.56 CUP y \$ 33.85 CUC. En la Tabla 7 se observa el consumo de diatomea bentónica en cada tratamiento y el costo por millón de postlarva. Es evidente que el consumo y el costo es menor en la especie *Amphora* sp. respecto a *Navicula* sp.

Tabla 7. Consumo ($M^3 \times 10^6$ PLs) y costo en CUP y CUC por millón de PLs, de las diatomeas bentónicas *Amphora* sp. y *Navicula* sp. a diferentes concentraciones.

Tratamientos	Consumo ($M^3 \times 10^6$ PLs)	Costo	
		CUP $\times 10^6$ PLs	CUC $\times 10^6$ PLs
A-8	3,019	7,74	102,19
A-16	4,723	12,10	159,87
A-25	8,904	22,82	301,40
N-20	5,370	13,75	181,67
N-40	8,270	21,20	280,07
N-60	16,860	43,21	570,77

La concentración que recomendamos para *Navicula* sp. es 40×10^3 cél.mL⁻¹ y la de *Amphora* sp. 16×10^3 cél.mL⁻¹, no obstante, cuando las postlarvas son alimentadas con esta última se mantienen los parámetros de calidad establecidos (GEDECAM, 2009), incrementando en un 4% la supervivencia, además de la estimulación de algunos parámetros fisiológicos e inmunológicos. La elección de producir postlarvas de camarón alimentadas con A16 representó un ahorro en CUP de \$ 9.10 y \$ 120.20 CUC por millón de postlarva a producir. Para un año de 500×10^6 de PL producidas se ahorran **\$ 4 550.00 CUP** y **\$ 60 100.00 CUC**.

Basado en lo anterior y teniendo en cuenta que la supervivencia alcanzada con A16 es el 4 % más respecto a N40, se revierte para un año de producción de 500×10^6 de postlarvas, en 20×10^6 PLs más, que a un precio de \$ 3.00511 CUP y \$ 1.61442 CUC el millar, equivale a **\$ 60 102.2** en CUP y **\$ 32 288.4** en CUC.

Se puede afirmar que la alimentación de las primeras postlarvas de camarón *L. vannamei* con la diatomea bentónica *Amphora* sp. a 40×10^3 cél.mL⁻¹ ahorra \$ 64 652.20 CUP y \$ 92 388.40 CUC, para un monto total al año de **\$ 157 040.60**.

CONCLUSIONES

La concentración de *Navicula* sp. a $40 \times 10^3 \text{cél.mL}^{-1}$ es adecuada en la alimentación de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* ya que incrementa el peso, mejora la supervivencia y no deteriora los indicadores fisiológicos e inmunológicos.

La diatomea bentónica *Amphora* sp., a $16 \times 10^3 \text{cel.mL}^{-1}$ de concentración constituye un excelente alimento para las postlarvas tempranas de camarón, lo que favoreció la supervivencia, los niveles de glucosa, actividad de fonoloxidasa y óxido nítrico.

7. RECOMENDACIONES

Continuar estudios en las diatomeas bentónicas (*Navicula* sp. y *Amphora* sp.) con las mejores concentraciones obtenidas en este experimento, sustituyendo así en diferentes porcentajes el alimento artificial, para una mejor explotación del cultivo de camarón en Cuba.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E. & Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de La Coruña (Eds.), Monografías No.26. España.
- Alfonso, E. (1996). Larvicultura de Camarões Marinhos. En T.C.V.Gesteira e A.J.P.Nunes (Eds.) *Anais do Primeiro Workshop do Estado do Ceará sobre Cultivo de Camarão Marinho* (86-100 pp.), Fortaleza, Ceará, Brasil.
- Alfonso, E. (1999). Cultivo de alimento vivo: actualidad y perspectivas. *Congreso Naturamigos '99*, Cancún, México, Conferencia Magistral, 9 pp.
- Alfonso, E., Ramos, L., Díaz-Iglesia, E., García, T. & Rosas, C. (1993). *Manual del II curso internacional de postlarvas de camarones peneidos del Atlántico de América*. Ciudad de Campeche, México, pp. 39-55.
- Almaguer, Y., Alfonso, E. Leal, S. (2004). Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Rev. Invest. Mar.*, 25(1), 57-64.
- Alpuche, J., Pereyra, A. y Agundis, C. (2005). Purification and of a lectin from the White shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochim. Biophys Acta*, 1724, 86-93.
- Araya, R., Bahamontes, C., Barahona, K. & Silva-Aciares, F. (2010). Utilización de una biopelícula microalgal multiespecífica para optimizar la fijación larval y el crecimiento del abalón (*Haliotis rufesiens*) en un criadero comercial. *Rev. Biol. Mar. y Oceanogr.*, 45(1), 59-69.
- Arellano, E. Pedrazzoli, A. & Montoya, Q.F.N. (1989). Primeros resultados preliminares de métodos de estrés para determinación de calidad de larvas. *Infolab*, 3, 6-9.
- Bachere, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191, 3-11.
- Bower, S., Holm-Hansen, T. (1980). Simplified hydrazine-reduction method for determining high concentration of nitrate in recirculate seawater. *Aquaculture*, 21, 281-286.

- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4), 315-331.
- Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R. & Stal, L.J. (2005). Biogenic stabilization of intertidal sediment: the importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms. *Microb. Ecol.*, 49, 501-512.
- Carbajal-Miranda, M.J., Sánchez-Saavedra, M.P. & Simental, J.A. (2005). Effect of monospecific and mixed benthic diatom cultures on the growth of red abalone postlarvae *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 401-405.
- Cedeño, R., Valenzuela, E. & Rodríguez, J. (2000). Efectores inmunitarios como marcadores de deficiencias nutricionales en dietas para *Litopenaeus vannamei*. *Panorama Acuícola*, 5, 42-44.
- Chang, W. & O'connor, J.D. (1983). Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In Mantel, L.H. (Ed.), *The biology of crustacea*, vol. 5, (pp. 263-287). Academic Press, New York.
- Cheng, W. y Cheng, J.C. (2000). Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenberguii*. *Fish Shellfish Immun*, 10, 387– 391.
- Cheng, W., Tsai, L.H., Huang, C.j. Chiang, P.C., Cheng, C.H., Yeh, M.S. (2008). Cloning and characterization of hemolymph clottable proteins of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Developmental and Comparative immunology*, 32, 265-274.
- Claybrook, D.L. (1983). Nitrogen metabolism. En Mantel L.H (ed), *The biology of Crustacea, internal anatomy and physiological regulation*. Vol.5 (pp.163-213). Academic Press, Nueva York.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., Quintana, P., Banguela, I. Muñoz, D. et al. (2004). Cultivo de la microalga bentónica *Navicula* sp. para la alimentación de las primeras postlarvas de camarón blanco. *Rev. Invest. Mar.*, 25(2), 143-150.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., & Almaguer, Y. (2006). Alimentación de las primeras postlarvas de camarón *Litopenaeus schmitti* con una especie de diatomea bentónica. *Rev. Invest. Mar.*, 27(3), 231-236.

- Curbelo, R., Leal, S., Núñez, N. & González, O. (2012). Sustitución parcial o total del alimento artificial en la alimentación de postlarvas tempranas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Cuba, 1er Taller Internacional PescaCONyMA 2012, Resúmenes.
- Dobretsow, S. (2010). Marine biofilms. In Dürr, S. and Thomason, J.C.(Eds.), *Biofouling (Cap. 9)*, Wiley-Blackwell.
- Decho, A.W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their roles in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 28, 73-153.
- Fegan, D. (1992). Recent developments and issues in the penaid shrimp hatchery industry. In Wyban, J. (ed.), *Proceedings of the special session on shrimp farming* (89 pp). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Gallardo, P.P. (2000). Aspectos nutrimentales y fisiológicos de larvas del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767): Esquema de alimentación. Tesis de Maestría para la obtención del título de Máster en Biología Marina, UNAM, México.
- García, T. (1997). Estado del arte de la investigación científica en nutrición de peneidos. *Taller de Trabajo "La Investigación Científica en Peneidos de Iberoamérica"*, La Paz, México, pp. 47-55.
- García, T. (1998). Nutrición de larvas de camarón. *Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, La Paz, México, 9 pp.
- GEDECAM (2009a). POT. P.3.FT.12. Clorinación del agua salada. MINAL, p.1-2.
- GEDECAM (2009b). POT. P.3. CR. 08. Alimentación. MINAL, p.1-4.
- GEDECAM (2009c). POT. P.2.LB.04. Calidad de postlarvas a cosechar. MINAL, 20-21 p.
- Griffith, D.R.W., Laborde E. & Wigglesworth J.M. (1992). Biological and economic of penaeid larval rearing using benthic diatoms. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, pp. 101–105.

- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In W.L. Smith & M.H. Chanley (Eds.) *Culture of Marine Invertebrates Animals* (pp. 29-60).
- Hahn, K.O. (1989). *Handbook of culture of Abalone and other Marine Gastropods*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Hall, M.R. & van Ham, E. H. (1998). The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World. Aquacult. Soc.*, 29, 290-299.
- Hernández-López J, Gollas-Galván T & Vargas-Albores F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C, 61-66.
- Holt. G.J. & F. Sun (1991). Lipase activity and total lipid content during early development of red drum *Sciaenops ocellatus*. In P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Oliverr (Eds.), *Symposium on fish and crustacean larviculture, Larvi 91, Fish and Crustacean Larviculture Symposium* (pp. 30-339).
- Ito, S. & Kitamura H. (1997). Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Stichopus japonicus* by periphitic diatoms. *Hydrobiology* 358, 281-284.
- Jaime-Ceballos, B., Galindo-López, J., Laria-Lamela, E., Cupul-Magaña, F., Vega-Villasante, F. (2008). Traslado de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) a diferentes tiempos, salinidades y densidades y su efecto en la supervivencia y algunos marcadores bioquímicos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, Vol. 43, (3), 681-686.
- Kawamura, T., Saido, T., Takami, H. & Yamashita, Y. (1995). Dietary value of benthic diatoms for the growth of postlarval abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 194, 189-199.
- Khatoon, H, Yusoff, F. Md., Banerjee, S., Shariff, M., Mohamed, S. (2007). Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. *Aquaculture*, 271, 196-205.

- Knuckey., R.M., Brown, M.R., Barret, S.M. & Hallegraeff, G.M. (2002). Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 211, 253-274.
- Laria, R. (2004). Biomarcadores de estrés en el manejo de reproductores del camarón *Litopenaeus schmitti*. Tesis de Maestría para la obtención del título de Máster en Biología Marina y Acuicultura, Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana.
- Laria, R., Silveira, R., Cruz, Y., & Martínez, M. (2005). Phenoloxidase and peroxidase activity in the shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 36, 12–93.
- Lavens, P., Merchie, G. & Sorgeloos, P. (1998). Critical reviews of the larval fish crustacean feeding methods with ascorbic acid enriched diets: Effects on fish and shrimp growth, stress and disease resistance. *World Aquaculture '98*, Las Vegas, USA, 250 pp.
- Le Moullac, G. & Haffner, P. (2000). Environmental factors affecting immune response in Crustacea. *Aquaculture*, 191, 121–131.
- Leal, S., Miranda, A., Curbelo, R. & Hernández, J. (2010). Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. México, Nuevo León. *X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, CD-ROM, pp. 559-580.
- Leal, S., Curbelo, R., Vega, X., Núñez, N. & Hernández, J. (2012): Método de dispersión de biopelículas en cultivos de la diatomea bentónica *Amphora* sp. para facilitar el conteo directo. *Serie Ocenológica*, 10, 23-29.
- Liu, P.C., Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H. & Chen, S.N., (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.*, 33, 129–132.
- Liu, C.H., Yeh, S.T., Cheng, S.Y. & Chen, J.C. (2004). The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to vibrio infection in relation with the moult cycle. *Fish Shellfish Immun*, 16, 151–161.

- Mazón-Suástegui, J.M., Bazua-Sicre, L., Lucero-Martínez, G.L. & Rodríguez-Ramos, R. (1992). Producción de semilla de abulón en el laboratorio: El método de Bahía Tortugas. In M.J. Sheperd, S.A. Stegner y Guzmán del Proo, (Eds.) *Abalone of the world; biology, fisheries and culture* (pp.561-569). Fishing News Books, Oxford.
- Moreno, J. L., Licea, S. & Santoyo, H. (1996). Diatomeas del Golfo de California. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 272pp.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodriguez, J., Van der Knaap, W.P.W. & Mialhe, E., Bachere, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191, 89-107.
- Noga, E. J. (2000). Haemolymph biomarkers of crustacean health. *Recent Advances in Marine Biotechnology*, 5, 125-163.
- Noga, E. J. (2001). Nonspecific Immunity: Applications to Aquaculture. ARS-01 Biotechnology-Aquaculture Workshop 2001.
- Olivera, A. (2002): Valor nutricional das microalgas. *Revista da ABCC, Año 4(2)*, 63-68.
- Pascual, C., Gaxiola, G. & Rosas, C. (2003b). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*, 142, 735-745.
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G. & Rosas, C. (2003a). Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218, 637-650.
- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari P. & Barracco, M.A.A. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214, 19-33.
- Pérez-Farfante I. & B. Kensley (1997). Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world, keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires Muséum National d' Histoire Naturelle, Zoologie*, 175-235.

- Peterson, J.J. & Curiel, J.I. (2002). Larvicultura de camarão aprimorada como uso de diatomáceas. *Revista da ABCC, Año 4(2)*, 40-42.
- Plasencia, A., Leal, S., Voltolina, D. & Curbelo, R. (2004). Cultivo de la diatomea bentónica *Amphora* cf. marina con una zeolita cubana enriquecida. *Rev. Invest. Mar.*, 25(2), 151-158.
- Rahim, S.A.K.A., Li, J.H. & Kitamura, H. (2004). Larval metamorphosis of the sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina* in response to microbial films. *Mar. Biol*, 144, 71-78.
- Racotta, I.S. & Palacios, E. (1998). Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World. Aquacult. Soc.*, 29, 351-356.
- Racotta, I. S., Palacios, E. & Méndez, L. (2002). Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 35: 269-275.
- Roberts, R., Kawamura, T., Tanaki, H. (2000). Diatoms for abalone culture : a workshop for abalona farmers. New Zeland, 4th International Abalone Symposium, Cawthron Report No. 547, p. 28.
- Roberts, R. (2001). A review of settlement cues for larval abalone (*Haliotis* spp.). *Journal Shellfish Research*, 20(2), 571-586.
- Rodríguez, J. (1996). Estado del Arte de la Investigación Científica en Inmunología de Penaeidos. Taller de Trabajo: La investigación científica en Penaeidos de Ibero América, 10-14 junio, pp. 37-45.
- Rodríguez, J. & Le Moullac, G. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquacult.*, 19, 109–119.
- Rodríguez-Ramos, T., Borrell, Y., Ramos, L. Bécquer, U. & Espinosa, G. (2001a). Actividad hemoaglutinante de la hemolinfa de *Litopenaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 22, 229-234.
- Rodríguez-Ramos, T., Borrell, Y., Ramos, L., Bécquer, U. & Espinosa, G. (2001b). Aplicación de la actividad hemoaglutinante de la hemolinfa de *Litopenaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 22, 235-240.
- Rodríguez-Ramos, T., Espinosa, G., Hernández-López, J., Golla-Galván, T., Marrero, J., Borrel, Y. et al. (2008). Effects of *Echerichia coli*

- lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 274, 118-125.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C. *et al.* (2000). Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 249, 181-198.
- Rosas, C., Cuzan, G., Gaxiola, G., LePriol, Y., Pascual, C., Rossignol, J. *et al.* (2001). Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 259, 1-22.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G. & Wormhoudt, A. V. (2002). An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 268, 47-67.
- Sánchez, A., Jaime, B., Delgado, G. & Pérez, L. (2002). Evaluación del alimento natural epibentónico en estanques de tierra teniendo en cuenta la densidad de camarones en cultivo. *I Congreso Virtual de Acuicultura*. Extraído el 5 de Enero, 2012, de <http://www.civa2002.org>.
- Searcy-Bernal, R., Salas-Garza, A. & Flores-Aguilar, R. (1992). Investigaciones en México sobre la etapa crítica de la producción de semilla de abulón (*Haliotis* spp.). In S.A. Sheperd, M.J. Tegner & S.A. Guzmán (Eds.), *Abalone of the world: biology, fisheries and cultures* (pp:547-560). Fishing News Books, Oxford.
- Sheskin, D. (2007). Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Chapman & Hall, CRC, Boca Raton.
- Shu-Ling, H., Yuan-Hwa, R., Yi-Chen, L., Pei-Shan, H., Chin-Hwa, H. & Ching-Ming, K. (2008). Immune and physiological response in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 275, 335-341.
- Silva-Aciaras, F. & Riquelme, C.E. (2008). Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. *Aquaculture Engineering*, 38, 26-35.
- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P. & Correa-Reyes, J.G. (2001). Biochemical composition of benthic marine diatoms using as cultured

- medium a common agricultural fertilizer. *J. of Shellfish Research*, 20(2), 611-617.
- Simental, J.A. & Sánchez-Saavedra, M.P. (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquaculture Engineering*, 27, 265-272.
- Siqueiros, D. (1994). Asociaciones de las diatomeas bentónicas marinas; Análisis de su estructura y aplicación. Tópicos selectos sobre microalgas, *Serie científica*, 2(1), 59-71.
- Soderhall, K. & Thorquist, O. (1979). *Crustacean immunity-A short review*. Gudding R. Ediciones, Fish Vaccinology. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger.
- Soliz, E., Baquerizo, J. & Monteverde, E. (1989). Prueba de estrés para determinación de calidad de larvas de laboratorio. *Infolab*, 3, 3-5.
- Sritunyalucksana, K. & Söderhäll, K. (2000). The proPO and Clotting System in crustaceans. *Aquacult.*, 191, 53–69.
- Staats, N., De Winder, B., Stal, L.J., Mur, L.R. (1999). Isolation on characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur. J. Phycol.*, 34, 161-169.
- Su-Tuen, Y. & Jiann-Chu, C. (2008). Immunomodulation by carrageenans in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 276, 22-28.
- Tackaert, W., Abelin, P., Léger, Ph. & Sorgeloos, P. (1989). Stress resistance as a criterium to evaluate quality of postlarval shrimp reared under different feeding procedures, pp: 393-403. Proceeding III Simposio Brasileiro sobre Cultivo de Camarão, vol. I. MCR Aquacultura Ltda, Joao Pessoa (PB), Brasil, 565 pp.
- Tadros, M.G. & J.R. Johansen, J.R. (1988). Physiological characterization of six lipid producing diatom from the south-eastern, U.S. *J. Phycol.*, 24, 445-452.

- Teshima, S-I & A. Kanazawa (1984). Effects of the protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates the prawn larvae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50(10), 1709-1715.
- Tseng, D., Lin, H., P., Huang, S., Cheng, S., Shiu, Chiu, C. *et al.* (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiótico, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immun.*, 26, (p.339).
- van de Braak, C.B.T. & Faber, R., Boom, J.H. (1996). Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. *Comparative Haematology International*, 6, 194-203.
- Villegas, C.T. & Kanazawa, A. (1979). Relationship between diet composition and growth of the zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. *Fish. Res. J. Philipp.*, 4(2), 32-40.
- Voltolina, D. (1991). A comparison of methods for the dispersion of cultures of benthic diatoms. *Criptogamie Algal.*, 12(3), 183-187.
- Voltolina, D. (1994). Cultivo de microalgas bentónicas para la alimentación de juveniles de abulón (*Haliotis* spp). Tópicos Selectos sobre Microalgas, *Serie Científica*, 2(1), 87-97.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L.M. & Romo-Figueroa, G. (1998). Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 121(3), 309-314.

BIBLIOGRAFÍA EN ZOTERO

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E. & Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de La Coruña (Eds.), Monografías No.26. España.
- Alfonso, E. (1996). Larvicultura de Camarões Marinhos. En T.C.V.Gesteira e A.J.P.Nunes (Eds.) *Anais do Primeiro Workshop do Estado do Ceará sobre Cultivo de Camarão Marinho* (86-100 pp.), Fortaleza, Ceará, Brasil.
- Alfonso, E. (1999). Cultivo de alimento vivo: actualidad y perspectivas. *Congreso Naturamigos '99*, Cancún, México, Conferencia Magistral, 9 pp.
- Alfonso, E., Ramos, L., Díaz-Iglesia, E., García, T. & Rosas, C. (1993). *Manual del II curso internacional de postlarvas de camarones peneidos del Atlántico de América*. Ciudad de Campeche, México, pp. 39-55.
- Almaguer, Y., Alfonso, E. Leal, S. (2004). Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Rev. Invest. Mar.*, 25(1), 57-64.
- Alpuche, J., Pereyra, A. y Agundis, C. (2005). Purification and of a lectin from the White shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochim. Biophys Acta*, 1724, 86-93.
- Araya, R., Bahamontes, C., Barahona, K. & Silva-Aciares, F. (2010). Utilización de una biopelícula microalgal multiespecífica para optimizar la fijación larval y el crecimiento del abalón (*Haliotis rufesciens*) en un criadero comercial. *Rev. Biol. Mar. y Oceanogr.*, 45(1), 59-69.
- Arellano, E. Pedrazzoli, A. & Montoya, Q.F.N. (1989). Primeros resultados preliminares de métodos de estrés para determinación de calidad de larvas. *Infolab*, 3, 6-9.
- Bachere, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191, 3-11.
- Bower, S., Holm-Hansen, T. (1980). Simplified hydrazine-reduction method for determining high concentration of nitrate in recirculate seawater. *Aquaculture*, 21, 281-286.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4), 315-331.

- Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R. & Stal, L.J. (2005). Biogenic stabilization of intertidal sediment: the importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms. *Microb. Ecol.*, 49, 501-512.
- Carbajal-Miranda, M.J., Sánchez-Saavedra, M.P. & Simental, J.A. (2005). Effect of monospecific and mixed benthic diatom cultures on the growth of red abalone postlarvae *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 401-405.
- Cedeño, R., Valenzuela, E. & Rodríguez, J. (2000). Efectores inmunitarios como marcadores de deficiencias nutricionales en dietas para *Litopenaeus vannamei*. *Panorama Acuicola*, 5, 42-44.
- Chang, W. & O'connor, J.D. (1983). Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In Mantel, L.H. (Ed.), *The biology of crustacea*, vol. 5, (pp. 263-287). Academic Press, New York.
- Cheng, W. y Cheng, J.C. (2000). Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immun*, 10, 387– 391.
- Cheng, W., Tsai, L.H., Huang, C.j. Chiang, P.C., Cheng, C.H., Yeh, M.S. (2008). Cloning and characterization of hemolymph clottable proteins of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Developmental and Comparative immunology*, 32, 265-274.
- Claybrook, D.L. (1983). Nitrogen metabolism. En Mantel L.H (ed), *The biology of Crustacea, internal anatomy and physiological regulation*. Vol.5 (pp.163- 213). Academic Press, Nueva York.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., Quintana, P., Banguela, I. Muñoz, D. et al. (2004). Cultivo de la microalga bentónica *Navicula* sp. para la alimentación de las primeras postlarvas de camarón blanco. *Rev. Invest. Mar.*, 25(2), 143-150.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., & Almaguer, Y. (2006). Alimentación de las primeras postlarvas de camarón *Litopenaeus schmitti* con una especie de diatomea bentónica. *Rev. Invest. Mar.*, 27(3), 231-236.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N. & González, O. (2012). Sustitución parcial o total del alimento artificial en la alimentación de postlarvas tempranas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Cuba, 1er Taller Internacional PescaCONyMA 2012, Resúmenes.

- Dobretsov, S. (2010). Marine biofilms. In Dürr, S. and Thomason, J.C.(Eds.), *Biofouling (Cap. 9)*, Wiley-Blackwell.
- Decho, A.W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their roles in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 28, 73-153.
- Fegan, D. (1992). Recent developments and issues in the penaeid shrimp hatchery industry. In Wyban, J. (ed.), *Proceedings of the special session on shrimp farming* (89 pp). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Gallardo, P.P. (2000). Aspectos nutrimentales y fisiológicos de larvas del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767): Esquema de alimentación. Tesis de Maestría para la obtención del título de Máster en Biología Marina, UNAM, México.
- García, T. (1997). Estado del arte de la investigación científica en nutrición de peneidos. *Taller de Trabajo "La Investigación Científica en Peneidos de Iberoamérica"*, La Paz, México, pp. 47-55.
- García, T. (1998). Nutrición de larvas de camarón. *Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, La Paz, México, 9 pp.
- GEDECAM (2009a). POT. P.3.FT.12. Clorinación del agua salada. MINAL, p.1-2.
- GEDECAM (2009b). POT. P.3. CR. 08. Alimentación. MINAL, p.1-4.
- GEDECAM (2009c). POT. P.2.LB.04. Calidad de postlarvas a cosechar. MINAL, 20-21 p.
- Griffith, D.R.W., Laborde E. & Wigglesworth J.M. (1992). Biological and economic of penaeid larval rearing using benthic diatoms. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, pp. 101–105.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In W.L. Smith & M.H. Chanley (Eds.) *Culture of Marine Invertebrates Animals* (pp. 29-60).
- Hahn, K.O. (1989). *Handbook of culture of Abalone and other Marine Gastropods*. CRC Press. Boca Raton, Florida.

- Hall, M.R. & van Ham, E. H. (1998). The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World. Aquacult. Soc.*, 29, 290-299.
- Hernández-López J, Gollas-Galván T & Vargas-Albores F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C, 61-66.
- Holt. G.J. & F. Sun (1991). Lipase activity and total lipid content during early development of red drum *Sciaenops ocellatus*. In P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Oliverr (Eds.), *Symposium on fish and crustacean larviculture, Larvi 91, Fish and Crustacean Larviculture Symposium* (pp. 30-339).
- Ito, S. & Kitamura H. (1997). Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Stichopus japonicus* by periphitic diatoms. *Hydrobiology* 358, 281-284.
- Jaime-Ceballos, B., Galindo-López, J., Laria-Lamela, E., Cupul-Magaña, F., Vega-Villasante, F. (2008). Traslado de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) a diferentes tiempos, salinidades y densidades y su efecto en la supervivencia y algunos marcadores bioquímicos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, Vol. 43, (3), 681-686.
- Kawamura, T., Saido, T., Takami, H. & Yamashita, Y. (1995). Dietary value of benthic diatoms for the growth of postlarval abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 194, 189-199.
- Khatoun, H, Yusoff, F. Md., Banerjee, S., Shariff, M., Mohamed, S. (2007). Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. *Aquaculture*, 271, 196-205.
- Knuckey., R.M., Brown, M.R., Barret, S.M. & Hallegraeff, G.M. (2002). Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 211, 253-274.
- Laria, R. (2004). Biomarcadores de estrés en el manejo de reproductores del camarón *Litopenaeus schmitti*. Tesis de Maestría para la obtención del título de Máster en Biología Marina y Acuicultura, Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana.

- Laria, R., Silveira, R., Cruz, Y., & Martínez, M. (2005). Phenoloxidase and peroxidase activity in the shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 36, 12–93.
- Lavens, P., Merchie, G. & Sorgeloos, P. (1998). Critical reviews of the larval fish crustacean feeding methods with ascorbic acid enriched diets: Effects on fish and shrimp growth, stress and disease resistance. *World Aquaculture '98*, Las Vegas, USA, 250 pp.
- Le Moullac, G. & Haffner, P. (2000). Environmental factors affecting immune response in Crustacea. *Aquaculture*, 191, 121–131.
- Leal, S., Miranda, A., Curbelo, R. & Hernández, J. (2010). Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. México, Nuevo León. *X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, CD-ROM, pp. 559-580.
- Leal, S., Curbelo, R., Vega, X., Núñez, N. & Hernández, J. (2012): Método de dispersión de biopelículas en cultivos de la diatomea bentónica *Amphora* sp. para facilitar el conteo directo. *Serie Ocenológica*, 10, 23-29.
- Liu, P.C., Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H. & Chen, S.N., (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.*, 33, 129–132.
- Liu, C.H., Yeh, S.T., Cheng, S.Y. & Chen, J.C. (2004). The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to vibrio infection in relation with the moult cycle. *Fish Shellfish Immun*, 16, 151–161.
- Mazón-Suástegui, J.M., Bazua-Sicre, L., Lucero-Martínez, G.L. & Rodríguez- Ramos, R. (1992). Producción de semilla de abulón en el laboratorio: El método de Bahía Tortugas. In M.J. Sheperd, S.A. Stegner y Guzmán del Proo, (Eds.) *Abalone of the world; biology, fisheries and culture* (pp.561-569). Fishing News Books, Oxford.
- Moreno, J. L., Licea, S. & Santoyo, H. (1996). Diatomeas del Golfo de California. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 272pp.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W.P.W. & Mialhe, E., Bachere, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191, 89-107.

- Noga, E. J. (2000). Haemolymph biomarkers of crustacean health. *Recent Advances in Marine Biotechnology*, 5, 125-163.
- Noga, E. J. (2001). Nonspecific Immunity: Applications to Aquaculture. ARS-01 Biotechnology-Aquaculture Workshop 2001.
- Olivera, A. (2002): Valor nutricional das microalgas. *Revista da ABCC, Año 4(2)*, 63-68.
- Pascual, C., Gaxiola, G. & Rosas, C. (2003b). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*, 142, 735-745.
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G. & Rosas, C. (2003a). Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218, 637-650.
- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari P. & Barracco, M.A.A. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214, 19-33.
- Pérez-Farfante I. & B. Kensley (1997). Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world, keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires Muséum National d' Histoire Naturelle, Zoologie*, 175-235.
- Peterson, J.J. & Curiel, J.I. (2002). Larvicultura de camarão aprimorada como uso de diatomáceas. *Revista da ABCC, Año 4(2)*, 40-42.
- Plasencia, A., Leal, S., Voltolina, D. & Curbelo, R. (2004). Cultivo de la diatomea bentónica *Amphora* cf. marina con una zeolita cubana enriquecida. *Rev. Invest. Mar.*, 25(2), 151-158.
- Rahim, S.A.K.A., Li, J.H. & Kitamura, H. (2004). Larval metamorphosis of the sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardaris crassispina* in response to microbial films. *Mar. Biol*, 144, 71-78.
- Racotta, I.S. & Palacios, E. (1998). Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World. Aquacult. Soc.*, 29, 351-356.

- Racotta, I. S., Palacios, E. & Méndez, L. (2002). Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 35: 269-275.
- Roberts, R., Kawamura, T., Tanaki, H. (2000). Diatoms for abalone culture : a workshop for abalona farmers. New Zeland, 4th International Abalone Symposium, Cawthron Report No. 547, p. 28.
- Roberts, R. (2001). A review of settlement cues for larval abalone (*Haliotis* spp.). *Journal Shellfish Research*, 20(2), 571-586.
- Rodríguez, J. (1996). Estado del Arte de la Investigación Científica en Inmunología de Penaeidos. Taller de Trabajo: La investigación científica en Penaeidos de Ibero América, 10-14 junio, pp. 37-45.
- Rodríguez, J. & Le Moullac, G. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquacult.*, 19, 109–119.
- Rodríguez-Ramos, T., Borrell, Y., Ramos, L. Bécquer, U. & Espinosa, G. (2001a). Actividad hemoaglutinante de la hemolinfa de *Litopenaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 22, 229-234.
- Rodríguez-Ramos, T., Borrell, Y., Ramos, L., Bécquer, U. & Espinosa, G. (2001b). Aplicación de la actividad hemoaglutinante de la hemolinfa de *Litopenaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 22, 235-240.
- Rodríguez-Ramos, T., Espinosa, G., Hernández-López, J., Golla-Galván, T., Marrero, J., Borrel, Y. *et al.* (2008). Effects of *Echerichia coli* lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 274, 118-125.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C. *et al.* (2000). Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 249, 181-198.
- Rosas, C., Cuzan, G., Gaxiola, G., LePriol, Y., Pascual, C., Rossignol, J. *et al.* (2001). Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 259, 1-22.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G. & Wormhoudt, A. V. (2002). An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 268, 47-67.

- Sánchez, A., Jaime, B., Delgado, G. & Pérez, L. (2002). Evaluación del alimento natural epibentónico en estanques de tierra teniendo en cuenta la densidad de camarones en cultivo. *I Congreso Virtual de Acuicultura*. Extraído el 5 de Enero, 2012, de <http://www.civa2002.org>.
- Searcy-Bernal, R., Salas-Garza, A. & Flores-Aguilar, R. (1992). Investigaciones en México sobre la etapa crítica de la producción de semilla de abulón (*Haliotis* spp.). In S.A. Sheperd, M.J. Tegner & S.A. Guzmán (Eds.), *Abalone of the world: biology, fisheries and cultures* (pp:547-560). Fishing News Books, Oxford.
- Sheskin, D. (2007). Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Chapman & Hall, CRC, Boca Raton.
- Shu-Ling, H., Yuan-Hwa, R., Yi-Chen, L., Pei-Shan, H., Chin-Hwa, H. & Ching-Ming, K. (2008). Immune and physiological response in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 275, 335-341.
- Silva-Aciaras, F. & Riquelme, C.E. (2008). Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. *Aquaculture Engineering*, 38, 26-35.
- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P. & Correa-Reyes, J.G. (2001). Biochemical composition of benthic marine diatoms using as cultured medium a common agricultural fertilizer. *J. of Shellfish Research*, 20(2), 611-617.
- Simental, J.A. & Sánchez-Saavedra, M.P. (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquaculture Engineering*, 27, 265-272.
- Siqueiros, D. (1994). Asociaciones de las diatomeas bentónicas marinas; Análisis de su estructura y aplicación. Tópicos selectos sobre microalgas, *Serie científica*, 2(1), 59-71.
- Soderhall, K. & Thorquist, O. (1979). *Crustacean immunity-A short review*. Gudding R. Ediciones, Fish Vaccinology. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger.
- Soliz, E., Baquerizo, J. & Monteverde, E. (1989). Prueba de estrés para determinación de calidad de larvas de laboratorio. *Infolab*, 3, 3-5.
- Sritunyalucksana, K. & Söderhäll, K. (2000). The proPO and Clotting System in crustaceans. *Aquacult.*, 191, 53-69.

- Staats, N., De Winder, B., Stal, L.J., Mur, L.R. (1999). Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur. J. Phycol.*, 34, 161-169.
- Su-Tuen, Y. & Jiann-Chu, C. (2008). Immunomodulation by carrageenans in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 276, 22-28.
- Tackaert, W., Abelin, P., Léger, Ph. & Sorgeloos, P. (1989). Stress resistance as a criterion to evaluate quality of postlarval shrimp reared under different feeding procedures, pp: 393-403. Proceeding III Simposio Brasileiro sobre Cultivo de Camarão, vol. I. MCR Aquacultura Ltda, Joao Pessoa (PB), Brasil, 565 pp.
- Tadros, M.G. & Johansen, J.R. (1988). Physiological characterization of six lipid producing diatom from the south-eastern, U.S. *J. Phycol.*, 24, 445-452.
- Teshima, S-I & Kanazawa (1984). Effects of the protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates of the prawn larvae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50(10), 1709-1715.
- Tseng, D., Lin, H., P., Huang, S., Cheng, S., Shiu, Chiu, C. *et al.* (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immun.*, 26, (p.339).
- van de Braak, C.B.T. & Faber, R., Boom, J.H. (1996). Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. *Comparative Haematology International*, 6, 194-203.
- Villegas, C.T. & Kanazawa, A. (1979). Relationship between diet composition and growth of the zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. *Fish. Res. J. Philipp.*, 4(2), 32-40.
- Voltolina, D. (1991). A comparison of methods for the dispersion of cultures of benthic diatoms. *Cryptogamie Algol.*, 12(3), 183-187.
- Voltolina, D. (1994). Cultivo de microalgas bentónicas para la alimentación de juveniles de abulón (*Haliotis* spp). Tópicos Selectos sobre Microalgas, *Serie Científica*, 2(1), 87-97.

Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L.M. & Romo-Figueroa, G. (1998). [Shrimp plasma HDL and \$\beta\$ -glucan binding protein \(BGBP\): comparison of biochemical characteristics](#). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 121(3), 309–314.