



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DE ESTRÉS DE
Litopenaeus vannamei POR MEDIO DEL
ALIMENTO FORMULADO**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Acuicultura)

Presenta

Eliza Magdalena Martínez Antonio

La Paz, Baja California Sur, enero 2020

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las ~~horas~~ ⁰⁹ del día 09 del Mes de Diciembre del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Modulación de la respuesta de estrés de *Litopenaeus vannamei* por medio del alimento formulado"

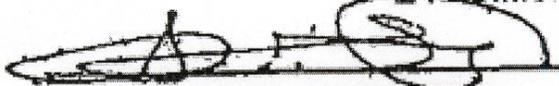
Presentada por el alumno:

Eliza Magdalena Martínez Antonio

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



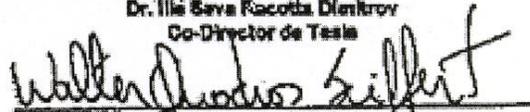
Dr. Francisco Javier Magalón Barajas
Co-Director de Tesis



Dr. Iliá Sava Racotta Dientrov
Co-Director de Tesis



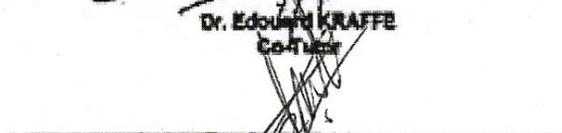
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Tutor



Dr. Walter Quedros Seiffert
Co-Tutor



Dr. Edouard KRAFFE
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
Co- Director de tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.
Co-Director de tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.
Co-tutor

Dr. Walter Quadros Seiffert
Universidad Federal de Santa Catarina
Co-tutor

Dr. Edouard KRAFFE
Université de Bretagne Occidentale
Co-tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dr. Walter Quadros Seiffert
Dr. Edouard KRAFFE

Jurado de Examen

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dr. Walter Quadros Seiffert
Dr. Edouard KRAFFE

Suplentes

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Resumen

Los sistemas de cultivo hiper-intensivos implican la exposición de los camarones a condiciones de estrés que pueden afectar el éxito de cultivo, dado que dependen de las capacidades de respuesta de los organismos. En estas condiciones, la regulación de metabolismo energético asociado a respuestas de estrés dependerá en buena medida de una nutrición adecuada que permita un óptimo estatus energético a nivel celular que puede ser inferido a partir de compuestos como el ATP y la carga energética adenilica (CEA), la disponibilidad de reservas a corto plazo, como el fosfato e arginina (Arg-P) y el glucógeno, y largo plazo como los triglicéridos y las proteínas de reserva.

Así, en este tipo de sistemas, la calidad del alimento formulado es crucial dado a que no sólo determina la capacidad de crecimiento y supervivencia, sino muy probablemente también la capacidad de respuesta de los organismos a factores de estrés propios del sistema de cultivo. Sin embargo, ésta relación se ha estudiado principalmente en relación a estrés biológico por patógenos y en menor grado en estrés ambiental o por manejo.

El objetivo principal del presente trabajo consiste en conocer la proporción de inclusión de los principales sustratos energéticos y fuente de fósforo en el alimento formulado con la cual los organismos puedan hacer frente a hipoxia y el manejo de los organismos, factores estresores propios de los sistemas de cultivos intensificados. Para esto, se diseñaron una serie de alimentos con variaciones de las fuentes energéticas (proteína, lípidos y carbohidratos) en los bioensayos #1 y #2, y de la fuente de fósforo en el bioensayo #3. Estos alimentos fueron consumidos por los camarones por varias semanas y posteriormente se realizó una prueba de estrés, la cual consistió en estimular la respuesta de escape y la exposición a hipoxia ambiental.

En el bioensayo #1, se analizó la influencia de un alimento experimental con menor contenido de proteínas y mayor contenido de carbohidratos así como la inclusión de ácidos orgánicos y una mezcla probiótica. Se determinó que el consumo de un alimento experimental mejoró el estado energético en términos de CEA y del contenido de Arg-P en el músculo de los camarones, permitiendo un mejor desempeño ante un factor de estrés crónico como salinidad baja, así como un mejor estatus energético antes factores de estrés agudo como la hipoxia y la respuesta de escape por manejo. En el bioensayo #2, se probaron un total de 20 alimentos con diferente inclusión de proteína (Pro), carbohidratos (CHO) y lípidos (Lip) y dado que se suministró la misma concentración de proteína por medio de la alimentación ajustada, se registró el efecto de la variación de CHO y lípidos con respecto a la proteína (CHO/Pro y Lip/Pro, respectivamente). La respuesta fisiológica se caracterizó por el incremento en un mejor uso de glucosa hemolinfática como sustrato energético para hacer frente a la hipoxia seguida de la respuesta de escape con el consumo de alimentos con altas proporciones de carbohidratos (CHO/Pro).

Los niveles de CHO/Pro y Lip/Pro en el alimento determinaron los respectivos niveles de glucógeno y triglicéridos en los tejidos. La magnitud de la respuesta de estrés combinada por hipoxia y respuesta de escape fue muy marcada en términos de incremento de lactato, disminución de CEA y ArgP, no observándose diferencias entre los tratamientos. En el bioensayo #3, no se encontraron diferencias significativas en el diseño en cultivo (crecimiento y supervivencia) ni en el estatus energético durante la respuesta de estrés por hipoxia y respuesta de escape, por el consumo de diferentes fuentes de fósforo en el alimento.

En general por medio del presente trabajo se concluye que *Litopenaeus vannamei* tiene la capacidad de usar la proteína del alimento eficientemente para el crecimiento, siempre y cuando la proporcionalidad con carbohidratos y lípidos sea adecuada, la cual determina la respuesta de estrés bajo condiciones de hipoxia y manejo.

Palabras clave: *estrés, hipoxia, manejo, salinidad baja, Carga Energética Adenilica*

Vo.Bo.



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Director de tesis



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Co-Director de tesis

Summary

Hyper-intensive farming systems involve the exposure of shrimp to stress conditions that can affect the production, since this depends on the response organisms capabilities. Under these conditions, the regulation of energy metabolism associated with stress responses will depend largely on adequate nutrition that allows optimal energy status at the cellular level that can be inferred from compounds such as ATP and Adenylate Energy Charge (AEC) , the availability of short-term reserves, such as arginine phosphate (Arg-P) and glycogen, and long-term such as triglycerides and reserve proteins.

Thus, in this type of systems, the quality of diet is crucial given that it determines the capacity for growth and survival, but also the ability of the of organisms to respond to stress factors of farming systems. However, this relationship has been studied mainly in relation to biological stress due to pathogens and to a lesser extent in environmental or management stress.

The main objective of the present work is to know the proportion of inclusion of the main energy substrates and phosphorus source in the diet that will improve the response of organisms to hypoxia and the management of stress associated with culture intensification. For this purpose, a series of diets with variations of the energy sources (protein, lipids and carbohydrates) in bioassays # 1 and # 2, and the phosphorus source in bioassay # 3 were designed. These diets were consumed by shrimp for several weeks and subsequently a stress test was performed, which consisted of stimulating the escape response and exposure to environmental hypoxia.

In bioassay # 1, the influence of an experimental diet with lower protein content and higher carbohydrate content as well as inclusion of organic acids and a probiotic mixture was analyzed. It was determined that the consumption of an experimental diet improved the energy status in terms of AEC and the Arg-P content in the shrimp muscle, allowing a better performance in the face of a chronic stress factor such as low salinity, as well as a better energy status to cope with hypoxia and the escape response as acute stressors. In bioassay # 2, a total of 20 diets with different inclusion of protein (Pro), carbohydrates (CHO) and lipids (Lip) were tested. Given that the same protein concentration was supplied through the adjusted diet, the effect of CHO and Lip variation with respect to protein (CHO / Pro and Lip / Pro, respectively) was analyzed. High carbohydrate proportions (CHO / Pro) promoted a better use of hemolymphatic glucose, as an energy source, to cope with hypoxia followed by the escape response. The levels of CHO / Pro and Lip / Pro in the diet determined the respective levels of glycogen and triglycerides in the tissues. The magnitude of the stress response combined by hypoxia and escape response was very marked in terms of lactate increase, decrease in CEA and ArgP, and it was not different between treatments. In bioassay # 3, no significant differences were found in productive performance (growth and survival) or in the energy status during the

hypoxia stress response and escape response, due to the consumption of different sources of phosphorus in the diet.

In general, through this work it is concluded that *Litopenaneus vannamei* has the ability to use diet protein efficiently for growth, as long as the proportionality with carbohydrates and lipids is adequate, which in turn will determine the ability to cope with stress conditions such as hypoxia and management.

Keywords: *stress, hypoxia, escape response, low salinity, Adenylate Energy Charge*

Vo.Bo.



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Director de tesis



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Co-Director de tesis

Dedicatoria

Éste trabajo de tesis que me ha enseñado a confiar en la vida, va dedicado a todas las personas que me acompañaron en el camino, especialmente:

A mis padres, por ser apoyo y amor incondicional

A mis hermanas Gaby y Alma, por ser mis compañeras de vida

A mi abuelo Vicente Antonio por promover la independencia de sus hijas

Sin importar que tan urbana sea nuestra vida, nosotros venimos de la Tierra y retornaremos a ella, y es así que existimos en la agricultura y acuicultura tanto como existimos en nuestra propia carne.

Wendell Berr

Agradecimientos

Al CIBNOR como institución receptora de los estudios de Posgrado y al CONACyT por la beca otorgada (#296397). Esta investigación se llevó a cabo gracias al financiamiento del proyecto CONACyT (FINNOVA) y DACI-CONACyT (260464).

A mí comité: Dr. Francisco Magallón Barajas, Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov, Dr. Alberto Peña Rodríguez, Dr. Walter Quadros y Dr. Edouard Krafee, por su dirección, apoyo y aportes académicos y personales.

Al “Apoyo para Titulación de Mujeres Indígenas Doctorantes STEM 2019” dentro del Programa Estancias Posdoctorantes para Mujeres Mexicanas Indígenas en Ciencia, Tecnología, Ingenierías y Matemáticas, por el apoyo otorgado para la participación a eventos científicos.

Al personal del Laboratorio de Microbiología: Dra. Paola Magallón, Dra. Melissa López Vela, MC. Cristina Galaviz, MC. Salvador Reyes, por el diseño y producción de la mezcla probiótica.

Al Dr. Ernesto Goytortua Bores por la formulación de los alimentos y el apoyo para la preparación en Planta de alimentos del CIBNOR y UABCS.

A la Lic. Sandra de La Paz Reyes y su equipo de trabajo del Laboratorio de Nutrición Acuícola Experimental por su apoyo para el desarrollo de los bioensayos.

Al MC. Roberto Hernández Herrera por el apoyo para el análisis de las variables bioquímicas en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica

Al personal del Laboratorio de Metabolismo Energético: MC. Rosa Linda Salgado García y Dra. Arlett Robles Romo por el asesoramiento y facilidades para el análisis de variables energéticas y a la MC. Dulce Valeria Ramírez Rodríguez y MC. Nairobi Pacheco Carlon por el apoyo para el procesamiento de muestras.

A la MC. Alondra Martínez Hernández por el análisis del agua en el Laboratorio de Análisis Químico del Agua. Al Dr. Iban Murillo Murillo por facilitarnos los Kits para medición de nutrientes en el agua.

Al MC Baudilio Acosta Vargas y Griselda Francisca Peña Armenta por las facilidades por agua destilada y el análisis elemental en el laboratorio.

A la MC. Ma Olivia Arjona Lopez por el apoyo para el análisis de ácidos grasos en el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos.

A la Dra. Elena Palacios Mechetnov y el Dr. Roberto Civera Cerecedo por las clases no formales de metabolismo y nutrición.

Al Laboratorio de Camarones Marinos de la Universidad Federal de Santa Catarina (UFSC) en Brasil, por la estancia otorgada.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Genómica, Gabriela Mendoza Carrion y MC. Diana Barajas Sandoval, por su paciencia en los análisis moleculares.

Al Dr. Marco A. Cadena Roa, por facilitarnos el uso de la planta de alimento de la UABCS, Unidad Pichilingue.

Al Departamento de Posgrado, integrado por Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic Leticia Gonzalez Rubio Rivera, Tania Verónica Núñez Valdez, Adriana Teresa Franzoni Garcia y a las Dras. Norma Hernández Saavedra y Gracia Alicia Gómez Anduro, por las facilidades y apoyo constante.

A la Lic. María Magdalena Galavez González por facilitar el contacto y apoyos con el Dr. Ilie Racotta.

A Horacio Sandoval Gómez por su accesibilidad en el centro de cómputo y por la atención para la reuniones de evaluación de semestre.

Al departamento de posgrado por su atención y asesoría: Tania Verónica Nuñez Valdez, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia Gonzalez Rubio Rivera y a la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro.

A Ana María Talamantes Cota, Susana Luna García, Elizabeth Guadalupe Sánchez Vázquez, por su apoyo constante y interés en mi desarrollo en el doctorado.

A mi compañero de experimentos y amigo Juan Carlos Ruvalcaba Márquez.

A Salvador Anwart Meza Jiménez por el apoyo en soporte electrónico.

A los miembros del taller de materiales: Alfonso Alvarez Casillas, Jorge Cobos Anaya, Carlos Soto Carrasco, Guillermo García Cortés y Nolberto Lucero Vega.

A mis colegas, Celene Navarro y Sergio Alan Ulaje, por sus consejos.

A amigos, Dani, Monica, Marcela, Oswaldo, Roberto, Milton, Ana, por su apoyo en todo momento.

Contenido

Resumen.....	i
Summary.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos	vi
Contenido.....	viii
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Nutrición energética.....	3
2.2. Respuesta fisiológica de estrés	4
2.3. Cultivo a baja salinidad	8
2.4. Estado energético.....	10
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
5.1. Objetivo general.....	15
5.2. Objetivos particulares.....	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1. Alimento formulado	16
6.2. Bioensayo #1	17
6.2.1. Condiciones experimentales	17
6.2.2. Elaboración de alimento formulado	18
6.3. Bioensayo #2	20
6.3.1. Condiciones experimentales	20
6.3.2. Alimento formulado.....	20
6.4. Bioensayo #3	22
6.4.1. Condiciones experimentales	22
6.4.2. Alimento formulado.....	23
6.5. Factores de estrés	24

6.5.1.	Respuesta de escape.....	25
6.5.2.	Hipoxia ambiental.....	25
6.6.	Parámetros zootécnicos.....	26
6.7.	Análisis.....	26
6.7.1.	Análisis de agua.....	26
6.7.1.1.	Perfiles elementales del agua.....	27
6.7.2.	Análisis bioquímicos.....	27
6.7.3.	Análisis de nucleótidos y Arg-P.....	29
6.7.4.	Análisis molecular.....	30
6.7.4.1.	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	30
6.7.4.2.	Expresión relativa de arginina quinasa (AK) por RT-qPCR.....	30
6.8.	Análisis estadísticos.....	31
7.	RESULTADOS	33
7.1.	Bioensayo #1.....	33
7.1.1.	Análisis químico proximal del alimento formulado.....	33
7.1.2.	Parametros zootécnicos.....	34
7.1.3.	Respuesta fisiológica.....	35
7.1.3.1.	Bioquímica de hemolinfa.....	36
7.1.3.2.	Bioquímica de tejidos.....	38
7.2.	Bioensayo #2.....	43
7.2.1.	Análisis químico próximo del alimento formulado.....	43
7.2.2.	Análisis del agua.....	43
7.2.3.	Parámetros zootécnicos.....	44
7.2.4.	Respuesta de estrés.....	46
7.2.4.1.	Bioquímica de hemolinfa.....	47
7.2.4.2.	Bioquímica de tejidos.....	50
7.2.4.3.	Arginina fosfato (Arg-P) y nucleótidos en músculo.....	52
7.3.	Bioensayo #3.....	56
7.3.1.	Análisis químico proximal del alimento formulado.....	56

7.3.2.	Análisis del agua	56
7.3.3.	Parámetros zootécnicos	57
7.3.4.	Respuesta de estrés.....	57
7.3.4.1.	Bioquímica de hemolinfa.....	58
7.3.4.2.	Bioquímica de tejidos.....	59
7.3.4.3.	Arginina fosfato (Arg-P) y nucleótidos en músculo	62
7.3.4.4.	Expresión relativa de arginina quinasa (AK)	63
8.	DISCUSIÓN	64
8.1.	Efecto de la salinidad baja y alimento	64
8.2.	Efecto del fósforo en el alimento	70
8.3.	Respuesta fisiológica	73
8.3.1.	Proteínas totales y hemocianina.....	73
8.3.2.	Glucosa y glucógeno	74
8.3.3.	Lípidos y triglicéridos	75
8.3.4.	Fosfágenos.....	76
9.	CONCLUSIONES	80
10.	LITERATURA CITADA	83
	ANEXO A	91
	ANEXO B	95

Lista de figuras

Figura 1. Análisis PCR cuantitativo de expresión relativa de AK (promedio \pm error estándar) en músculo de camarones que consumieron 4 alimentos con diferente fuente de fósforo durante 42 días y expuestos a estrés por persecución e hipoxia.	63
---	----

Lista de tablas

Tabla I. Respuesta de estrés en términos de la concentración total de proteína (TP), glucosa (GL), lactato (LAC), triglicéridos (TG) y hemocianina (HC) en hemolinfa de <i>L. vannamei</i> , reportado por diversos autores.	7
Tabla II. Composición de alimento (%) del alimento control y experimental en el bioensayo #1.....	19
Tabla III. Niveles de inclusión de diferentes ingredientes para la elaboración de 20 alimentos para el Bioensayo #2.	21
Tabla IV. Niveles de inclusión de ingredientes de los 4 alimentos utilizados en el bioensayo #3.....	23
Tabla V. Fórmula semidesarrollada de las fuentes de fósforo utilizadas para la elaboración de los alimentos en el bioensayo #3.....	24
Tabla VI. Sustratos metabólicos para cuantificación en diferentes tejidos de <i>L. vannamei</i> en bioensayos.	28
Tabla VII. Métodos para la cuantificación de sustratos metabólicos.....	28
Tabla VIII. Secuencias de primers para AK y RPL8	31
Tabla IX. Factores para el Análisis de Varianza según el bioensayo.	32
Tabla X. Análisis proximal promedio \pm desviación estándar de los alimentos control y experimental utilizados en el bioensayo #1.	33
Tabla XI. Contenido de ácidos grasos (promedio \pm desviación estándar) en los alimentos control y experimental utilizados en el bioensayo #1.....	34
Tabla XII. Parámetros zootécnicos (promedio \pm error estandar) de <i>L. vannamei</i> con el cosumo de alimento (A) control y experimental y cultivado a 37 and 6 ups de salinidad (S) durante 42 días.....	35
Tabla XIII. Niveles Bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hemolinfa de <i>L. vannamei</i> cultivados a 37 y 6 ups (salinidad(S)), que consumieron alimento control y experimental (A) por 6 semanas y expuestos a hipoxia y manejo (E=prueba de estrés).	37
Tabla XIV. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hepatopáncreas de <i>L. vannamei</i> cultivado a 37 y 6 ups (salinidad(S)), que consumieron alimento control y experimental (A) por 6 semanas y expuestos a hipoxia y manejo (E=prueba de estrés).	39
Tabla XV. Niveles Bioquímicos (promedio \pm error estándar) en músculo de <i>L. vannamei</i> cultivado a 37 y 6 ups (salinidad(S)), que consumieron alimento control y experimental (A) por 6 semanas y expuestos a hipoxia y manejo (escape) (E=prueba de estrés).	40
Tabla XVI. Concentración de Arg-P y Carga Energética Adenilica (CEA) (promedio \pm error estándar) en músculo de <i>L. vannamei</i> cultivado a 37 y 6 ups (salinidad(S)), que consumieron alimento control y experimental (A) por 6 semanas y expuestos a hipoxia y manejo (E=prueba de estrés).....	42

Tabla XVII. Análisis químico proximal de 20 alimentos probados en el bioensayo de crecimiento #2.....	43
Tabla XVIII. Concentraciones promedio \pm desviación estándar (mg.L ⁻¹) de los nutrientes residuales en el agua del cultivo de camarones que consumieron diferentes alimentos	44
Tabla XIX. Parámetros zootécnicos de camarones cultivados durante 49 días con 20 alimentos diferentes. Abajo se muestra el resultado del ANOVA de dos vías.	46
Tabla XX. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hemolinfa de camarones que consumieron 6 alimentos con diferente proporción CHO/Pro y Lip/Pro por 7 semanas y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.	49
Tabla XXI. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hepatopáncreas de camarones que consumieron 6 alimentos con diferente proporción CHO/Pro y Lip/Pro por 7 semanas y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.	53
Tabla XXII. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en músculo de camarones que consumieron 6 alimentos con diferente proporción CHO/Pro y Lip/Pro por 7 semanas y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.	54
Tabla XXIII. Niveles de Arg-P y Carga Energética Adenilica (CEA) (promedio \pm error estándar) músculo de camarones que consumieron 6 alimentos con diferente proporción CHO/Pro y Lip/Pro por 7 semanas y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.	55
Tabla XXIV. Análisis químico proximal de 4 alimentos con diferente fuente de fósforo, utilizados en el bioensayo 3 de crecimiento.	56
Tabla XXV. Concentraciones promedio \pm desviación estándar (mg.L ⁻¹) de los nutrientes residuales en el agua del cultivo de camarones que consumieron diferentes alimentos.	57
Tabla XXVI. Parámetros zootécnicos de camarones cultivados durante 42 días con 4 alimentos diferentes.	57
Tabla XXVII. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hemolinfa de camarones que consumieron 4 alimentos con diferente fuente de fósforo durante 42 días y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.	59
Tabla XXVIII. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hepatopáncreas de camarones (n=10) alimentados con 4 alimentos de diferente fuente de fósforo durante 42 días y sometidos a percusión e hipoxia.	60
Tabla XXIX. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en músculo de camarones (n=10) alimentados con 4 alimentos de diferente fuente de fósforo durante 42 días y sometidos a percusión e hipoxia.	61
Tabla XXX. Concentración de Arg-P y nucleótidos (promedio \pm error estándar) en músculo de camarones que consumieron 4 alimentos con diferente fuente de fósforo durante 42 días y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.	62

Tabla XXXI. Condiciones experimentales de trabajos reportados con relación al efecto de la salinidad en el crecimiento y supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> . PC (%) porcentaje de proteína cruda en el alimento formulado.....	67
Tabla XXXII. Proteína cruda (PC) óptima en el alimento para el mayor crecimiento de <i>L. vannamei</i> expuesto a variaciones de salinidad.....	69
Tabla A4. Perfil elemental (ppm) en los diferentes tratamientos del Bioensayo #1.	94

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la expansión e intensificación de la acuicultura ha conllevado riesgos productivos principalmente, en términos de sanidad acuícola, calidad de producto y costos ambientales (González-Félix y Pérez-Velázquez, 2006). Por esto, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) pretende impulsar la búsqueda de nuevas estrategias que promuevan el uso eficiente de los recursos para la acuicultura, con la finalidad de encaminar a una acuicultura sostenible, a través de la optimización en la producción de alimentos funcionales e integración de cultivos animales con cultivos vegetales.

En México, el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, es la especie con el mayor valor acuícola. Por lo cual, las áreas prioritarias de la investigación relativa a este cultivo, son aquellas que encaminen hacia la sostenibilidad mediante una acuicultura integrada (Chamberlain, 2010).

Actualmente los sistemas cultivo tienden a intensificarse para cubrir la demanda que ha dejado de cubrir las pesquerías desde los últimos años. Sin embargo, estos tipos de sistemas implican la exposición de los camarones a diversos factores crónicos (altas densidades, altas concentraciones de nutrientes en el agua, entre otras) y agudos (eventos de hipoxia, manejo) que deben manejarse para garantizar el éxito de cultivo, el cual a su vez está determinado por la respuesta fisiológica de los organismos a dichos factores (Avnimelech, 2012). Aunado a que en este tipo de sistemas el alimento formulado es el principal componente que influye en la nutrición de los camarones, el factor alimento determina la capacidad de crecimiento, supervivencia y probablemente la respuesta de los organismos a factores estresores propios del sistema de cultivo.

Por ejemplo, el cultivo de salinidad baja a pesar de que representa una estrategia que disminuye los problemas epidemiológicos y la presión del uso y contaminación del agua en zonas costeras, implica cierta situación de estrés crónico con cierto

costo energético de osmoregulación y la necesidad de ciertos nutrientes específicos que requieren ser compensados (Li *et al.*, 2017). Por lo anterior, el desempeño de los camarones en este tipo de cultivo puede disminuir por la falta de un alimento óptimo y el balance iónico en el agua de salinidad baja (Romano y Zeng, 2012).

Por lo anterior, es de suma importancia determinar el efecto del alimento en diferentes escenarios que puedan desencadenar una respuesta de estrés. Si bien existen numerosos estudios relacionados que evalúan niveles de metabolitos, como reflejo del estado fisiológico para determinar las condiciones de cultivo donde los organismos son susceptibles a estrés (Racotta *et al.*, 2002; Hall y Ham 1998; Chiu *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2013; Aparicio-Simón *et al.*, 2010; Racotta y Palacios, 1999), la relación de la respuesta de estrés a factores estresores crónicos y agudos en función del alimento formulado, aun no es clara.

Por lo tanto, este trabajo evalúa la respuesta fisiológica de los organismos a la exposición a factores de estrés crónico (salinidad baja) y agudos (hipoxia y manejo) por medio de mediciones de metabolitos hemolinfáticos, musculares y hepatopancreáticos, y el estatus energético a nivel celular, en función a la variación de sustratos energéticos (proteína, carbohidratos, lípidos y fósforo) en el alimento.

2. ANTECEDENTES

2.1. Nutrición energética

Los camarones, como cualquier organismo, necesitan de energía para realizar procesos vitales como el mantenimiento de funciones, crecimiento y reproducción. Los nutrientes obtenidos a partir del alimento natural y/o formulado sirven como precursores para la biosíntesis de una gran diversidad de moléculas y además proporcionan la energía química, la cual es conocida como energía metabólica ya que por medio de ésta se lleva a cabo las rutas anabólicas y catabólicas necesarias para la supervivencia y crecimiento de los organismos (Burton y Rout, 1977).

Se conoce que la energía metabólica en condiciones aeróbicas proviene de la oxidación de macronutrientes como proteínas, carbohidratos y lípidos asimilados a partir del alimento que consumen, los cuales son degradados durante la digestión a aminoácidos, hexosas (principalmente glucosa) y ácidos grasos y glicerol, respectivamente. Estos sustratos se incorporan en diferentes niveles a reacciones anabólicas que permiten la retención de energía en el organismo o se catabolizan para generar energía. Las reacciones exergónicas acopladas a la síntesis de moléculas que posean al menos un enlace de alta energía (enlace fosfoanhídrido) es una estrategia para el intercambio de energía según se requiera. Una de estas moléculas es el adenosín trifosfato o ATP, el cual ha sido ampliamente estudiado ya que su hidrólisis libera la energía necesaria para la síntesis, el transporte transmembranal, la contracción muscular, entre muchas otras funciones (Cuzon, *et al.*, 2004).

En la etapa de engorda de camarones en cultivo, se busca el máximo crecimiento en menor tiempo, por lo cual se han realizado grandes esfuerzos desde hace más de 30 años por parte de científicos, acuicultores y de la industria de alimentos e insumos para generar conocimiento acerca de nutrición de organismos de interés acuícola y de esta manera generar alimentos con base en los requerimientos

nutricionales para obtener crecimientos máximos a menores costos (Cuzon *et al.*, 2004).

En este contexto, las fuentes de proteína constituyen el mayor costo a considerar para la formulación del alimento, por lo cual las investigaciones se han enfocado en optimizar su uso exclusivo para el crecimiento, mientras que los carbohidratos, los cuales representan costos menores, son utilizados como fuente de energía metabólica. En el aspecto energético, los lípidos representan la mayor fuente de energía metabólica (9.44 kcal/g) en comparación con las proteínas y carbohidratos (5.6 y 4.11 kcal g⁻¹, respectivamente); sin embargo, se tiene reportado que los camarones no toleran niveles mayores del 10% (D'Abamo, 1997).

Esta situación ha producido un amplio debate acerca de la formulación de alimentos para el crecimiento de camarones, debido a que hay amplio número de factores endógenos y exógenos que se deben tomar en cuenta para comprender la utilización de energía y nutrientes en los organismos (Cuzon *et al.*, 2004).

Por lo tanto, es necesario entender los efectos de los cambios en los sustratos energéticos (proteína, carbohidratos y lípidos) del alimento en la fisiología del camarón y consecuentemente en el desempeño productivo con el propósito de generar alimentos que además de producir máximos crecimientos, también garanticen la salud de los organismos, del ambiente y optimización de la economía del cultivo (Cuzon y Guillaume, 1997; Davis, 2010; FAO, 2016).

2.2. Respuesta fisiológica de estrés

Los organismos mantienen un equilibrio dinámico, llamado homeostasis, la cual es afectada constantemente por diversos factores externos. El estrés es una respuesta fisiológica adaptativa del organismo para mantener la homeostasis que ocurre ante estímulos externos o internos denominados factores de estrés o estresores, que puede implicar afectaciones negativas para el organismo a nivel de capacidad de respuesta inmune, desequilibrios metabólicos, hasta deficiencias en los procesos del ciclo de vida; crecimiento, reproducción y supervivencia (Chrousos, 2009).

Los sistemas de cultivo intensivos y más aún los hiperintensivos conllevan la exposición a una serie de factores que producen en los organismos la respuesta de estrés, la cual en primer término tiene un carácter adaptativo para mantener la homeostasis, aunque puede producir una alteración en dicha homeostasis y producir las consecuencias negativas arriba mencionadas si dicha respuesta se prolonga o se repite en el tiempo. La respuesta de estrés implica, en primer término (respuesta primaria), la activación de mecanismos neuroendocrinos que desencadenan la respuesta metabólica (secundaria) que consiste en la movilización de sustratos energéticos (aminoácidos, glucosa, triglicéridos, entre otros) para producir la energía necesaria, para restablecer la condición de homeostasis que fue alterada. Cuando esto no se logra, el crecimiento se ve afectado ya que la energía destinada al crecimiento es redireccionada para hacer frente al factor estresor (Lucas, 1996). Los nutrientes obtenidos a partir del alimento natural o formulado son la fuente de dichos sustratos energéticos, los cuales sirven como precursores para la biosíntesis de una gran diversidad de moléculas y proporcionan la energía química por medio de moléculas fosfatadas, como el ATP, el fosfato de arginina (Arg-P) y los polifosfatos (PolyP) para el mantenimiento, crecimiento y reproducción de los organismos (Burton y Rout, 1977).

Los factores estresores se pueden clasificar de acuerdo con el tiempo de exposición. Los factores estresores agudos son eventos puntuales o de corta duración, por ejemplo los factores que incluyen la manipulación de los organismos (captura, transporte, biometría) y eventos de hipoxia. Los factores estresores crónicos son eventos de mayor tiempo de duración, tales como variaciones de salinidad, pH, temperatura, densidad de cultivo (Giesy *et al.*, 1981).

Por lo tanto, diversos grupos de investigación se han dedicado a la búsqueda de indicadores de la respuesta de estrés y de su intensidad, con el propósito de obtener herramientas del diagnóstico del estado fisiológico de los organismos en cultivo, buscando establecer indicadores hasta cierto punto predictivos del posible deterioro fisiológico ante factores de estrés previo a la ocurrencia de mayor susceptibilidad a

infecciones y enfermedades que finalmente resultan en mortalidades (Chrousos, 2009; Giesy et al., 1981).

En la tabla I se muestran los indicadores en hemolinfa de la respuesta de estrés de *L. vannamei* que han sido reportados en diferentes condiciones de cultivo. En general, se observa que los niveles de proteínas totales y glucosa varían de acuerdo a la alimentación (Pascual *et al.*, 2006; Rosas *et al.*, 2001). Mientras que el incremento del nivel de glucosa se presenta en varios escenarios como hipoxia, aumento de temperatura, manejo y después de la alimentación (Racotta *et al.*, 2002; Hall y Ham 1998; Chiu *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2013; Aparicio-Simón *et al.*, 2010; Racotta y Palacios, 1999). El nivel de lactato aumenta cuando se somete a los organismos a hipoxia y manejo (Racotta *et al.*, 2002; Aparicio-Simón *et al.*, 2010; Racotta y Palacios, 1999.).

Tabla I. Respuesta de estrés en términos de la concentración total de proteína (TP), glucosa (GL), lactato (LAC), triglicéridos (TG) y hemocianina (HC) en hemolinfa de *L. vannamei*, reportado por diversos autores.

Factor estresor	TP (mg ml ⁻¹)	GL (mg dl ⁻¹)	LAC (mg dl ⁻¹)	TG (mg dl ⁻¹)	HC (mg ml ⁻¹)	REF
Aumento de TAN	185-168.8	14.0-22.7	15.1-10.6	32-21		1
Inanición (5% PD)	250-100	50-20	3.5-0.5	33-20		2
Inanición (40% PD)	300-175	50-20	3.1	45-15		
Hipoxia (3 días)	117	57*	30.1*		76.1	3
Hipoxia (14 días)	135.7	45.3*	34.4*		110.6*	
Post-alimentación		164.5*				4
Aumento de 4 °C	79.5*	26.3*	10.20*	87.2	58.7*	5
Presencia de biota	184.8*	56.8*		150		6
Después de nadar	70-50*	14.4-18				7
Inyección dopamina	120-130*	34.2-68.4				8
Post-alimentación	90*	21	6*			9
Manejo	111*	17.1	3.6	39.5*	72.7	10
Post-alimentación	90	25*		215		11
Aumento de 12 °C	145-160	49-57*				12
Manejo	77.7*	45*	17*	48.3	62.8	13
Inyección serotonina	100	45*	45*	30		14
Inclusión de acidulante	124.6*	45.4*				15
Microbiota y manejo	230	35	50*	78*		16

*Indica diferencias significativas con respecto al control. 1. Racotta y Hernández-Herrera, 2000. 2. Pascual *et al.*, 2006. 3. Racotta *et al.*, 2002. 4. Rosas *et al.*, 2001. 5. Carreño-Mejía, 2009. 6. Porchas-Cornejo *et al.*, 2011. 7. Zhang *et al.*, 2006. 8. Chiu *et al.*, 2006. 9. Rosas *et al.*, 2002. 10. Mercier *et al.*, 2006. 11. Sánchez-Paz *et al.*, 2007. 12. Díaz *et al.*, 2013. 13. Aparicio-Simón *et al.*, 2010. 14. Racotta y Palacios, 1999. 15. Anuta *et al.*, 2011. 16. Martínez-Antonio, 2013.

2.3. Cultivo a baja salinidad

El cultivo de camarón en agua de salinidad baja ha sido una opción atractiva en muchas partes del mundo con el objetivo de disminuir los problemas epidémicos y la contaminación del agua en zonas costeras (Saoud *et al.*, 2003; McGraw *et al.*, 2002). Así, se han impulsado cultivos de camarón con agua subterránea de baja salinidad en diversas regiones de Estados Unidos de Norteamérica (McGraw *et al.*, 2002), Ecuador, Tailandia (Saoud *et al.* 2003; Roy *et al.*, 2007), China (Cheng *et al.*, 2006) y México (Tamayo, 1998).

Debido a que parte del ciclo de vida de *L. vannamei* ocurre en ambientes costeros, estos organismos están adaptados para sobrevivir a periodos cortos de disminución de oxígeno en el agua y a variaciones de salinidad. Sin embargo, a pesar de que su tolerancia a los cambios de salinidad, se ha reportado que su crecimiento y supervivencia son afectados, principalmente cuando la disminución de la salinidad es por debajo de 10 ups (unidades prácticas de salinidad; Wang *et al.*, 2014).

Uno de los primeros mecanismos para hacer frente a estos factores para mantenimiento de la homeostasis, es el aumento de la capacidad de captación de oxígeno y de mecanismos de osmoregulación, respectivamente (Burton y Rout, 1977). Particularmente, mediante la osmorregulación los organismos regulan la concentración de sales para mantener la homeostasis de la presión osmótica interna, lo cual genera una mayor demanda de energía. En peces marinos, la osmorregulación utiliza del 20% al 50% de la energía metabólica disponible, por lo tanto la energía para crecimiento disminuye (Li *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando la capacidad de regulación es sobrepasada, la supervivencia y el crecimiento de los organismos es comprometida, debido a la condición de estrés crónico que generan la variación de salinidad (Romano y Zeng, 2012).

La osmoregulación requiere de energía y de nutrientes, los cuales se obtiene del alimento consumido en forma de proteína y lípidos principalmente (Rosas *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2002). Por esto, las estrategias para aumentar la supervivencia

y el crecimiento de los organismos cultivados a salinidad baja, consisten principalmente en la suplementación del alimento, el cual deberá de proveer suficientes nutrientes y energía para afrontar la disminución de la salinidad y el cambio en el balance iónico en el agua y de esta manera no afectar el crecimiento en estas condiciones (Roy *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2004; Romano y Zeng, 2012). Por lo anterior, se ha reportado el mejoramiento del desempeño en términos de crecimiento y supervivencia, mediante una formulación adecuada del alimento y del suplemento de ciertos iones en el agua de salinidad baja para garantizar un adecuado balance iónico (Romano y Zeng, 2012).

Si bien se ha reportado la preferencia en el uso de proteína del alimento como adaptación a ambientes con salinidades bajas (Rosas *et al.*, 2001), su requerimiento a salinidades por debajo de 5 ups no ha sido definido, debido a que existe una controversia acerca del impacto del nivel de proteína del alimento en la supervivencia y fisiología de los camarones (Li *et al.*, 2015; Pérez-Velázquez *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha registrado que niveles altos de lípidos en lo alimentos mejora el desempeño de *L. vannamei* en condiciones de salinidad baja. Por una parte debido a que tanto los lípidos como los carbohidratos pueden proveer la energía necesaria para la osmorregulación. Por otro lado, se han reportado el aumento de la capacidad osmorreguladora por la inclusión de algunos lípidos como los fosfolípidos, glucolípidos y colesterol (Davis *et al.*; Li *et al.*, 2015).

Por lo anterior, el nivel de inclusión de sustratos energéticos (proteína, carbohidratos y lípidos) en los alimentos debe considerar las condiciones en las que se van a cultivar a los organismos (por ejemplo, salinidad baja) y las posibles condiciones que puedan aumentar la demanda energética (exposición a factores estresores) para garantizar el éxito del cultivo (Li *et al.*, 2017). Aunado a que el alimento formulado es aún la principal fuente de nutrientes y energía en los sistemas de cultivo, es la mejor herramienta con la se cuenta para mejorar la respuesta

fisiológica bajo dichas condiciones y con esto garantizar un mejor desempeño de los camarones en cultivo.

2.4. Estado energético

Al considerar que la homeostasis energética es esencial para asegurar una buena condición fisiológica, el cambio del estado energético a nivel celular es un indicador de la respuesta de los organismos bajo condiciones adversas (Pascual *et al.*, 2004). En este contexto la Carga Energética Adenilica (CEA, 1) se ha propuesto como un índice que refleja la respuesta del estrés ambiental, debido a que describe una relación entre la de la concentración de Adenosín Trifosfato (ATP), difosfato (ADP) y monofosfato (AMP), la cual describe la regulación de transferencia de energía por medio de sistemas enzimáticos catabólicos y anabólicos. La CEA es calculada de acuerdo a la siguiente fórmula (1; Ivanovici, 1980).

$$CEA = \frac{ATP + \frac{1}{2}ADP}{ATP + ADP + AMP} \quad (1)$$

La CEA presenta valores de 0 a 1, donde niveles próximos a 1.0 indican una energía metabólica disponible alta, la cual disminuye conforme el valor de este índice se acerca a 0 (Atkinson, 1968).

Otros componentes que también definen el estado energético, han sido considerados en situaciones donde la energía aportada por la hidrólisis aeróbica del ATP es sobrepasada por la demanda de energía, como ocurre en el movimiento “tail-flip” de escape de los camarones (Robles-Romo *et al.*, 2016). Bajo estas condiciones, la producción de ATP es anaeróbica y su origen son fosfatos de alta energía aportados por los fosfógenos musculares. En crustáceos es el fosfato de arginina (Arg-P) es el fosfógeno más importante descrito hasta ahora y que, por su enlace fosfato de alta energía, actúa principalmente como un buffer de ATP para que la demanda de energía sea cubierta rápidamente (England y Baldwin, 1983; Ellington, 2001).

Además de los fosfágenos, existen diversas moléculas que son fuente de energía debido a sus enlaces covalentes, una de esas moléculas son los polifosfatos (PolyP). Los PolyP son polímeros que contienen desde <10 a 100's de iones fosfato unidos por enlaces fosfoanhídridos. En células microbianas, los gránulos de polifosfatos o gránulos de Volutina son sintetizados como reserva de energía y fósforo y son degradados para sintetizar ATP o la disposición de fósforo (Rao *et al.*, 2009). Durante el siglo pasado y el presente se ha soportado al idea de que los PolyP son fundamentales para las respuestas al estrés ambiental, debido a que tienen funciones como fuente de energía, quelato divalente, buffer frente a estrés alcalino y regulador del ciclo celular en microorganismos (Albi y Serrano, 2016).

Los estudios que relacionen el desempeño de los organismos en cultivo como el caso del camarón con la incorporación de PolyP en el sistema de cultivo son inexistentes, sin embargo existe un par de registros que presentan evidencia indirecta de que existe un efecto favorable al incluir polifosfatos en los alimentos de los camarones. Estos reportes se enfocan en el efecto de la vitamina C en post larvas (Kontara *et al.*, 1997) y juveniles (Niu *et al.*, 2009) de *L. vannamei*. Sin embargo y dado que la vitamina C fue suplementada en el alimento bajo forma de ácido ascórbico-2-polifosfato, lo cual confieren mayor estabilidad molecular a la vitamina, es posible que el efecto benéfico también se deba parcialmente a la presencia de polifosfatos. El trabajo de Niu y colaboradores (2009), pone de manifiesto que el contenido de ascórbico-2-polifosfato está relacionado directamente con la supervivencia de los organismos bajo estrés crónico de hipoxia por 9 días, lo cual muy bien podría explicarse por el papel de polifosfatos en suministro inmediato de energía por vía anaerobia, modelo similar al de fosfágenos en crustáceos (Arg-P).

Sin embargo, para esclarecer el papel del fósforo en los camarones en diferentes escenarios, primeramente se debe determinar cuál es la mejor fuente de fósforo en el alimento, si al igual que en los microorganismos, los camarones tienen la capacidad de utilizar los PolyP como sustrato energético.

Desde que Davis y Arnold en 1994 plantearon la posibilidad de que la disponibilidad del fósforo dependerá de la fuente, son pocos los estudios que determinan el efecto de la fuente del fósforo en el cultivo de crustáceos comerciales. Por lo cual, en la actualidad y específicamente en el caso de *L. vannamei* se reporta requerimientos de 0.34-2% de 3 principales fuentes: Ca, Na y K (Kanazawa *et al.*, 1984; Davis *et al.*, 1993). La disponibilidad del fósforo dependerá de la conformación molecular, lo cual está relacionado con el grado de lixiviación de éste elemento en el agua (Davis y Arnold, 1994), y de la capacidad de los organismos de asimilar éste (especificidad enzimática, por ejemplo).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Litopenaeus vannamei* representa en México el mayor valor acuícola y aunado al crecimiento de su cultivo en los próximos años, se han propuesto el cultivo a salinidad baja y la generación de alimentos funcionales como estrategias para promover el uso eficiente de los recursos, con la finalidad de encaminar a una acuicultura sostenible (FAO, 2016).

En los sistemas de cultivo, el alimento formulado es el principal componente que influye en la nutrición de los organismos y en el flujo de nutrientes, por lo cual determina la capacidad de crecimiento, supervivencia y probablemente la respuesta de los organismos a estresores propios del sistema de cultivo. Por lo anterior, es de suma importancia determinar el efecto del alimento en diferentes escenarios que puedan desencadenar una respuesta de estrés. Sin embargo, no se ha logrado entender cuál o cuáles son los sustratos energéticos que pueden determinar un mejor desempeño en cultivo como reflejo de un buen estado fisiológico. Existen estudios relacionados que evalúan niveles de metabolitos hemolinfáticos musculares y hepatopancreáticos, para determinar las condiciones donde los organismos son susceptibles a estrés como: hipoxia (Racotta *et al.*, 2002; Mugnier *et al.*, 2008), variación de salinidad e incremento de amonio (Racotta y Hernández-Herrera, 2000) y manipulación (Mercier *et al.*, 2006).

Sin embargo, la relación de la respuesta de estrés a estresores crónicos y agudos en función del alimento formulado, aun no es clara. El propósito raíz del presente trabajo de investigación consiste en conocer la proporción de inclusión de los principales sustratos energéticos (proteína, lípidos y carbohidratos) y fuente de fósforo en el alimento formulado con la cual los organismos puedan hacer frente a los factores estresores propios de los sistemas de cultivos intensificados, como lo son la disminución de oxígeno en el agua (hipoxia) y el manejo de los organismos.

4. HIPÓTESIS

Si la respuesta fisiológica de *Litopenaeus vannamei* a estresores crónicos (baja salinidad) y agudos (hipoxia y manejo), depende del estado nutricional de los camarones, entonces las variaciones en los macro (proteína, carbohidratos y lípidos) y micronutrientes (fósforo) en el alimento, modularán la respuesta de estrés disminuyendo así la vulnerabilidad de los camarones en términos de desempeño productivo y respuesta de estrés.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Analizar la respuesta fisiológica de *L. vannamei* a un factor de estrés crónico de salinidad baja y a factores agudos de hipoxia y manejo en relación con la variación de macro (proteína, carbohidratos y lípidos) y micronutrientes (fósforo) en el alimento.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar la respuesta fisiológica de *L. vannamei* por salinidad baja (estresor crónico) y por hipoxia y manejo (estresores agudos) en relación al nivel de proteína en el alimento formulado.
- Evaluar la respuesta fisiológica de *L. vannamei* a una condición de estrés agudo (manejo e hipoxia combinada) en relación a la variación de la proporcionalidad de macro nutrientes (carbohidratos/proteína y lípidos/proteína) en el alimento formulado.
- Evaluar la respuesta fisiológica de *L. vannamei* a una condición de estrés agudo (manejo e hipoxia combinada) en relación a la variación de la fuente de fósforo en el alimento formulado.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluó la respuesta fisiológica de *L. vannamei* a la exposición a factores de estrés crónicos (salinidad baja y alimento formulado) y factores agudos (manejo e hipoxia). Para lo cual, se formularon una serie de alimentos en los cuales se variaron las fuentes energéticas (proteína, lípidos y carbohidratos) y fósforo, los cuales fueron consumidos por los camarones por varias semanas y posteriormente se les sometió a dos pruebas de estrés: persecución e hipoxia ambiental.

Por lo anterior, se realizaron tres experimentos en condiciones controladas de laboratorio o bioensayo, en los cuales se evaluó el efecto de los alimentos formulados en términos de crecimiento y parámetros zootécnicos y posteriormente después el efecto de la exposición a los factores agudos (persecución e hipoxia) en términos de parámetros bioquímicos en hemolinfa y tejidos y parámetros energéticos en músculo.

6.1. Alimento formulado

En general, los alimentos se formularon para cubrir los requerimientos de aminoácidos libres, vitaminas y minerales de la especie y de conformidad con la revisión bibliográfica hasta 2015. Las fuentes principales de proteína fueron harina de pescado, harina de soya, harina de trigo y levadura (Tabla II). Las harinas de trigo y soya se realizaron a partir de los granos que provenían de la Forrajera San Joaquin. Mientras que el aceite de pescado fue proporcionado por Maz Industrial, S.A. de C.V. y el concentrado de soya por Procesadora de Ingredientes S.A. de C.V.

El alimento que se probó en el bioensayo #1, llamado alimento experimental, fue el resultado del PROYECTO CONACYT “Alimentos balanceados de nueva generación para el cultivo de camarón”, en donde se planteó la innovación en la elaboración de alimentos para camarón, la cual consistió en ingredientes que disminuyen el costo del alimento, mejoran la calidad del agua y contribuyen a disminuir la incidencia de problemas epidemiológicos.

Por lo anterior, todos los alimentos elaborados en este trabajo fueron alimentos con inclusión baja de harina de pescado, baños de ácidos orgánicos y probióticos (selección de levaduras y lactobacilos en medio líquido). Una vez extruido y seco, el alimento experimental fue sometido a un baño de ácidos orgánicos y posteriormente a un baño de aceite de pescado para su recubrimiento. Los alimentos del bioensayo #1 y #3 se elaboraron en la planta de alimentos del CIBNOR, mientras que los alimentos del bioensayo #2 en la planta de alimentos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Unidad Pichilingue.

Con base a los resultados del bioensayo #1, se decidió formular alimentos una serie de alimentos con cinco proporciones de carbohidrato:proteína (CHO/Pro) combinadas con cuatro proporciones de lípidos (Lip/Pro; 20 alimentos en total) en el bioensayo #2, para conocer el efecto de la relación carbohidratos/proteína y lípidos/proteína en el desempeño del cultivo (crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia) y la respuesta de estrés.

Posteriormente, se seleccionó el alimento con la mejor relación carbohidratos/proteína y lípidos/proteína de acuerdo al desempeño en cultivo y a la respuesta de estrés, el cual se utilizó como base para la formulación de cuatro alimentos con diferentes fuentes de fósforo del bioensayo #3, para conocer su efecto sobre el desempeño del cultivo y la respuesta de estrés.

6.2. Bioensayo #1

Se probó el efecto de la salinidad baja (6 ups) y del alimento experimental en el crecimiento y la respuesta de estrés (apartado 6.5) de los camarones.

6.2.1. Condiciones experimentales

En el laboratorio de nutrición acuícola experimental del Centro de Investigaciones del Noroeste (CIBNOR), se recibieron juveniles de *L. vannamei* (2.97 ± 0.55 g) provenientes de la empresa Acuicultura Mahr ubicada en Playa Pichilingue, La Paz, B.C.S. La aclimatación de los organismos a salinidad baja se realizó paulatinamente

por disminución de salinidad del agua marina por recambio con agua de pozo salinizada (6 ups), la tasa de recambio fue de 1.0 ups hora⁻¹ durante 8 horas diarias. Cuando la salinidad llegó al nivel de 6 ups, los organismos fueron transferidos a las unidades experimentales correspondientes previamente aclimatadas y distribuidos de manera homogénea para cumplir con la normalidad de tallas al inicio del bioensayo. Los camarones asignados para el tratamiento de 35 ups de salinidad, fueron sembrados directamente sin previa aclimatación de salinidad. La densidad de siembra fue de 12 organismos por acuario (67 organismos/m²). Las unidades experimentales fueron acuarios de 60 L de capacidad total. La asignación de tratamiento por acuario fue al azar. Los organismos se mantuvieron en los acuarios por 7 días más para descartar la mortalidad por manejo y aclimatación a salinidad baja. Al término de este tiempo, se inició con el suministro de los diferentes alimentos. Después de una semana de adaptación al alimento, se reguló la temperatura en cada acuario para mantenerla en 26±0.5°C durante todo el experimento.

El experimento duró 42 días (6 semanas) durante los cuales se controlaron los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad y fotoperiodo de 12h: 12h luz: oscuridad.). Se realizaron recambios de agua (80-90%) dos veces por semana y biometrías semanales para registrar el crecimiento y supervivencia. Antes de cada recambio, se tomaron muestras de agua de cada acuario para los análisis de calidad de agua. La alimentación fue del 5% de su biomasa en cuatro raciones diarias (9:00 h, 12:00 h, 15:00 h y 17:00 h).

6.2.2. Elaboración de alimento formulado

En la tabla II se muestran los ingredientes utilizados para la elaboración de los dos alimentos probados en el bioensayo #1. En el apartado 7.1.1. se muestra el análisis químico proximal como resultados de los porcentajes de inclusión de la tabla II. Se observa que el alimento experimental contó una menor inclusión harina de pescado (6%) en comparación con el alimento control (20%). También el alimento

experimental contó con inclusión adicional de fósforo (1.5%), aminoácidos libres, vitaminas y minerales para cubrir los requerimientos de estos de conformidad con la bibliografía pertinente hasta 2015. En el caso del alimento control se utilizó una premezcla de vitaminas y minerales proporcionada por la empresa PIASA. En la siguiente tabla se muestra el análisis proximal de estos alimentos.

Tabla II. Composición de alimento (%) del alimento control y experimental en el bioensayo #1.

Ingrediente	Control	Experimental
Harina de pescado	20	6
Harina de soya	37.2	24.1
Harina de trigo	35	44.5
Aceite de pescado	4	2.6
Lecitina de soya	3	5
Ácido algínico	0.75	2
Mezcla de vitaminas*	0.09*	0.27‡
Mezcla de minerales**	0.05*	8.5†
Levadura†	0	4
Probiótico††	0	1.2
Ácidos Orgánicos‡	0	1
Aceite de pescado + Astaxantina	0	0.5
Mezcla de aminoácidos libres †††	0	0.4

*Mezcla de vitaminas de laboratorio: Colina, Butylated hydroxytoluene (BHT), colesterol, vitamina A, Vitamin A, C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9, B12, B20, D, E, and K.

** Mezcla de minerales de laboratorio: CaCO₃, KH₂PO₄, MgSO₄.H₂O, ZnSO₄.7H₂O, ZnSO₄.H₂O, MnSO₄.4H₂O, FeSO₄, CuSO₄.7 H₂O, Na₂SeO₃, KI, Na₂MoO₄.

† Levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*).

†† Mezcla probiótica de laboratorio, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*.

‡ Mezcla de ácidos orgánicos de laboratorio: ácido propiónico, butílico, acético y nicotínico.

†††Aminoácidos libres de laboratorio: arginina, metionina, lisina, triptófano y treonina.

6.3. Bioensayo #2

6.3.1. Condiciones experimentales

De acuerdo con los resultados del bioensayo #1, los cuales se describen en el apartado correspondiente, se decidió desarrollar los bioensayos 2 y 3 en agua marina.

Durante 49 días, los camarones se alimentaron con los 20 diferentes alimentos, bajo condiciones de laboratorio (6 mgO₂/L, 37 ups de salinidad, 28 °C y fotoperiodo de 12h: 12h Luz: oscuridad). Se realizó 80-90% de recambio de agua, dos veces por semana. La alimentación se basó en la ingesta diaria de proteína (g proteína.Kg biomasa⁻¹) de conformidad con el requerimiento de proteína establecido por Kureshy y Davis (2000), por lo cual, en cada tratamiento se proporcionó la misma cantidad de proteína diaria en función del peso individual con diferentes proporciones de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína. La alimentación se ajustó semanalmente con los datos cada biometría. La ingesta diaria de proteína se dividió y proporcionó en seis raciones diarias (8:00 h, 10:00 h, 12:00 h , 14:00, y 16:00 18:00 h).

Se realizó una prueba de estrés combinado por manejo e hipoxia solo en los camarones que consumieron el alimento 1, 3, 9, 11, 17 y 19 (Tabla II), para considerar sólo 3 proporciones de CHO/Pro (0.6, 1.1 y 2.1 g/g proteína) y dos proporciones de Lip/Pro (0.2 y 0.3 g/ g proteína).

6.3.2. Alimento formulado

En la tabla III se muestra el nivel de inclusión de ingredientes para obtener cinco proporciones de carbohidratos:proteína (FACTOR 1 CHO/Pro: 2.1, 1.5, 1.1, 0.8 y 0.6 g de CHO/g de proteína) y cuatro niveles diferentes de lípidos en proporción a la proteína (FACTOR 2 Lip/Pro: 0.20, 0.23, 0.30 y 0.36 g de lípidos/g de proteína), en total 20 alimentos.

Tabla III. Niveles de inclusión de diferentes ingredientes para la elaboración de 20 alimentos para el Bioensayo #2.

Alim.	#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
CHO/Pro	g/g	2.1				1.5				1.1				0.8				0.6			
LIP/Pro	g/g	0.20	0.23	0.30	0.36	0.20	0.23	0.30	0.36	0.20	0.23	0.30	0.36	0.20	0.23	0.30	0.36	0.20	0.23	0.30	0.36
Harina de trigo	%	51.4	49.6	47.8	46.0	37.4	33.9	33.8	32.0	23.6	23.0	21.2	19.1	16.6	13.7	10.8	7.9	8.4	6.8	1.9	0.0
Concentrado proteico de soya	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	10.0	10.0	10.1	32.4	32.4	32.4	32.4	49.1	49.1	49.1	49.1
Pasta de soya	%	21.9	22.4	22.9	23.4	36.0	37.0	37.0	37.5	36.8	37.0	37.5	37.9	20.4	21.2	22.0	22.8	11.5	11.9	13.3	13.8
Harina de pescado	%	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Aceite de pescado	%	0.7	2.0	3.3	4.6	1.0	2.6	4.1	5.6	1.5	3.2	5.0	6.8	1.8	3.9	5.9	8.0	2.2	4.5	6.9	9.2
levadura†	%	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Mix vitaminas*	%	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
Mix minerales**	%	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
lecitina de soya	%	2.4	2.4	2.4	2.4	3.1	3.1	3.1	3.1	3.8	3.8	3.8	3.8	4.4	4.4	4.4	4.4	5.0	5.0	5.0	5.0
triptófano	%	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2
Ácido alginico	%	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Fosfato dibasico de sodio	%	2.3	2.3	2.3	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.2	2.4	2.4	2.4	1.9	1.9	1.9	1.9	1.5	1.6	1.6	1.6
Metionina	%	0.1	0.1	0.1	0.1	0.04	0.03	0.04	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1
Arginina	%	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KH ₂ PO ₄	%	1.4	1.4	1.4	1.4	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	1.4	1.4	1.4	1.4	1.6	1.6	1.6	1.6
Mix ac. Orgánicos°	%	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
‡ Ac. de pescado°	%	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0

°Baño. *Mezcla de vitaminas de laboratorio: Colina, Butylated hydroxytoluene (BHT), colesterol, vitamina A, Vitamin A, C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9, B12, B20, D, E, and K. ** Mezcla de minerales de laboratorio: CaCO₃, KH₂PO₄, MgSO₄.H₂O, ZnSO₄.7H₂O, ZnSO₄.H₂O, MnSO₄.4H₂O, FeSO₄, CuSO₄.7 H₂O, Na₂SeO₃, KI, Na₂MoO₄. † Levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*). †† Mezcla probiótica de laboratorio, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*. ‡ Mezcla de ácidos orgánicos de laboratorio: ácido propiónico, butílico, acético y nicotínico.

6.4. Bioensayo #3

6.4.1. Condiciones experimentales

Durante 42 días, los camarones se alimentaron con los cuatro alimentos con diferentes fuentes de fósforo, bajo condiciones de laboratorio (5-6 mgO₂/L, 37 ups de salinidad, 28 °C y fotoperiodo de 12h: 12h Luz: oscuridad).

A mediados de mayo del 2018, se recibió en el campo experimental del CIBNOR, un lote de post-larvas de camarón (*Litopenaeus vannamei*) de menos de 1 gr provenientes de la empresa Acuicultura Marh (Playa Pichilingue, La Paz BCS). Las post-larvas se mantuvieron por tres semanas en condiciones de invernadero en sistema de bioflocs (cero recambio de agua, sin inoculación de microorganismos; temperatura= 29.07 °C, salinidad=15.99 ups, pH=7.7 y oxígeno disuelto=6.65 mg.L⁻¹). Posteriormente, 300 organismos fueron trasladados al laboratorio de Nutrición Acuícola del mismo centro de investigaciones. Se realizó una aclimatación durante aproximadamente 5 días a las condiciones del laboratorio (37 ups, 23°C y 5-6 mg de oxígeno disuelto), durante este tiempo las post-larvas se alimentaron con el 10% de su biomasa con alimento comercial PIASA de 35% de proteína.

Para iniciar el bioensayo, por cada alimento se sembraron 12 camarones de pesos similares (1.91±0.1 g) en cuatro acuarios de 50 L previamente aclimatados (35±1 ups, 30±0.5 °C y 5-6 mg de oxígeno disuelto). En total se utilizaron 16 acuarios, cuatro tratamientos (alimentos) por cuadruplicado.

Se realizó 80-90% de recambio de agua dos veces a la semana. El alimento utilizado fue basado en el alimento de altos niveles de CHO/Pro (2.0) y niveles intermedios de Lip/Pro (0.3). La alimentación se ajustó con los datos cada biometría semanal para cubrir la ingesta diaria de proteína de conformidad con los datos de Kureshy y Davis, 2000. Al igual que en el bioensayo #2 la ingesta diaria de proteína se dividió y proporcionó en cuatro raciones diarias (9:00 h, 12:00 h, 15:00 h y 17:00 h).

6.4.2. Alimento formulado

En la tabla IV se muestran los niveles de inclusión de los ingredientes de los 4 alimentos utilizados en el bioensayo. Las fuentes de fósforo fueron: KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. Tal como se muestra en la tabla V, en los primeros tres alimentos la fuente fueron monofosfatos de grado 99% pureza (Sigma aldrich®), mientras que la fuente de fósforo denominada trifosfato de grado alimentario ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) incluida en el último tratamiento fue de QUIMIR, SA de CV, este compuesto consiste en una cadena de tres fosfatos. Los alimentos fueron elaborados en la planta de alimentos del CIBNOR. Una vez extruidos y secados los alimentos se sometieron a un baño ácidos orgánicos y posteriormente a un baño de aceite de pescado (tabla IV).

Tabla IV. Niveles de inclusión de ingredientes de los 4 alimentos utilizados en el bioensayo #3.

Fuente de fósforo	KH_2PO_4	NaH_2PO_4	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$
Harina de pescado (%)	6.5	6.5	6.5	6.5
Pasta de soya (%)	27.5	27.5	27.5	27.5
Harina de trigo (%)	47.3	47.3	47.3	47.3
Aceite de pescado (%)	2.6	2.6	2.6	2.6
Lecitina (%)	2.2	2.2	2.2	2.2
Levadura* (%)	4.0	4.0	4.0	4.0
Triptófano (%)	0.2	0.2	0.2	0.2
Ácido algínico (%)	2.0	2.0	2.0	2.0
Metionina (%)	0.1	0.1	0.1	0.1
Arginina (%)	0.1	0.1	0.1	0.1
Mezcla de vitaminas** (%)	0.3	0.3	0.3	0.3
Mezcla de minerales† (%)	2.2	2.2	2.2	2.2
KH_2PO_4 (%)	3.6	0.0	0.0	0.0
NaH_2PO_4 (%)	0.0	3.2	0.0	0.0
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (%)	0.0	0.0	3.1	0.0
$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (%)	0.0	0.0	0.0	3.3
Celulosa (%)	0.0	0.4	0.5	0.3
Ácidos orgánicos en baño†† (%)	1.0	1.0	1.0	1.0
Mezcla probiótica en baño‡ (%)	0.8	0.8	0.8	0.8
Aceite de pescado en baño (%)	0.5	0.5	0.5	0.5
Total (%)	100	100	100	100

* Levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*).

**Mezcla de vitaminas de laboratorio: Colina, Butylated hydroxytoluene (BHT), colesterol, vitamina A, Vitamina A, C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9, B12, B20, D, E, and K.

† Mezcla de minerales de laboratorio: CaCO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2SeO_3 , KI , Na_2MoO_4 .

†† Mezcla de ácidos orgánicos de laboratorio: ácido propiónico, butílico, acético y nicotínico.

‡ Mezcla probiótica de laboratorio, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*.

Tabla V. Fórmula semidesarrollada de las fuentes de fósforo utilizadas para la elaboración de los alimentos en el bioensayo #3

Alimento #1	Alimento #2	Alimento #3	Alimento #4
$\text{K}^+ \text{O}^- \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{P} \\ \\ \text{O} \end{array} \text{OH}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{O}^- \end{array} \text{Na}^+$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{O}^- \end{array} \text{NH}_4^+$	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{O}^- \text{P} \text{O} \text{P} \text{O} \text{P} \text{O}^- \\ \quad \quad \\ \text{O}^- \quad \text{O}^- \quad \text{O}^- \end{array} \right] \left[\text{Na}^+ \right]_5$
KH_2PO_4	NaH_2PO_4	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$

6.5. Factores de estrés

La salinidad baja en el bioensayo #1 se mantuvo durante todo el experimento, por lo cual ésta se consideró como un estresor del tipo crónico. Al final del bioensayo se aplicó una prueba de estrés de persecución e hipoxia ambiental, las cuales no duraron más allá de 60 min, por lo tanto, fueron estresores agudos.

Al final de cada bioensayo, se expuso a los camarones a persecución e hipoxia ambiental. En el bioensayo #1 dichas pruebas de estrés se realizaron por separado mientras que en el caso de los bioensayos #2 y #3, las pruebas se combinaron.

Cabe aclarar que en el caso del bioensayo #2, se seleccionaron camarones que consumieron alimentos de alta, media y baja proporción de carbohidratos/proteína y dos niveles de proporción de lípidos/proteína, es decir 6 alimentos (1, 3, 9, 11, 17 y 19) de los 20 probados en el bioensayo de crecimiento para la prueba de estrés por hipoxia y persecución.

En general, 20 camarones de cada tratamiento de cualquiera de los bioensayos fueron seleccionados y ayunados al menos 12 horas, de éstos 10 camarones se destinaron para la prueba de estrés, por lo cual se les considero como “grupo

estrés”. Mientras que los otros 10 camarones integraron el “grupo basal” el cual no fue expuesto a ninguna prueba. En el caso del bioensayo #1, el grupo estrés implicó dos grupos a su vez, “grupo escape” y “grupo hipoxia”

A continuación, se describen las pruebas de estrés agudas aplicadas.

6.5.1. Respuesta de escape

La respuesta de escape se caracteriza por contracciones abdominales o “coletazos” (también conocidas como “tail-flipping” en inglés), las cuales fueron inducidas por persecución de la siguiente manera. Se transfirió a cada organismo del grupo estrés en unidades experimentales redondas, donde fueron perseguidos por separado hasta agotamiento (30 segundos aproximadamente), durante este tiempo se registró el número coletazos realizados. El agotamiento se definió como la falta de coletazos después de 3 estímulos físicos (Robles-Romo *et al.*, 2014). Inmediatamente después de esta prueba los camarones fueron muestreados, como se describe en el siguiente apartado, en el caso del bioensayo #1 o transferidos a las unidades experimentales para la exposición a la siguiente prueba de estrés por hipoxia ambiental, solo en el caso de los bioensayos #2 y #3.

6.5.2. Hipoxia ambiental

Se disminuyó oxígeno del agua hasta llegar a niveles de $1.0 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ por medio de la inyección de gas nitrógeno en el agua. La superficie del agua fue cubierta con plástico transparente para evitar el aumento de oxígeno y la compensación de los organismos con el oxígeno del aire. El grupo control se mantuvo en condiciones normales de oxígeno ($>5.0 \text{ mg L}^{-1}$).

En el bioensayo #1 esta prueba fue de 30 min, mientras que en los demás bioensayos fue de 60 min.

Transcurrido el tiempo de hipoxia y persecución, se extrajeron 100-200 μl de hemolinfa a partir del seno hemolinfático ventral con ayuda de una jeringa de 1.0 ml con aguja removible, previamente enjuagada con oxalato de potasio al 5% como

anticoagulante disuelto en una solución isotónica para crustáceos, (SIC: 450 mM NaCl, 10 mM KCl, pH a 7.3; Vargas Albores et al., 1993). Se retiró un úropodo de cada organismo para la identificación del estadio de muda e inmediatamente después los organismos fueron congelados en nitrógeno líquido. Las muestras se mantuvieron a -75 °C hasta su análisis. El mismo procedimiento de muestreo se realizó en camarones del grupo control, que no fueron sometidos a la prueba de estrés.

6.6. Parámetros zootécnicos

Con los datos de cada biometría se calcularon los siguientes parámetros zootécnicos en cada bioensayo

Incremento de peso (%) = ((peso final (g) – peso inicial (g))*100)/ peso inicial (g)

Tasa de crecimiento específica (TCE) (%) = 100 * (ln peso final (g) – ln peso inicial (g))/días del experimento;

Supervivencia (%) = (Número de camarones iniciales – número de camarones muertos)*100/ Número de camarones iniciales;

Factor de Conversión Alimenticia (FCA) = Alimento proporcionado (peso seco) (g)/biomasa húmeda ganada (g)

Eficiencia proteica = Biomasa húmeda ganada (g) / proteína seca consumida (g)

6.7. Análisis

6.7.1. Análisis de agua

La concentración de nutrientes residuales en el agua (N-NH₃, N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃, P-PO₄), fueron monitoreados a lo largo del desarrollo del cultivo antes de cada recambio de agua.

La metodología fue establecida en el laboratorio de análisis químico del agua del CIBNOR basada en técnicas colorimétricas. Para las mediciones de concentración de amonio, nitritos y fosfatos, las técnicas utilizadas se realizaron con base en el método sugerido por la NOM-AA-26 pero con adaptaciones a microplaca por el

Laboratorio de Análisis químico de aguas en el CIBNOR (Hernández-López y Vargas-Albores, 2003). El lector de microplaca utilizado fue Multiskan marca Labsystems Acent versión 1.3.1 (No. Cat. 1507540).

6.7.1.1. Perfiles elementales del agua

Solamente en el caso del bioensayo #1 se midió la concentración de Ca, K, dureza y alcalinidad por medio de métodos colorimétricos de Kit LYSA (Laboratorios y Servicios Ambientales).

Por otra parte, una muestra representativa de cada tratamiento se analizó por espectrofotometría de emisión atómica mediante la digestión ácida por plasma acoplado inductivamente o método ICS-AES, por sus siglas en inglés. El cual estuvo a cargo del grupo de trabajo del Colegio de Postgraduados (COLPOS) en el laboratorio de Edafología. Los elementos que se analizaron fueron: N, B, Ca, Cd, Co, Cr, Fe, Hg, K, Mg, Na, Ni, P, S, Se y Zn.

6.7.2. Análisis bioquímicos

Los sustratos metabólicos que son cuantificados en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas de los organismos en cada bioensayo se muestran en la tabla VI. Los análisis cuantitativos se realizan de acuerdo a la metodología mediante técnicas adaptadas a microplaca en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR (Racotta y Hernández-Herrera, 2000). Mientras que los métodos para dichas mediciones se muestran en la tabla VII. Los tejidos se liofilizaron por 24 horas en una liofilizadora Virtis SP-Industries modelo Bench Top 3.5. Las muestras secas fueron pulverizadas en una homogeneizador de tejidos Fast PREP-24 MO-Biomedicals modelo 6004-500. Las muestras se hidrataron con 1 ml de una solución isotónica de crustáceos (SIC) y nuevamente los extractos fueron homogenizados para los análisis correspondientes.

Tabla VI. Sustratos metabólicos para cuantificación en diferentes tejidos de *L. vannamei* en bioensayos.

Hemolinfa	Músculo	Hepatopáncreas
Proteínas totales	Proteínas totales	Proteínas totales
Hemocianina	Carbohidratos totales	Carbohidratos totales
Glucosa	Glucógeno	Glucógeno
Lactato	Lípidos totales	Lípidos totales
	Lactato	Triglicéridos
	Nucleótidos (AMP, ADP, ATP)	
	Arginina-P	

Tabla VII. Métodos para la cuantificación de sustratos metabólicos.

Análisis	Método	Referencia
Hemocianina	Dilución de plasma	Hagerman., 1986
Proteínas totales	Bradford	Bradford., 1976
Triglicéridos	Enzimático (Kit comercial GPO-PAP)	
Glucosa	Enzimático (Kit comercial GPO-PAP)	
Lactato	Enzimático (Kit comercial GPO-PAP)	
Glucógeno	Enzimático (Kit comercial GPO-PAP)	
Lípidos Totales	Sulfofosfovainillina	Barnes y Blackstock., 1973
Nucleótidos	HPLC	Le Coz 1989 y Moal <i>et al.</i> , 1989
Arg-P	HPLC	Viant <i>et al.</i> , 2001

Para la determinación de proteínas totales de acuerdo con Bradford (1976), el plasma fue diluido 1: 100 con una solución salina isotónica (NaCl 450 mM y KCl 10 mM). En los homogeneizados de hepatopáncreas y músculo, las proteínas totales se determinaron después de la digestión con NaOH (0,1 N) en la dilución 1:20.

La hemocianina se midió directamente a partir de 10 µl de plasma diluido 1:20 con una solución salina isotónica. La absorbancia se leyó a 335 nm y se calcularon las

concentraciones, utilizando un coeficiente de extinción ($E^{1\%}$) de 2,83 (Hagerman, 1986).

6.7.3. Análisis de nucleótidos y Arg-P

El músculo abdominal se disecó y se homogeneizó bajo condiciones criogénicas, luego se realizó la extracción y análisis de nucleótidos adenílicos y Arg-P según Robles-Romo *et al.* (2016). La extracción consistió en la homogeneización en ácido tricloroacético al 10% y la neutralización se obtuvo por medio de una mezcla de trioctilamina y diclorometano (1: 5 v / v).

La cuantificación de nucleótidos adenílicos y Arg-P se realizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) de fase reversa (modelo 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). En el caso del Arg-P, se utilizó una columna SphereClone NH_2O 5 μm 250 x 4.6 mm (PHENOMENEX), y una fase móvil 20 mM de KH_2PO_4 a pH 2.6, con acetonitrilo en una proporción de 72:28 respectivamente, durante 15 min a un flujo de $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Viant *et al.*, 2001). Se empleó estándar de Arg-P (Santa Cruz) para la identificación del pico de Arg-P y el cálculo de su concentración.

Por otro lado, para la separación de nucleótidos se utilizó una columna C18 con octadecilsilano (Hyper Clone 150 mm de largo, 4.6 mm de diámetro interno, 3 μm tamaño de partícula, Phenomenex, Torrance, CA, USA) y cartucho de seguridad C18 (40 mm largo, 3.0 mm diámetro interno, Phenomenex). Las condiciones de flujo fueron, $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, con fase móvil de 0.15 M NaH_2PO_4 buffer, 3 mM tetrahidrofurano como agente de apareamiento de iones, y 8% metanol, ajustado a pH 6.0 with 5 N NaOH. Se emplearon estándares de ATP, ADP, AMP, GTP, GMP, IMP e hipoxantina para la identificación de los picos de los diferentes nucleótidos y el cálculo de la concentración de cada uno de ellos. La carga energética adenílica fue calculada mediante: $\text{AEC} = \text{ATP} + 1/2\text{ADP} / \text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$, de acuerdo a Atkinson (1968).

6.7.4. Análisis molecular

Se realizó un análisis molecular de la expresión relativa de la arginina quinasa (AK) solo en el caso del bioensayo #3, como se describe a continuación.

6.7.4.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

A partir del músculo abdominal disecado en condiciones criogénicas se tomó una alícuota para colocarlo en *RNAlater* y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Se extrajo el ARN total por medio de la maceración con pistilo y Trizol (Ambion®) de acuerdo al protocolo del fabricante. El ARN extraído se cuantificó con ayuda de espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y su integridad se validó por medio de electroforesis con gel de agarosa al 1%. El ARN se trató con ADNasa I (1 U, Sigma Aldrich) durante 30 min a 37 °C para retirar el ADN residual y se inactivó con EDTA (50mM, 10 min, 37 °C). Posteriormente, se agregó 1 ul de oligo dT y se matuvieron 5 min a 70 °C y 5 min en hielo. Finalmente, la retrotranscripción se llevó a cabo por medio de la transcriptasa inversa (ImProm-II Reverse Transcription System), según el protocolo del fabricante (Promega). La síntesis de ADNc se verificó por medio de PCR, en las condiciones que se describen en el siguiente apartado.

6.7.4.2. Expresión relativa de arginina quinasa (AK) por RT-qPCR

Se utilizaron 2 ng de ARN tratado en cada muestra, 6 muestras por grupo experimental (n=6). La reacción se llevó a cabo en un equipo C1000 Touch™ Thermal Cycler (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad). Las condiciones de qPCR fueron las siguientes, un ciclo inicial de 95 °C de 3 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos y finalmente 5 minutos a 72 °C. El control negativo consistió en una reacción por triplicado solo con agua desionizada, libre de ADNc. Se utilizaron primers específicos (Tabla VIII) para una amplificación de producto de 111 pb para AK (Yao, et al., 2009) as como para un gen de referencia (RPL8).

Tabla VIII. Secuencias de primers para AK y RPL8

Primers	Secuencia
AK-F	AGGCGAAGGTTTCCTCTACCCT
AK-R	AGTGGTCGTCGATCAGCTTCTG
RPL8-F	ATTCTGCCTTGGGTCCTTCT
RPL8-R	GCCTAAGGTGCGTGGTGT

R= Reverse primer F= Forward primers

Los valores de los ciclos (Ct) se analizaron y calcularon automáticamente en el software CFX Manager™, versión 3.1 (Bio-Rad). Todos los datos se expresaron en términos de expresión relativa de ARNm para AK.

6.8. Análisis estadísticos

Se verificó la homocedasticidad de las varianzas y la normalidad de los datos zootécnicos, bioquímicos y energéticos. Posteriormente se aplicaron análisis de varianza (ANOVA). En la tabla IX se muestra los factores y niveles analizados en cada bioensayo. Las variables zootécnicas (ganancia de peso (%), Tasa de Crecimiento Específica (TCE), supervivencia (%), FCA y eficiencia proteica) fueron analizadas por medio de un ANOVA de dos vías en el caso de los primeros dos bioensayos, mientras que en el último bioensayo se aplicó una ANOVA de una vía. Las variables bioquímicas y energéticas incluyeron la condición de estrés como un segundo (Bioensayo #3) o tercer factor (Bioensayo #1 y #2), como se muestra en la tabla IX. Cuando se presentaron diferencias significativas, éstas se evaluaron por medio de la prueba a posteriori de Tukey con el 95% de confianza.

Tabla IX. Factores para el Análisis de Varianza según el bioensayo.

Bioensayo	Factor 1	Factor 2	Factor 3
#1	Salinidad (37, 12, 6 y 1 ups)	Alimento (control y experimental)	Estrés (basal y estrés)
#2	CHO/Pro (2.1, 1.5, 1.1, 0.8 y 0.6)	LIP/Pro (0.20, 0.23, 0.30 y 0.36)	Estrés (basal y estrés)
#3	Fuente de fósforo (KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)	Estrés (basal y estrés)	

7. RESULTADOS

7.1. Bioensayo #1

7.1.1. Análisis químico proximal del alimento formulado

En la tabla X y XI se muestran los análisis químicos proximales y el contenido de ácidos grasos de cada alimento.

Tabla X. Análisis proximal promedio \pm desviación estándar de los alimentos control y experimental utilizados en el bioensayo #1.

	Control	Experimental
Proteína cruda(%)	40.4 \pm 0.2 ^a	26.1 \pm 0.1 ^b
Lípidos (%)	8.1 \pm 0.1 ^a	9.0 \pm 0.05 ^b
Carbohidratos (%)	43.3 ^a	54.1 ^b
Humedad (%)	6.4 \pm 0.1 ^a	4.7 \pm 0.1 ^b
Nitrógeno (%)	6.5 \pm 0.02 ^a	4.2 \pm 0.02 ^b
Fibra cruda (%)	1.0 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.1 ^b
Cenizas (%)	7.2 \pm 0.04 ^a	10.2 \pm 0.02 ^b
Energía (cal/g)	4809.6 \pm 3.1 ^a	4391.4 \pm 1.4 ^b

Valores con diferente en el mismo renglón indican diferencias significativas (P<0.05).

Tabla XI. Contenido de ácidos grasos (promedio \pm desviación estándar) en los alimentos control y experimental utilizados en el bioensayo #1.

Ácido graso (%)	Control	Experimental
16:0	15.54 \pm 0.08 ^a	14.40 \pm 0.09 ^b
18:0	4.20 \pm 0.03 ^a	3.92 \pm 0.02 ^b
16:1n-7	3.96 \pm 0.01 ^a	3.51 \pm 0.02 ^b
18:1n-9	13.44 \pm 0.04 ^a	14.64 \pm 0.02 ^b
18:1n-7	2.57 \pm 0.02 ^a	2.23 \pm 0.01 ^b
20:1n-9	1.64 \pm 0.01 ^a	1.53 \pm 0.003 ^b
22:1n-11	2.30 \pm 0.04 ^a	2.17 \pm 0.03 ^a
18:2n-6	27.69 \pm 0.03 ^a	31.44 \pm 0.14 ^b
18:3n-3	3.84 \pm 0.02 ^a	4.32 \pm 0.01 ^b
18:4n-3	1.09 \pm 0.01 ^a	1.00 \pm 0.01 ^b
20:4n-6	0.43 \pm 0.001 ^a	0.36 \pm 0.01 ^b
20:5n-3 (EPA)	6.81 \pm 0.06 ^a	6.15 \pm 0.06 ^b
22:5n-6	1.28 \pm 0.01 ^a	1.16 \pm 0.02 ^b
22:6n-3 (DHA)	8.27 \pm 0.10 ^a	7.33 \pm 0.18 ^b
Σ SAT	23.96 \pm 0.11 ^a	21.74 \pm 0.13 ^b
Σ MUFA	25.86 \pm 0.12 ^a	25.75 \pm 0.01 ^a
Σ PUFA	50.19 \pm 0.23 ^a	52.50 \pm 0.13 ^b
Σ HUFA	18.32 \pm 0.18 ^a	16.41 \pm 0.28 ^b
Total de ácidos grasos (mg.g⁻¹)	8.13 \pm 0.31 ^a	8.75 \pm 0.38 ^a

Σ SAT: suma de ácidos grasos saturados, Σ MUFA: suma de ácidos grasos monoinsaturados, Σ PUFA: suma de ácidos grasos poliinsaturados, Σ HUFA: suma de ácidos grasos altamente insaturados, Σ n-6: suma de n-6, Σ n-3: suma de n-3. Valores con diferente en el mismo renglón indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.1.2. Parametros zootécnicos

Los parámetros zootécnicos fueron afectados significativamente en su mayoría por la interacción entre el factor salinidad y alimento (Tabla XII). Los camarones que fueron cultivados a salinidad marina (37 ups) y que consumieron el alimento control presentaron el mayor incremento de peso y TCE (304 \pm 8 % y 2.5, respectivamente) y menor FCA en comparación con los camarones en los demás tratamientos (tabla XXX). Sin embargo, la eficiencia proteica (EP) fue mayor en los camarones que consumieron el alimento experimental y se cultivaron en ambas salinidades. Por otra parte, la supervivencia promedio fue mayor con el consumo de alimento

experimental debido a la baja supervivencia presentada en el cultivo de baja salinidad y con el consumo del alimento control ($72.2 \pm 6.5\%$; Tabla XII).

Tabla XII. Parámetros zootécnicos (promedio \pm error estándar) de *L. vannamei* con el consumo de alimento (A) control y experimental y cultivado a 37 and 6 ups de salinidad (S) durante 42 días.

Tratamiento	1	2	5	7	ANOVA		
	37 ups		6 ups		S	A	SxA
	Control 37+DC	Experimental 37+DT	Control 6+Po+DC	Experimental 6+Po+DT			
IP (%)	304 \pm 8 ^a	246 \pm 6 ^b	253 \pm 7 ^b	274 \pm 5 ^b	NS	*	**
TCE (%/day)	2.5 \pm 0.1 ^a	2.3 \pm 0.05 ^b	2.2 \pm 0.1 ^b	2.4 \pm 0.04 ^{ab}	NS	NS	**
FCA	1.9 \pm 0.1 ^b	2.1 \pm 0.1 ^{ab}	2.5 \pm 0.2 ^a	2.1 \pm 0.1 ^{ab}	NS	NS	*
S (%)	91.8 \pm 5.8 ^{ab}	93.7 \pm 3.9 ^a	72.2 \pm 6.5 ^b	98.1 \pm 1.9 ^a	NS	*	*
EP	1.4 \pm 0.1 ^b	1.9 \pm 0.04 ^a	1.1 \pm 0.01 ^c	1.9 \pm 0.01 ^a	NS	**	*

IP= Incremento de peso, TCE= Tasa de crecimiento específica, FCA= Factor de Conversión Alimenticia, S= Supervivencia y EP= Eficiencia Proteica.* Indica diferencias significativas ($P < 0.05$) del ANOVA de dos factores (SxA). Letras en el mismo renglón indican los grupo homogéneos según prueba Tukey

7.1.3. Respuesta fisiológica

Tal y como se mencionó en apartados anteriores posterior al bioensayo de crecimiento, los camarones fueron sometidos a la prueba de estrés por hipoxia y persecución. Por lo cual, a continuación se describen los resultados del ANOVA de tres factores (salinidad, alimento y prueba de estrés). Cabe especificar que la significancia del ANOVA se presentará en las tablas con los valores promedios y solo cuando se presenté diferencias significativas ($P < 0.05$) por la interacción de los tres factores, los grupos homogéneos resultantes de la prueba a posterior Tukey se indicarán con letras diferentes en cada caso. En caso de que registrar diferencias significativas por 1 o 2 factores solamente, las medias globales se describen en el texto y se refieren a los promedios por los factores que mostraron efecto significativo.

7.1.3.1. *Bioquímica de hemolinfa*

En la tabla XIII se muestran los niveles bioquímicos de hemolinfa y se indica que factores o interacciones entre estos afectaron significativamente ($P < 0.05$) los niveles bioquímicos. De esta manera, se registró que los camarones cultivados a baja salinidad (6 ups) presentaron niveles significativamente más bajos de glucosa ($16.9 \pm 1.4 \text{ mg.dL}^{-1}$) en comparación con los camarones cultivados en salinidad marina (37 ups) ($25.7 \pm 2.5 \text{ mg.dL}^{-1}$). El efecto de la salinidad en la hemocianina dependió del alimento consumido, por lo que solo en el caso del alimento experimental se registraron disminuciones en salinidad baja (6 ups: $51.5 \pm 3.8 \text{ mg.mL}^{-1}$ vs 37 ups: $69.1 \pm 4.1 \text{ mg.mL}^{-1}$, medias globales del alimento experimental independientemente de factor estrés).

El alimento como factor único no afectó ninguna variable en la hemolinfa, aunque se registraron diferencias significativas por la interacción de éste con la salinidad y el factor estrés, como se describe más adelante. En contraste, el factor estrés afectó significativamente a todas las variables en la hemolinfa, tanto como factor único o combinado con salinidad y alimento (tabla XIII).

Se observaron efectos particulares de la hipoxia y la respuesta de escape para las diferentes variables analizadas. Los niveles de proteína fueron significativamente menores después de la respuesta de escape ($84.1 \pm 4.3 \text{ mg.mL}^{-1}$) en comparación con el nivel en el grupo basal e hipoxia (114.9 ± 7.1 y $106.4 \pm 6.9 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente). La hemocianina no se vio afectada por el estrés como factor único, aunque todas las interacciones fueron significativas (tabla XIII). Por ejemplo, los niveles de hemocianina aumentaron después de la respuesta de escape en camarones cultivados a 6 ups y que consumieron el alimento control, mientras que se observó una disminución (aunque no significativa) en aquellos que consumieron el alimento experimental y cultivados a la misma salinidad, y no se observó ningún efecto a 37 ups para ambos alimentos (tabla XIII).

Los camarones expuestos a hipoxia presentaron niveles de glucosa en hemolinfa significativamente más altos ($35.8 \pm 3.1 \text{ mg.mL}^{-1}$) en comparación con los camarones

del grupo basal o inducidos a escapar (14.3 ± 1.3 y 14.2 ± 1.1 mg dL⁻¹, respectivamente). Además, como lo indica la interacción significativa, la influencia de la hipoxia fue más pronunciada a 37 ups que a 6 ups (44.8 ± 4.9 vs 26.7 ± 2.2 mg dL⁻¹, respectivamente) y en camarones que consumieron el alimento experimental con respecto con aquellos que consumieron el alimento control (40.4 ± 2.4 vs 30.6 ± 2.9 mg dL⁻¹, respectivamente). El lactato aumentó significativamente en respuesta a ambas condiciones de estrés, aunque fue más pronunciado en la hipoxia (57.3 ± 4.0 mg dL⁻¹) que en la respuesta de escape (18.3 ± 1.0 mg dL⁻¹), en comparación con los valores basales (8.0 ± 0.4 mg dL⁻¹).

Tabla XIII. Niveles Bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hemolinfa de *L. vannamei* cultivados a 37 y 6 ups (salinidad(S)), que consumieron alimento control y experimental (A) por 6 semanas y expuestos a hipoxia y manejo (E=prueba de estrés).

	37 ups		6 ups		ANOVA							
	Control	Experimental	Control	Experimental	S	A	E	SxA	SxE	AxE	SxAxE	
Proteínas Totales (mg.mL ⁻¹)					NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	
Basal	97.2 \pm 11.6	127.1 \pm 13.4	94.4 \pm 19.6	105.1 \pm 11.3								
Hipoxia	110.9 \pm 15.2	118.2 \pm 14.4	106.6 \pm 12.1	121.8 \pm 15.6								
Escape	78.1 \pm 4.7	95.6 \pm 11.5	99.2 \pm 5.4	62.3 \pm 4.6								
Hemocianina (mg.mL ⁻¹)					*	NS	NS	**	*	**	**	
Basal	52.8 \pm 4.5 ^{abc}	73.7 \pm 6.4 ^a	42.3 \pm .5.7 ^{bc}	50.0 \pm 2.7 ^{abc}								
Hipoxia	50.1 \pm 3.1 ^{abc}	63.7 \pm 6.3 ^{ab}	56.6 \pm 6.1 ^{abc}	68.5 \pm 7.5 ^{ab}								
Escape	56.2 \pm 3.8 ^{abc}	70.2 \pm 8.7 ^a	70.1 \pm 3.1 ^a	36.0 \pm 2.6 ^c								
Glucosa (mg.dL ⁻¹)					**	NS	**	NS	**	*	NS	
Basal	12.7 \pm 1.3	18.8 \pm 3.0	10.8 \pm 2.6	14.5 \pm 3.0								
Hipoxia	36.1 \pm 3.0	53.5 \pm 8.7	24.5 \pm 4.4	28.6 \pm 1.8								
Escape	18.6 \pm 2.9	16.7 \pm 2.3	15.5 \pm 8.7	7.2 \pm 0.7								
Lactato (mg.dL ⁻¹)					NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	
Basal	9.0 \pm 0.6	6.6 \pm 1.1	8.1 \pm 0.4	8.4 \pm 0.9								
Hipoxia	58.1 \pm 11.3	49.6 \pm 6.5	52.2 \pm 7.4	68.4 \pm 5.9								
Escape	21.3 \pm 1.6	19.4 \pm 2.1	19.5 \pm 1.6	13.5 \pm 1.8								

*=Diferencias significativas (P<0.05) y NS= No Significativo.

7.1.3.2. *Bioquímica de tejidos*

Los niveles de lípidos y triglicéridos (TG) en el hepatopáncreas fueron significativamente más bajos a 6 ups (164.5 ± 12.3 y 43.9 ± 3.4 mg.g⁻¹, respectivamente) que a 37 ups (204.5 ± 7.8 y 57.9 ± 1.8 mg.g⁻¹, respectivamente). Sin embargo, como se refleja en la interacción significativa, tal efecto se registró solo con el consumo de alimento control. Con respecto al nivel de lípidos, se observaron valores significativamente más bajos en los camarones sometidos a hipoxia y escape y cultivados a salinidad baja en comparación con la salinidad marina (Tabla XIV). Para los triglicéridos, la influencia del alimento como factor único fue significativa, los niveles más altos se encontraron en camarones que consumieron el alimento experimental (59.0 ± 2.3 vs. 42.8 ± 3.0 mg.g⁻¹). Los niveles de proteína en el hepatopáncreas se vieron afectados por la salinidad. Sin embargo, este efecto dependía del alimento consumido y la condición de estrés, como lo indican las interacciones significativas (Tabla XIV).

Los niveles de proteína fueron más altos en camarones que consumieron el alimento control y se cultivaron a 6 ups (329.9 ± 20.8 mg.g⁻¹) que en aquellos que consumieron el alimento experimental y se cultivaron a la misma salinidad (266.2 ± 15.9 mg.g⁻¹), mientras que se observaron niveles similares a 37 ups con el consumo de ambos alimentos. Se detectó una interacción significativa entre la salinidad y el estrés dado que los niveles de proteína aumentaron con la hipoxia en los camarones cultivados a 37 ups (344 frente a $24,9$ mg g⁻¹ frente a valores basales de $276,5 \pm 13,9$ mg.g⁻¹), mientras que a la tendencia inversa (aunque no significativa) se observó a 6 ups (basal: 304 ± 28.4 mg.g⁻¹; hipoxia 251.6 ± 15.8 mg.g⁻¹).

Tabla XIV. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hepatopáncreas de *L. vannamei* cultivado a 37 y 6 ups (salinidad(S)), que consumieron alimento control y experimental (A) por 6 semanas y expuestos a hipoxia y manejo (E=prueba de estrés).

	37 ups		6 ups		ANOVA						
	Control	Exp	Control	Exp	S	A	E	SxA	SxE	AxE	SxAxE
Proteínas Totales (mg.g ⁻¹)					NS	NS	NS	*	**	NS	NS
Basal	283 \pm 18	267 \pm 22	362 \pm 43	258 \pm 33							
Hipoxia	337 \pm 27	351 \pm 42	258 \pm 29	246 \pm 17							
Escape	225 \pm 10	285 \pm 19	369 \pm 28	294 \pm 30							
Lípidos Totales (mg.g ⁻¹)					**	NS	NS	**	NS	NS	*
Basal	206 \pm 22 ^{abc}	184 \pm 24 ^{abc}	206 \pm 50 ^{abc}	169 \pm 27 ^{abc}							
Hipoxia	257 \pm 17 ^c	183 \pm 13 ^{abc}	126 \pm 18 ^{ab}	179 \pm 13 ^{abc}							
Escape	234 \pm 10 ^{bc}	165 \pm 14 ^{abc}	119 \pm 34 ^a	191 \pm 30 ^{abc}							
Triglicéridos (mg.g ⁻¹)					**	**	NS	**	NS	NS	NS
Basal	56 \pm 5	53 \pm 7	27 \pm 6	49 \pm 7							
Hipoxia	53 \pm 3	68 \pm 3	29 \pm 7	61 \pm 3							
Escape	55 \pm 3	60 \pm 4	30 \pm 10	61 \pm 7							
Carbohidratos totales (mg.g ⁻¹)					NS	NS	NS	**	NS	NS	NS
Basal	42 \pm 2	47 \pm 5	51 \pm 6	41 \pm 4							
Hipoxia	41 \pm 3	50 \pm 2	40 \pm 5	37 \pm 3							
Escape	39 \pm 2	54 \pm 4	48 \pm 5	37 \pm 3							
Glucógeno (mg.g ⁻¹)					NS	NS	**	**	NS	NS	*
Basal	18.9 \pm 1.4 ^a	23.8 \pm 3.3 ^{ab}	24.4 \pm 2.6 ^{ab}	21.2 \pm 2.2 ^{ab}							
Hipoxia	17.5 \pm 1.6 ^a	18.3 \pm 1.6 ^a	18.9 \pm 2.5 ^a	17.5 \pm 1.4 ^a							
Escape	15.9 \pm 1.1 ^a	31.1 \pm 2.6 ^b	31.9 \pm 4.0 ^b	21.2 \pm 2.6 ^{ab}							

*=Diferencias significativas (P<0.05) y NS= No Significativo.

Los niveles de lactato en el músculo fueron significativamente más bajos a 6 ups (5.5 \pm 0.3 mg.g⁻¹) que a 37 ups (7.2 \pm 0.2 mg.g⁻¹), y afectados por el factor estrés con un aumento significativo en la respuesta de escape (7.6 \pm 0.3 mg.g⁻¹ vs. valores basales 5.5 \pm 0.3 mg.g⁻¹ y 6.0 \pm 0.3 mg.g⁻¹ en camarones expuestos a hipoxia). La interacción significativa de los tres factores muestra que el consumo de alimento experimental aumenta significativamente los niveles de lactato en el músculo (6.4 \pm 0.4 mg.g⁻¹) con respecto al consumo de alimento control (4.5 \pm 0.4 mg.g⁻¹), solo en camarones cultivados a 6 ups. Los niveles de proteína en el músculo aumentaron

significativamente por efecto de ambos factores estresores (hipoxia 625.5 ± 11.5 mg.g^{-1} y respuesta de escape 705.0 ± 20.4 mg.g^{-1}) en comparación con los niveles basales (550.3 ± 19.3 mg.g^{-1}). En contraste, los niveles de lípidos en el músculo aumentaron significativamente bajo el escape (49.0 ± 2.5 mg.g^{-1}) en comparación con la hipoxia y los valores basales (36.8 ± 2.1 y 33.1 ± 2.4 mg.g^{-1}). El consumo de alimento experimental aumentó significativamente los lípidos totales en el músculo (42.9 ± 2.2 mg.g^{-1}), en comparación con el alimento control (36.3 ± 1.9 mg.g^{-1} ; Tabla XV).

Tabla XV. Niveles Bioquímicos (promedio \pm error estándar) en músculo de *L. vannamei* cultivado a 37 y 6 ups (salinidad(S)), que consumieron alimento control y experimental (A) por 6 semanas y expuestos a hipoxia y manejo (escape) (E=prueba de estrés).

		37 ups		6 ups		ANOVA						
		Control	Exp	Control	Exp	S	A	E	SxA	SxE	AxE	SxAxE
Proteínas Totales (mg.g^{-1})						NS	NS	**	NS	NS	NS	NS
Basal		504 \pm 57	560 \pm 32	548 \pm 37	584 \pm 25							
Hipoxia		643 \pm 27	656 \pm 22	593 \pm 27	608 \pm 10							
Escape		693 \pm 20	727 \pm 16	694 \pm 69	705 \pm 47							
Lactato (mg.g^{-1})						**	**	**	*	NS	NS	NS
Basal I		5.9 \pm 0.4	6.2 \pm 0.8	3.8 \pm 0.4	5.7 \pm 0.4							
Hipoxia		6.6 \pm 0.6	7.8 \pm 0.4	4.1 \pm 0.7	5.3 \pm 0.5							
Escape		7.8 \pm 0.4	8.5 \pm 0.5	5.4 \pm 0.6	8.2 \pm 0.7							
Lípidos Totales (mg.g^{-1})						NS	**	**	NS	NS	NS	NS
Basal		26.2 \pm 5.2	42.0 \pm 4.9	26.4 \pm 2.7	35.9 \pm 4.0							
Hipoxia		37.9 \pm 1.8	29.1 \pm 4.9	36.4 \pm 3.2	43.9 \pm 4.4							
Escape		43.5 \pm 6.0	49.1 \pm 2.3	45.3 \pm 4.0	57.6 \pm 6.3							
Carbohidratos totales (mg.g^{-1})						NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Basal		30.0 \pm 3.0	27.1 \pm 4.5	26.8 \pm 4.1	26.4 \pm 2.2							
Hipoxia		36.1 \pm 3.7	31.9 \pm 2.1	28.7 \pm 2.8	27.3 \pm 2.6							
Escape		31.6 \pm 3.2	27.6 \pm 2.2	29.2 \pm 2.9	34.9 \pm 3.2							
Glucógeno (mg.g^{-1})						NS	NS	**	NS	NS	NS	NS
Basal		16.3 \pm 1.4	13.4 \pm 2.0	15.0 \pm 2.6	13.4 \pm 1.2							
Hipoxia		19.4 \pm 3.1	15.7 \pm 1.3	14.8 \pm 2.3	14.0 \pm 1.1							
Escape		17.4 \pm 2.1	20.4 \pm 1.3	22.3 \pm 2.5	30.2 \pm 2.4							

*=Diferencias significativas ($P < 0.05$) y NS= No Significativo.

Por otro lado, el nivel de Arg-P fue significativamente mayor en camarones que consumieron el alimento experimental (4.6 ± 0.5 mmoles.g⁻¹) que en aquellos que consumieron el alimento control (1.6 ± 0.2 mmoles.g⁻¹). Por el contrario, se observó una disminución de Arg-P después de la respuesta de escape (1.5 ± 0.2 mmoles.g⁻¹) en comparación con los valores del grupo control no sometido a estrés (4.7 ± 0.6 mmoles.g⁻¹), mientras que se observó una disminución menor y no significativa en camarones sometidos a hipoxia (3.6 ± 0.7 mmoles.g⁻¹). Sin embargo, como lo indica la interacción entre los factores alimento y estrés, la disminución después de la respuesta de escape no fue significativa con el alimento control, ya que los niveles iniciales fueron más bajos que con el alimento experimental. Además, la interacción triple involucró a la salinidad e indicó que para las comparaciones medias individuales, la influencia de la respuesta de escape fue significativa en la combinación de salinidad de 6 ups y alimento experimental solamente (Tabla XVI).

De manera similar, la CEA fue mayor significativamente con el consumo del alimento experimental (0.82 ± 0.01) que con el alimento control (0.71 ± 0.01), dado que el mayor contenido de ATP (7.1 ± 0.2 vs. 5.1 ± 0.2 mmoles.g⁻¹), contenido menor de ADP (2.6 ± 0.1 vs. 3.3 ± 0.1 mmoles.g⁻¹) y AMP (0.47 ± 0.05 vs. 1.15 ± 0.08 mmoles.g⁻¹) en comparación con el consumo de alimento control. La concentración total de nucleótidos adenílicos (TAN) también fue mayor en camarones que consumieron el alimento experimental (10.2 ± 0.2 mmoles.g⁻¹) en comparación con el alimento control (9.6 ± 0.17 mmoles.g⁻¹). Además, los niveles de ADP, AMP y NAT fueron más bajos a 37 ups (2.7 ± 0.1 , 0.68 ± 0.06 y 9.3 ± 0.17 mmoles.g⁻¹, respectivamente) que a 6 ups (3.2 ± 0.1 , 0.94 ± 0.09 y 10.6 ± 0.2 mmoles.g⁻¹).

Sin embargo, la interacción significativa encontrada entre el alimento y la salinidad indicó que los efectos de la salinidad se observaron solo en con el alimento control en el caso de AMP y para el alimento experimental en el caso de TAN (Tabla XVI). Finalmente, la CEA y los niveles de nucleótidos no mostraron diferencias significativas por el estrés agudo (hipoxia o escape).

Tabla XVI. Concentración de Arg-P y Carga Energética Adenilica (CEA) (promedio \pm error estándar) en músculo de *L. vannamei* cultivado a 37 y 6 ups (salinidad(S)), que consumieron alimento control y experimental (A) por 6 semanas y expuestos a hipoxia y manejo (E=prueba de estrés).

	37 ups		6 ups		ANOVA						
	Control	Experimental	Control	Experimental	S	A	E	SxA	SxE	AxE	
Arg-P ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)					NS	**	**	NS	NS	*	*
Control	2.51 \pm 1.04 ^{abc}	5.93 \pm 1.37 ^{bcd}	2.97 \pm 0.68 ^{abc}	6.63 \pm 1.20 ^{cd}							
Hipoxia	1.22 \pm 0.43 ^a	8.24 \pm 1.64 ^d	1.51 \pm 0.40 ^a	3.05 \pm 0.68 ^{abc}							
Escape	1.02 \pm 0.24 ^a	2.14 \pm 0.48 ^{ab}	0.62 \pm 0.19 ^a	2.08 \pm 0.32 ^{ab}							
AMP ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)					**	**	NS	*	NS	NS	NS
Control	1.0 \pm 0.16	0.38 \pm 0.04	1.34 \pm 0.19	0.48 \pm 0.10							
Hipoxia	1.11 \pm 0.16	0.34 \pm 0.06	1.32 \pm 0.24	0.51 \pm 0.14							
Escape	0.71 \pm 0.10	0.60 \pm 0.19	1.54 \pm 0.27	0.55 \pm 0.12							
ADP ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)					**	**	NS	NS	NS	NS	NS
Control	2.97 \pm 0.30	2.26 \pm 0.13	3.51 \pm 0.26	2.48 \pm 0.21							
Hipoxia	3.47 \pm 0.22	2.07 \pm 0.19	3.44 \pm 0.24	3.01 \pm 0.29							
Escape	3.22 \pm 0.18	2.72 \pm 0.26	3.42 \pm 0.43	3.33 \pm 0.21							
ATP ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)					NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Control	4.61 \pm 0.32	7.07 \pm 0.30	5.03 \pm 0.26	7.54 \pm 0.70							
Hipoxia	5.19 \pm 0.41	6.58 \pm 0.52	5.69 \pm 0.61	7.63 \pm 0.60							
Escape	5.52 \pm 0.37	6.21 \pm 0.44	4.67 \pm 0.60	7.78 \pm 0.40							
NAT ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)					**	*	NS	*	NS	NS	NS
Control	8.6 \pm 0.5	9.7 \pm	9.9 \pm 0.4	10.5 \pm 0.7							
Hipoxia	9.8 \pm 0.4	9.0 \pm 0.6	10.4 \pm 0.4	11.1 \pm 0.5							
Escape	9.5 \pm 0.3	9.5 \pm 0.2	9.6 \pm 0.4	11.7 \pm 0.3							
AEC (ATP+1/2ADP/ATP+ADP+AMP)					NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Control	0.71 \pm 0.03	0.84 \pm 0.01	0.69 \pm 0.02	0.83 \pm 0.02							
Hipoxia	0.71 \pm 0.03	0.85 \pm 0.02	0.70 \pm 0.03	0.82 \pm 0.03							
Escape	0.75 \pm 0.02	0.79 \pm 0.03	0.66 \pm 0.04	0.81 \pm 0.02							

NS= No Significativo, NAT= Nucleótidos Adenilicos Totales

7.2. Bioensayo #2

7.2.1. Análisis químico proximal del alimento formulado

En la siguiente tabla se muestra el análisis químico proximal de los 20 alimentos formulados. El nivel de proteína varió de 26.5 a 47.3%, el de lípidos de 6.3 a 14.7% y el de carbohidratos (CHO) de 25.4 a 57.9% (tabla XVII).

Tabla XVII. Análisis químico proximal de 20 alimentos probados en el bioensayo de crecimiento #2.

Ali	CHO/ Pro	LIP/ Pro	Humedad	Proteína	Lípidos	Fibra Cruda	Cenizas	CHO	Energía
	g/g	g/g	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(cal/g)
#1	2.1	0.20	8.8±0.10	26.5±0.24	5.1±0.03	0.4±0.10	10.0±0.01	57.9	4091±0.61
#2	2.1	0.23	9.5±0.1	26.8±0.2	6.8±0.1	0.4±0.1	9.9±0.01	56.2	4174.3±1.2
#3	2.1	0.30	8.5±0.03	26.9±0.1	8.2±0.1	0.3±0.0	10.2±0.1	54.4	4284.3±7.3
#4	2.1	0.36	10.4±0.1	26.7±0.1	9.8±0.1	0.6±0.1	10.1±0.1	52.8	4350.0±1.1
#5	1.5	0.20	11.5±0.1	32.7±0.1	6.3±0.1	0.6±0.00	10.8±0.1	49.6	4276.8±3.9
#6	1.5	0.23	11.3±0.1	32.4±0.1	7.8±0.1	0.6±0.1	10.6±0.01	48.6	4344.4±1.8
#7	1.5	0.30	10.1±0.03	32.1±0.1	10.0±0.03	0.4±0.0	10.54±0.03	47.0	4437.1±9.3
#8	1.5	0.36	9.4±0.1	32.5±0.1	11.4±0.03	0.9±0.0	10.5±0.1	44.8	4503.4±7.4
#9	1.1	0.20	9.1±0.1	37.9±0.1	7.5±0.1	1.0±0.1	10.6±0.1	42.9	4398.1±6.1
#10	1.1	0.23	8.9±0.03	37.5±0.1	9.3±0.1	1.0±0.1	10.6±0.1	41.6	4435.1±1.2
#11	1.1	0.30	8.9±0.1	37.7±0.03	11.2±0.1	1.2±0.1	10.7±0.01	39.3	4570.0±0.5
#12	1.1	0.36	7.1±0.03	37.1±0.01	13.3±0.03	1.0±0.0	10.7±0.03	37.9	4697.4±0.8
#13	0.8	0.20	11.2±0.1	42.2±0.1	8.5±0.03	1.8±0.0	10.34±0.1	37.1	4488.0±4.8
#14	0.8	0.23	10.6±0.1	43.3±0.1	8.9±0.1	1.2±0.1	10.4±0.02	36.3	4579.6±7.1
#15	0.8	0.30	11.9±0.1	41.9±0.1	13.1±0.1	0.9±0.1	10.1±0.2	34.0	4689.3±2.9
#16	0.8	0.36	12.4±0.1	41.9±0.04	14.7±0.1	1.2±0.1	10.2±0.03	31.9	4803.2±6.84
#17	0.6	0.20	9.7±0.1	46.1±0.1	9.1±0.1	0.7±0.1	10.2±0.01	33.8	4608.1±1.2
#18	0.6	0.23	9.9±0.03	47.3±0.02	11.6±0.1	1.5±0.1	10.3±0.1	29.3	4734.9±0.9
#19	0.6	0.30	11.6±0.03	46.2±0.1	12.1±0.1	1.2±0.1	9.9±0.03	30.6	4762.1±1.6
#20	0.6	0.36	8.0±0.03	45.8±0.03	17.3±0.1	1.6±0.1	9.9±0.03	25.4	4976.4±4.7

7.2.2. Análisis del agua

Los nutrientes en el agua variaron a lo largo del cultivo y en promedio estuvieron influenciados significativamente ($P < 0.05$) por el nivel CHO/Pro en el alimento. Los alimentos 13 al 20, correspondientes a los niveles más altos de proteína presentaron

mayores concentraciones de N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃ y NID. En contraste, la mayor concentración de P-PO₄ se presentó en niveles mayores de CHO/Pro (alimento 1 al 8; Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Concentraciones promedio \pm desviación estándar (mg.L⁻¹) de los nutrientes residuales en el agua del cultivo de camarones que consumieron diferentes alimentos

#	CHO/Pro	LIP/Pro	N-NH ₄	N-NO ₂	N-NO ₃	NID	P-PO ₄
1	2.1	0.20	2.00 \pm 1.44	4.51 \pm 3.50	0.86 \pm 0.83	7.37 \pm 3.41	3.65 \pm 1.40
2	2.1	0.23	1.83 \pm 1.64	3.54 \pm 3.17	0.86 \pm 0.88	6.23 \pm 3.15	3.16 \pm 1.14
3	2.1	0.30	1.73 \pm 1.27	3.34 \pm 2.59	0.71 \pm 0.78	5.79 \pm 2.65	3.46 \pm 1.08
4	2.1	0.36	1.88 \pm 1.73	3.88 \pm 4.39	0.97 \pm 1.61	6.73 \pm 5.68	3.76 \pm 1.37
5	1.5	0.20	2.33 \pm 2.45	5.31 \pm 3.67	1.00 \pm 1.12	8.64 \pm 3.48	3.11 \pm 1.09
6	1.5	0.23	2.20 \pm 1.5	4.07 \pm 3.17	0.75 \pm 0.88	7.02 \pm 3.00	2.72 \pm 1.05
7	1.5	0.30	1.86 \pm 2.05	4.43 \pm 2.97	0.88 \pm 0.89	7.17 \pm 2.98	2.82 \pm 1.99
8	1.5	0.36	2.37 \pm 2.44	4.62 \pm 3.45	0.85 \pm 1.01	7.84 \pm 3.41	3.27 \pm 1.00
9	1.1	0.20	2.68 \pm 2.85	6.41 \pm 4.71	1.32 \pm 1.36	10.41 \pm 4.24	2.76 \pm 0.83
10	1.1	0.23	2.54 \pm 2.4	6.25 \pm 4.06	1.18 \pm 1.27	9.97 \pm 3.30	2.81 \pm 0.96
11	1.1	0.30	2.39 \pm 2.52	5.39 \pm 3.70	1.01 \pm 1.01	8.79 \pm 3.17	2.44 \pm 0.85
12	1.1	0.36	2.52 \pm 2.74	5.30 \pm 3.72	1.10 \pm 1.15	8.93 \pm 3.37	2.61 \pm 0.5
13	0.8	0.20	2.32 \pm 2.32	7.26 \pm 5.01	1.32 \pm 1.49	10.90 \pm 4.80	2.37 \pm 0.86
14	0.8	0.23	2.45 \pm 2.53	7.19 \pm 4.53	1.13 \pm 1.20	10.77 \pm 3.61	2.65 \pm 0.99
15	0.8	0.30	2.24 \pm 2.51	6.67 \pm 4.75	1.19 \pm 1.06	10.10 \pm 4.19	2.31 \pm 0.90
16	0.8	0.36	2.29 \pm 2.64	6.66 \pm 4.34	1.13 \pm 1.23	10.08 \pm 3.63	2.48 \pm 1.28
17	0.6	0.20	2.52 \pm 2.75	7.06 \pm 4.37	1.30 \pm 1.44	10.88 \pm 3.76	2.08 \pm 0.62
18	0.6	0.23	3.27 \pm 3.40	6.94 \pm 4.82	0.99 \pm 1.16	11.20 \pm 3.62	2.16 \pm 0.48
19	0.6	0.30	2.56 \pm 2.89	6.61 \pm 4.35	1.36 \pm 1.37	10.54 \pm 3.75	1.97 \pm 0.63
20	0.6	0.36	2.77 \pm 3.23	6.42 \pm 3.90	0.95 \pm 1.00	10.14 \pm 2.96	2.10 \pm 0.57

7.2.3. Parámetros zootécnicos

Los camarones que consumieron los alimentos de más alta proporción de CHO/Pro (2.1 y 1.5) presentaron en promedio un incremento de peso (316 \pm 7.9% y 303 \pm 8% por día) significativamente mayor a los tratamientos de menores proporciones (1.1, 0.8 y 0.6: 287 \pm 7%, 276 \pm 5% y 277 \pm 7%, respectivamente). De igual manera, esta diferencia se presentó en la tasa de crecimiento específica (TCE), donde los camarones que consumieron alimentos de 2.1 y 1.5 de CHO/Pro presentaron

valores significativamente mayores ($2.29 \pm 0.05\%$ y $2.21 \pm 0.05\%$ por día), con respecto a los camarones que se cultivaron con alimentos de menores relaciones de CHO/Pro que en promedio tuvieron una TCE de 2.06 ± 0.04 . Tanto el incremento de peso como la TCE fueron independientes de la proporción LIP/Pro en el alimento (Tabla XIX).

Por otra parte, la supervivencia no fue afectada significativamente por ninguno de los dos factores en el alimento. En promedio, se presentó una supervivencia de $90.3 \pm 9.7\%$ en el experimento. Con respecto al FCA éste varió según la proporción CHO/Pro, donde las menores proporciones (0.6, 0.8, 1.1 y 1.5) presentaron valores de entre 1.7 y 2.1, significativamente menores que el FCA de 2.4, obtenido en camarones alimentados con la mayor relación CHO/Pro (2.1). La eficiencia proteica también presentó significativamente mayores valores (1.73 ± 0.06 y 1.67 ± 0.07) en tratamientos con alimentos de mayores proporciones CHO/Pro (2.1 y 1.5) en comparación con los demás alimentos de 1.1, 0.8 y 0.6 CHO/Pro, con un valor promedio de 1.43 ± 0.04 (Tabla XIX).

No se presentó algún efecto en el crecimiento ni en otro parámetro productivo por la proporción LIP/Pro en el alimento (Tabla XIX).

Tabla XIX. Parámetros zootécnicos de camarones cultivados durante 49 días con 20 alimentos diferentes. Abajo se muestra el resultado del ANOVA de dos vías.

AI	CHO/ Pro	LIP/ Pro	IP (%)	TCE	S (%)	FCA	Eficiencia Proteica
1	2.1	0.20	323.3±15.7	2.3±0.1	86.5±5.8	2.25±0.08	1.84±0.07
2	2.1	0.23	297.3±26.1	2.2±0.2	80.5±11.11	2.76±0.38	1.55±0.19
3	2.1	0.30	323.4±12.6	2.3±0.1	86.1±5.5	2.37±0.08	1.71±0.05
4	2.1	0.36	320.1±7.4	2.3±0.1	94.9±2.6	2.29±0.04	1.82±0.03
5	1.5	0.20	297.4±7.6	2.2±0.1	94.4±2.8	2.16±0.04	1.60±0.03
6	1.5	0.23	286.0±11.1	2.1±0.1	100.0	2.26±0.19	1.56±0.13
7	1.5	0.30	303.0±15.8	2.2±0.1	88.9±7.3	2.08±0.25	1.72±0.21
8	1.5	0.36	319.4±20.6	2.3±0.1	89.7±5.1	1.94±0.14	1.78±0.14
9	1.1	0.20	267.6±1.5	2.0±0.01	89.5±6.7	2.07±0.01	1.40±0.001
10	1.1	0.23	274.6±10.0	2.0±0.1	89.7±5.1	2.07±0.09	1.42±0.06
11	1.1	0.30	315.3±13.4	2.3±0.1	83.8±4.8	1.74±0.06	1.68±0.05
12	1.1	0.36	291.2±6.7	2.1±0.1	89.5±6.7	1.85±0.08	1.58±0.07
13	0.8	0.20	269.0±9.7	2.0±0.1	92.3±7.7	1.95±0.08	1.37±0.06
14	0.8	0.23	281.7±7.2	2.1±0.1	100.0	1.78±0.05	1.46±0.04
15	0.8	0.30	277.8±7.4	2.0±0.1	81.4±6.5	1.95±0.07	1.39±0.05
16	0.8	0.36	277.0±16.4	2.0±0.1	89.5±6.7	1.89±0.16	1.46±0.12
17	0.6	0.20	285.3±5.2	2.1±0.03	89.3±2.3	1.66±0.02	1.45±0.02
18	0.6	0.23	262.5±10.5	1.9±0.1	94.9±5.1	1.82±0.15	1.31±0.1
19	0.6	0.30	275.1±19.7	2.0±0.1	94.4±5.5	1.79±0.19	1.39±0.13
20	0.6	0.36	290.0±11.2	2.1±0.1	96.1±3.8	1.57±0.001	1.51±0.001
ANOVA							
Valor P	CHO/Pro	Lip/Pro	CHO*Lip/Pro	**	**	NS	**
				NS	NS	NS	NS
				NS	NS	NS	NS

*=Diferencias significativas (P<0.05) y NS= No Significativo. IP= Incremento de Peso, TCE=Tasa de Crecimiento Específica, S=supervivencia

7.2.4. Respuesta de estrés

Tal y como se mencionó en apartados anteriores posterior al bioensayo de crecimiento, los camarones fueron sometidos a la prueba de estrés por hipoxia y persecución combinada. Para la prueba de estrés se seleccionaron solo camarones que consumieron los 6 alimentos (1, 3, 9, 11, 17 y 19) con niveles bajos (0.6), intermedios (1.1) y altos (2.1) de CHO/Pro así como niveles bajos (0.2) e intermedio-altos de lípidos/Pro (0.3).

A continuación se describen los resultados del ANOVA de tres factores (CHO/Pro, Lip/Pro y prueba de estrés). Cabe especificar que la significancia del ANOVA se presentará en las tablas con los valores promedios y solo cuando se presenté diferencias significativas ($P < 0.05$) por la interacción de los tres factores, los grupos homogéneos resultantes de la prueba a posterior Tukey se indicarán con letras diferentes en cada caso. En caso de que registrar diferencias significativas por 1 o 2 factores solamente, las medias globales se describen en el texto y se refieren a los promedios por los factores que mostraron efecto significativo.

7.2.4.1. *Bioquímica de hemolinfa*

Los niveles de los indicadores en hemolinfa se muestran en la tabla XXVI. En general, se presentó el típico incremento significativo de glucosa y lactato en hemolinfa (61.8 ± 3.9 y 188.7 ± 2.3 mg.dL⁻¹, respectivamente) como respuesta a la exposición a persecución e hipoxia, en comparación con el grupo control (19.2 ± 1.6 y 14.1 ± 0.8 mg.dL⁻¹, respectivamente). Sin embargo, los demás indicadores en hemolinfa no presentaron diferencias por efecto del factor estrés solamente (Tabla XX).

A pesar del ayuno de 18 horas, los niveles de glucosa en hemolinfa fueron relacionados directa y proporcionalmente a los niveles de CHO en el alimento, donde los camarones que consumieron mayores proporciones de CHO/Pro (2.1) presentaron mayores niveles de glucosa, aunque el efecto dependió de la condición de estrés. Así, para la condición basal en los camarones alimentados con la proporción alta de 2.1 CHO/Pro los niveles de glucosa fueron significativamente más altos (26.9 ± 3.3 mg.dL⁻¹) que para los tratamientos de 1.1 y 0.6 (13.6 ± 2.2 y 17.7 ± 1.9 mg.dL⁻¹, respectivamente). Por otro lado, el incremento de glucosa por efecto de estrés, también dependió directamente con los niveles de carbohidratos en la dieta (37.9 ± 5.3 , 61.4 ± 6.0 y 86.2 ± 3.7 , a 0.6, 1.1 y 2.1 de CHO/Pro, respectivamente). Los mayores niveles de triglicéridos en hemolinfa (0.90 ± 0.13 mg.ml⁻¹) también correspondieron a los mayores niveles de CHO/Pro en el alimento (2.1), significativamente diferentes a los niveles de triglicéridos en camarones que

consumieron menores proporciones de CHO (1.1 y 0.6: 0.53 ± 0.10 y 0.52 ± 0.10 mg/ml, respectivamente). El nivel de lípidos en el alimento también afectó significativamente los niveles de triglicéridos en hemolinfa, aunque por la interacción entre CHO y Lip en el alimento, éste efecto solo se presentó con el mayor nivel de CHO en el alimento, por lo cual los camarones que consumieron la mayor proporción de CHO/Pro y Lip/Pro, presentaron mayores niveles de triglicéridos en hemolinfa (1.4 ± 0.2 mg.ml⁻¹), significativamente diferente con respecto a los demás tratamientos.

Cabe mencionar que el nivel de proteínas estuvo determinado por la interacción entre CHO/Pro y Lip/Pro del alimento y de éstos con el factor estrés. Los mayores niveles se presentaron en camarones que consumieron altas CHO/Pro (2.1 y 1.1) con ambos niveles del Lip/Pro, excepto en el caso del consumo del alimento #3, con 2.1 de CHO/Pro y 0.3 de Lip/Pro, que presentó los menores niveles (77.9 ± 2.3), promedio también debido a que el grupo estrés presentó niveles bajos (Tabla XX).

Tabla XX. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hemolinfa de camarones que consumieron 6 alimentos con diferente proporción CHO/Pro y Lip/Pro por 7 semanas y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.

Alimento	#1	#3	#9	#11	#17	#19	ANOVA						
	CHO/Pro	2.1		1.1		0.6	CHO/Pro	Lip/Pro	st	CHxLip/Pro	CHO/Proxst	Lip/Proxst	Trt
Lip/Pro	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3							
Proteínas Totales (mg.mL ⁻¹)							NS	NS	NS	**	**	**	NS
Basal	161.7 \pm 21.9	81.8 \pm 4.3	93.6 \pm 2.2	90.4 \pm 13.8	96.5 \pm 3.7	95.1 \pm 5.8							
Estrés	91.0 \pm 5.5	73.9 \pm 0.4	106.5 \pm 4.1	146.6 \pm 16.8	91.8 \pm 5.1	94.9 \pm 6.2							
Hemocianina (mg mL ⁻¹)							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	58.0 \pm 3.7	60.8 \pm 6.7	58.3 \pm 4.7	57.6 \pm 3.0	67.9 \pm 4.6	67.4 \pm 5.6							
Estrés	62.1 \pm 6.6	49.7 \pm 5.6	77.4 \pm 8.4	60.4 \pm 7.6	69.0 \pm 6.8	59.8 \pm 7.0							
Glucosa (mg.dl ⁻¹)							**	NS	**	NS	**	NS	NS
Basal	25.1 \pm 3.1	28.7 \pm 6.0	15.2 \pm 4.1	12.0 \pm 1.5	20.1 \pm 2.7	14.1 \pm 2.3							
Estrés	89.3 \pm 6.1	83.02 \pm 4.3	56.0 \pm 9.9	66.7 \pm 6.5	44.3 \pm 7.7	31.5 \pm 7.1							
Lactato (mg dl ⁻¹)							NS	**	**	*	NS	**	NS
Basal	17.5 \pm 2.0	13.0 \pm 1.7	8.7 \pm 1.8	15.9 \pm 1.8	14.0 \pm 2.1	15.6 \pm 0.9							
Estrés	183.8 \pm 1.9	196.4 \pm 4.7	180.5 \pm 3.7	199.5 \pm 3.0	170.2 \pm 6.4	201.2 \pm 6.0							
Triglicéridos (mg mL ⁻¹)							**	**	NS	**	NS	NS	NS
Basal	0.34 \pm 0.03	1.10 \pm 0.10	0.25 \pm 0.10	0.80 \pm 0.19	0.50 \pm 0.11	0.46 \pm 0.18							
Estrés	0.50 \pm 0.05	1.70 \pm 0.40	0.48 \pm 0.03	0.58 \pm 0.17	0.40 \pm 0.04	0.74 \pm 0.15							

*=Diferencias significativas (P<0.05) y NS= No Significativo.

7.2.4.2. *Bioquímica de tejidos*

Por otra parte, no se observaron diferencias en los niveles bioquímicos en hepatopáncreas por efecto del estrés por persecución e hipoxia, excepto por una interacción con los niveles de CHO dado que los camarones del grupo basal y que consumieron la más baja proporción CHO/Pro (0.6), presentaron niveles menores significativos de carbohidratos totales ($19.2 \pm 1.8 \text{ mg.g}^{-1}$). Sin embargo, esto no fue reflejado en el nivel de glucógeno en el hepatopáncreas (Tabla XXI).

Los niveles de proteína en el hepatopáncreas estuvieron relacionados inversamente con los niveles de CHO/Pro en el alimento, ya que los camarones que consumieron menores niveles de estos (0.6 de CHO/Pro), presentaron mayores niveles de proteínas totales ($462.4 \pm 11.3 \text{ mg.g}^{-1}$) en comparación con al menos el grupo de camarones que consumieron los mayores niveles de CHO/Pro (2.1; $399.1 \pm 10.6 \text{ mg.g}^{-1}$).

Los niveles de carbohidratos totales y específicamente de glucógeno en hepatopáncreas estuvieron influenciados directamente por los CHO/Pro en el alimento. Donde los menores niveles de carbohidratos totales y de glucógeno, (20.9 ± 1.3 y $11.1 \pm 0.7 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente) los presentaron camarones que consumieron alimentos con menor proporción CHO/Pro (0.6) (Tabla XXI), mientras que los mayores niveles se presentaron en hepatopáncreas de camarones alimentados con mayores niveles de CHO/Pro (1.1 y 2.1: 24.9 ± 1.0 y $25.9 \pm 0.8 \text{ mg.g}^{-1}$ de CHO totales; 13.5 ± 0.8 y $14.0 \pm 1.0 \text{ mg.g}^{-1}$ de glucógeno, respectivamente).

El mayor nivel de inclusión de Lip/Pro (0.3) también afectó positivamente el nivel de lípidos totales en el hepatopáncreas, ya que los camarones que consumieron este alimento presentaron mayores niveles en promedio ($152.0 \pm 8.4 \text{ mg.g}^{-1}$) con respecto a los camarones que consumieron menores niveles de Lip/Pro (0.2; $131.2 \pm 7.4 \text{ mg.g}^{-1}$). Sin embargo, estos mayores niveles de Lip/Pro (0.3) en el alimento también promovieron menores niveles de carbohidratos totales y glucógeno. Así, los carbohidratos totales y glucógeno hepatopancreático fueron significativamente mayores en relación con el nivel menor de lípidos (0.2 vs 0.3: 26.5 ± 0.66 vs 21.0 ± 1.0

y 14.8 ± 0.70 vs 10.8 ± 0.6 mg.g^{-1} , respectivamente), y tal como lo muestra la interacción significativa, este efecto es mayor para el menor nivel de CHO/Pro en el caso de carbohidratos totales con 14.2 ± 0.73 mg.g^{-1} en comparación con los demás tratamientos que varían de 23.73 ± 1.70 a 27.90 ± 1.1 mg.g^{-1} (Tabla XXI).

En el caso de la composición bioquímica muscular (Tabla XXII), los niveles de lípidos totales y triglicéridos promedio incrementaron significativamente (36.7 ± 1.7 y 13.7 ± 0.9 mg.g^{-1} , respectivamente) durante la respuesta de estrés con respecto al grupo basal (32.1 ± 1.4 y 7.2 ± 0.7 mg.g^{-1} , respectivamente). Sin embargo, para lípidos totales, este efecto dependió del nivel de lípidos así como de la combinación de lípidos y carbohidratos en el alimento, tal como lo indican las interacciones significativas.

Los niveles de proteínas en músculo fueron afectados significativamente por ambos factores del alimento así como por interacciones con el factor estrés. Los camarones que consumieron alimento con proporción intermedia (1.1) de CHO/Pro y la mayor inclusión de Lip/Pro (0.3) presentaron los mayores niveles promedio de proteínas totales en el músculo (586.6 ± 17.8 y 583.4 ± 16.0 mg.g^{-1}) en comparación con el nivel en el músculo de camarones alimentados con menores (0.6) y mayores (2.1) proporciones de CHO/Pro (495.8 ± 12.3 y 514.3 ± 21.2 mg.g^{-1}) y menores inclusiones de Lip/Pro (0.2) (484.2 ± 10.9 mg.g^{-1}).

El contenido de proteínas y lípidos totales en el músculo fue afectado por la interacción de los tres factores, CHO/Pro y Lip/Pro en el alimento y por la exposición a persecución e hipoxia, tal como se muestra en la tabla XXII. Los mayores niveles de proteína se registraron en el músculo de camarones que no fueron expuestos a estrés (grupo basal) y que consumieron al alimento #11, el cual contenía valores intermedios de CHO/Pro (1.1) y los altos contenidos de Lip/Pro (0.3). En contraste, el menor nivel encontrado fue camarones del grupo basal y que consumieron el alimento #1, de altos CHO/Pro (2.1) y baja inclusión de Lip/Pro (0.2).

La concentración de carbohidratos totales y glucógeno en músculo fue influenciada de manera directa por el nivel de CHO/Pro en el alimento con niveles mayores

(17.41 ± 0.92 y 11.02 ± 0.91 mg.g^{-1}) con el consumo de mayores proporciones CHO/P (2.1) en comparación con niveles menores (10.6 ± 0.64 y 8.69 ± 0.75 mg.g^{-1} de carbohidratos totales y 6.50 y 5.3 mg.g^{-1} de glucógeno para 1.1 y 0.6 de CHO/PT, respectivamente). Adicionalmente, la concentración de glucógeno fue mayor con el mayor nivel de Lip/Pro en el alimento (8.45 ± 0.58 vs 6.70 ± 0.68 mg.g^{-1}). No hubo efectos significativos por estrés combinado (Tabla XXII).

7.2.4.3. Arginina fosfato (Arg-P) y nucleótidos en músculo

Los niveles de nucleótidos, Arg-P y la carga energética adenílica (CEA) se muestra en la tabla XXIII. Se observa que todos los niveles variaron significativamente por el factor estrés, ya que los camarones disminuyeron su nivel de Arg-P (2.64 ± 0.44 $\mu\text{moles.g}^{-1}$) en comparación con el grupo basal (13.71 ± 1.94 $\mu\text{moles.g}^{-1}$). No hubo diferencias de disminución de ArgP al factor estrés entre los diferentes alimentos. De manera similar la CEA disminuyó en el grupo estrés (0.69 ± 0.04 vs 0.86 ± 0.02) sin diferencias entre alimentos. Solamente el contenido de AMP y ADP variaron de acuerdo a CHO/Pro en el alimento, los mayores contenidos se registraron en camarones que consumieron proporciones intermedias (1.1; 1.18 ± 0.19 y 3.5 ± 0.27 $\mu\text{moles.g}^{-1}$, respectivamente).

Tabla XXI. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hepatopáncreas de camarones que consumieron 6 alimentos con diferente proporción CHO/Pro y Lip/Pro por 7 semanas y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.

Alimento	#1	#3	#9	#11	#17	#19	ANOVA						
	2.1		1.1		0.6		CHO/Pro	Lip/Pro	st	CHOxLip/Pro	CHO/Proxst	Lip/Proxst	Trt
Lip/Pro	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3							
Proteínas Totales (mg.g ⁻¹)							**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	435.7 \pm 17.0	367.0 \pm 24.9	475.0 \pm 31.6	420.7 \pm 33.2	479.5 \pm 18.9	450.4 \pm 13.7							
Estrés	367.0 \pm 14.9	417.0 \pm 22.0	409.4 \pm 29.6	427.4 \pm 21.0	457.8 \pm 28.0	463.6 \pm 28.3							
Lípidos Totales (mg g ⁻¹)							NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	95.0 \pm 11.9	183.6 \pm 23.6	107.9 \pm 18.9	159.8 \pm 17.7	168.2 \pm 17.5	150.0 \pm 24.7							
Estrés	125.0 \pm 18.5	147.4 \pm 16.1	136.7 \pm 15.0	159.1 \pm 21.4	156.0 \pm 18.6	122.1 \pm 19.6							
Triglicéridos (mg.g ⁻¹)							NS	NS	NS	**	NS	NS	NS
Basal	57.3 \pm 14.3	96.6 \pm 13.7	45.0 \pm 13.9	107.2 \pm 18.1	123.4 \pm 15.0	77.2 \pm 15.8							
Estrés	60.2 \pm 17.1	94.4 \pm 14.3	74.8 \pm 18.1	115.0 \pm 17.2	98.4 \pm 12.9	70.0 \pm 16.0							
Carbohidratos Totales (mg g ⁻¹)							**	**	NS	**	*	NS	NS
Basal	26.5 \pm 2.32	26.1 \pm 1.5	26.1 \pm 1.2	26.5 \pm 1.5	26.3 \pm 1.6	12.8 \pm 0.9							
Estrés	25.1 \pm 1.4	26.0 \pm 1.2	25.9 \pm 1.5	21.22 \pm 2.7	29.3 \pm 1.4	15.6 \pm 1.0							
Glucógeno (mg g ⁻¹)							*	**	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	17.1 \pm 2.2	10.7 \pm 1.4	14.9 \pm 1.7	11.4 \pm 0.7	14.8 \pm 1.6	8.2 \pm 1.3							
Estrés	14.7 \pm 1.7	12.5 \pm 1.6	16.3 \pm 1.5	11.5 \pm 1.7	11.4 \pm 0.9	10.2 \pm 1.0							

*=Diferencias significativas (P<0.05) y NS= No Significativo.

Tabla XXII. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en músculo de camarones que consumieron 6 alimentos con diferente proporción CHO/Pro y Lip/Pro por 7 semanas y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.

Alimento	#1	#3	#9	#11	#17	#19	ANOVA						
	2.1		1.1			0.6		CHO/ P	Lip/ P	St	CHO/P xLip/P	CHO/P xst	Lip/ Pxst
Lip/Pro	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3							
Proteínas Totales (mg.g ⁻¹)							**	**	NS	NS	**	NS	**
Basal	432.1 \pm 28.9 ^d	501.0 \pm 37.1 ^{cd}	514.0 \pm 23.4 ^{cd}	714.7 \pm 32.6 ^a	475.2 \pm 31.1 ^{cd}	548.1 \pm 11.4 ^{bcd}							
Estrés	476.3 \pm 21.8 ^{cd}	659.5 \pm 42.7 ^{ab}	545.5 \pm 18.1 ^{bcd}	577.7 \pm 30.7 ^{bc}	465.0 \pm 24.7 ^{cd}	495.0 \pm 20.7 ^{cd}							
Lípidos Totales (mg g ⁻¹)							NS	NS	*	NS	NS	**	**
Basal	26.9 \pm 2.6 ^b	39.4 \pm 4.0 ^{ab}	34.0 \pm 3.8 ^{ab}	35.7 \pm 3.3 ^{ab}	31.9 \pm 2.9 ^b	26.8 \pm 3.0 ^b							
Estrés	42.2 \pm 2.6 ^{ab}	30.7 \pm 3.1 ^b	48.4 \pm 3.3 ^a	30.0 \pm 3.4 ^b	31.5 \pm 3.4 ^b	37.3 \pm 5.4 ^{ab}							
Triglicéridos (mg.g ⁻¹)							NS	NS	**	NS	NS	NS	NS
Basal	5.9 \pm 0.7	10.9 \pm 2.7	6.2 \pm 1.2	8.4 \pm 2.6	8.3 \pm 1.7	4.3 \pm 0.8							
Estrés	15.3 \pm 1.9	14.9 \pm 1.2	13.1 \pm 2.0	15.3 \pm 2.2	13.5 \pm 3.6	10.0 \pm 2.0							
Carbohidratos Totales (mg g ⁻¹)							**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	16.5 \pm 2.5	21.5 \pm 0.9	11.0 \pm 0.8	9.4 \pm 1.7	11.2 \pm 0.7	8.7 \pm 1.3							
Estrés	14.8 \pm 1.3	17.8 \pm 1.5	10.6 \pm 1.5	11.5 \pm 1.2	6.8 \pm 1.2	8.1 \pm 2.4							
Glucógeno (mg g ⁻¹)							**	*	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	11.5 \pm 2.3	11.3 \pm 1.7	5.3 \pm 0.8	7.1 \pm 1.6	4.9 \pm 0.8	6.8 \pm 1.0							
Estrés	10.3 \pm 1.8	11.0 \pm 1.5	4.5 \pm 0.8	9.0 \pm 0.9	3.4 \pm 0.9	6.1 \pm 1.3							

*=Diferencias significativas (P<0.05) y NS= No Significativo.

Tabla XXIII. Niveles de Arg-P y Carga Energética Adenilica (CEA) (promedio \pm error estándar) músculo de camarones que consumieron 6 alimentos con diferente proporción CHO/Pro y Lip/Pro por 7 semanas y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.

Alimento	#1	#3	#9	#11	#17	#19	ANOVA							
							CHO/P	Lip/P	st	CHOx Lip/Pro	CHO/Pro oxst	Lip/Pro oxst	Trt	
	2.1		1.1		0.6									
	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3								
Arg-P ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)							NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	14.60 \pm 2.3	12.46 \pm 2.0	16.0 \pm 2.6	14.32 \pm 1.32	13.16 \pm 2.30	11.70 \pm 1.1								
Estrés	2.40 \pm 0.5	1.42 \pm 0.3	2.50 \pm 0.4	2.33 \pm 0.30	3.30 \pm 0.20	3.90 \pm 0.92								
AMP ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)							*	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	0.22 \pm 0.04	0.46 \pm 0.10	0.64 \pm 0.27	0.45 \pm 0.05	0.39 \pm 0.06	0.37 \pm 0.06								
Estrés	1.11 \pm 0.22	1.38 \pm 0.37	1.65 \pm 0.46	1.78 \pm 0.20	0.89 \pm 0.19	1.23 \pm 0.19								
ADP ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)							*	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	1.70 \pm 0.21	2.37 \pm 0.24	2.54 \pm 0.51	2.54 \pm 0.18	2.18 \pm 0.30	2.36 \pm 0.18								
Estrés	3.48 \pm 0.41	3.72 \pm 0.51	4.10 \pm 0.48	4.66 \pm 0.25	3.31 \pm 0.36	3.57 \pm 0.66								
ATP ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)							NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	7.39 \pm 0.63	7.82 \pm 0.89	8.18 \pm 1.22	8.85 \pm 0.35	7.60 \pm 0.56	9.05 \pm 0.56								
Estrés	4.57 \pm 0.61	4.40 \pm 0.58	5.14 \pm 0.45	5.54 \pm 0.37	6.65 \pm 0.58	5.42 \pm 1.10								
CEA (ATP+1/2ADP/ATP+ADP+AMP)							NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Basal	0.89 \pm 0.01	0.84 \pm 0.03	0.82 \pm 0.05	0.85 \pm 0.01	0.86 \pm 0.01	0.87 \pm 0.01								
Estrés	0.69 \pm 0.02	0.67 \pm 0.04	0.67 \pm 0.04	0.66 \pm 0.02	0.77 \pm 0.03	0.65 \pm 0.06								

*=Diferencias significativas (P<0.05) y NS= No Significativo.

7.3. Bioensayo #3

7.3.1. Análisis químico proximal del alimento formulado

En la tabla XXIV se muestran los resultados de los análisis proximales de los 4 alimentos utilizados en el bioensayo de crecimiento, donde se observa que el nivel de nutrientes (proteína, lípidos y carbohidratos o ELN) se mantuvieron relativamente constantes en todos los alimentos.

Tabla XXIV. Análisis químico proximal de 4 alimentos con diferente fuente de fósforo, utilizados en el bioensayo 3 de crecimiento.

Alimento	1	2	3	4
Fuente de fósforo	KH₂PO₄	NaH₂PO₄	NH₄H₂PO₄	Na₅P₃O₁₀
Humedad (%)	9.4±0.03	8.5±0.02	8.9±0.02	9.5±0.04
Proteína (%)	26.1±0.03	27.6±0.08	27.1±0.04	27.3±0.06
Lípidos (%)	7.4±0.02	7.8±0.02	7.8±0.02	7.3±0.02
Fibra Cruda (%)	1.2±0.03	1.3±0.03	1.7±0.03	1.4±0.03
Cenizas (%)	10.0±0.004	9.1±0.02	8.3±0.02	10.3±0.01
Carbohidratos (%)	55.3±0.06	54.1±0.08	55.2±0.02	53.8±0.08
Energía (cal/g)	4148.8±0.5	4328.1±0.5	4348.9±0.4	4268.7±0.5
CHO/Pro	2.0	2.0	2.0	2.0
Lip/Pro	0.3	0.3	0.3	0.3

7.3.2. Análisis del agua

Los nutrientes residuales en el agua variaron a lo largo del cultivo. Sin embargo, en promedio las concentraciones no fueron diferentes significativamente, excepto en el total de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) que fue significativamente mayor con el alimento a base de NH₄H₂PO₄ como fuente de fosfatos (tabla XXV).

Tabla XXV. Concentraciones promedio \pm desviación estándar (mg.L^{-1}) de los nutrientes residuales en el agua del cultivo de camarones que consumieron diferentes alimentos.

Alimento	N-NH ₄	N-NO ₂	N-NO ₃	NID	P-PO ₄
1 KH ₂ PO ₄	1.52 \pm 0.40	1.13 \pm 0.95	0.18 \pm 0.11	2.84 \pm 1.08 ^b	2.48 \pm 0.80
2 NaH ₂ PO ₄	1.98 \pm 0.98	1.22 \pm 1.04	0.18 \pm 0.14	3.37 \pm 1.28 ^{ab}	2.42 \pm 1.02
3 NH ₄ H ₂ PO ₄	2.02 \pm 1.09	1.47 \pm 1.22	0.42 \pm 0.96	3.92 \pm 1.08 ^a	2.46 \pm 0.99
4 Na ₅ P ₃ O ₁₀	1.73 \pm 0.46	1.10 \pm 0.75	0.20 \pm 0.15	3.04 \pm 0.86 ^b	2.63 \pm 0.78

NID=Nitrógeno Inorgánico Disuelto

7.3.3. Parámetros zootécnicos

El crecimiento de los camarones no dependió significativamente del alimento consumido ($P>0.05$). Durante los 42 días de cultivo los camarones incrementaron su peso 300 \pm 23% en promedio. La tasa de crecimiento específica, el FCA y la supervivencia fueron de 3.30 \pm 0.14 %/día, 2.09 \pm 0.17 y 96 \pm 7%, respectivamente y no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, tal y como se muestra en la tabla XXVI.

Tabla XXVI. Parámetros zootécnicos de camarones cultivados durante 42 días con 4 alimentos diferentes.

Alimento	Incremento de peso (%)	Tasa de crecimiento específica	FCA	Supervivencia (%)	Eficiencia proteica
1 KH ₂ PO ₄	296.4 \pm 14.9	3.27 \pm 0.09	2.10 \pm 0.07	98.6 \pm 1.4	2.04 \pm 0.07
2 NaH ₂ PO ₄	293.8 \pm 14.8	3.26 \pm 0.09	2.20 \pm 0.07	97.2 \pm 1.6	1.82 \pm 0.06
3 NH ₄ H ₂ PO ₄	289.9 \pm 3.3	3.24 \pm 0.02	2.16 \pm 0.07	95.8 \pm 2.7	1.88 \pm 0.06
4 Na ₅ P ₃ O ₁₀	320.8 \pm 3.6	3.42 \pm 0.02	1.95 \pm 0.11	93.1 \pm 6.9	2.10 \pm 0.11

7.3.4. Respuesta de estrés

Tal y como se mencionó en apartados anteriores posterior al bioensayo de crecimiento, los camarones fueron sometidos a la prueba de estrés por hipoxia y persecución combinada. Por lo cual, a continuación se describen los resultados del

ANOVA de dos factores (alimento y prueba de estrés). Cabe especificar que la significancia del ANOVA se presentará en las tablas con los valores promedios y solo cuando se presenté diferencias significativas ($P < 0.05$) por la interacción de los dos factores, los grupos homogéneos resultantes de la prueba a posterior Tukey se indicarán con letras diferentes en cada caso. En caso de que registrar diferencias significativas por 1 o 2 factores solamente, las medias globales se describen en el texto y se refieren a los promedios por los factores que mostraron efecto significativo.

7.3.4.1. *Bioquímica de hemolinfa*

Se registraron aumentos de proteínas totales ($278.3 \pm 10.3 \text{ mg.ml}^{-1}$), glucosa ($76.7 \pm 3.3 \text{ mg/dl}$) y lactato ($189.8 \pm 5.4 \text{ mg/dl}$) en hemolinfa de camarones como respuesta de estrés, en comparación con el grupo basal ($242.5 \pm 12.2 \text{ mg.ml}^{-1}$, $25.2 \pm 1.8 \text{ mg.dl}^{-1}$ y $19.3 \pm 0.9 \text{ mg.dl}^{-1}$, respectivamente). Por último, el consumo de diferentes alimentos y la interacción de los factores (alimento y grupo estrés) no afectaron significativamente los niveles en hemolinfa de los camarones (Tabla XXVII).

Tabla XXVII. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hemolinfa de camarones que consumieron 4 alimentos con diferente fuente de fósforo durante 42 días y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.

Alimento Fuente de fósforo	1	2	3	4	ANOVA		
	KH ₂ PO ₄	NaH ₂ PO ₄	NH ₄ H ₂ PO ₄	Na ₅ P ₃ O ₁₀	Alimen to	st	Alimento *st
Proteínas Totales (mg.mL ⁻¹)					NS	*	NS
Basal	242.3 \pm 32.5	235.9 \pm 25.9	230.6 \pm 32.0	232.8 \pm 23.7			
Estrés	246.5 \pm 22.2	290.13 \pm 25.3	254.6 \pm 26.8	303.6 \pm 17.1			
Hemocianina (mg mL ⁻¹)					NS	NS	NS
Basal	51.5 \pm 4.3	58.3 \pm 5.0	49.6 \pm 6.4	56.5 \pm 4.7			
Estrés	50.9 \pm 5.5	47.4 \pm 5.3	46.7 \pm 3.1	46.8 \pm 4.0			
Glucosa (mg.dl ⁻¹)					NS	**	NS
Basal	24.0 \pm 2.7	22.7 \pm 2.1	25.1 \pm 4.7	33.0 \pm 5.1			
Estrés	79.8 \pm 5.9	68.6 \pm 11.0	81.1 \pm 5.7	77.7 \pm 6.6			
Lactato (mg dl ⁻¹)					NS	**	NS
Basal	19.8 \pm 1.8	18.6 \pm 1.7	20.3 \pm 2.0	18.3 \pm 193.6			
Estrés	204.2 \pm 14.4	184.6 \pm 15.0	184.1 \pm 11.2	193.6 \pm 3.9			
Triglicéridos (mg mL ⁻¹)					NS	NS	NS
Basal	0.42 \pm 0.04	0.40 \pm 0.04	0.38 \pm 0.05	0.45 \pm 0.04			
Estrés	0.45 \pm 0.06	0.46 \pm 0.07	0.53 \pm 0.12	0.63 \pm 0.17			

*=Diferencias significativas (P<0.05) y NS= No Significativo.

7.3.4.2. Bioquímica de tejidos

En la tabla XXVIII y XXIX se muestran los niveles bioquímicos del músculo y hepatopáncreas de camarones de cada tratamiento. Por una parte, se observa que el contenido de carbohidratos en ambos tejidos y el nivel de lactato y glucógeno en hepatopáncreas dependió del alimento. El mayor contenido de carbohidratos en el músculo (41.6 \pm 3.4 mg.g⁻¹) lo presentaron camarones que consumieron el alimento 4, con Na₅P₃O₁₀ como fuente de fósforo, en comparación con camarones que consumieron el alimento 3 (29.5 \pm 2.5 mg.g⁻¹) con NH₄H₂PO₄ como fuente de fósforo. Mientras que los camarones que consumieron los alimentos 1 y 2 presentaron niveles intermedios de carbohidratos totales en el músculo (35.7 \pm 3.1 y 34.1 \pm mg.g⁻¹, respectivamente). El nivel de carbohidratos totales y glucógeno en hepatopáncreas fue mayor en los camarones que consumieron el alimento 2 (33.0 \pm 2.1 y 25.5 \pm 1.3 mg.g⁻¹, respectivamente), en comparación con el alimento 1

(25.7 ± 1.8 y 21.1 ± 1.4 mg.g^{-1} , respectivamente), pero sin diferencia con los alimentos 3 y 4 (26.9 ± 1.3 , 21.5 ± 1.3 y 29.3 ± 1.4 , 24.9 ± 1.2 mg.g^{-1} , respectivamente).

Por otra parte, la exposición a hipoxia y persecución solo incrementó los niveles de lactato (7.8 ± 0.2 mg.g^{-1}) en músculo, en comparación con el grupo basal (2.6 ± 0.1 mg.g^{-1}). La interacción entre el factor alimento y estrés no presentó algún efecto en los niveles bioquímicos en estos tejidos (Tabla XXVIII y XXIX).

Tabla XXVIII. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en hepatopáncreas de camarones (n=10) alimentados con 4 alimentos de diferente fuente de fósforo durante 42 días y sometidos a percusión e hipoxia.

Alimento	1	2	3	4	ANOVA		
					Alim	std	Alim*std
Fuente de fósforo	KH_2PO_4	NaH_2PO_4	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$			
Proteínas Totales (mg.g^{-1})					NS	NS	NS
Basal	442.4 \pm 27.9	431.4 \pm 24.1	452.0 \pm 33.0	452.4 \pm 33.1			
Estrés	438.8 \pm 31.8	434.8 \pm 22.7	395.8 \pm 30.0	408.4 \pm 20.4			
Lípidos Totales (mg.g^{-1})					NS	NS	NS
Basal	50.7 \pm 3.1	54.3 \pm 4.6	50.1 \pm 3.7	57.7 \pm 6.1			
Estrés	56.8 \pm 5.7	51.3 \pm 5.9	57.9 \pm 4.7	56.3 \pm 6.4			
Carbohidratos Totales (mg.g^{-1})					*	NS	NS
Basal	25.5 \pm 2.3	32.8 \pm 2.4	29.0 \pm 1.8	31.0 \pm 2.1			
Estrés	25.9 \pm 2.9	33.1 \pm 3.5	24.9 \pm 1.8	27.6 \pm 1.8			
Glucógeno (mg.g^{-1})					*	NS	NS
Basal	20.4 \pm 1.1	24.3 \pm 1.9	22.1 \pm 2.0	24.8 \pm 1.7			
Estrés	21.8 \pm 2.7	26.7 \pm 1.7	21.0 \pm 1.7	25.0 \pm 1.7			
Triglicéridos (mg.g^{-1})					NS	NS	NS
Basal	34.2 \pm 5.0	42.8 \pm 5.3	32.5 \pm 5.0	41.4 \pm 6.0			
Estrés	38.4 \pm 5.6	31.4 \pm 4.8	44.8 \pm 4.3	42.6 \pm 5.2			

*=Diferencias significativas ($P < 0.05$) y NS= No Significativo.

Tabla XXIX. Niveles bioquímicos (promedio \pm error estándar) en músculo de camarones (n=10) alimentados con 4 alimentos de diferente fuente de fósforo durante 42 días y sometidos a percusión e hipoxia.

Alimento	1	2	3	4	ANOVA		
	Fuente de fósforo	KH_2PO_4	NaH_2PO_4	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	Alim	st
Proteínas Totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					NS	NS	NS
Basal	699.1 \pm 30.0	726.1 \pm 25.2	665.1 \pm 32.0	719 \pm 21.6			
Estrés	725.4 \pm 24.3	724.3 \pm 26.3	727.1 \pm 17.4	704.2 \pm 14.2			
Lípidos Totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					NS	NS	NS
Basal	34.1 \pm 1.6	38.5 \pm 3.2	33.3 \pm 2.4	35.3 \pm 2.9			
Estrés	33.2 \pm 1.8	35.2 \pm 1.5	34.8 \pm 2.1	32.4 \pm 1.9			
Carbohidratos Totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					*	NS	NS
Basal	36.7 \pm 3.7	40.1 \pm 2.7	32.2 \pm 4.2	45.4 \pm 3.2			
Estrés	34.8 \pm 5.1	30.2 \pm 4.1	26.9 \pm 3.0	37.8 \pm 6.0			
Glucógeno ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					NS	NS	NS
Basal	25.8 \pm 2.7	31.8 \pm 2.8	24.5 \pm 3.5	36.1 \pm 3.4			
Estrés	28.6 \pm 5.2	21.7 \pm 1.5	24.2 \pm 2.8	26.5 \pm 5.6			
Lactato ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					*	**	NS
Basal	2.4 \pm 0.3	2.4 \pm 0.3	2.3 \pm 0.3	3.5 \pm 0.3			
Estrés	7.3 \pm 0.5	7.5 \pm 0.4	8.0 \pm 0.5	8.2 \pm 0.2			

*=Diferencias significativas ($P < 0.05$) y NS= No Significativo.

7.3.4.3. Arginina fosfato (Arg-P) y nucleótidos en músculo

El nivel del Arg-P, ATP y CEA en el músculo de camarones disminuyó significativamente debido a la exposición de persecución e hipoxia (grupo estrés, 3.5 ± 0.2 , $7.02 \pm 0.29 \mu\text{mol.g}^{-1}$ y 0.80 ± 0.01 , respectivamente) en comparación con los camarones que no fueron expuestos (grupo basal, 18.50 ± 1.26 , $9.31 \pm 0.24 \mu\text{mol.g}^{-1}$ y 0.90 ± 0.01 , respectivamente). Por otro lado, la concentración de AMP y ADP incrementó significativamente (0.58 ± 0.10 y $2.98 \pm 0.16 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente) en comparación con el grupo basal (0.21 ± 0.02 y $1.83 \pm 0.10 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente).

El nivel de Arg-P, ATP y CEA no dependió significativamente ($P > 0.05$) del alimento consumido ni de la interacción entre éste y el factor estrés, tal y como se muestra en la tabla XXX.

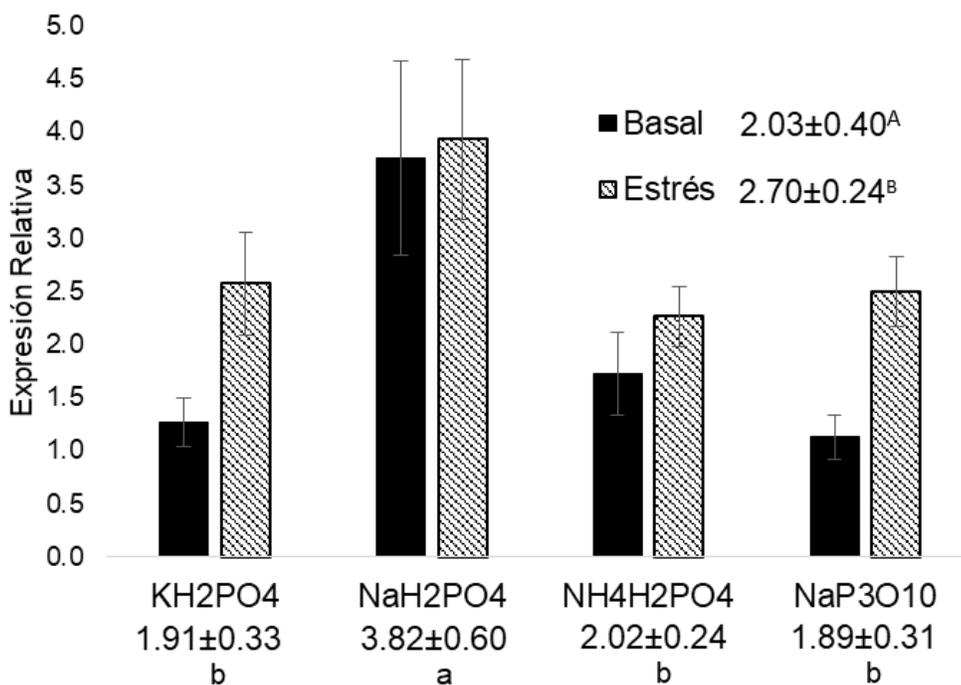
Tabla XXX. Concentración de Arg-P y nucleótidos (promedio \pm error estándar) en músculo de camarones que consumieron 4 alimentos con diferente fuente de fósforo durante 42 días y expuestos a estrés (St) por persecución e hipoxia.

Alimento Fuente de fósforo					ANOVA		
	1 KH_2PO_4	2 NaH_2PO_4	3 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	4 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	Alim	std	Alim*std
Arg-P ($\mu\text{mol g}^{-1}$)					NS	**	NS
Basal	15.9 ± 1.6	19.5 ± 1.8	21.9 ± 4.3	16.3 ± 1.6			
Estrés	3.1 ± 0.3	4.0 ± 0.4	3.0 ± 0.4	3.5 ± 0.6			
ATP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)					NS	**	NS
Basal	9.60 ± 0.65	9.63 ± 0.33	8.66 ± 0.55	9.31 ± 0.46			
Estrés	6.45 ± 0.37	7.99 ± 0.89	7.13 ± 0.32	6.61 ± 0.58			
ADP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)					NS	**	NS
Basal	1.93 ± 0.19	1.82 ± 0.17	1.77 ± 0.24	1.82 ± 0.19			
Estrés	3.22 ± 0.33	2.86 ± 0.41	3.05 ± 0.28	2.75 ± 0.32			
AMP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)					NS	**	NS
Basal	0.24 ± 0.07	0.21 ± 0.04	0.22 ± 0.06	0.16 ± 0.04			
Estrés	0.73 ± 0.20	0.56 ± 0.09	0.53 ± 0.12	0.50 ± 0.15			
CEA					NS	**	NS
Basal	0.90 ± 0.02	0.90 ± 0.01	0.90 ± 0.01	0.90 ± 0.01			
Estrés	0.78 ± 0.03	0.82 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.81 ± 0.03			

*=Diferencias significativas ($P < 0.05$) y NS= No Significativo.

7.3.4.4. Expresión relativa de arginina quinasa (AK)

Se determinó que los camarones que fueron expuestos a persecución e hipoxia presentaron mayor expresión relativa significativa de la AK (2.70 ± 0.24) en comparación con camarones del grupo basal (2.03 ± 0.40). Por otra parte, los camarones que consumieron el alimento 2 con NaH_2PO_4 como fuente de fósforo, presentaron una significativamente mayor expresión (3.82 ± 0.60) que los niveles en camarones que consumieron los demás alimentos. Finalmente, no se presentaron diferencias significativas por la interacción del alimento y estrés, tal y como se muestra en la figura 14.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) de la prueba Tukey del ANOVA bifactorial (estrés*alimento).

Figura 1. Análisis PCR cuantitativo de expresión relativa de AK (promedio \pm error estándar) en músculo de camarones que consumieron 4 alimentos con diferente fuente de fósforo durante 42 días y expuestos a estrés por persecución e hipoxia.

8. DISCUSIÓN

En el trabajo presente se determinó que la respuesta de estrés en términos de uso de sustratos energéticos depende el tipo de factor estresor aplicado y en algunos casos del alimento consumido.

8.1. Efecto de la salinidad baja y alimento

El efecto de la salinidad baja en el crecimiento *L. vannamei* aún no es claro, ya que existen reportes contradictorios. Mientras que algunos autores reportan que la disminución de la salinidad disminuye el crecimiento (Laramore *et al.*, 2001) otros autores encuentran mayores crecimientos a salinidades bajas (5 y 15 ups, Bray *et al.*, 1994; 15 ups Rosas *et al.*, 2001) o algunos otros no encuentran diferencias en crecimiento al cultivar a diferentes salinidades (2 y 20 ups; Sower *et al.*, 2005; 2, 35 y 50 ups Perez-Velázquez *et al.*, 2007; 5 y 38 ups Li *et al.*, 2011). Estos reportes contradictorios señalan que el entendimiento de la respuesta fisiológica a disminuciones de salinidad aún no es claro. Probablemente esto se debe a que existe una gran diversidad de condiciones experimentales que puedan generar la inconsistencia en los resultados (salinidad, talla, temperatura, concentración de amonio, duración del cultivo, fuente de agua, entre otros; Tabla XXXI).

Tampoco es claro el uso de la proteína del alimento en salinidades bajas (Tabla XXXII). Por una parte, se registran menores requerimientos proteicos (27, 38, 35% PC) en salinidades bajas (2, 2 y 12 ups, respectivamente) en comparación con salinidades altas (28, 30, 46 ups; Huang *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2010 y Robertson *et al.*, 1993; tabla XXXII). Mientras que otros autores reportan que el crecimiento de *L. vannamei* no es afectado por la salinidad y los diferentes niveles de proteína en el alimento formulado (Perez-Velázquez *et al.*, 2007). En contraste, Rosas y colaboradores (2001) reportan un mayor crecimiento en camarones que consumieron alimento de alta proteína (50% y 1% de carbohidratos) a salinidad de 15 ups, en comparación con alimento de menor proteína (30% y 36% de carbohidratos) a 40 ups. En el presente estudio, se observó lo contrario, donde el

alimento control que contenía un mayor nivel de proteína (40%) promovió un mayor crecimiento a salinidades de 35 ups en comparación con el alimento experimental de baja proteína (26%). Mientras que, en agua con salinidad bajas (6 ups) este mismo alimento de alta proteína no presentó alguna ventaja en el crecimiento de los camarones, y en contraste el alimento experimental con baja proteína (26% PC) fue suficiente para resultar en crecimientos similares que a salinidad marina con alimento de alta proteína.

El crecimiento menor de *L. vannamei* a salinidad baja con alimento de baja proteína que registraron Rosas y colaboradores (2001), lo atribuyeron a la saturación de la glándula digestiva por el alto nivel de carbohidratos (36%) que contenía el alimento, en comparación con el alimento de alta proteína que contenía menor nivel (1%), el cual no comprometió la absorción de nutrientes y por lo tanto presentó mayores crecimientos a pesar de la disminución de la salinidad. Sin embargo, en el presente trabajo el alimento experimental de proteína baja (26%) presentó mayor nivel de carbohidratos (54%) que el reportado por Rosas y colaboradores (2001) y aun así presentó mejor desempeño que el alimento con nivel menor de carbohidratos y alta proteína (43% y 40%, respectivamente) a salinidad baja (6 ups).

Se ha reportado que la demanda de energía para afrontar la disminución de la salinidad aumenta conforme se aleja del punto isosmótico de los organismos, en el caso específico de *L. vannamei*, éste se encuentra entre 20-25 ups (Castille y Lawrence, 1981). Por lo cual, la comparación entre 15 ups de salinidad en el caso de la investigación de Rosas y colaboradores (2001), con 6 ups utilizada en el presente trabajo, probablemente se trate de diferentes demandas energéticas. Recientemente un análisis transcriptómico del hepatopáncreas de camarones que fueron sometidos a la disminución de salinidad (3 ups) y comparados con camarones que se mantuvieron en condiciones isosmóticas (25 ups), reveló un incremento en el glucometabolismo, (ciclo de Krebs, glucólisis, gluconeogénesis, metabolismo de almidón y sacarosa, metabolismo de azúcares de azúcares y nucleótidos; Xu *et al.*, 2017), lo cual podría ser evidencia de un mayor requerimiento

de carbohidratos bajo tal condición, comparable a la condición de los camarones cultivados a 6 ups de salinidad en el presente estudio en comparación con camarones expuestos a mayores salinidades (15 ups) como el caso de Rosas y colaboradores (2001). Lo cual podría explicar lo mayores incrementos de peso en camarones que consumieron alimentos de mayor nivel de carbohidratos en el presente estudio.

Tabla XXXI. Condiciones experimentales de trabajos reportados con relación al efecto de la salinidad en el crecimiento y supervivencia de *Litopenaeus vannamei*. PC (%) porcentaje de proteína cruda en el alimento formulado

Referencia	Salinidades (ups)	Talla inicial (gr)	Días de cultivo	Temperatura (°C)	PC (%)	Tipo de cultivo	Agua para disminuir salinidad
Bray et al, 1994	5, 15, 25, 35 y 49	2.2	35	27	45	Outdoor. 20% recambio	Agua de la llave filtrada
Rosas et al, 2001	15 y 40	0.36	30	28	30 y 50	Indoor	No específica
Laramore et al, 2001	0.5, 1, 1.5, 2, 3, 30	0.1	18 y 40	30	42	Indoor. 80% recambio agua diario	Agua de la llave filtrada
	0, 2, 4, 30	8	40	25	42		
Sower et al, 2005	5 2 y 20	0.8	7 y 21	26	35	Indoor. Sin recambio y 30% recambio semanal	Agua reconstituida
Pérez-Velázquez et al, 2007	2, 35 y 50	0.4	32	30.5	25, 30, 35 y 40	Indoor. 80% recambio diario	Desionizada
Zhu et al, 2010	2 y 30	0.42 y 0.56	56	24.5	38, 41 y 44	Indoor. 20-80% recambio diario	Agua de la llave
Valenzuela-Quiñonez et al, 2010	0.08-0.72 y 34	0.02	84	26.5	40	Indoor. 5-10% recambio diario	Agua de pozo de cuatro regiones

Aunado a lo anterior, en nuestro estudio, los camarones se obtuvieron de Acuicultura Mahr. Esta empresa tiene un programa de selección genética en cultivo biofloc hiperintensivo con niveles de proteína baja en el alimento y que se implementan gradualmente durante generaciones sucesivas. De ésta manera se ha seleccionado camarones mejor adaptados a alto contenido de carbohidratos en el alimento. Lo cual explicaría el mejor rendimiento con el consumo del alimento experimental. Debido a que la capacidad metabólica para usar carbohidratos es más notoria en camarones cultivados y genéticamente seleccionados en comparación con las poblaciones silvestres, lo cual está sustentado por los siguientes estudios genéticos. Una reducción de la frecuencia de alelos en genes de la enzima amilasa de camarones domesticados (25^a generación) se relacionó a una capacidad reducida de los camarones para usar carbohidratos en la dieta (Arena *et al.*, 2003). Del mismo modo, la 7^a generación de camarones cultivados (*L. vannamei*) presentó una alta dependencia de proteínas para metabolismo y respuesta inmune (Pascual *et al.*, 2004). Esto explica por qué niveles intermedios de carbohidratos (19-30%) son óptimos a baja salinidad (Wang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, estos resultados dependen de la naturaleza particular de cada programa de selección con respecto al desarrollo de la cultura durante generaciones y condiciones de cultivo específicas.

El presente trabajo concuerda con los autores que reportan el mejoramiento del crecimiento de los organismos cultivados en salinidad baja por medio del alimento (Huang *et al.*, 2003a; Rosas *et al.*, 2001a; Li *et al.*, 2011). Sin embargo, no se puede concluir que el aumento en el nivel de proteína en alimento es el principal factor que mejora el crecimiento en estas condiciones. Debido a que el alimento experimental promovió mayor crecimiento a pesar de la baja inclusión de proteína en comparación con el alimento control de alta proteína. Lo cual puede ser explicado por el uso eficiente de las proteínas para el crecimiento, debido a las siguientes posibles causas, 1) uso de lípidos y carbohidratos como fuente energía para atender la demanda de la osmoregulación, lo cual se discutirá más adelante (apartado 8.3.3.). Y 2) a la presencia de otros elementos que ayudaron a disminuir la presión

en el uso de la proteína como la presencia de astaxantina, suplementación de vitaminas, minerales, aminoácidos libres, inclusión de fósforo adicional y presencia de microorganismos.

Tabla XXXII. Proteína cruda (PC) óptima en el alimento para el mayor crecimiento de *L. vannamei* expuesto a variaciones de salinidad.

Salinidades (ups)	% PC óptima	Referencia
6	26	Trabajo presente
35	40	Trabajo presente
2	26.7	Huang <i>et al.</i> , 2003a
28	33	Huang <i>et al.</i> , 2003a
2	38*	Zhu <i>et al.</i> , 2010
30	41*	Zhu <i>et al.</i> , 2010
12	35	Robertson <i>et al.</i> , 1993
46	45	Robertson <i>et al.</i> , 1993
15	50	Rosas <i>et al.</i> , 2001a
40	30	Rosas <i>et al.</i> , 2001a
2, 35 y 50	25, 30, 35 y 40	Perez-Velázquez <i>et al.</i> , 2007
5 y 38	50	Li <i>et al.</i> , 2011

*depende del contenido de lípidos

En este contexto, se ha reportado que la inclusión de antioxidantes como la astaxantina y vitamina E en los alimentos para camarones que son sometidos a estrés salino mejora el crecimiento y supervivencia, debido a que incrementan la capacidad osmótica en condiciones de salinidad baja (Liu *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2007).

La presencia de microorganismos en el alimento experimental es otro de los factores que pudieron afectar el desempeño de los camarones, debido a que estos son fuente adicional de macronutrientes (proteína, carbohidratos y lípidos), micronutrientes (aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y minerales) y compuestos de fósforo de energía alta (polifosfatos), que pueden promover el crecimiento de los camarones (Avnimelech, 2012; Pangastuti *et al.*, 2010).

El alimento control al no presentar otros componentes adicionales que ayuden a contener la variación de la salinidad, probablemente su contenido de alta proteína fue utilizado para cubrir la demanda de energía para mantenimiento, crecimiento y osmoregulación (Davis *et al.*, 2002). Por lo tanto, la ventaja de un mayor nivel de proteína en el alimento control probablemente fue disminuida en agua de salinidad baja por los otros factores. En los camarones que consumieron el alimento experimental (proteína baja) se presentaron mayores niveles de carbohidratos que pudieron cubrir la demanda energética y contener la disminución de salinidad.

En este sentido, la sinergia de la suplementación de diversos componentes (vitaminas, minerales, aminoácidos libres, fósforo y microorganismos), probablemente es la mejor vía para mejorar el rendimiento de los organismos en cultivo expuestos a disminuciones de salinidad, ya que se ha observado que el estudio por separado de cada suplementación disminuye el efecto benéfico en el rendimiento de los organismos (Roy *et al.*, 2006).

8.2. Efecto del fósforo en el alimento

A pesar de que el fósforo tiene diversas funciones fisiológicas esenciales, ya que su forma orgánica es constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos, lipoproteína y conformación de enzimas, y/o su forma inorgánica es utilizada como buffer e intervención del metabolismo de carbohidratos y energético, los estudios se han enfocado principalmente en el efecto en el crecimiento y la capacidad de mineralización de los camarones en cultivo, lo cual ha dejado de lado el rol energético del fósforo a nivel celular, ya que el fósforo es parte fundamental de la estructura del ATP y otras moléculas energéticas como los fosfágenos importantes para mantener la integridad celular al exponerse ante un estrés ambiental (Ye *et al.*, 2016)

En el bioensayo 1 del trabajo presente, el alimento experimental con mayores niveles de carbohidratos y de fósforo, probablemente facilitó el metabolismo de carbohidratos en los camarones que lo consumieron, mediante una rápida

fosforilación de la glucosa. Es decir, es posible que este alimento promoviera un uso eficiente de carbohidratos para que la proteína se utilizara en el crecimiento como ha sido planteado por Rosas y colaboradores (2001).

Sin embargo, para esclarecer el papel del fósforo en los camarones en diferentes escenarios, primeramente se debe determinar cuál es la mejor fuente de fósforo en el alimento. Desde que Davis y Arnold en 1994 plantearon la posibilidad de que la disponibilidad del fosforo dependerá de la fuente, son pocos los estudios que determinan el efecto de la fuente del fósforo en el cultivo de crustáceos comerciales. Por lo cual, en la actualidad y específicamente en el caso de *L. vannamei* se reporta requerimientos de 0.34-2% de 3 principales fuentes: Ca, Na y K (Kanazawa *et al.*, 1984; Davis *et al.*, 1993). La disponibilidad del fosforo dependerá de la conformación molecular, lo cual está relacionado con el grado de lixiviación de éste elemento en el agua (Davis y Arnold, 1994), y de la capacidad de los organismos de asimilar éste (especificidad enzimática, por ejemplo). Bajo éste contexto se llevó a cabo el bioensayo 3, ya que son escasos los estudios que experimentan con diferentes fuentes de fósforo en el alimento de camarones en cultivo

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los camarones por el consumo de diferentes fuentes de fósforo en contraste con el único trabajo hasta el momento donde reportan un mayor crecimiento significativo con KH_2PO_4 como fuente de fósforo en comparación con NaH_2PO_4 y CaH_2PO_4 (Niu *et al* 2008). Es probable que al cubrir el requerimiento de fósforo de 0.34-2% (Kanazawa *et al.*, 1984; Davis *et al.*, 1993) como se realizó los alimentos del bioensayo #2 y #3 y en el alimento experimental del bioensayo #1, los camarones tienen la capacidad de utilizarlo indistintamente de las fuentes probadas en el presente estudio.

La falta de diferencias también puede ser debido al contenido de calcio en el alimento y a la biodisponibilidad del fósforo. Con respecto al primer punto, se ha reportado que el crecimiento depende de la proporcionalidad Ca:P, siendo una proporción adecuada 2:1, mientras que una proporción 3:2 inhibe el crecimiento

(Davis y Arnold, 1994). Sin embargo otros trabajos muestran baja correlación entre el nivel de Ca y P en el alimento particularmente para *L. vannamei* (Davis *et al.*, 1993). En el presente trabajo los camarones consumieron alimentos con proporciones 1:3.5 en promedio de los cuatro alimentos probados por lo cual no fue posible comparar diferentes proporciones entre los alimentos.

Por otra parte, se reporta que la disponibilidad del fósforo varía entre $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 9.9%; CaHPO_4 , 19.1%, $\text{CaH}_4\text{P}_2\text{O}_8$, 46.3%; KH_2PO_4 , 68.1%; NaH_2PO_4 , 68.2%. (Davis y Arnold, 1994), siendo estos dos últimos comparables con los utilizados en el presente experimento (Alimento 1 y 3), y se observa que presentan los mayores y similares porcentajes de fósforo aparente disponible. Sin embargo, se debe tener en cuenta que es probable que los porcentajes de fósforo disponible y asimilado fue mayor debido a la actividad microbiológica del probiótico utilizado en la elaboración de los alimentos del presente estudio. Ya que se ha reportado que los microorganismos que formaron parte de la mezcla de probióticos utilizados permiten aumentar la disponibilidad del fósforo (Greppi *et al.*, 2015; Kerovuuo y Tynkkynen, 2000; Anyakwo y Abot, 2010) y junto con la acidificación del tracto digestivo por parte de los ácidos orgánicos, también utilizados en el alimento, propicia un ambiente para el mantenimiento y desarrollo de las comunidades microbiológicas y así una mayor asimilación del fósforo (Romano *et al.*, 2015). En el caso del alimento 4 ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) también debe contemplarse que probablemente presentó una menor lixiviación en el agua, ya que se ha registrado que fuentes como Na y K son altamente solubles en comparación con la fuentes de Ca, donde el calcio forma quelatos con el P (Davis, 1994), de manera similar las cadenas de fósforo que han sido reportadas como quelatos (Kornberg, 1995). En este caso el $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ podrían formar quelatos con el Na, disminuyendo así su lixiviación en el agua y su mayor disponibilidad del P en el tracto digestivo del camarón (Romano *et al.*, 2015). Por lo tanto, esto podría explicar la tendencia al mayor incremento de peso por el consumo del alimento 4 (sin diferencias significativas) y el menor FCA (Tabla XXVI).

8.3. Respuesta fisiológica

8.3.1. Proteínas totales y hemocianina

Se ha registrado que el incremento de la concentración de proteínas en hemolinfa está directamente relacionado con el nivel de proteína en el alimento, el cual modula el uso de energía bajo condiciones de inanición y estrés salino (Pascual *et al.*, 2006; Rosas *et al.*, 2002). Sin embargo, en el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en el nivel de proteínas con el consumo de alimento de alta (control) y baja proteína (experimental) en el bioensayo#1, aunque se presentó la tendencia a mayores niveles de proteína con el consumo de éste último alimento. Mientras que en el bioensayo #2 se registraron aumentos significativos de proteína en hemolinfa con el consumo de alimentos altos CHO/Pro y bajos Lip/Pro en el alimento (Tabla XX).

Aunado a que los alimentos con menores inclusiones de proteína en los primeros bioensayos, se elaboraron con mayor porcentaje de carbohidratos, el presente trabajo expone que el uso de proteína puede ser más eficiente mediante la inclusión de carbohidratos. Lo anterior se debe al uso preferencial de carbohidratos fuente de energía para mejorar la supervivencia y el crecimiento de los organismos expuestos a factores crónicos y agudos, como los aquí probados (Wang *et al.*, 2015; Cruz-Suarez *et al.*, 1994; Shiao y Peng, 1993).

Entonces tenemos que, cuando los camarones consumen alimento de niveles de proteína altos y por lo tanto de niveles de carbohidratos bajos, la fuente de energía es la proteína, mientras que al consumir una concentración de carbohidratos, la proteína es utilizada para la síntesis de tejido (incremento de peso) en lugar de producir energía y entonces aquí es donde los carbohidratos presentan un mayor papel energético (Rosas *et al.*, 2001). Lo cual ha sido reflejado en los altos niveles de carbohidratos en hemolinfa de camarones que consumieron el alimento experimental (bioensayo #1; Tabla XIII) y alimentos#1 y 3 del bioensayo #2 (Tabla XX). Adicionalmente, esto se tradujo en mayores incrementos de peso y TCE en

camarones que consumieron dichos alimentos y en salinidades bajas en el caso del bioensayo #1.

Por otro lado en el caso de la exposición a hipoxia, se ha registrado el incremento de la síntesis de proteínas que transportan oxígeno, como la hemocianina (Richards *et al.* 2009), cuando los camarones son expuestos a largos periodos de hipoxia (Racotta *et al.*, 2002), debido a que ésta es una estrategia para aumentar la capacidad de transporte de oxígeno y así poder mantener la producción aeróbica de ATP bajo tal circunstancia. Sin embargo, esto no sucedió en ningún bioensayo del trabajo presente, a pesar de que se registró el incremento en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa en el bioensayo 1 y 3, pero no específicamente de la hemocianina. Lo cual es debido al tiempo de exposición a hipoxia, el cual fue de 60 min en el caso del presente estudio, en comparación con la prolongación de hipoxia por 14 días (Racotta *et al.*, 2002).

8.3.2. Glucosa y glucógeno

La glucosa hemolinfática proviene de tres fuentes diferentes, la primera es la absorción a partir del alimento, a través de las células epiteliales del intestino y hepatopancreáticas. La segunda fuente es el glucógeno como reserva energética en el hepatopáncreas y la tercera es por vía gluconeogénesis, principalmente a partir de aminoácidos (Verri *et al.*, 2001).

En el presente trabajo los niveles altos de glucosa en la hemolinfa de camarones que no se les aplicó algún factor estresor (grupo basal) estuvieron relacionados con el nivel de carbohidratos en el alimento. Rosas y colaboradores (2000) no registraron diferencias entre alimento de alto y bajo nivel de carbohidratos en camarones ayunados. No obstante, el máximo porcentaje de inclusión que utilizaron estos autores fue 33% por lo cual puede suponerse que porcentajes mayores como los utilizados en el trabajo presente (54-58%) aumenta el flujo de glucosa por periodos más largos.

El consumo de alta concentración de carbohidratos incrementa el uso de la glucosa como sustrato energético (Rosas *et al.*, 2001). En este contexto, en el primer

bioensayo, el alimento experimental de baja proteína y alto nivel de carbohidratos (54%) y en el bioensayo #2 los alimentos 1 y 3 (57.9 y 56.2%) promovieron mayores concentraciones de glucosa circulante (Tabla XIII y XX), a pesar de que a todos los camarones se les sometió a ayuno de más de 12 horas.

Sin embargo, el uso de la glucosa como sustrato energético fue mayor bajo condiciones de hipoxia en comparación a los camarones sometidos a manejo y dependió de la salinidad del agua, en el caso del bioensayo #1. Mientras que el incremento de glucosa en la hemolinfa de los camarones sometidos a estrés combinado, fue mayor por el consumo de alto CHO/Pro, independientemente del nivel de lípidos en el alimento en el caso del bioensayo #2.

Por otra parte, los camarones tienen la capacidad de aumentar su reserva de glucógeno a partir del nivel de carbohidratos en el alimento (Hutchins *et al.*, 1998; Gumus y Ikiz, 2009), lo cual explica que el alimento experimental con mayor nivel de carbohidratos (54%) incrementó el almacenamiento de glucógeno en hepatopáncreas en el cultivo de agua marina (35 ups; Tabla XIV). En contraste, el agua con salinidad baja (6 ups), no se observó este efecto probablemente por la demanda energética asociada a la osmoregulación.

En el bioensayo 2, también se observaron mayores contenidos de glucógeno y carbohidratos totales en el músculo de camarones que consumieron alimentos de altas CHO/Pro (Tabla XXI).

8.3.3. Lípidos y triglicéridos

En el trabajo presente se registró que los camarones utilizaron reservas de lípidos y triglicéridos en hepatopáncreas para afrontar la salinidad baja (tabla XIV), debido a que este tipo de sustrato puede tener funciones energéticas, estructurales y/o reuladoras para afrontar el estrés salino (Castell, 1979).

Las reservas de lípidos se pueden incrementar significativamente mediante el consumo de alimentos con altos y medio CHO/Pro y con altos Lip/Pro como se registró en el Bioensayo 2 (Tabla XXI). Por lo tanto, puede suponerse que los

camarones que aumentaron las reservas de triglicéridos en hepatopáncreas, tienen mayor probabilidad de afrontar con éxito la exposición a los factores estresores probados como ya se ha reportado (Roy *et al.*, 2006).

8.3.4. Fosfágenos

El movimiento de escape es un movimiento muscular intenso que demanda una gran cantidad de energía en corto tiempo y que supera la capacidad de oxígeno que puede ser suministrado por el sistema respiratorio y circulatorio. Por lo tanto, este tipo de ejercicio provoca una hipoxia funcional (England y Baldwin, 1983). Entonces, cuando las vías aeróbicas son insuficientes para proveer del oxígeno necesario, ya sea por la exposición a hipoxia ambiental o funcional, el segundo mecanismo para la producción de ATP, es la activación de vías no dependientes del oxígeno. Tales como la fosforilación a nivel sustrato a partir de fosfágenos y de la glucólisis anaeróbica (Richards *et al.* 2009).

Específicamente en camarón el uso de Arginin fosfato (Arg-P) como fosfágeno, ha sido registrado tanto por la exposición a hipoxia (Abe *et al.*, 2007) como resultado del manejo de los organismos (Robles-Romo *et al.*, 2014). El uso de fosfágenos es preferido por la rápida fosforilación del ADP (England y Baldwin, 1983), en comparación con la glucólisis anaeróbica. Lo anterior, se comprobó en el trabajo presente, ya que se registraron disminuciones de ArgP en el músculo de camarones que fueron expuestos tanto a hipoxia como en lo que se promovió la respuesta de escape (Tabla XVI, XXIII y XXX).

La carga energética adenílica (CEA) es un índice del estado energético a nivel celular y por lo tanto representa la cantidad de energía disponible como enlace de fosfato del ATP y ADP en relación a la concentración total de los nucleótidos (Atkinson, 1968). Aunque se ha relacionado la CEA con el grado de perturbación del ambiente que están expuestos los organismos, está también depende de la capacidad de los organismos de mantener su homeostasis energética. En este trabajo la CEA se mantuvo regulada a pesar de las condiciones de estrés agudo por separado (hipoxia y escape; bioensayo 1; Tabla XVI). En contaste cuando la

condición de estrés implicó la combinación del escape seguido de hipoxia, la demanda energética superó la capacidad de regulación de la CEA en los bioensayos 2 y 3 (Tabla XXIII y XXX). Lo anterior pone de manifiesto la gran capacidad de los organismos a afrontar las condiciones adversas por medio del uso diferencial de las reservas energéticas en función al tipo de estrés. Por otro lado y dado que la CEA fue significativamente mayor en camarones que consumieron el alimento experimental (Tabla XVI), es posible aumentar la energía disponible tanto en forma de reserva (glucógeno y lípidos) como en enlace fosfato a nivel celular por medio del alimento, lo cual ha sido uno de los aportes más importante del presente trabajo (Martínez-Antonio *et al.*, 2019).

Entonces tenemos que la rápida fosforilación por parte de Arg-P, no fue suficiente para mantener el estado energético en términos de CEA en el factor estresor agudo combinado. Otra ruta anaeróbica para mantener su estado energético, es el uso de la glucosa como sustrato en la glucólisis anaeróbica y utilización para la formación de ATP y la concomitante liberación de lactato en la hemolinfa. Por lo cual tanto el nivel de glucosa y lactato aumentó en todos los camarones expuestos a factores estresores agudos (Tabla XIII), en mucho mayor magnitud con la combinación de estos factores (Tabla XX y XXVII).

Cabe recalcar que solo en el caso del consumo del alimento experimental en el bioensayo 1 las reservas de fosfógenos y la CEA aumentaron significativamente, y por lo tanto las disminuciones por la exposición a hipoxia o el manejo fueron menores que con el consumo de alimento control (Tabla XVI). Probablemente esto fue debido a la diferencia del porcentaje de inclusión de fósforo total entre los alimentos. Donde el mayor nivel de fósforo en el alimento experimental se relacionó con el mayor nivel de Arg-P y CEA en el músculo (Martínez-Antonio *et al.*, 2019). Posteriormente por medio de los resultados del bioensayo 3, se determinó que la fuente de fósforo del alimento no es tan relevante, ya que no se encontraron diferencias en el nivel de Arg-P y CEA en el músculo de camarones que consumieron alimentos de altos porcentajes y de diferentes fuentes de fósforo.

En condiciones de hipoxia el incremento de glucosa en hemolinfa fue mayor en agua marina que en agua con salinidad baja (Tabla XIII). En contraste, el manejo de los organismos no promovió un aumento significativo de glucosa en ambas salinidades (Tabla XIII), probablemente esta diferencia se deba, como ya se mencionó anteriormente, al tipo de estrés y a la duración de la exposición, ya que el manejo consistió en la fatiga muscular en menos de un minuto en promedio, por lo cual el tiempo para incrementar la glucosa en hemolinfa fue corto. Mientras que en hipoxia se trató de una exposición de 30 min, tiempo que al igual que otros autores han registrado aumentos significativos con 60 min (Soñanez-Organis *et al.*, 2010), 72 horas (Racotta *et al.*, 2002) y 120 horas de exposición (Duan *et al.*, 2012).

En el trabajo presente la fuente de glucosa como sustrato energético para hacer frente a la disminución de oxígeno, probablemente fue la reserva en forma de glucógeno en el hepatopáncreas, ya que se presentaron disminuciones de éste (Tabla XIV), lo cual ha sido registrado por Pérez-Rostro *et al.*, 2004 con una exposición de 60 min a 0.4 mg.L^{-1} de oxígeno disuelto en el agua. Sin embargo, esto solo se presentó por efecto del estrés estresor por separado, ya que al combinarse con la respuesta de escape de los bioensayo 2 y 3, no se observa la movilización de esta reserva (Tabla XXI y XXVIII), lo cual sería difícil de explicar con base a los presentes resultados, haciendo falta más estudios para esclarecer este resultado.

En relación con lo anterior, el uso diferencial de las reservas energéticas dependerá del factor estresor y el tiempo de exposición, ya que como se observó en este trabajo presente, el manejo como la exposición a hipoxia por separado o combinado indican el incremento del metabolismo anaeróbico. Sin embargo, los resultados sugieren que el manejo en tiempos cortos de duración, la inducción de movimientos de desplazamiento rápidos por contracción abdominal y la hipoxia funcional inducida, provocan la utilización en mayor medida los fosfágenos, mientras que durante la exposición a eventos de hipoxia donde los organismos hacen uso del glucógeno en hepatopáncreas para continuar con la oxidación de glucosa hasta lactato.

Si bien se ha reportado que la suplementación de fósforo en el alimento mejora la viabilidad celular, capacidad antioxidante, generación de energía y el transporte de lípidos del pez *Takifugu obscurus* al enfrentarse a la disminución de la temperatura en el agua (Ye *et al.*, 2016), en crustáceos estudios similares son inexistentes. Solamente Niu y colaboradores (2008), atribuyen el buen desempeño productivo de camarones alimentados con fuentes de fósforo de K y Na debido al mantenimiento de la presión osmótica, ya que estos iones son necesarios para activar la bomba de protones dependientes de ATP, la cual es una adaptación a ambientes marinos. Por otra parte, este mismo grupo de trabajo reporta diferencias en la supervivencia de camarones que fueron sometidos a estrés salino y consumieron alimentos con diferente nivel de L-ascorbyl-2-polyphosphate; sin embargo, éstas diferencias fueron explicadas por el nivel de vitamina C, y no por la inclusión de fósforo (Chen *et al* 2017).

Los fosfógenos son moléculas fosforadas intermediarias para la síntesis de ATP en situaciones de alta demanda. En el caso de los artrópodos, es la arginina fosfato (Arg-P) es el fosfógeno más abundante en el músculo. Por lo cual, podría seguirse la idea de aumentar este almacén de energía de fósforo por el incremento de fósforo disponible proveniente del alimento consumido. Sin embargo, se ha registrado que los niveles de fósforo en el alimento no afectan el contenido del fósforo total en *Penaeus monodon* (Peñaflorida, 1999) ni en *P. vannamei* y *P. stylirostris* (Boyd and Teichert-Coddington, 1995). Entonces los camarones regulan el fósforo en su cuerpo para mantener una proporcionalidad con otros minerales como el Ca (Amasankar *et al.*, 2006), para llevar a cabo procesos como la mineralización del exoesqueleto, principalmente. Sin embargo, a pesar del rol energético del fósforo en la estructura del ATP, la relación entre el contenido de fósforo en el alimento con la respuesta a diferentes factores ambientales donde es necesario la gestión de la energía, no ha sido establecida (Jokinen *et al.*, 2003).

Lo anterior fue comprobado en el presente trabajo, en el cual a pesar de que probablemente el fósforo del $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (alimento 4) fue más disponible debido a los

puntos expuestos en el apartado anterior, sin embargo, ésta disponibilidad no afectó la cantidad de Arg-P en el músculo y mucho menos en la concentración final de ATP (Tabla XXX).

Por otra parte, el efecto de la fuente de fósforo en otras reservas como los carbohidratos totales en músculo y hepatopáncreas se incrementó con el consumo del alimento 4 (Tabla XXVIII y XXIX). Liang y colaboradores (2012) reportan disminuciones de lípidos y proteínas en el músculo de carpas (*Ctenopharyngodon idella Val*) por el incremento de P total del alimento. Por otro lado Romano y colaboradores (2015) observan mayor tamaño de células R en el hepatopáncreas de *L. vannamei*, lo cual se traduce en mayores reservas de energía en camarones que tuvieron mayor disponibilidad de fósforo por el efecto benéfico de ácidos orgánicos. Probablemente en el caso de la investigación presente, la disponibilidad de fósforo del alimento incremento las reservas energéticas en los diferentes tejidos. Sin embargo hizo falta un grupo control sin inclusión de fósforo para poder confirmar esto.

9. CONCLUSIONES

1). Es posible modular la respuesta fisiológica de *L. vannamei* por medio del alimento formulado, debido a que:

El consumo del alimento experimental mejoró el estado energético en términos de CEA y el contenido de Arg-P en el músculo de los camarones, permitiendo enfrentar la salinidad baja y adicionalmente la hipoxia y el manejo agudo, sin afectar significativamente el estado energético de los organismos.

El consumo de alimento experimental permitió mantener la concentración de las reservas energéticas en forma de triglicéridos en hepatopáncreas en camarones cultivados a salinidad baja (6 ups) igual a la concentración en camarones cultivados a salinidad marina (37 ups). En comparación con la disminución de éstas reservas

en camarones que consumieron el alimento control y que fueron cultivados a salinidad baja.

El consumo de alimentos con altas proporciones de carbohidratos (CHO/P) incrementa el uso de glucosa hemolinfática como sustrato energético para hacer frente a la hipoxia y manejo.

El consumo de alimentos con altos CHO/P y altos Lip/P incrementó el contenido de lípidos totales en hepatopáncreas.

2). En la respuesta de estrés a hipoxia y manejo agudo:

Los camarones utilizan principalmente vías anaeróbicas como la glucólisis y la hidrólisis de Arg-P del músculo como fuentes de energía (ATP) para hacer frente a la hipoxia y manejo agudo.

3). La fuente de fósforo en el alimento no determinó el crecimiento y la respuesta de estrés a hipoxia y manejo agudo.

En general por medio del presente trabajo se concluye que *Litopenaeus vannamei* tiene la capacidad de usar la proteína del alimento eficientemente para el crecimiento, siempre y cuando la proporcionalidad con carbohidratos y lípidos sea adecuada, la cual determina la respuesta de estrés bajo condiciones de hipoxia y manejo, tanto a salinidad marina (35 ups) y como salinidad baja (6 ups).

Si bien el trabajo presente mostró la capacidad *L. vannamei* para utilizar los sustratos energéticos del alimento formulado diferencialmente, es necesario esclarecer diversos aspectos.

Se observó la tendencia al uso de diferentes sustratos energéticos, dependiendo del tipo de estrés expuesto. Sin embargo, al aplicar un estresor combinado, que además de ser más intenso en la respuesta de estrés, los efectos individuales de los factores de estrés no fueron registrados. Por lo cual, se recomienda realizar solo un tipo de

prueba de estrés aguda o bien la combinación con una prueba de estrés crónica, como lo fue la salinidad baja en el bioensayo #1.

Por otra parte, se ha registrado que la cantidad de alimento que consumen los camarones dependerá del nivel de energía del alimento. Por lo tanto, un alimento con mayor nivel de energía será consumido en menor cantidad en comparación con un alimento de menor contenido calórico. Aunque en el trabajo presente, éste efecto se trató de minimizar, por medio del control del alimento no consumido y con el aumento de raciones diarias, se recomiendan investigaciones que ayuden a elucidar la relación de las proporcionalidades de proteína-carbohidratos-lípidos con el nivel de energía en el alimento.

También deben ser abordados con mayor profundidad los aspectos uso de diferentes proporciones de proteína-carbohidratos-lípidos en los alimentos formulados en la calidad de agua. Debido a que en trabajo presente se encontraron tendencias a la variación de nutrientes críticos en los sistemas de cultivo por efecto del alimento. Lo cual, debería ser analizado bajo la perspectiva de la proporcionalidad carbono-nitrógeno disuelto en el agua y de hecho un factor de control microbilógico en los sistemas de cultivo.

Por último, debido a lo observado en el bioensayo #3, si bien la respuesta de estrés no se puede registrar a nivel de disminución de las reservas, como lo es el Arg-P en músculo, por efecto de la fuente de fósforo en el alimento, bien podría detectarse a nivel de actividad enzimática o de expresión de genes, por lo cual se recomienda la búsqueda de indicadores de la respuesta de estrés en estos niveles.

Adicionalmente se recomienda la implementación de un tratamiento con alimento con bajo contenido de fósforo y con variación del nivel de Calcio para esclarecer la función de éste como fosfato de alta energía en la respuesta de estrés.

10. LITERATURA CITADA

- Anuta, J. D., A. Buentello, S. Patnaik, A. L. Lawrence, A. Mustafa, M. Hume, D. M. Gatlin y M. C. Kemp. 2011. Effect of dietary supplementation of acid calcium sulfate (Vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc.42: 6-10.
- Aparicio-Simon, B., M. Poñón, R. Racotta y I. Racotta. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. Aquac. 298:308-314.
- Atkinson, D. E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochem. 7: 4030-4034.
- Avnimelech, Y. 2012. Biofloc Technology: A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society (eds). 2d Edition., Baton Rouge, Louisiana, United States. 272 p.
- Bray, W. A., A. L. Lawrence, J. R. Leung-Trujillo. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. Aquac. 122: 133-146.
- Burton, D. J. y J. L. Rout. 1977. Química Orgánica y Bioquímica. McGraw-Hill (eds). México. 416 pp.
- Carreño-Mejía, A. 2009. Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis. (Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México. 115p.
- Castell, J. D., 1979. Review of lipid requirements of finfish. En: Halver J. and E., Tiews K. (Eds), Proceeding of the World Symposium of Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Hamburg, Germany, V1. Heenemann, Berlin, pp59-84.
- Castille, F. L. & A. L. Lawrence. 1981. The effect of salinity on the osmotic and chloride concentration in the haemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. Comp. Biochem. Physiol. 68: 75–85.
- Chamberlain G. 2010. History of shrimp farming. En Alday-Sanz (eds). The shrimp book. Nottingham. University Press. 1-34 p.
- Cheng, K-M, C-Q Hu Y-N Liu, S-X Zheng y X-J Qi. 2006. Effects if dietary calcium, phosphorus and calcium/phosphorus ratio on the growth and tissue mineralization of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity water. Aquac. 251: 472-483.

- Chien Y.H., Pan C.-H. y Hunter B. 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquac.* 216:177–191.
- Chiu, H-T., S-P Yeh, S-C. Huang, C-C. Chang, C-M. Kuo y W. Cheng. 2006. Dopamine induces transient modulation of the physiological responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac.* 251:558-566.
- Chrousos, G. P. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5: 374-381.
- Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Pinal-Mansilla, J.D. & Wesche-Ebelling, P. (1994) Effect of different carbohydrate sources on the growth of *P. vannamei*: economic impact. *Aquac.* 123: 349–360.
- Cuzon, G., A. Lawrence, G. Gaxiola, C. Rosas y J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquac.* 235: 513-551
- Cuzon, G. y J. Guillaume. 1997. En. D´Abramo, L. R., D. E. Conklin and D. M. Akiyama. *Crustacean Nutrition. J. World Aquac. Soc.* 71-84 pp.
- D´Abramo, 1997. Triacylglycerols and Fatty Acids En: D´Abramo, L. R., D. E. Conklin and D. M. Akiyama. *Crustacean Nutrition. J. World Aquac. Soc.* 71-84 pp.
- Davis, D. A. 2010. En Alday-Sanz (ed). *The shrimp book*. Nottingham. University Press.
- Davis, D. A., I. P. Saoud, W. J. McGraw y D. B. Rouse. 2002. Considerations for *Litopenaeus vannamei* reared in inland low salinity waters. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.*
- Diaz, F. A. D. Re, A. Sánchez, H. Cruz., R. A. González, L. N. Sánchez, A. Licea, E. Ponce-Rivas. M. E. Muñoz-Márquez, I. Giffard y C. Rosas. 2013. The effects of exposure to critical thermal maxima on the physiological, metabolic, and immunological responses in adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 45:365-374.
- Ellington, W. R. 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu. Rev. Physiol.* 63:289-325.
- England, W. R. y J. Baldwin. 1983. Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, decapoda,

- parastacide): Role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behavior. *Physiol. Zool.* 56(4):614-622.
- Flores, M., F. Díaz, R. Medina, A. D. Re y A. Licea. 2007. Physiological, metabolic and haematological responses in White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplement with astaxanthin acclimated to low-salinity water. *Aquac. Res.* 38:740-747.
- Giesy, J. P., S. R. Denzer, C. S. Duke y G. W. Dickson. 1981. Phosphoadenylate concentrations and energy charge in two freshwater crustaceans: responses to physical and chemical stressors. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21: 205-220.
- Gong, H., Jiang, D.H., Lightner, D.V., Collins, C., Brock, D., 2004. A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert. *Aquac. Nutr.* 10: 227–236.
- González-Felix, M. L. y M. Pérez-Velázquez. 2006. Un panorama de los presupuestos de nitrógeno para cultivo de camarón. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 15-17 Noviembre. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Gumus, E. & Ikiz, R. 2009. Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, chemical contents and digestibility in rainbow trout. *Pak. Vet. J.*, 29:59–63.
- Hall, M. R. y E. H. Ham. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquac. Soc.* 29:290-299
- Huang, K., Wang, W. & Lu, J. 2003a Protein requirements in compounded diets for *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Fish. Sci. China*, 10, 308–321.
- Hsieh, S. L., S. M. Chen, Y. H. Yang y C. M. Kuo. 2006. Involvement of norepinephrine in the hyperglycemic responses of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, under cold shock. *Comp. Biochem. Physiol.* 143: 254-263.
- Hutchins, C.G., Rawles, S.D. y Gatlin, D.M. III. 1998. Effects of dietary carbohydrate kind and level on growth, body composition and glycemic response of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* ♀ 9 *M. saxatilis* ♂). *Aquac.* 161: 187–199.
- Ivanovici, M. A. 1980. The adenylate energy charge in the estuarines mollusk, *Pyrazus ebeninus*. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. *Biochem. Physiol.* 66:43-55.

- Joseph, A. y R., Philip. 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquac.* 272: 87–97
- Laramore, S. C. E. Laramore, J. Scarpa. 2001. Effect of low salinity on growth and survival of postlarve and juvenile *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 32:4-8.
- Li, Er-Chao., Arena L, Lizama G, Gaxiola G, Cuzon G, C. Rosas. 2011. Glutamate dehydrogenase and Na⁺-K⁺ ATPase expression and growth response of *Litopenaeus vannamei* to different salinities and dietary protein levels. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 29: 343–349.
- Li, Er-Chao, Qin, J. G., L Chen. 2015. Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Rev. Aquac.* 7: 1-19.
- Li, Er-Chao. Wang, K. Chen, C., Xu, J. G. Qin, L.Chen. 2017. Physiological change nutritional requirement of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Rev. Aquac.* 9: 57-75.
- Liu, Y. W.N. Wang, A.L. Wang, J.M. Wang, R.Y. Sun. 2007. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boon,1931) exposed to acute salinity changes. *Aquac.* 265: 351–358.
- Lucas, A. 1996. Bioenergetics of Aquatic Animals. Taylor y Francis. 169 pp.
- Mantel, L. H. L. L. Farmer. 1983. Osmotic and ionic regulation. The biology of Crustacea. En Bliss,. E. Mantel, L. H. (Eds), Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, New York. 53-161 p.
- Martínez-Antonio. E. M. 2013. Niveles de nutrientes residuales, ecoeficiencia, desempeño productivo y estado fisiológico de *Litopenaeus vannamei* a diferentes niveles de proteína por efecto de micro biota en cultivos hiperintensivos. Tesis. (Maestría en Manejo de Recursos Naturales). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. 149 p.
- McGraw, W.J., D.A. Davis, D. Teichert-Coddington, D.B. Rouse. 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: influence of age, salinity, endpoint and rate of salinity reduction. *J. World Aquac. Soc.* 33: 78–84.
- Mercier, L. , E. Palacios, A. I. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramirez, R. Hernández-Herrera y I. S. Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquac.* 258: 633-640.

- Mugnier, C., E. Zipper, C. Goarant, H. Lemonnier. 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquac.* 274:398-407.
- Niu, J., L.-X. Tian, Y.-J. Liu, K.-S. Mai, H. J. Yang, C.-X. Y, W. Gao. 2009. Nutrient values of dietary ascorbic acid (L-ascorbyl-2-polyphosphate) on growth, survival and stress tolerance of larval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 15:194-201.
- Ogle, J. T., K. Beaugez, and J. M. Lotz. 1992. Effects of salinity on survival and growth of postlarval *Penaeus vannamei*. *Res. Rep.* 8:415-421.
- Olmos, J., L. Ochoa, J. Paniagua-michel, R. Contreras. 2011. Functional Feed Assessment on *Litopenaeus vannamei* Using 100 % Fish Meal Replacement by Soybean Meal, High Levels of Complex Carbohydrates and Bacillus Probiotic Strains. 1: 1119–1132.
- Palacios, E., C. I. Pérez-rostro, J. L. Ramirez, A. M. Ibarra y I. S. Racotta. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquac.* 171:309-321.
- Pangastuti A., A. Suwanto, Y. Lestari, S. M. Tennawijaya. 2010. Bacterial communities associated with shrimp (*Litopaenaeus vannmei*) larvae at early developmental stages. *Biodiversity.* 11: 65-68.
- Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gabriela, G., Brito, R. y R. Gelabert. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac.* 251:416-429.
- Pascual, C. A. Sánchez, C. Rosas. 2003. Manual de Métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones peneidos. CYTED. Laboratorio de ecología y biología marina experimental. Campeche. 26 p.
- Pascual, C., E. Zenteno, G. Cuzon, A. Sánchez, G. Gaxiola, G. Taboada, J. Suárez, T. Maldonado, C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquac.* 236:431-450.
- Perez-Velazquez, M., M. L. González-Félix, F. Jaimes-Bustamante, L. R, Martínez-Cordova, D. A. Trujillo-Villalba y D. A. Davis. 2007. Investigation of the effects of salinity and survival of pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 38:1-4.
- Porchas-Cornejo, M. A., L. R. Martínez-Córdova, L. Ramos-Trujillo, J. Hernández-López, M. Martínez-Porchas, F. Mendoza-Cano. 2011. Effect of promoted natural feed on the production, nutritional, and immunological parameters of

- Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) semi-intensively farmed. *Aquac. Nutr.* 17:2-6.
- Racotta I. S. y E. Palacios. 1999. Hemolymph Metabolic in Response to Experimental Manipulation Stress and Serotonin Injection in *Panaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 29:1-6.
- Racotta, I. S., E. Palacios y L. Méndez. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 35: 269-275.
- Racotta, I. S. y R. Hernandez-Herrera. 2000. Metabolic responses of the White shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125:437-443.
- Robertson, L., A. L. Lawrence, F. Castille. 1993. Interaction of salinity and feed protein level on growth. *J. Appl. Aquac.* 2:1-20.
- Robles-Romo, A. Zenteno-Savín y I. S. Racotta. 2016. Bioenergetic status and oxidative stress during escape response until exhaustion in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 478: 16-23.
- Romano, N., C. Zeng. 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity. Methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquac.* 334-337:12-23.
- Rosas, C. G. Cuzon, G. Gaxiola, Y. L. Priol, C. Pascual, J. Rossignol, F. Contreras, A. Sanchez, A. V. Wormhoudt. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 259:1-22.
- Rosas, C. G. Cuzon, G. Gaxiola, C. Pascual, G. Taboada, L. Arena, A. van Wormhoudt. 2002. An energetic role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 268: 47-67.
- Rosas, C. G. Cuzon, G. Gaxiola, L. Arena, O. Lemaire, C. Soyez, A. Van Wormhoudt. 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 249: 181-198.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., y A. Van Wormhoudt. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penae). *Aquac. Res.* 32:531-547.

- Roy, L. A., D. A. Davis, I. P. Saoud. 2006. Effects of lecithin and cholesterol supplementation to practical diets for *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity waters. *Aquac.* 257:446-452.
- Roy, L. A., D. A. Davis, I. P. Saoud, C. A. Boy, H. J. Pine y C. E. Boyd. 2010. Shrimp culture in inland low salinity waters. *Rev Aquac.* 2: 191-208.
- Roy, L. A., D. A. Davis, I. P. Saoud, R. P. Henry. 2007. Effect of varying levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth, and respiration of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquac.* 262: 461-469.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, J. Hernández-López, A. Muhlia-Almazán y G. Yepiz-Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 340:2-10.
- Saoud, I. P., D. A. Davis y D. B. Rouse. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquac.* 217:373-383.
- Shiau, S.Y. & Peng, C.Y. 1993. Protein sparing effect of carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac.* 117: 327–334
- Sower, A. D. M. Gatlin, S. P. Young, J. J. Isely, C. L. Browdy, J. R. Tomasso. 2005. Response of *Litopenaeus vannamei* (Boome) in water containing low concentrations of total dissolved solids. Short communication. *Aquac. Res.* 36:819-823.
- Spaargaren, D. H., P. Richard y H. J. Ceccaldi. 1982. Effects of temperatura and salinity on phosphate levels in two euryhaline crustacean species. *Netherlands J. Sea Res.* 15: 284-292.
- Tamayo, A. M. 1998. Camarón blanco en agua dulce: una nueva opción. En: II Simposium Internacional de Acuicultura. Mazatlán, Sinaloa, México. 206-212.
- Thibodeaux, L. K., K. G. Burnett, y L. E. Burnett. 2009. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *J. Exp. Biol.* 212(Pt 21):3428-39.
- Valenzuela-Quiñonez, W., G. Rodriguez-Quiroz y H.M. Esparza-Leal. 2010. Cultivo intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) en agua de pozo de baja salinidad como alternativa acuícola para zonas de alta marginación. *Ra Ximhai. Rev. Soc. Cul. Des. Sus.* 6:1-10.

- Verri, T., A. Mandal, L. Zilli, D. Bossa, P.K. Mandal, L. Ingrosso, V. Zonno, S. Vilella, G.A. Ahearn, C. Storelli. 2001. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 130:585–606.
- Wang, X. D., E. C. Li, S. F. Wang, J. G. Qin, X. F. Chen, Q. M. Lai, K. Chen, C. Xu, L. Gan, N. Yu, Z. Y. Du, L. Q. Chen. 2015. Protein-sparing effect of carbohydrate in the diet of white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquac. Nutr.* 21: 904-912.
- Wang, X. O. E. Li, J. G. Qin, S. Wang, X. Chen, Y. Cai, K. Chen, Y. Hou, N. Yu, M. Zhang, Z. Du, L. Che. 2014. Growth, body composition, and ammonia tolerance of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing different carbohydrate levels at low salinity. *J. Shellfish Res.* 33: 511-517.
- Xu, C., Li, E., Liu, Y., Wang, X., Qin, J. G., & Chen, L. 2017. Comparative proteome analysis of the hepatopancreas from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under long-term low salinity stress. *J. Proteomics.* 162:1-10.
- Zhang, P., X. Zhang, J. Li, G. Huang. 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquac.* 256: 579-587.
- Zhu, X. Z., Y.-L. Liu, L. X. Tian, K. S. Mai, S. X. Zheng, Q. J. Pan, M. C. Cai. C. Q. Zheng, Q. H. Zhang y Y. Hu. 2010. Effects of dietary protein and lipid levels on growth and energy productive value of pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei* at different salinities. *Aquac. Nutr.* 16: 391-399.

ANEXO A

En el bioensayo 1 se experimentaron con cuatro niveles de salinidad del agua de cultivo (0.5, 6, 12 y 37 ups). La disminución de la salinidad a partir del agua marina se realizó con dos tipos de agua, agua de pozo salinizada (6-7 ups) con y sin tratamiento de osmosis inversa. Por lo cual, se obtuvieron dos mezclas de agua diferentes (agua de osmosis y agua de pozo). El tratamiento de osmosis inversa se realizó en la planta de tratamiento del CIBNOR, la cual consiste en el paso del agua del pozo por membranas de poliamida (TORAY ® Modelo TM720D-370) con 250 libras de presión. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla A1, en los tratamientos de salinidad de 37 y 0.5 ups de salinidad, no hubo ninguna mezcla como en los demás tratamientos, ya que estos tratamientos representan al control de salinidad marina y dulce, respectivamente. El alimento experimental probado se describe en el apartado 6.1 al igual que el alimento control. En el caso de los tratamientos de 12 ups de salinidad solo consistieron de alimento control.

Tabla A1. Diseño experimental del bioensayo 1

No. de tratamiento	Salinidad	Fuente de agua	Alimento	Abreviatura
1	37	Marina	Control	37+DC
2	37	Marina	Experimental	37+DT
3	12	Pozo sin osmosis	Control	12+Po+DC
4	12	Pozo con osmosis	Control	12+Os+DC
5	6	Pozo sin osmosis	Control	6+Po+DC
6	6	Pozo con osmosis	Control	6+Os+DC
7	6	Pozo sin osmosis	Experimental	6+Po+DT
8	6	Pozo con osmosis	Experimental	6+Os+DT
9	0.5	Osmosis	Control	0.5+Os+DC
10	0.5	Osmosis	Experimental	0.5+Os+DT

Tabla A2. Parametros zootécnicos de camarones cultivados a diferentes salinidades (37, 12, 6 y 0.5 ups) y que consumieron alimento control durante 42 días.

Tratamiento	1	4	6	9
	37+DC	12+Os+DC	6+Os+DC	0.5+Os+DC
Incremento de peso (%)	304.1±7.8 ^a	234.2±13.2 ^b	230.3±11.1 ^b	220.5±34.7 ^b
Tasa de crecimiento específica	2.5±0.1 ^a	2.0±0.1 ^b	2.0±0.1 ^b	1.8±0.3 ^b
FCA	1.92±0.08	2.56±0.20	2.75±0.19	2.43±1.53
Supervivencia (%)	91.8±5.9 ^a	93.7±4.0 ^a	83.3±3.4 ^a	35.4±25.4 ^b
Eficiencia proteica	1.38±0.06	1.06±0.08	1.09±0.11	1.79±1.12

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) ANOVA de una vía

Tabla A3. Ganancia de peso, supervivencia y FCA promedio \pm desviación estándar de camarones cultivados a salinidad de 6 ups en función de la fuente de agua para disminución de la salinidad (sin y con osmosis) y el alimento suministrado (control y experimental) al final de 42 días de cultivo.

Tratamiento	5	7	6	8	ANOVA		
	Sin Osmosis		Con Osmosis		F	A	F*A
	Control	Experimental	Control	Experimental			
Ganancia de peso (g)	6+Po+DC	6+Po+DT	6+Os+DC	6+Os+DT	*	*	NS
Supervivencia (%)	70.8±7.2 ^a	95.8±4.2 ^b	83.3±6.1 ^{ab}	88.5±2.7 ^{ab}	NS	*	*
FCA	2.2±0.3	1.6±0.1	1.9±0.2	1.9±0.1	NS	*	NS

*Indica diferencias significativas ($P < 0.05$) ANOVA de dos factores

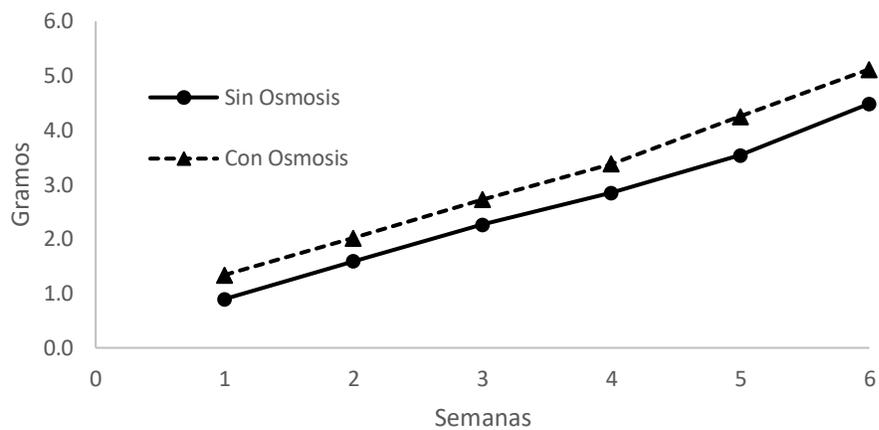


Figura A1. Ganancia de peso promedio de camarones cultivados a salinidad 6 ups y alimentados con dos alimentos (control y experimental) durante seis semanas en función de la fuente de agua para la disminución de la salinidad del agua marina (con o sin osmosis inversa). * Diferencias significativas.

Tabla A4XXXIII. Perfil elemental (ppm) en los diferentes tratamientos del Bioensayo #1.

Etiqueta	37+AM+DC	37+AM+DT	12+Po+DC	12+Os+DC	6+Po+DC	6+Os+DC	6+Po+DT	6+Os+DT	1+Os+DC	1+Os+DT
Fuente de agua	AM	AM	AM+AP	AM+AP	AM+AP	AM+AP	AM+AP	AM+AP	AM+AP	AM+AP
Tratamiento al AP	NA	NA	Sin osmosis	Con osmosis	Sin osmosis	Con osmosis	Sin osmosis	Con osmosis	Con osmosis	Con osmosis
Salinidad	37 ups	37 ups	12 ups	12 ups	6 ups	6 ups	6 ups	6 ups	0.5 ups	0.5 ups
Alimento	Control	Experimental	Control	Control	Control	Control	Experimental	Experimental	Control	Experimental
N	2.90	2.56	4.46	2.25	1.75	2.71	3.49	4.51	3.31	1.97
B	2.42	1.79	1.38	1.09	0.52	0.55	0.92	0.96	0.28	0.22
Ca	216.8	158.22	216.12	93.42	141.33	46.81	187.81	71.37	16.92	12.77
Cd	nd	0.02	0.01	nd	nd	nd	0.02	0.01	0.01	0.01
Co	nd	0.02	nd	0.04	nd	nd	nd	0.03	nd	0.02
Cr	0.01	nd	0.02	0.02	0.00	nd	0.02	nd	nd	nd
Cu	0.00	0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fe	0.44	0.39	nd	0.14	0.00	0.04	0.06	0.13	0.01	0.01
Hg	nd	0.32	0.05	nd	0.20	nd	0.00	0.32	nd	nd
K	125.9	93.12	38.11	45.49	10.12	18.07	20.12	34.10	3.05	2.20
Mg	863.1	633.88	280.33	317.52	82.85	131.84	158.85	232.49	24.48	12.57
Mn	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Mo	0.05	nd	0.01	nd	nd	nd	0.00	nd	nd	nd
Na	8208.4	6915.22	1976.31	1948.16	451.32	805.08	960.18	1208.15	135.81	85.82
Ni	0.02	0.04	nd	0.03	nd	0.02	0.01	0.01	nd	nd
P	0.69	1.96	0.44	1.07	1.62	1.16	0.57	3.90	0.83	2.22
S	1039.2	928.63	329.69	218.88	76.85	101.38	90.96	140.08	12.20	9.22
Sb	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Se	0.12	0.09	0.30	0.06	nd	0.08	0.25	nd	0.32	nd
Zn	0.05	0.07	0.04	0.03	0.04	0.05	0.01	0.06	0.03	nd
Na/K	65.2	74.3	51.9	42.8	44.6	44.6	47.7	35.4	44.5	39.0
Ca/K	1.72	1.70	5.67	2.05	13.97	2.59	9.33	2.09	5.55	5.79
Mg/Ca	3.98	4.01	1.30	3.40	0.59	2.82	0.85	3.26	1.45	0.98
Ca/Mg	0.25	0.25	0.77	0.29	1.71	0.36	1.18	0.31	0.69	1.02

AM= Agua Marina, AP= Agua de Pozo, NA= No aplica y Nd= No detectable

ANEXO B

Artículo publicado de título “Modulation of stress response and productive performance of *Litopenaeus vannamei* through diet” en la revista PeerJ- the Journal of life and Environmental Sciences. PeerJ7:e6850. <http://doi.org/10.7717/peerj.6850>

Artículo sometido de título “EFFECT OF DIETARY PHOSPHORUS SOURCE ON STRESS RESPONSE OF white shrimp *Litopenaeus vannamei*” en la revista Archives of Animal Nutrition

**EFFECT OF DIETARY PHOSPHORUS SOURCE ON STRESS RESPONSE OF
white shrimp *Litopenaeus vannamei***

Eliza M. Martínez-Antonio, Rosa Linda Salgado-García, Alberto Peña-Rodríguez,
Juan C. Ruvalcaba-Márquez, Ilie S. Racotta*, Francisco Magallón-Barajas*

Programa de Acuicultura, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Calle Instituto Politécnico Nacional 195, La Paz, Baja California Sur, México

*Corresponding authors: iracotta@cibnor.mx, fmagallon04@gmail.com. Both authors equally contributed to present article

Tel: +52 612 12 38400

ABSTRACT

Specific requirements of particular nutrients is a major concern for shrimp industry. These requirements could be different according to particular culture conditions, particularly if stress is involved. The chemical form or source of particular nutrients is also important and this is the case for phosphorous (P) requirement, as different inclusion of different P salts produced different growth responses. In the present study, we analyzed the influence of Na, K and NH_4 salts of P, as well as in the form of polyphosphate, on overall performance and stress response induced by handling followed by hypoxia. Shrimp growth, feed conversion ratio, survival and protein efficiency ratio were not significantly different among the different diets with various chemical forms of phosphorus. Stress response to handling and hypoxia were characterized by an increase in hemolymph lactate and glucose, a decrease in arginine phosphate and adenylate energy charge and an increase in arginine kinase (AK) RNAm expression, although no influence of diet was observed. However, a higher expression of AK RNAm and higher levels of total carbohydrates and glycogen in muscle was observed in shrimp fed the NaH_2PO_4 , suggesting a possible beneficial role of this P source on energy metabolism, that should be further explored using additional experimental approaches.

1. INTRODUCTION

Shrimp culture has been one of the major growth areas in worldwide aquaculture during the last 55 years, with a total production of 4.156 million tons in 2016 (FAO, 2018). Shrimp industry depends importantly on formulated feeds, which are manufactured with high contents of protein and fish meal to promote rapid shrimp growth (Shiau, 1998; Cuzon *et al.*, 2004). Specific requirements of other nutrients have also been investigated; among them, the phosphorous dietary need was established at around 1% of diet (Davis, 1997).

In general feed formulation have a poor consideration of environmental impact, production costs (increasing prices of fish meal and oil), and shrimp responses to several stressors inherent to the current culture systems (Tacon and Metian, 2008). Thus, there is a great need to formulate functional feeds that, in addition to providing good culture yield, enhance the capacity of shrimp to minimize stress.

In intensified culture systems, hypoxia and shrimp handling increase given the high densities used. Under these conditions, shrimp use arginine phosphate (Arg-P) and increase anaerobic metabolism to obtain the necessary energy in response to hypoxia. Something similar happens when shrimp have muscular movement as an escape response, presenting the phenomenon of functional hypoxia. The Adenylate Energy Charge (AEC) is an index of energy status at the cellular level and depends on the ability of organisms to maintain their homeostasis through the use of energy substrates that come from the diet (Lucas, 1996)

Although phosphorus has been reported to be an essential element for growth and other energy molecules such as adenosine triphosphate (ATP) and ArgP, the research in crustaceans culture has been mainly focused on the effect on growth and mineralization capacity shrimp and the relation between dietary phosphorus with the response to different environmental factors where energy management is necessary has not been established in crustaceans group (Ye *et al.*, 2016; Jokinen *et al.*, 2003).

During 42 days, juvenile shrimp were fed with four diets with different phosphorus source (KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$). Following, a combined stress test was performed in order to know the effect of diet on growth and stress response.

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Experimental diets

Four diets were tested with 3.1-3.6% of phosphorus inclusion from a different source (KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$). The diets were prepared according to a baseline formulation established in a previous study (Martinez et al., 2019) (Table I). The proximate composition of the diets is shown in table II.

2.1. Shrimp and experimental conditions

Litopenaeus vannamei postlarvae ($1.42 \pm 0.02\text{g}$) from the private company Acuacultura Marh (La Paz, Mexico) were acclimated to experimental conditions (37 ups, $26 \pm 0.8^\circ\text{C}$, $5\text{-}6 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, feeding rate of 10% total biomass) in the experimental nutrition laboratory of the Mexican research center [Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste (CIBNOR)] for 5 days.

Shrimp with mean initial of $1.91 \pm 0.19 \text{ g}$ were randomly distributed in 16 aquariums and cultured under laboratory conditions ($28.0 \pm 0.6^\circ\text{C}$, dissolved oxygen = $5.9 \pm 0.6 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, and photoperiod = 12h: 12h light: dark) during 42 days. The feeding rate was according Kureshy and Davis (2000) in four daily rations for each aquarium (9:00 h, 12:00 h, 15:00 h and 17:00 h) to reach maximum weight gain

The following zootechnical parameters were obtained:

Weight gain (%) (WG) = $((\text{final weight (g)} - \text{initial weight (g)}) * 100) / \text{initial weight (g)}$;
 Specific growth rate (%) (SGR) = $100 * (\ln \text{ final weight (g)} - \ln \text{ initial weight (g)}) / \text{days of experiment}$;
 Survival (%) = $(\text{shrimp initial number} - \text{dead shrimp number}) / \text{shrimp initial number} \times 100$;
 Feed conversion ratio (FCR) = $\text{feed intake (dry matter) (g)} / \text{weight gain (g)}$;
 and Protein efficiency ratio (PER) = $\text{wet weight gain (g)} / \text{dry protein intake (g)}$

2.2. Stress test and biochemical analysis.

After shrimp have fasted for 15 hours, 10 shrimp fed with different diets were exposed to stress test with another group of 10 undisturbed shrimp as a control. Stress tests were divided into two phases: escape response and hypoxia. First, the escape response (tail-flipping) was induced by prodding shrimp from stress group until exhaustion, which is characterized by a prolonged unwillingness to respond by tail-flipping (Robles-Romo *et al.*, 2016). Immediately each exhausted shrimp was exposed to hypoxia for 60 min. The dissolved oxygen was decreased by nitrogen bubbling to $1.0 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$. Shrimp of the control group (baseline) were undisturbed and maintained at normoxia ($5.6 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$).

After hypoxia test, 100-200 μl of hemolymph were collected in each shrimp from the ventral sinus at the base of the first abdominal segment, this procedure was performed using a cooled-anticoagulant solution formulated with 5% sodium oxalate in isotonic saline (Mendoza, 1992). Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at $-75 \text{ }^\circ\text{C}$ for further analyses. The same sampling procedure was applied for control shrimp to obtain baseline values.

Hemolymph was centrifuged at 1350 g for 10 min at 4°C , plasma was collected for quantification of hemocyanin, total proteins, glucose, and lactate. The hepatopancreas and muscle (first abdominal segment) were dissected, lyophilized, grinded, re-hydrated and homogenized for quantification of levels of total proteins, total lipids, and triglycerides.

Commercial kits were employed to determine lactate and glycogen (PAP, Randox, U. K.), glucose (GOD-PAP, Boehringer Mannheim GmbH, Germany), and triglycerides (GPO-PAP, Randox), methods were adapted to microplates (Palacios *et al.*, 1999).

Plasma was 1:100 with a saline isotonic solution (450 mM NaCl and 10 mM KCl). Total proteins were determined according to Bradford (1976) using a commercial reagent concentrate (Bio-Rad, 500-0006) and bovine serum albumin (Sigma, A-3912) as standard. Total proteins were read on a microplate reader at 595 nm

(Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). In hepatopancreas and muscle homogenates, total protein was determined after digestion with NaOH (0.1N) at dilution of 1:20.

Hemocyanin was measured directly from 10- μ l plasma diluted 1:20 with the saline isotonic solution. Absorbance was read at 335 nm and concentrations were calculated using an extinction coefficient ($E^{1\%}$) of 2.83 for shrimp hemocyanin (Hagerman, 1986). Total lipids were determined by the sulphophosphovanillin method (Barnes and Blackstock, 1973).

The abdominal muscle was dissected and homogenized under cryogenic conditions. Extraction and analysis of adenylic nucleotides and arginine phosphate were performed according to Robles-Romo *et al.* (2016). Extraction consisted of homogenization in 10% trichloroacetic acid and neutralization by means of a mixture of trioctylamine and dichloromethane (1:5 v/v). Nucleotides were separated by ion pairing reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC) (model 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with an octadecylsilane C18 column (Hyper Clone 150 mm length, 4.6 mm internal diameter, 3 μ m particle size diameter, Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a security guard cartridge C18 (40 mm length, 3.0 mm internal diameter, Phenomenex). Conditions of this procedure were the following: a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ using a mobile phase of 0.15 M NaH₂PO₄ buffer, 3 mM of tetrabutylammonium as the ion-pairing agent, and 8% methanol adjusted to pH 6.0 with 5 N NaOH. The adenylic energy charge (AEC) was calculated in accordance with Atkinson (1968): $AEC = \frac{ATP + 1/2ADP}{ATP + ADP + AMP}$.

2.3. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted by maceration with a pestle using Trizol (Ambion®) according to the fabricant protocol. The RNA was quantified using NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific) and its integrity was validated by 1% agarose gel electrophoresis. The RNA was subsequently treated with DNase I (1 U, Sigma

Aldrich) for 30 min at 37 °C to remove DNA residual and was quenched with EDTA (50 mM, 10 minutes, 37 °C). Then, 1 ul of oligo dT was added and kept 5 min at 70 °C and 5 min on ice. Finally, the retro transcription was carried out by means of the reverse transcriptase (ImProm-II™ Reverse Transcription System), according to the protocol manufacturer (Promega). The cDNA synthesis was verified by PCR, under the conditions described in the following section.

2.4. Quantification of gene expression by qPCR

2 ng of treated RNA was used in each sample, 6 samples per group (n=6). The reaction was carried out in a Thermal Cycler C1000 Touch™ (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad). The qPCR conditions were as follows: an initial cycle of 95 °C of 3 minutes, 35 cycles de 95 °C for 30 seconds, 60 °C for 30 seconds and 72 °C for 30 seconds and finally 5 minutes at 72 °C. The negative control consisted of a triplicate reaction with deionized water, free of cDNA. Specific primers (Table III) were used for a product amplification of 111 bp for AK (Yao, et al., 2009) as well as for a reference gene (RPL8).

Cycle values (Ct) were automatically analyzed and calculated in CFX Manager™ software, version 3.1 (Bio-Rad). All data were expressed in terms of relative RNAm expression for AK.

2.5. Statistical analysis

Homoscedasticity of variances and normality of data were verified. One-way ANOVA was employed to determine the effect of phosphorus source from the diet over the zootechnical parameters in terms of weight gain, SGR, PER, FCR and survival. A bifactorial ANOVA (5x2) was performed to determine the influence of diet and stress factor over metabolic variables in hemolymph, muscle, and hepatopancreas. Tukey HSD test was conducted to determine the significant differences ($P < 0.05$) among treatments. Only, when a significant triple interaction (diet-stress) was observed, the

differences are indicated in tables with different letters. Otherwise, global means within each factor or two-factor combination are mentioned and compared in text, together with the corresponding significant main effect of this factor or the two-factor interaction. The software used was STATISTICA (version 10.0).

3. RESULTS

3.1. Productive performance

Shrimp growth (WG and SGR), FCR, survival and PER were not significantly different ($P>0.05$), among the different diets with various chemical forms of phosphorus (table IV).

3.2. Biochemical responses

Hemolymph variables were not significantly affected by the different phosphorus forms in the diet (Table V). Nevertheless, stress affected significantly almost all of the variables in the hemolymph. Shrimp from the stress group presented significantly higher total proteins ($278.3\pm 10.3 \text{ mg.ml}^{-1}$), glucose ($76.7\pm 3.3 \text{ mg.dl}^{-1}$) and lactate ($189.8\pm 5.4 \text{ mg.dl}^{-1}$) levels in hemolymph than undisturbed shrimp maintained at normoxia ($242.5\pm 12.2 \text{ mg.ml}^{-1}$, $25.2\pm 1.8 \text{ mg.dl}^{-1}$ y $19.3\pm 0.9 \text{ mg.dl}^{-1}$, respectively).

On the other hand, diet influenced total carbohydrate and glycogen content in hepatopancreas, with the highest levels in diet 2 and the lowest ones in diet 1, regardless of stress factor (Table VI). In contrast, lactate levels in muscle increased during stress ($7.8\pm 0.2 \text{ mg.g}^{-1}$) in comparison of group control (baseline; $2.6\pm 0.1 \text{ mg.g}^{-1}$).

The ArgP level and AEC in shrimp muscle decreased significantly after escape response and hypoxia exposure (stress group, $3.5\pm 0.2 \text{ }\mu\text{mol.g}^{-1}$ and 0.80 ± 0.01 , respectively) compared to levels in shrimp without disturbances (baseline, $17.6\pm \text{ }\mu\text{mol.g}^{-1}$ and 0.90 ± 0.006 , respectively). Finally, the diet and its interaction with stress factor did not affect significantly ($P>0.05$) the ArgP level and AEC (Table VII). Stress

effect on AEC is attributed to significant decrease in ADP and AMP levels together with in ATP levels (Table VII).

Shrimp exposed to stress test increased significantly AK relative expression (2.70 ± 0.24) in comparison with the shrimp from the basal group (2.03 ± 0.40) (Figl. 1) However, Nevertheless, although the interaction between both factors was not significantly different, such stress effect was not observed in shrimp fed with diet 2 that also presented the highest AK relative expression (3.82 ± 0.60)..

4. DISCUSSION

Besides, phosphorous content, Davis and Arnold (1994) clearly demonstrated that phosphorus availability could be related to the chemical form of phosphorus (source) included in the diet, with the highest values for sodium and potassium form compared to calcium ones Growth was improved in shrimp with KH_2PO_4 as phosphorus source, compared to NaH_2PO_4 and $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (Niu et al., 2008). In contrast, in this research, we did not found significant differences in growth in terms of WG, SGR, FCR and survival of shrimp fed with different source phosphorus from the diet, as previously reported by Velasco *et al.*, (1998). The dietary phosphorus availability was probably improved since the ability of microorganisms used in the elaboration of diets to make phosphorus available from a different source has been reported (Greppi *et al.*, 2015; Kerovuo y Tynkkynen, 2000; Anyakwo y Abot, 2010).

On the other hand, there are few studies analyzing a possible relation between stress response and dietary phosphorus. Dietary phosphorus improves cell viability, antioxidant capacity, energy generation and lipid transport of fish *Takifugu obscurus* when exposed to a decrease in water temperature (Ye et al., 2016). Niu *et al.*, (2008) attribute the higher productive performance of shrimp fed with potassium and sodium forms of phosphorus, most likely due to the maintenance of osmotic pressure, through to activate the proton pumping-ATPase, counteracting in this way the osmotic stress in full-strength seawater. In the present study, we did not obtain

enough evidence to establish a relation between stress response and dietary phosphorus.

A strong decrease in ArgP levels was observed in the present study following escape response combined with hypoxia as previously with separated stress induced by escape response (Robles-Romo et al., 2016) and hypoxia (Abe et al., 2007). However, in contrast to our hypothesis, phosphorous source did not affect baseline levels and the decrease rate of ArgP and ATP during pronounced stress conditions such as those applied in the present study. The increase expression AK following stress is in accordance to ArgP hydrolysis, although, in this case a diet effect was observed. Indeed, up-regulation of AK expression in diet 2 (NaH₂PO₄) and lack of stress effect in this treatment indicate that influence of phosphorous source could exist at another level and must be further analyzed. Moreover, the increased levels of total carbohydrate and glycogen levels in hepatopancreas could indicate a sparing effect of another immediate source, additional to ArgP, energy source. Therefore, more studies of phosphorus sources on intermediary metabolism should be explored.

5. REFERENCES

- Abe, H., Hirai, S., & Okada, S. (2007). Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 146(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.08.027>
- Ambasankar, K. S., Ali, A. S., & Dayal, J. D. (2006). Effect of Dietary Phosphorus on Growth and Its Excretion in Tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Asian Fisheries Society*, 19, 21–26.
- Aparicio-Simón, B., Piñón, M., Racotta, R., & Racotta, I. S. (2010). Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture*, 298(3–4), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.016>

- Barnes, H., & Blackstock, J. (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for “total” lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 12(1), 103–118. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(73\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(73)90040-3)
- Boyd, C. E., & Teichert-Coddington, D. (1995). Dry Matter, Ash, and Elemental Composition of Pond-Cultured *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 26(1), 88–92. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1995.tb00214.x>
- Chen, S., Gao, Y., Xie, S., Niu, J., Yang, F., Fang, W., & Tian, L. (2017). Effect of L-ascorbyl-2-polyphosphate supplementation on growth performance , body composition, antioxidative capacity and salinity stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 1–15. <https://doi.org/10.1111/are.13284>
- Davis, D. A., & Arnold, C. R. (1994). Estimation of apparent phosphorus availability from inorganic phosphorus sources for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 127(2–3), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90430-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90430-8)
- Davis, D. A., Lawrence, A. L., & Gatlin, D. M. (1993). Response of *Penaeus vannamei* to Dietary Calcium, Phosphorus and Calcium: Phosphorus Ratio. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(4), 504–515. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00581.x>
- Anyakwo, C. N., & Obot, O. W. (2010). Phosphorus Removal Capability of *Aspergillus Terreus* and *Bacillus Subtilis* from Nigeria’s Agbaja Iron Ore. *Journal*

of Minerals and Materials Characterization and Engineering, 09(12), 1131–1138. <https://doi.org/10.4236/jmmce.2010.912082>

Jokinen, E. I., Vielma, J., Aaltonen, T. M., & Koskela, J. (2003). The effect of dietary phosphorus deficiency on the immune responses of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 15(2), 159–168. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00155-9)

Kanazawa, A., Teshima, S., & Sasaki, M. (1984). Requirements of Juvenile prawn for calcium, phosphorus, magnesium, potassium, copper, manganese, and iron. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 33(1), 63–71.

Kerovuo, J., & Tynkkynen, S. (2000). Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755. *Letters in Applied Microbiology*, 30(4), 325–329.

Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate: Toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 491–496. <https://doi.org/10.1128/jb.177.3.491-496.1995>

Kureshy, N., & Davis, D. A. (2002). Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 125–143.

Liang, J. J., Liu, Y. J., Tian, L. X., Yang, H. J., & Liang, G. Y. (2012). Effects of dietary phosphorus and starch levels on growth performance, body composition and nutrient utilization of grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.). *Aquaculture Research*, 43(8), 1200–1208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02924.x>

Niu, J., Liu, Y. J., Tian, L. X., Mai, K. S., Yang, H. J., Ye, C. X., & Gao, W. (2008). Effect of dietary phosphorus sources and varying levels of supplemental phosphorus on survival, growth and body composition of postlarval shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 14(5), 472–479.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00552.x>
- Peñaflorida, V. D. (1999). Interaction between dietary levels of calcium and phosphorus on growth of juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 172(3–4), 281–289. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00503-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00503-1)
- Racotta, I. S., Palacios, E., & Méndez, L. (2002). Metabolic Responses to Short and Long-term Exposure to Hypoxia in White Shrimp (*Penaeus vannamei*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 35(4), 269–275.
<https://doi.org/10.1080/1023624021000019333>
- Robles-Romo, A., Zenteno-Savín, T., & Racotta, I. S. (2016). Bioenergetic status and oxidative stress during escape response until exhaustion in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 478, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.01.016>
- Romano, N., Koh, C. B., & Ng, W. K. (2015). Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 435, 228–236.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.037>
- Yao, C. L., Ji, P. F., Kong, P., Wang, Z. Y., & Xiang, J. H. (2009). Arginine kinase from *Litopenaeus vannamei*: Cloning, expression and catalytic properties. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(3), 553–558.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.012>
- Ye, C. X., Wan, F., Sun, Z. Z., Cheng, C. H., Ling, R. Z., Fan, L. F., & Wang, A. L. (2016). Effect of phosphorus supplementation on cell viability, anti-oxidative capacity and comparative proteomic profiles of puffer fish (*Takifugu obscurus*)

under low temperature stress. *Aquaculture*, 452, 200–208.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.039>

Table I. Composition experimental diets (dry weight percentage).

	1	2	3	4
Ingredient	KH₂PO₄	NaH₂PO₄	NH₄H₂PO₄	Na₅P₃O₁₀
Fish meal	6.5	6.5	6.5	6.5
Soybean meal	27.5	27.5	27.5	27.5
Wheat meal	47.3	47.3	47.3	47.3
Yeast*	4.0	4.0	4.0	4.0
Fish oil	2.6	2.6	2.6	2.6
Soy lecithin	2.2	2.2	2.2	2.2
Mineral Mix**	2.2	2.2	2.2	2.2
Alginate acid	2.0	2.0	2.0	2.0
Free amino acids mix [‡]	0.4	0.4	0.4	0.4
Vitamin Mix [†]	0.3	0.3	0.3	0.3
Organic acids Mix ^{‡‡}	1.0	1.0	1.0	1.0
Probiotic Mix ^{††}	0.8	0.8	0.8	0.8
Fish oil	0.5	0.5	0.5	0.5
KH₂PO₄	3.6	0.0	0.0	0.0
NaH₂PO₄	0.0	3.2	0.0	0.0
NH₄H₂PO₄	0.0	0.0	3.1	0.0
Na₅P₃O₁₀	0.0	0.0	0.0	3.3
Cellulose	0.0	0.4	0.5	0.3

* Commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

**Laboratory minerals mix: NaH₂PO₄, CaH₂PO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·H₂O, ZnSO₄·7H₂O, ZnSO₄·H₂O, MnSO₄·4H₂O, FeSO₄, CuSO₄·7 H₂O, Na₂SeO₃, KI, Na₂MoO₄.

‡ Laboratory free amino acids: arginine, methionine, lysine, tryptophan, and threonine.

† Laboratory vitamins mix: Choline, Butylated hydroxytoluene (BHT), cholesterol, Vitamin A, C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9, B12, B20, D, E, and K.

‡‡ Organic acids Mix: propionic, butyric acetic and nicotinic acids

†† Laboratory strain mix of *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*.

Table II. Proximate analysis of experimental diets (mean \pm standard error).

	1	2	3	4
	KH_2PO_4	NaH_2PO_4	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$
Crude protein (%)	26.1 \pm 0.03	27.6 \pm 0.08	27.1 \pm 0.04	27.3 \pm 0.06
Lipid (%)	7.4 \pm 0.02	7.8 \pm 0.02	7.8 \pm 0.02	7.3 \pm 0.02
Nitrogen-free extract (%)	55.3 \pm 0.06	54.1 \pm 0.08	55.2 \pm 0.02	53.8 \pm 0.08
Water content (%)	9.4 \pm 0.03	8.5 \pm 0.02	8.9 \pm 0.02	9.5 \pm 0.04
Crude fiber (%)	1.2 \pm 0.03	1.3 \pm 0.03	1.7 \pm 0.03	1.4 \pm 0.03
Ash (%)	10.0 \pm 0.004	9.1 \pm 0.02	8.3 \pm 0.02	10.3 \pm 0.01
Gross energy (cal/g)	4148.8 \pm 0.5	4328.1 \pm 0.5	4348.9 \pm 0.4	4268.7 \pm 0.5

Table III. Sequence of primers for AK and RPL8

Primer	Sequence
AK-F	AGGCGAAGGTTTCCTCTACCCT
AK-R	AGTGGTCGTCGATCAGCTTCTG
RPL8-F	ATTCTGCCTTGGGTCCTTCT
RPL8-R	GCCTAAGGTGCGTGGTGT

Table IV. Biological performance (mean \pm standard error) of juveniles of *L. vannamei* reared with different phosphorus source for 6 weeks.

	1	2	3	4
Phosphorus form	KH₂PO₄	NaH₂PO₄	NH₄H₂PO₄	Na₅P₃O₁₀
WG (%)	296.4 \pm 14.9	293.8 \pm 14.8	289.9 \pm 3.3	320.8 \pm 3.6
SGR (%/day)	3.27 \pm 0.09	3.26 \pm 0.09	3.24 \pm 0.02	3.42 \pm 0.02
FCR	2.10 \pm 0.07	2.20 \pm 0.07	2.16 \pm 0.07	1.95 \pm 0.11
Survival (%)	98.6 \pm 1.4	97.2 \pm 1.6	95.8 \pm 2.7	93.1 \pm 6.9
PER	2.04 \pm 0.07	1.82 \pm 0.06	1.88 \pm 0.06	2.10 \pm 0.11

WG= Weight gain; SGR= Specific growth rate; FCR= Feed conversion rate; PER = protein efficiency ratio

Table V. Biochemical levels (means \pm standard error) in the hemolymph of *L. vannamei* reared different phosphorus source in diets (D) for 42 days and exposed to hypoxia and management (st= stress test).

	1	2	3	4			
	KH ₂ PO ₄	NaH ₂ PO ₄	NH ₄ H ₂ PO ₄	Na ₅ P ₃ O ₁₀	D	st	D*st
Total Proteins (mg.mL ⁻¹)					NS	*	NS
Baseline	242.3 \pm 32.5	235.9 \pm 25.9	230.6 \pm 32.0	232.8 \pm 23.7			
Stress	246.5 \pm 22.2	290.13 \pm 25.3	254.6 \pm 26.8	303.6 \pm 17.1			
Hemocyanin (mg.mL ⁻¹)					NS	NS	NS
Baseline	51.5 \pm 4.3	58.3 \pm 5.0	49.6 \pm 6.4	56.5 \pm 4.7			
Stress	50.9 \pm 5.5	47.4 \pm 5.3	46.7 \pm 3.1	46.8 \pm 4.0			
Glucose (mg.dl ⁻¹)					NS	**	NS
Baseline	24.0 \pm 2.7	22.7 \pm 2.1	25.1 \pm 4.7	33.0 \pm 5.1			
Stress	79.8 \pm 5.9	68.6 \pm 11.0	81.1 \pm 5.7	77.7 \pm 6.6			
Lactate (mg dl ⁻¹)					NS	**	NS
Baseline	19.8 \pm 1.8	18.6 \pm 1.7	20.3 \pm 2.0	18.3 \pm 193.6			
Stress	204.2 \pm 14.4	184.6 \pm 15.0	184.1 \pm 11.2	193.6 \pm 3.9			
Triglycerides (mg mL ⁻¹)					NS	NS	NS
Baseline	0.42 \pm 0.04	0.40 \pm 0.04	0.38 \pm 0.05	0.45 \pm 0.04			
Stress	0.45 \pm 0.06	0.46 \pm 0.07	0.53 \pm 0.12	0.63 \pm 0.17			

Values with different letters in the same row present significant differences (P<0.05); NS= Not significant

Table VI. Biochemical levels (means \pm standard error) in tissues of *L. vannamei* fed with different phosphorus source in diets (D) for 42 days and exposed to hypoxia and management (st= stress test).

		1	2	3	4	D	st	D*st
		KH ₂ PO ₄	NaH ₂ PO ₄	NH ₄ H ₂ PO ₄	Na ₅ P ₃ O ₁₀			
	Total proteins (mg.g⁻¹)					NS	NS	NS
HEPATOPANCREAS	Baseline	442.4 \pm 27.9	431.4 \pm 24.1	452.0 \pm 33.0	452.4 \pm 33.1			
	Stress	429.8 \pm 33.1	457.4 \pm 23.1	394.6 \pm 19.5	380.3 \pm 26.5			
	Total carbohydrates (mg.g⁻¹)					*	NS	NS
	Baseline	25.5 \pm 2.3	32.8 \pm 2.4	29.0 \pm 1.8	31.0 \pm 2.1			
	Stress	23.9 \pm 2.2	35.7 \pm 3.1	24.5 \pm 1.5	26.2 \pm 1.8			
	Glycogen (mg.g⁻¹)					*	NS	NS
	Baseline	20.4 \pm 1.1	24.3 \pm 1.9	22.1 \pm 2.0	24.8 \pm 1.7			
	Stress	20.5 \pm 1.4	27.2 \pm 1.9	22.3 \pm 1.6	24.2 \pm 1.9			
	Total lipids (mg.g⁻¹)					NS	NS	NS
	Baseline	50.7 \pm 3.1	54.3 \pm 4.6	50.1 \pm 3.7	57.7 \pm 6.1			
	Stress	56.4 \pm 5.6	51.8 \pm 6.0	55.5 \pm 4.8	59.5 \pm 7.9			
	Triglycerides (mg.g⁻¹)					NS	NS	NS
Baseline	34.2 \pm 5.0	42.8 \pm 5.3	32.5 \pm 5.0	41.4 \pm 6.0				
Stress	40.6 \pm 5.3	34.0 \pm 4.5	42.6 \pm 4.0	41.6 \pm 6.3				
MUSCLE	Total proteins (mg.g⁻¹)					NS	NS	NS
	Baseline	699.1 \pm 24.9	726.1 \pm 25.2	665.1 \pm 31.7	719.4 \pm 21.6			
	Stress	738.9 \pm 29.8	722.7 \pm 21.0	706.2 \pm 14.4	712.7 \pm 15.2			
	Total lipids (mg.g⁻¹)					NS	NS	NS
	Baseline	34.1 \pm 1.6	38.5 \pm 3.2	33.3 \pm 2.4	35.3 \pm 2.9			
	Stress	34.8 \pm 2.1	34.3 \pm 1.4	35.7 \pm 2.1	30.9 \pm 1.4			
	Total carbohydrates (mg.g⁻¹)					NS	NS	NS
	Baseline	36.7 \pm 3.7	40.1 \pm 2.7	32.2 \pm 4.2	45.4 \pm 3.2			
	Stress	36.6 \pm 5.2	29.9 \pm 4.2	31.6 \pm 3.7	37.7 \pm 5.5			
	Glycogen (mg.g⁻¹)					NS	NS	NS
	Baseline	25.8 \pm 2.7	31.8 \pm 2.8	24.5 \pm 3.5	36.1 \pm 3.4			
	Stress	24.7 \pm 4.3	26.9 \pm 4.7	27.0 \pm 3.1	25.4 \pm 5.3			
Lactate (mg.g⁻¹)					*	**	NS	
Baseline	2.4 \pm 0.3	2.4 \pm 0.3	2.3 \pm 0.3	3.5 \pm 0.3				
Stress	7.1 \pm 0.4	8.0 \pm 0.5	7.6 \pm 0.3	8.4 \pm 0.3				

Table VII. Concentration of Arg-P, nucleotides and Adenylate Energy Charge (AEC) (means \pm standard error) in muscle of *L. vannamei* fed with different phosphorus source for 42 days and exposed to hypoxia and management (st= stress test).

	1	2	3	4	D	st	D*st
	KH_2PO_4	NaH_2PO_4	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$			
ArgP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)						**	
Baseline	15.9 \pm 1.6	19.5 \pm 1.8	21.9 \pm 4.3	16.3 \pm 1.6			
Stress	3.1 \pm 0.3	4.0 \pm 0.4	3.0 \pm 0.4	3.5 \pm 0.6			
ATP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)						**	
Baseline	9.60 \pm 0.65	9.63 \pm 0.33	8.66 \pm 0.55	9.31 \pm 0.46			
Stress	6.45 \pm 0.37	7.99 \pm 0.89	7.13 \pm 0.32	6.61 \pm 0.58			
ADP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)						**	
Baseline	1.93 \pm 0.19	1.82 \pm 0.17	1.77 \pm 0.24	1.82 \pm 0.19			
Stress	3.22 \pm 0.33	2.86 \pm 0.41	3.05 \pm 0.28	2.75 \pm 0.32			
AMP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)						**	
Baseline	0.24 \pm 0.07	0.21 \pm 0.04	0.22 \pm 0.06	0.16 \pm 0.04			
Stress	0.73 \pm 0.20	0.56 \pm 0.09	0.53 \pm 0.12	0.50 \pm 0.15			
AEC (ATP+1/2ADP/ATP+ADP+AMP)						**	
Baseline	0.90 \pm 0.02	0.90 \pm 0.01	0.90 \pm 0.01	0.90 \pm 0.01			
Stress	0.78 \pm 0.03	0.82 \pm 0.02	0.81 \pm 0.02	0.81 \pm 0.03			

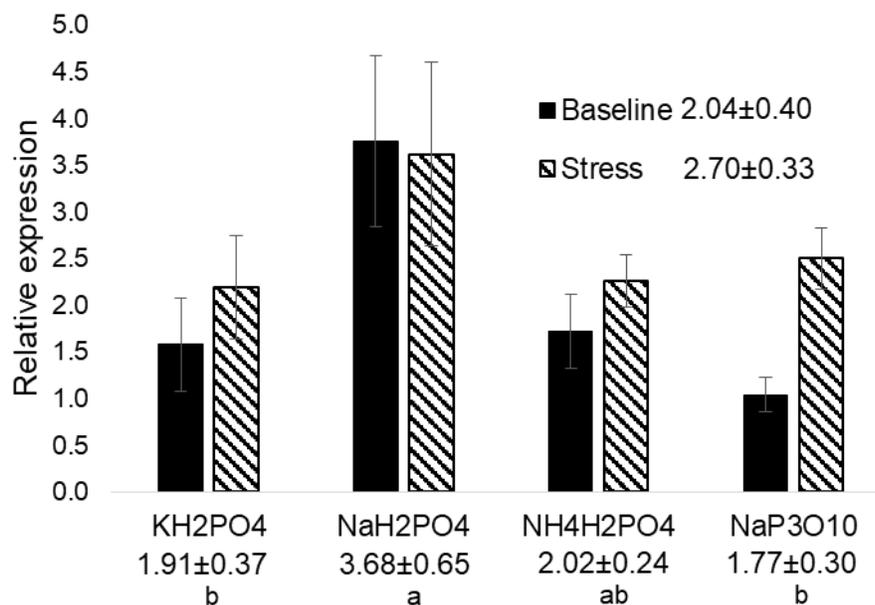


Figure 1. Relative expression PCR analysis (means \pm standard error) in muscle of *L. vannamei* fed with different phosphorus source for 42 days and exposed to hypoxia and management. Values with different letters present significant differences ($P < 0.05$) from Tukey test of ANOVA bifactorial (stress*diet).

