



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

SUSTRATOS ENERGÉTICOS, RELACIONES
CARBOHIDRATO:PROTEÍNA Y LÍPIDO:PROTEÍNA EN LA DIETA
DE *Litopenaeus vannamei* CON RELACIÓN AL DESEMPEÑO
ACUICOLA, CAPACIDAD INMUNE Y ANTIOXIDANTE.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Juan Carlos Ruvalcaba Márquez

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2021.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 23 del Mes de Marzo del 2021, 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:

"Sustratos energéticos, relaciones carbohidrato:proteína y lípido:proteína en la dieta de *Litopenaeus vannamei* con relación al desempeño acuícola, capacidad inmune y antioxidante"

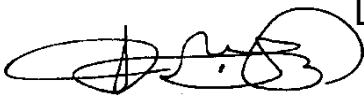
Presentada por el alumno:

Juan Carlos Ruvalcaba Márquez

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



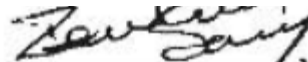
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Director de Tesis




Dr. Píndaro Álvarez Ruíz
Co-Director de Tesis



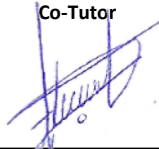
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz
Co-Tutor



Dra. Tania Zenteno Savín
Co-Tutora



Dr. Illie Sava Racotta Dimitrov
Co-Tutor



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

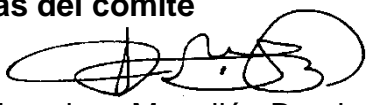
La Paz, Baja California Sur, a 22 de marzo de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Juan Carlos Ruvalcaba Márquez del Programa de doctorado en manejo de recursos naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Por default
- Porcentajes de similitud:
9% (Máximo permitido 20%)

		Citas incluidas Bibliografía incluida	9% SIMILAR
Resumen de Coincidencias			
1	Internet 728 palabras Copiado el 13-Ene-2019 cibnor.repositorioinstitucional.mx		3%
2	Internet 121 palabras Copiado el 30-Jul-2017 docplayer.es		<1%
3	Internet 72 palabras Copiado el 26-Nov-2020 doczz.net		<1%
4	Internet 63 palabras Copiado el 01-May-2020 www.scribd.com		<1%


Firmas del comité



Francisco Magallón Barajas
Co-Director



Píndaro Álvarez Ruíz
Co-Director



Tania Zenteno Savín
Co-Tutora



Humberto Mejía Ruiz
Co-Tutor



Illie Racotta Dimitrov
Co-Tutor



Conformación de Comités

Comité Tutorial

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

Dr. Píndaro Álvarez Ruíz
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa,
Instituto Politécnico Nacional
Co-Director de Tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
Co-Tutor

Dra. Tania Zenteno Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
Co-Tutora

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
Co-Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dr. Píndaro Álvarez Ruíz
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dra. Tania Zenteno Savín
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

Jurado de Examen

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dr. Píndaro Álvarez Ruíz
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dra. Tania Zenteno Savín
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

Suplentes

Dr. Walter Quadros Seiffert
Dr. Alberto Peña Rodríguez

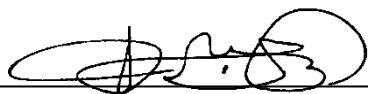
Resumen

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) representa el 90% del valor de la producción acuícola a nivel nacional, en parte gracias a la intensificación de los cultivos. La alimentación es la principal estrategia para favorecer el rendimiento de los sistemas acuícolas, y debe estar encaminada a favorecer procesos sustentables en su elaboración, por medio de la disminución del uso de ingredientes de alto costo y disponibilidad variable como la harina de pescado, además de disminuir la contaminación residual. Esto no es sencillo, ya que la acuicultura intensiva presenta diferentes factores que dan lugar a distintos tipos de estrés que pueden favorecer la aparición de enfermedades. El camarón blanco posee un sistema inmune innato con mecanismos de defensa celular y humoral mediados por hemocitos, así como un sistema antioxidante que contribuye a regular el efecto oxidativo de la respuesta inmune, el cual se ve influenciado por la variación de la concentración de sustratos energéticos. El presente trabajo pretende determinar la capacidad de respuesta inmune y antioxidante de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de sustratos energéticos en la dieta (proteínas, lípidos, carbohidratos y fósforo), cultivados en sistemas de agua clara, donde el alimento es la única vía para fortalecer a los organismos. Para ello, se realizaron bioensayos seriados con cultivos hiperintensivos de camarón blanco en acuarios de 50 L. Se determinó el efecto de un alimento experimental enriquecido con vitaminas, minerales y aminoácidos con bajo nivel de proteína y harina de pescado contra un alimento comercial con alto nivel de estos elementos. Al encontrarse rendimientos similares, en el segundo bioensayo se evaluó la fuente de fósforo para favorecer el rendimiento y con ello satisfacer la demanda fósforo producida por la reducción de harina de pescado. Se encontró que el KH_2PO_4 es el más efectivo, dado el rendimiento obtenido y su facilidad de obtención. Una vez con el alimento base establecido, se determinó una formulación matemática para la tasa de ingesta diaria de proteína (IDP) más eficiente, mediante cuatro niveles (80, 100, 120 y 140 %), con mejores resultados a 120 %. Por último, se evaluó la eficacia de 20 alimentos formulados con cinco niveles de proporcionalidad de carbohidratos:proteína (2.1, 1.5, 1.1, 0.8 y 0.6) y cuatro de lípidos:proteína (0.20, 0.23, 0.30 y 0.36) ($\text{mg sustrato mg prot}^{-1}$), a con base en una IDP de 120 %. El mejor rendimiento zootécnico se encontró con el alimento con mayor proporción carbohidratos:proteína. Se observaron diferencias significativas en el conteo total de hemocitos (CTH) por el efecto de los carbohidratos, mientras que el índice fagocítico no se vio afectado por carbohidratos ni por los lípidos. Tanto el CTH como la capacidad fagocítica presentaron una relación con la proporción energía:proteína. Por parte del sistema antioxidante, se observó un efecto por la proporcionalidad carbohidratos:proteína en la actividad SOD y carbonilos proteicos en hepatopáncreas, mientras que la diferencia de lípidos solo afectó significativamente la producción de carbonilos proteicos y TBARS en músculo y hepatopáncreas respectivamente.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, sistema inmune, sistema antioxidante, sustratos energéticos.

ORCID: 0000-0001-8271-0249

Vo. Bo.



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Director de Tesis



Dr. Píndaro Álvarez Ruíz
Co-Director de Tesis

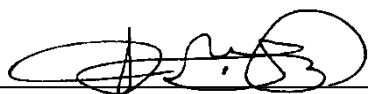
Summary

White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) represent 90% of the value of aquaculture production at national level, in part thanks to the culture intensification. Feeding is the main strategy to favor the performance of aquaculture systems, and should be aimed at favoring sustainable processes in its elaboration, by reducing the use of high-cost ingredients and variable availability such as fishmeal, in addition to decrease residual contamination. This is not easy, since intensive aquaculture presents different factors that give rise to different stress conditions that can favor diseases. White shrimp have an innate immune system with cellular and humoral defense mechanisms mediated by hemocytes, as well as an antioxidant system that contribute to regulating the oxidative effect of the immune response, which is influenced by the energy substrates variation. The present work aims to determine the immune and antioxidant response capacity of *L. vannamei* fed with different levels of energy substrates in the diet (proteins, lipids, carbohydrates and phosphorus), grown in clear water systems, where food is the only route to strengthen organisms. For this, serial bioassays were carried out with hyper-intensive white shrimp cultures in 50 L aquariums. The effect of an experimental food enriched with vitamins, minerals and amino acids with a low fish meal and protein content was determined against a commercial food with high protein and fish meal content. In the second bioassay, the source of phosphorus was evaluated to favor the yield and thereby satisfy the phosphorus demand produced by the reduction of fishmeal. We found that KH_2PO_4 is the most effective. Once the basic food was established, a mathematical formulation for the most efficient daily protein intake rate (DPI) was determined, using four levels (80, 100, 120 and 140%), with better results at 120 %. Finally, the efficacy of 20 foods formulated with five carbohydrates:protein (2.1, 1.5, 1.1, 0.8 and 0.6) and four lipids:protein (0.20, 0.23, 0.30 and 0.36) (mg substrate mg prot-1) levels was evaluated, based on a 120% DPI. Best zootechnical performance was observed in feed with a higher carbohydrate:protein ratio. Significant differences were observed in the total hemocyte count (THC) due to the effect of carbohydrates, while the phagocytic index was not affected by carbohydrates or lipids. THC and phagocytic capacity showed a correlation with the energy ratio. We found an effect due to the carbohydrates:protein proportionality in the SOD activity and protein carbonyls in digestive gland, while the difference in lipids only affects the production of protein carbonyls and TBARs in muscle and digestive gland respectively.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, immune system, antioxidant system, energy substrates.

ORCID: 0000-0001-8271-0249

Vo. Bo.



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Director de Tesis



Dr. Píndaro Álvarez Ruíz
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

A mi madre, solo tú sabes todo lo que hemos pasado...

A mi abuela, exista o no el paraíso, seguro que se las arregla para cuidarnos.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, receptor de mis estudios de Posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada y por el apoyo mediante el proyecto Proinnova 2018 (ID_253807) y el proyecto 437 de la Alianza de Investigación en Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible [número de subvención JPMJSA1405], apoyado por la Agencia Japonesa de Ciencia y Tecnología 438 (JST) y la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA)

A mis Co-Directores de Tesis, Dr. Francisco Javier Magallón Barajas y Dr. Píndaro Álvarez Ruíz, por su apoyo, paciencia y confianza. A los miembros del comité tutorial, Dra. Tania Zenteno, Dr. Illie Racotta y Dr. Humberto Mejía, por el apoyo brindado estos cinco años de manera personal y académica.

A mis profesores durante el tiempo de Posgrado, todos siempre dispuestos a ayudar, enseñar y aprender, Dr. Civera, Dr. Nolasco, Dra. Lora, Dra. Kitty, Dr. Campa y muchos más, gracias a todos.

Al Personal Técnico del CIB, tengo que decir que a cualquier lugar que fui siempre encontré gente dispuesta a ayudar de la mejor manera; Dr. Ernesto Goytortua, Enrique, Sandra de la Paz, Orlado Lugo, Celia Rojas. Al Personal del Laboratorio de Análisis Químico Proximal, de Fisiología, de Estrés Oxidativo, de Microbiología, Nutrición Acuícola, Elaboración de Alimentos de la UABCS encabezado por el Dr. Cadena, al Personal Administrativo del Almacén, de la oficina de Posgrado, a la secretaria del Dr. Racotta, de Administración, Personal de Seguridad y Mantenimiento, con todos tuve por lo menos una buena platica y a todos les agradezco su tiempo, apoyo y ayuda.

A mis compañeros de Posgrado y amigos fuera de él, muchas gracias.

A mi familia, mi abuelo, mi hermano y mi madre, gracias por todo, tengo que decirles que me siento muy afortunado.

Contenido

Resumen	i
Summary	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vi
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Harina de pescado.	3
2.2 Proteína.	4
2.3 Fósforo.....	5
2.4 Lípidos y carbohidratos.....	6
2.5 Sistema inmune.	7
2.6 Especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo.....	8
2.7 Sistema antioxidante.	9
2.8 Sustratos energéticos frente a un agente patógeno.....	10
2.9 Desecho de nutrientes.....	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general.	15
5.2 Objetivos particulares.....	15
6. MATERIAL Y METODOS	16
6.1 Bioensayo 1: Evaluación de la eficacia de un alimento formulado para <i>L. vannamei</i> con base en un nivel bajo de proteína total, inclusión de harina de pescado y satisfacción de requerimientos de aminoácidos, vitaminas y minerales, en condiciones de agua clara con diferentes salinidades y recambio de agua bajo.	16
6.2 Bioensayo 2: Selección experimental de una fuente química de fósforo apropiada para su inclusión en las fórmulas alimenticias que permitan evaluar sustratos energéticos.	22
6.3 Bioensayo 3: 3. Determinación de las formulaciones matemáticas de ingesta diaria de proteína (IDP) para <i>L. vannamei</i> y la variación del rendimiento con base a diferentes niveles	

de aplicación de la ecuación de IDP en condiciones de densidad hiper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.	23
6.4 Bioensayo 4: Evaluación del efecto de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de <i>L. vannamei</i> sobre el desempeño zootécnico en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.	24
6.4.1 Calidad del sistema.	27
6.4.2 Rendimiento del sistema.	27
6.5 valuación del efecto de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de <i>L. vannamei</i> sobre el sistema inmune y antioxidante en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.	28
6.5.1 Conteo total de hemocitos (CTH).	28
6.5.2 Evaluación de fagocitosis en hemocitos.	28
6.5.3 Superóxido dismutasa (SOD).	29
6.5.4 Catalasa (CAT).	30
6.5.5 Peroxidación de lípidos.	30
6.5.6 Proteínas carboniladas.....	31
7. RESULTADOS	32
7.1 Bioensayo 1: Evaluación de la eficacia de un alimento formulado para <i>L. vannamei</i> con base en un nivel bajo de proteína total, inclusión de harina de pescado y satisfacción de requerimientos de aminoácidos, vitaminas y minerales, en condiciones de agua clara con diferentes salinidades y recambio de agua bajo.	32
7.1.1 Análisis de agua.....	32
7.1.2 Parámetros zootécnicos.....	35
7.1.2.1 Crecimiento.	35
7.1.2.2 Supervivencia.	36
7.1.2.3 Factor de conversión alimenticia (FCA).....	37
7.2 Bioensayo 2.- Selección experimental de una fuente química de fósforo apropiada para su inclusión en las fórmulas alimenticias que permitan evaluar sustratos energéticos para <i>L. vannamei</i>	37
7.2.1 Parámetros zootécnicos.....	37
7.3 Bioensayo 3: Determinación de las formulaciones matemáticas de ingesta diaria de proteína (IDP) para <i>L. vannamei</i> y la variación del rendimiento con base a diferentes niveles	

de aplicación de la ecuación de IDP en condiciones de densidad hiper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.....	38
7.3.1 Determinación de las formulaciones matemáticas de Ingesta Diaria de Proteína (IDP) para <i>L. vannamei</i> , en relación con el peso corporal (PC).....	38
7.3.2 Variación del rendimiento con base a diferentes niveles de aplicación de la ecuación de IDP en condiciones de densidad hiper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.....	40
7.3.2.1 Crecimiento.....	40
7.3.2.2 Supervivencia.....	41
7.3.2.3 Factor de conversión alimenticia.....	41
7.4 Bioensayo 4: Evaluación del efecto de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de <i>L. vannamei</i> sobre el desempeño zootécnico en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.....	42
7.4.1 Parámetros zootécnicos.....	42
7.5. Evaluación del efecto de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína, lípidos:proteína y energía:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de <i>L. vannamei</i> sobre el sistema inmune y antioxidante en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.....	44
7.5.1 Conteo total de hemocitos (CTH).....	44
7.5.2 Índice de fagocitosis.....	44
7.5.3 Actividad de la Super Oxido Dismutasa (SOD) en músculo y glándula digestiva.....	47
7.5.4 Actividad de la Catalasa (CAT) en músculo y glándula digestiva.....	47
7.5.5 TBARS en músculo y glándula digestiva.....	47
7.5.6 Carbonilos proteicos en músculo y glándula digestiva.....	47
8. DISCUSIÓN	51
8.1 Eficacia de un alimento formulado para <i>L. vannamei</i> con base en un nivel bajo de proteína total, inclusión de harina de pescado y satisfacción de requerimientos de aminoácidos, vitaminas y minerales, en condiciones de agua clara con diferentes salinidades y recambio de agua bajo.....	51
8.2 Fuente química de fósforo apropiada para su inclusión en las fórmulas alimenticias que permitan evaluar sustratos energéticos para <i>L. vannamei</i>	55
8.3 Formulaciones matemáticas de ingesta diaria de proteína (IDP) para <i>L. vannamei</i> y variación del rendimiento con base a diferentes niveles de aplicación de la ecuación de IDP en	

condiciones de densidad híper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.	56
8.4 Variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de <i>L. vannamei</i> sobre el desempeño zootécnico en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.	57
8.5 Variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de <i>L. vannamei</i> sobre el sistema inmune y antioxidante en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.	59
9. CONCLUSIONES	62
10. LITERATURA CITADA	64
11. ANEXOS	75
A.- Artículo Aceptado: Performance of <i>Litopenaeus vannamei</i> in experimental conditions at different levels of daily protein intake and carbohydrate/protein ratios in low fishmeal content feeds.....	75
B.- Artículo Sometido: Performance of <i>Litopenaeus vannamei</i> in experimental conditions at different levels of daily protein intake and carbohydrate/protein ratios in low fishmeal content feeds.....	98

Lista de figuras

Figura 1. Concentración de N-NH ₄ a lo largo del experimento en todos los tratamientos, donde Po= agua de pozo, Os= agua tratada por ósmosis inversa, DC= dieta control, DT= dieta tratamiento.	32
Figura 2. Concentración de N-NO ₂ a lo largo del experimento en todos los tratamientos, donde Po= agua de pozo, Os= agua tratada por ósmosis inversa, DC= dieta control, DT= dieta tratamiento.	33
Figura 3. Concentración de N-NO ₃ a lo largo del experimento en todos los tratamientos, donde Po= agua de pozo, Os= agua tratada por ósmosis inversa, DC= dieta control, DT= dieta tratamiento.	33
Figura 4. Concentración de P-PO ₄ a lo largo del experimento en todos los tratamientos, donde Po= agua de pozo, Os= agua tratada por ósmosis inversa, DC= dieta control, DT= dieta tratamiento.	34
Figura 5. Ganancia en peso de juveniles de <i>L. vannamei</i> cultivados en laboratorio en condiciones de alta densidad (240 organismos m ³) diferentes salinidades (A) 0.5, (B) 6 y (C) 35 ups alimentados con el alimento experimental y control.	36
Figura 6. Funciones matemáticas de la ingesta diaria de proteína IDP expresada en g prot.kg biomasa ⁻¹ . día ⁻¹ , en función del peso corporal PC expresado en gramos.	39
Figura 7. Ingesta diaria de proteína (g prot/kg biomasa/día) a 80, 100, 120 y 140 %, IDP = 44.7 PC ^{-0.714} , donde PC se expresa en gramos de peso corporal individual.	40
Figura 8. Crecimiento de <i>L. vannamei</i> cultivados en laboratorio en condiciones de alta densidad alimentados con base a una ingesta diaria de proteína (IDP) de 80, 100, 120 y 140 %.	41
Figura 9. Conteo total de hemocitos (10 ⁶ Cell/mL) en <i>L. vannamei</i> relacionado al contenido de energía en el alimento (Kcal/g proteína) con diferentes proporcionalidades de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína de acuerdo a una ingesta diaria de proteína (g prot/Kg biomasa/día) de 120 %.	46
Figura 10. Capacidad fagocítica (10 ⁶ Cell/mL) en <i>L. vannamei</i> relacionado al contenido de energía en el alimento (Kcal/g proteína) con diferentes proporcionalidades de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína de acuerdo a una ingesta diaria de proteína (g prot/Kg biomasa/día) de 120 %.	46
Figura 11. Actividad enzimática (U mg de proteína ⁻¹) y daño oxidativo (nmol mg de tejido ⁻¹) en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con diferentes niveles de proporcionalidad de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína a una ingesta diaria de proteína de 120% (A: SOD, B: CAT) (C: Carbonilos proteicos, D: TBARs) (C= nivel de carbohidratos, L= nivel de lípidos).	49
Figura 12. Actividad enzimática (U mg de proteína ⁻¹) y daño oxidativo (nmol mg de tejido ⁻¹) en hepatopáncreas de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con diferentes niveles de proporcionalidad de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína a una ingesta diaria de proteína de 120% (A: SOD, B: CAT) (C: Carbonilos proteicos, D: TBARs) (C= nivel de carbohidratos, L= nivel de lípidos).	50

Lista de tablas

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar la respuesta de <i>Litopenaeus vannamei</i> en agua marina y salinidades bajas.	18
Tabla 2. Ingredientes utilizados para la elaboración de los alimentos utilizados en el bioensayo 1.	18
Tabla 3. Requerimientos mínimos de aminoácidos esenciales para <i>L. vannamei</i>	19
Tabla 4. Requerimientos mínimos de vitaminas para <i>L. vannamei</i>	19
Tabla 5. Requerimientos mínimos de minerales esenciales para <i>L. vannamei</i>	20
Tabla 6. Análisis químico-proximal del alimento control y alimento tratamiento utilizados durante el presente bioensayo 1.	20
Tabla 7. Análisis elemental del agua de pozo con (0.5 ups) y sin (6 ups) tratamiento de ósmosis inversa (mg L^{-1}).	21
Tabla 8. Formulación de alimentos para el bioensayo 4 con diferentes fuentes de fósforo.	22
Tabla 9. Diseño experimental del Bioensayo 3 con las diferentes proporciones carbohidrato:proteína y lípido: proteína de acuerdo a la ingesta diaria de proteína en relación con el peso corporal para los diferentes tratamientos (IDP=Ingesta Diaria de Proteína).	23
Tabla 10. Composición de 20 alimentos formulados con diferentes proporciones carbohidrato:proteína y lípido:proteína. Los ingredientes se muestran en porcentaje de peso seco (%).	25
Tabla 11. Análisis químico proximal de 20 fórmulas alimenticias con variaciones independientes en la proporción carbohidrato:proteína y lípido: proteína.	26
Tabla 12. Valores promedio y máximos observados en la concentración de N-NH_4 , N-NO_2 , N-NO_3 y P-PO_4 en los diferentes tratamientos (DC= dieta control, DE= dieta experimental, Os= agua tratada por ósmosis inversa, Po= agua de pozo).	34
Tabla 13. Diferencias significativas por el efecto de la salinidad, alimento, tipo de agua, tiempo y sus interacciones sobre la concentración de N-NH_4 , N-NO_2 , N-NO_3 y P-PO_4 sobre los diferentes tratamientos.	35
Tabla 14. Efecto de la salinidad, alimento y tiempo, así como sus interacciones sobre el crecimiento de los organismos cultivados a 0.5, 6 y 35 ups.	36
Tabla 15. Supervivencia y factor de conversión alimenticia de <i>L. vannamei</i> cultivados en laboratorio bajo condiciones de alta densidad a 0.5, 6 y 25 ups, alimentados con el alimento control y experimental en tres tipos de agua.	37
Tabla 16. Indicadores de producción del bioensayo con diferentes fuentes de fósforo para los diferentes alimentos.	38
Tabla 17. Ganancia de peso (g), supervivencia (%) y factor de conversión alimenticia de <i>L. vannamei</i> cultivados en laboratorio en condiciones de alta densidad alimentados con base a una ingesta diaria de proteína de 80, 100, 120 y 140 % durante cinco semanas.	42
Tabla 18. Desempeño de <i>L. vannamei</i> cultivado en laboratorio con 20 dietas experimentales que incluyen variaciones carbohidrato:proteína y lípido:proteína, con una ingesta diaria de	

proteína (IDP) del 120% de la fórmula $IDP=43.174 PC^{0.684}$, donde IDP se expresa en g proteína. Kg biomasa⁻¹. Día⁻¹ y PC es el peso corporal en gramos (WG= ganancia de peso, SGR= tasa de crecimiento específica, AWG= crecimiento semanal promedio, S= supervivencia, FCR= factor de conversión alimenticia, PE= eficiencia proteica, NR=retención de nitrógeno, RP=retención de fósforo).....43

Tabla 19. Parámetros de respuesta inmune de juveniles de *L. vannamei* cultivados en laboratorio alimentados con 20 diferentes alimentos formulados con diferentes proporcionalidades carbohidratos:proteína, lípidos:proteína y energía:proteína, con base a una ingesta diaria de proteína (IDP) de 120 % de la fórmula $IDP=43.174 PC^{0.684}$, donde IDP se expresa en g proteína. Kg biomasa⁻¹. Día⁻¹ y PC es el peso corporal en gramos.45

Tabla 20. Actividad antioxidante y daño oxidativo en músculo (M) y hepatopáncreas (DG) de juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas con diferentes niveles de proporcionalidad de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína a una tasa de IDP de 120%.48

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es uno de los sectores de producción de alimentos con mayor crecimiento en los últimos años, con una producción de 82.095 millones de toneladas de animales acuáticos en 2018, donde la acuicultura de crustáceos representó 9.387 millones de toneladas (FAO, 2020). Una de las principales especies de crustáceos cultivados es el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con 52.9% de la producción, y con un incremento de 154 mil toneladas en el año 2000 hasta poco más de 4.966 millones de toneladas en 2018 en producción en granjas (FAO, 2016).

Este aumento en la producción acuícola se ha logrado en gran medida a la intensificación de los cultivos (Wasielensky *et al.*, 2006), lo que ha forzado el desarrollo de patrones de alimentación cada vez más eficientes. Esto permite que los organismos presenten mejor crecimiento y supervivencia en menor tiempo y costo económico (Olvera-Novoa *et al.*, 2012).

En la acuicultura intensiva es inevitable la presencia de factores que dan lugar a distintas condiciones de estrés. Ciertos eventos pueden provocar mortalidades masivas o un estrés subletal que puede comprometer las funciones fisiológicas y de comportamiento normales. En este último caso, los efectos nocivos no siempre son visibles a corto plazo, sino que pueden manifestarse en periodos más largos (Weber, 2009).

El entendimiento de los mecanismos de defensa de los camarones, junto con el desarrollo de estrategias de buen manejo, pueden contribuir a un mejor control de las enfermedades, donde la evaluación continua de parámetros inmunológicos y fisiológicos pueden evitar pérdidas en la producción (Morales-Cristóbal, 2012).

Los invertebrados han desarrollado un sistema inmune para mantener su integridad biológica, el cual se caracteriza por poseer mecanismos de defensa innatos basado en componentes celulares y humorales que cooperan entre sí, lo que está relacionado con la detección y eliminación de agentes patógenos, por la ausencia de inmunoglobulinas y células linfoides (Rowley & Powell, 2007).

Este tipo de sistema inmune reconoce patrones conservados de moléculas que se encuentran en el patógeno y que no están en las células del hospedero, estas moléculas se denominan patrón de moléculas asociadas al patógeno (PMAP). Las células inmunitarias responden a este patrón y desencadenan una respuesta inmune que interfiere con la replicación del invasor (Hedrick, 2004).

La defensa humoral se compone de péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, sistemas de coagulación y melanización; mientras que el componente celular incluye apoptosis y las respuestas mediadas por hemocitos como fagocitosis y procesos de encapsulación (Lavine & Strand, 2002).

El metabolismo intracelular en las mitocondrias y peroxisomas, así como algunos procesos del sistema inmune, conllevan a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), que incluye radicales libres (Rahman *et al.*, 2012). Los radicales libres presentan un electrón no apareado en su órbita molecular. La presencia de uno o más electrones no apareados provoca que dicha molécula sea altamente reactiva (Halliwell & Whiteman, 2004). La presencia de un desbalance entre la producción de EROs y los niveles de antioxidantes provoca un estado de estrés oxidativo (Halliwell, 2006). Se define estrés oxidativo como un disturbio en el balance entre moléculas pro-oxidantes y antioxidantes que genera un daño oxidativo (Sies 1991; Halliwell & Whiteman, 2004).

Las EROs pueden causar daño en las membranas celulares, peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas, atacan a la mayor parte de los componentes celulares y liberan Fe^{2+} de las proteínas sulfuradas que promueven la formación de más EROs (Rahman *et al.*, 2012). Los seres vivos poseen un sistema antioxidante que se encarga de disminuir la concentración de oxidantes, ya sea mediante la transformación de las EROs en productos menos reactivos o mediante la disipación de los radicales libres (Ighodaro & Akinloye, 2018).

2. ANTECEDENTES

La dieta es uno de los factores más importantes para el crecimiento y mantenimiento de los camarones. La dieta ideal deberá estar compuesta por niveles esenciales de nutrientes como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales, cada uno con una contribución específica para el crecimiento (Pandian, 1989). Los niveles de nutrientes no son el único factor a tomar en cuenta en la formulación de alimentos, la calidad de los ingredientes también debe ser considerada, ya que de esta depende la disponibilidad de los nutrientes que contienen.

2.1 Harina de pescado.

El ingrediente más caro económicamente en la elaboración de alimentos acuícolas son las harinas de origen animal, ya que estas contienen valores altos de proteínas, vitaminas y minerales (Olsen & Hasan, 2012). Una vía para la reducción de costos en la acuicultura es el uso de alimentos con baja inclusión de este ingrediente (comúnmente entre 35 y 50 %), el cual alcanzó un valor promedio de 1,450 dólares por tonelada en 2020, y reemplazarlo por proteína vegetal de alta calidad como la harina de soya, con precios que rondan los 380 dólares (Amaya *et al.*, 2006; World Bank, 2020). La harina de pescado es ampliamente utilizada ya que presenta valores de alrededor de 70 % de proteína, con un alto contenido energético comparado con otros productos proteicos, además es altamente palatable y attractant (Fox *et al.*, 2004). Por otro lado, los camarones presentan una alta tasa de digestibilidad aparente sobre esta, además de favorecer el rápido crecimiento y la absorción de nutrientes (Xie *et al.*, 2018; Hodar *et al.*, 2020). La reducción de la harina de pescado no solo mejora el rendimiento económico, también proporciona un desahogo a las pesquerías, ya que se estima que cerca del 12 % de la pesca total (20 millones de toneladas) es utilizada para la producción de harina y aceite de pescado (FAO, 2018). Se ha observado que la harina de pescado puede ser reemplazada en su totalidad por fuentes de proteína vegetal en sistemas semi-intensivos con productividad natural sin costo en crecimiento y supervivencia (Amaya *et al.*, 2006), mientras que en ausencia de esta, puede ser reducida a valores de 12.5 y 10 % (Fox *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2018), con resultados similares en crecimiento comparado con alimentos con niveles de inclusión mayores, aunque requieren de añadir ingredientes en la dieta como aminoácidos libres y una fuerte carga de minerales. La proteína vegetal presenta deficiencias en aminoácidos esenciales

como metionina, lisina y treonina (NRC, 1993), así como una baja disponibilidad de fósforo (Pascual, 2000; Akiyama *et al.*, 1991). Una alternativa eficaz para disminuir la inclusión de harina pescado es el uso de levaduras por su alto valor de proteína cruda, ya que se ha observado que el uso de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* a permite disminuir los niveles de inclusión de harina pescado hasta valores cercanos al 10 % sin costo en el rendimiento (Guo *et al.*, 2019).

2.2 Proteína.

Una buena nutrición es fundamental para la producción saludable de los sistemas acuícolas, ya que esta representa cerca del 50 % del costo de producción, además de que con base en ella se obtiene el rendimiento del sistema (Tacon & Akiyama, 1997; Carig, 2017). Los métodos convencionales de alimentación se dan en términos de cantidad de alimento con respecto al peso del organismo, cuando el porcentaje de proteína en el alimento se considera por separado, lo que conlleva a situaciones en las que el porcentaje de alimentación con base a la talla del organismo pueda no presentar los requerimientos adecuados de proteína. Si se toma en cuenta que la proteína es el mayor nutriente limitante en el crecimiento y costo de los cultivos acuícolas, determinar de manera cuantitativa la cantidad de proteína para mantenimiento o máximo crecimiento es indispensable, esto puede permitir elaborar tablas de alimentación con base a la ingesta de proteína que satisfaga los requerimientos acuícolas de una manera más precisos. El requerimiento proteico es definido como la cantidad máxima o mínima de proteína necesaria por un animal por día (Guillaume, 1997). Kureshy & Davis (2002) determinaron que el requerimiento diario de proteína para mantenimiento de *L. vannamei* se encuentra entre 1.8 y 3.8 g DP kg⁻¹ BW d⁻¹, mientras que para sub-adultos es de 1.5-2.1 g DP kg⁻¹ BW d⁻¹. El requerimiento diario de proteína para el máximo crecimiento de juveniles es de 46.4 g DP kg⁻¹ BW d⁻¹ y 43.4 g DP kg⁻¹ BW d⁻¹ cuando son alimentados con dietas con 32 y 48 % de proteína, respectivamente. Siccardi III (2006) reporta que el requerimiento de proteína digestible aparente para el máximo crecimiento de *L. vannamei* con un peso de 7.69 a 13.08 g alimentados con dietas con 25 y 35% de proteína es de 6.31 y 8 g DP kg⁻¹ BW d⁻¹, respectivamente, mientras que para el mantenimiento del organismo es de 1.03 y 1.87 g DP kg⁻¹ BW d⁻¹ para las mismas dietas.

La inclusión de la cantidad apropiada de proteína en el alimento es indispensable para el desarrollo de un sistema de cultivo, ya que los desechos del camarón y los residuos de alimento pueden llevar al deterioro del fondo, lo que conlleva a situaciones de estrés que pueden comprometer la integridad de los organismos (Limsuwan, 2004). La alimentación con niveles sub-óptimos de proteína promueven la reducción en el número de hemocitos y las funciones inmunológicas del mismo (Pascual *et al.*, 2004). Morales-Cristóbal (2012) encontró un incremento en el número de hemocitos, capacidad fagocítica y capacidad de estallido respiratorio en camarones alimentados 40% de proteína en la dieta con respecto a porcentajes menores. Sin embargo, Yaemsooksawat *et al.* (2008) evaluaron el efecto de la variación del nivel de proteína en el crecimiento y supervivencia de *L. vannamei* alimentados con 35% de proteína, con reducciones en el porcentaje de esta de 26, 32, 28 y 24%. Ellos no encontraron diferencias significativas en el crecimiento y tasa de supervivencia; tampoco reportaron diferencias en el conteo total de hemocitos, producción de anión superóxido y actividad de profenoloxidasa, lo cual sugiere que se pueden disminuir los niveles de proteína de 35 % a 24-32 %.

2.3 Fósforo.

Los camarones son capaces de asimilar minerales directamente del medio ambiente. Sin embargo, las concentraciones ambientales de fósforo son usualmente bajas, por lo que debe ser ingresado al organismo por medio del alimento. El fósforo es un componente de los fosfolípidos, de compuestos de alta energía como el adenosín trifosfato (ATP), del ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), coenzimas e intermediarios metabólicos, y juega un papel importante en la regulación del pH intra y extracelular (Velasco *et al.*, 1997). Se ha determinado que una dieta con 0.6 % de fósforo es adecuado para obtener un buen rendimiento en términos de crecimiento para *L. vannamei* (Civera & Guillaume, 1989). Davis *et al.* (1993) reportan que en ausencia de suplementación de calcio, un nivel de 0.4 % de fósforo es suficiente para el óptimo crecimiento y supervivencia de juveniles. A salinidades bajas, Cheng *et al.* (2005) observaron que el requerimiento de fósforo para un crecimiento óptimo es afectado por la concentración de calcio en la dieta. En ausencia de calcio suplementario, el alimento con 0.77 % de fósforo disponible estimado (FDE) fue suficiente para un crecimiento óptimo, mientras que en presencia

de 1 % de calcio dietario, camarones alimentados con 1.22 FDE presentaron buen crecimiento. En contraste, suplementos de 2 % de calcio en el alimento provocaron disminución en el crecimiento, lo cual sugiere que el calcio puede ser reducido para satisfacer la demanda de fósforo en los organismos con valores menores al 1 % de inclusión. La harina de pescado es una importante fuente de fósforo en los alimentos acuícolas, con valores de entre 1,9 y 4.8 % según el origen de esta (FAO, 2018). Reducir la cantidad de harina pescado en el alimento requiere suplir su aporte de fósforo por otros medios, por lo que la evaluación de diferentes fuentes de fósforo en alimento es esencial. Una fuente fósforo no convencional son los poli-fosfatos (PolyP). Estos son polímeros de pocos a cientos de fosfatos unidos por enlaces fosfoanhídridos de alta energía. Estos polímeros han sido reportados en bacterias, protistas y mamíferos (Moreno & Docampo, 2013). En algunas bacterias, los polyP se acumulan en forma de gránulos de volutina, equivalentes a los acidocalcisomas (Docampo *et al.*, 2005), donde alcanzan hasta el 20% del peso seco de estos microorganismos (McGrath & Quinn, 2000). En células eucariotas, los polyP están presentes en diferentes compartimientos, que incluyen el citosol, núcleo, lisosomas y mitocondrias (Rao *et al.*, 2009). Generalmente se encuentran cargados negativamente, asociados con cationes orgánicos e inorgánicos. En estas combinaciones, los polyP forman canales en las membranas de las bacterias, como parte de los poros de transición que les confieren permeabilidad (Moreno & Docampo, 2013). Dentro de sus funciones en células procariontas, sirven como almacenamiento de fósforo (Ogawa *et al.*, 2000), una fuente de energía que facilita la regeneración de ADP a ATP y la regularización de actividades enzimáticas (Kuroda *et al.*, 2001). En células de mamíferos, se almacenan en los acidocalcisomas y tienen actividad moduladora en los procesos de coagulación (Smith *et al.*, 2006) e inflamación (Müller *et al.*, 2009).

2.4 Lípidos y carbohidratos.

Los camarones requieren lípidos en su dieta para realizar una serie de funciones metabólicas. Además, son una fuente concentrada de alta energía digestible que suministra el doble de energía de la que aportan los carbohidratos o las proteínas, así como de ácidos grasos necesarios para el metabolismo. Los niveles de lípidos recomendados en la dieta de *L. vannamei* son de 6 a 8% (González-Félix *et al.*, 2002). Se ha reportado el decremento en el crecimiento y el

incremento en mortalidad en camarones alimentados con niveles mayores al 10% de lípidos, probablemente debido al desbalance de nutrientes y su relación con la energía y productos tóxicos de la oxidación de éstos (Akiyama *et al.*, 1991). Además, se ha observado que valores mayores a un 10 % de inclusión de lípidos en el alimento afecta la composición lipídica en los tejidos del camarón. Ello resulta en una alta concentración de lípidos en el hepatopáncreas y músculo, aunque no se ha observado un efecto negativo en el crecimiento (González-Félix *et al.*, 2002). Zhang *et al.* (2013) investigaron el efecto del nivel de lípidos en la dieta sobre el crecimiento e inmunidad de *L. vannamei*, con alimentos con 34 % de proteína y 6, 8, 10, 12 y 14 % de lípidos. Ellos reportaron el mayor crecimiento en las dietas con 10 y 12 % de lípidos. La capacidad de estallido respiratorio, el conteo total de hemocitos y la actividad CAT y GPx aumentaron con el incremento de lípidos en la dieta, lo cual sugiere que el nivel adecuado de éstos se encuentra entre el 10 y 12 %.

La proteína en el alimento puede ser reducida si la energía requerida por los camarones proviene de otra fuente, como los carbohidratos. Esto puede disminuir la emisión de nutrientes residuales al ambiente y el costo del alimento. De esta manera, los carbohidratos pueden aportar un contenido importante de energía y pueden ser utilizados por los organismos en la síntesis de la quitina; sin embargo, su capacidad para utilizarlos es limitada, debido a la poca capacidad que tienen para digerir y regular las concentraciones de glucosa en el plasma (Zainuddin *et al.*, 2014). La pobre digestibilidad de los carbohidratos por parte de los camarones está asociada con la disponibilidad de la enzima α -amilasa, mientras que las deficiencias en la regulación de glucosa en plasma son causadas por la deficiencia de la hormona insulina (Shiau, 1997). en términos de crecimiento para *L. vannamei* se obtiene con una dieta con un nivel de 38% de carbohidratos, comparado con niveles menores (Zainuddin *et al.*, 2014).

2.5 Sistema inmune.

El sistema inmune de los invertebrados comprende barreras físicas pasivas y una respuesta activa contra organismos invasores. Las primeras están representadas por el exoesqueleto, el sistema de epitelios y la membrana peritrófica que envuelve el bolo alimenticio manteniéndolo separado del epitelio estomacal (Rowley & Powell, 2007). Los hemocitos son la unidad básica de defensa inmune en los camarones, encargados de los procesos de fagocitación y encapsulación de

agentes extraños, así como de la respuesta humoral, ya que liberan contenido enzimático al ser estimulados (Soderhall, & Cerenius, 1992). Durante los procesos de coagulación, los hemocitos granulados secretan enzimas que actúan sobre los microorganismos antes de ser eliminados por los procesos de fagocitosis o encapsulación. Posteriormente, el proceso de melanización los deja inertes y los prepara para ser expulsados mediante excreción cuticular (Cheng *et al.*, 2005). Se ha observado una relación directa entre los hemocitos y los sustratos energéticos. La disminución de la proteína disminuye la cantidad de hemocitos en la hemolinfa, así como la capacidad de realizar funciones como la fagocitosis (Pascual *et al.*, 2004). Los aminoácidos aportados por la proteína que son indispensables para el camarón suelen ser la metionina, lisina y arginina (Pascual & Kanazawa 1986). La arginina tiene funciones importantes en el sistema inmune, ya que está involucrada en la síntesis del óxido nítrico a través de la óxido-nítró-sintetasa (Jia *et al.*, 2014), además de tener otros efectos positivos sobre la inmunidad mediada por células T en diversos modelos animales. Por otro lado, Xu & Pan (2014) no encontró diferencias significativas en la actividad fagocítica en organismos alimentados con cuatro dietas con porcentajes de proteína de 20, 25, 30 y 35%, lo que sugiere que, a excepción del rendimiento de crecimiento subóptimo de los camarones en el tratamiento de un nivel de proteína en la dieta del 20%, niveles superiores al 20 % son suficientes en términos de fagocitosis. Se ha observado que la cantidad de hemocitos puede verse modificada por la variación de algunos factores físico-químicos en el agua como el oxígeno disuelto y el pH (Ching, 2019), por lo que es indispensable otorgar a los organismos los elementos necesarios para que estos se encuentren en la mejor condición posible, donde los métodos más prácticos son utilizar alimento de buena calidad y el uso de inmunoestimulantes.

2.6 Especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo.

Durante la fagocitosis, el contacto con el agente patógeno activa la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH) del hospedero, la cual incrementa el consumo de oxígeno y produce diferentes EROs como el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), los cuales tienen una acción importante como microbicidas (Ighodaro & Akinloye, 2018).

Las EROs pueden interactuar con diferentes macromoléculas como lípidos, ADN y proteínas, lo que puede causar alteraciones estructurales y funcionales e inducir daño celular. Los ácidos grasos poli-insaturados contienen múltiples enlaces dobles de carbono que son propensos a la oxidación. La peroxidación de lípidos es iniciada por las EROs y propagada a través de una reacción de cadena autocatalítica (Kyoungcho, 2007), lo que puede alterar la fluidez y causar la ruptura de las membranas celulares (Rahman *et al.*, 2012). Las EROs inducen daño al ADN por interacciones químicas directas y por interferencia indirecta con enzimas que pueden reparar el daño de éste. Las EROs pueden reaccionar con los aminoácidos con modificaciones de las proteínas y producción de carbonilos, lo cual puede resultar en pérdida de su funcionalidad (Kyoungcho, 2007).

No sólo los procesos de acción contra agentes patógenos producen EROs; algunos procesos metabólicos básicos e inherentes al organismo también lo hacen en pequeñas cantidades. Se considera la fuente más importante de éstas la respiración celular, específicamente el transporte de electrones en la membrana mitocondrial, donde las EROs se generan como producto secundario del metabolismo energético oxidativo, por lo tanto, la producción de agentes antioxidantes para mantener el equilibrio de óxido-reducción es esencial para mantener un estado óptimo fisiológico de los organismos (Dorado-Martínez *et al.*, 2003).

Le Moullac y Haffner (2000) reportaron que los cambios en los factores ambientales reducen la capacidad inmune de los crustáceos. Jia *et al.* (2014) encontraron que eventos de hipotermia (22-16°C) y de hipertermia (22-28°C) disminuyen significativamente el número de hemocitos en la hemolinfa, la actividad de profenoloxidasa, y la actividad de la SOD, mientras que, en condiciones de hipoxia, Magallón-Servín (2004) reporta decrementos en la actividad de profenoloxidasa en *L. vananmei*.

2.7 Sistema antioxidante.

Los antioxidantes impiden que otras moléculas reaccionen con radicales libres, ya que pueden interactuar más rápido con éstos que con el resto de las moléculas presentes (Venéreo-Gutiérrez, 2002). La acción de los antioxidantes permite disminuir la concentración de oxidantes, retrasar o inhibir la oxidación, y transformar las EROs en productos menos reactivos

(Navarro-Meza & Orosco-Ceballos, 2015). Existen antioxidantes endógenos, como el ácido úrico, la ubiquinona y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST), así como antioxidantes exógenos, obtenidos generalmente a partir de la dieta, como las vitaminas C y E y β -carotenos entre otros (El-Missiry, 2012). Los sistemas antioxidantes trabajan en forma coordinada en una serie de pasos metabólicos (Dorado-Martínez *et al.*, 2003).

La SOD es la enzima antioxidante que cataliza la dismutación del súper óxido a una especie menos reactiva como lo es el H_2O ; a su vez, hay tres formas conocidas que actúan a nivel mitocondrial, citoplasmático y extracelular para la eliminación de H_2O_2 . La CAT a nivel citoplasmático es la enzima responsable de la degradación de H_2O_2 a agua y una molécula de oxígeno. La GPx a nivel mitocondrial contribuye a proteger las células del daño causado por radicales libres como los peróxidos lipídicos y de hidrógeno (El-Missiry, 2012).

Se ha reportado tolerancia de *L. vannamei* a salinidades que varían de 0.5 a 50 ups (Saoud *et al.*, 2003); sin embargo, en los cultivos a salinidades menores a 5 ups se han reportado efectos negativos como disminución en el crecimiento y la supervivencia (Li *et al.*, 2007), así como menor capacidad inmunológica (Ponce-Palafox *et al.*, 1997). En los sistemas de cultivo a salinidad baja puede aumentar la difusión de iones de la hemolinfa a los tejidos o al ambiente, y el agua puede ser absorbida del ambiente, lo cual produce edema celular (Davis *et al.*, 2002). La adaptación a salinidades bajas incluye procesos de osmorregulación a través del cambio de varias enzimas y transportadores que tienen un alto costo energético (Tseng & Hwang, 2008). La presencia de agentes patógenos disminuye la capacidad enzimática del sistema antioxidante; Mohankumar & Ramasamy (2006) reportan una disminución gradual de todas las enzimas involucradas en la regulación de las EROs en organismos infectados con el virus de la mancha blanca.

2.8 Sustratos energéticos frente a un agente patógeno.

La glucosa es el principal carbohidrato circundante en la hemolinfa, la cual es un importante sustrato energético para la producción de ATP. En las primeras etapas de la mayoría de las infecciones virales, durante el proceso de replicación del genoma del virus, los productos virales

modificarán las actividades de la célula, impulsando procesos como la glucólisis y el metabolismo de ácidos grasos para favorecer la producción de patógenos (Chen *et al.*, 2011). Yoganandhan *et al.* (2003) reportan aumentos en los niveles de glucosa en el plasma de camarones infectados por el WSSV en etapas tempranas, con decrementos considerables en etapas posteriores. Mathew *et al.* (2007) reportan reducciones de glucosa en el plasma de hasta 33% a las 24 horas post-infección. Estas variaciones coinciden con el tiempo de máxima replicación del virus, por lo que pueden ser el reflejo de la activación de la gluconogénesis como respuesta al aumento de energía necesario para hacer frente al patógeno. Al completarse la maduración del patógeno, el daño metabólico a la célula puede provocar la muerte celular y la liberación de los nuevos viriones. Este tipo de cambios metabólicos son característicos del efecto Warburg, el cual se define como una repuesta glucolítica anormal asociada con células cancerosas y es mediado en parte por el canal de aniones voltaje-dependientes (VDAC) (Chen *et al.*, 2011). Se ha observado que al silenciar el VDAC en camarones infectados por virus de la mancha blanca el proceso de infección se retrasa, es probable que el virus lo utilice para regular las funciones mitocondriales del huésped durante la patogénesis (Chen *et al.*, 2011).

Algunos virus son capaces de interferir con la homeostasis metabólica del colesterol por medio de la regulación de su biosíntesis, donde contribuyen a la modificación de la permeabilidad de las membranas celulares. Galván-Álvarez *et al.* (2012) observaron que el virus de necrosis hipodermal y hematopoyética infecciosa (IHNV) es capaz de modificar el metabolismo de lípidos e induce cambios en la composición de las membranas celulares lo que favorece el microambiente para su replicación. Se ha descrito un decremento constante en la concentración de triacilglicéridos en camarones infectados por WSSV, y se ha sugerido que esta reducción es causada por el uso de los triacilglicéridos para la producción de energía y síntesis de macromoléculas usadas por el virus (Chen *et al.*, 2011).

Se sabe que algunos virus tienen la capacidad de generar alteraciones en el metabolismo energético, incluso el flujo normal en el ciclo de Krebs es alterado por el virus (Vastag *et al.*, 2011, Galván-Álvarez *et al.*, 2012). Este efecto provoca que la glucosa sea utilizada para la producción de ácido láctico aún en condiciones de abundante oxígeno, lo que restringe la obtención de energía a rutas anaeróbicas (Sánchez & Lagunoff, 2015).

El principal mecanismo de defensa contra patógenos virales es la fagocitosis. En macrófagos, la energía para realizar el estallido respiratorio es obtenida parcialmente de la creatinina fosfato, producto del metabolismo oxidativo (Sbarra & Strauss, 1988). Por lo que la presencia de un agente patógeno repercutirá directamente en el almacén de energía de los organismos.

2.9 Desecho de nutrientes.

Los nutrientes que entran al sistema se distribuyen en el agua, sedimentos y en la biomasa del cultivo (Lin *et al.*, 1997). Se ha determinado que menos del 20 % de nitrógeno y 10 % de fósforo son asimilados por los camarones (Edwards 1993). Por esta razón, es indispensable determinar la cantidad de nutrientes que son añadidos al sistema, lo que favorece el cultivo en términos económicos y disminuyen la contaminación (Bharat *et al.*, 2012). Xia *et al.* (2004) determinaron que el alimento es la mayor fuente de nitrógeno y fósforo en los sistemas de cultivos, los que en altas concentraciones pueden producir eutrofización. Se ha determinado que modificar las cantidades de nutrientes tienen un efecto en la retención de estos por parte de los organismos, así como una disminución de estos en el agua, donde se encuentran valores de retención por parte de los organismos de hasta 20 % (Bharat & Subhendu, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura moderna debe dirigirse a encontrar procesos de producción cada vez más eficientes y sustentables. Si se tiene en cuenta que el alimento es uno de los mayores costos de producción y a su vez uno de los más contaminantes, la utilización de estrategias como la reducción de ingredientes caros y de variable disponibilidad como la harina de pescado debe ser prioritario. El uso de este tipo de estrategias no puede ser arbitrario, ya que esta es una fuente de nutrientes indispensable para el organismo en términos de crecimiento y supervivencia, y debe ser reemplazada por ingredientes de alta calidad que permitan mantener un nivel de rendimiento adecuado en el sistema, debido a que los cultivos se encuentran en condiciones continuas de estrés por densidad, manipulación y variación de parámetros físico-químicos. Estas situaciones de estrés pueden favorecer una disminución en el rendimiento del sistema inmune y antioxidante de los organismos, lo cual se torna particularmente importante en sistemas de agua clara, donde la única vía para otorgar las herramientas energéticas necesarias para hacer frente a estas necesidades es el alimento formulado. Si bien se sabe que altas dosis de proteína favorecen el rendimiento del sistema, el uso excesivo de esta propicia contaminación residual que favorece la proliferación de eventos negativos, así como un incremento en los costos de producción. Utilizar la cantidad de proteína adecuada es indispensable para obtener el máximo rendimiento al menor costo económico y con el menor impacto en el sistema. Para ello, es necesario conocer la proporción de los sustratos energéticos que maximicen la eficiencia de la proteína, lo que reduciría el costo general y puede favorecer el estado inmune de los organismos, no solo en términos de nutrientes, si no de algunos ingredientes cuya reducción favorezca la sustentabilidad de la alimentación. Por ello, en primera instancia, en el presente trabajo se determinó la tasa de ingesta diaria de proteína (IDP) que permita un máximo rendimiento al menor costo. Una vez con la IDP definida, se determinó la fuente de fósforo más adecuada que favorezca la disminución de la harina de pescado, así como la evaluación de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína en la dieta sobre la capacidad de respuesta inmune y antioxidante en *L. vannamei* bajo condiciones de estrés por densidad de cultivo.

4. HIPÓTESIS

Si los sustratos energéticos determinan la capacidad de respuesta inmune y antioxidante de *L. vannamei*, las variaciones de los sustratos metabólicos a través de la ingesta diaria de proteína, proporciones carbohidrato:proteína y lípido:proteína en fórmulas alimenticias con niveles bajos de inclusión de harina de pescado que cubren los requerimientos de aminoácidos, minerales y proteínas, producirán cambios favorables en la eficacia de la respuesta inmune y antioxidante de éste.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Conocer el efecto de la variación de los sustratos energéticos en fórmulas alimenticias con niveles bajos de inclusión de harina de pescado que cubren los requerimientos de aminoácidos, minerales y proteínas, a través de la ingesta diaria de proteína, relaciones carbohidrato:proteína y lípido:proteína sobre la capacidad de respuesta inmune y antioxidante de *L. vannamei* en sistemas de agua clara.

5.2 Objetivos particulares.

1. Evaluar la eficacia de un alimento formulado para *L. vannamei* con base en un nivel bajo de proteína total, inclusión de harina de pescado y satisfacción de requerimientos de aminoácidos, vitaminas y minerales, en condiciones de agua clara con diferentes salinidades y bajo recambio de agua.
2. Seleccionar experimentalmente una fuente química de fósforo para su inclusión en las fórmulas alimenticias que permitan evaluar sustratos energéticos.
3. Determinar las formulaciones matemáticas de ingesta diaria de proteína (IDP) para *L. vannamei* y la variación del rendimiento con base a diferentes niveles de aplicación de la ecuación de IDP en condiciones de densidad híper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.
4. Evaluar el efecto de la variación en proporciones de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de *L. vannamei* sobre el desempeño zootécnico en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.
5. Evaluar el efecto de la variación de diferentes proporciones de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de *L. vannamei* sobre la capacidad de respuesta inmune y antioxidante de *L. vannamei* en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.

6. MATERIAL Y METODOS

Se realizaron cuatro bioensayos seriados para determinar las formulaciones alimenticias para *L. vannamei* con contenido bajo de harina de pescado, satisfacción de requerimientos de aminoácidos, vitaminas, minerales, fuente química de fósforo, ingesta diaria de proteína, variación de los diferentes sustratos energéticos (carbohidrato:proteína y lípido:proteína) y la relación de éstos con la respuesta inmune y antioxidante.

6.1 Bioensayo 1: Evaluación de la eficacia de un alimento formulado para *L. vannamei* con base en un nivel bajo de proteína total, inclusión de harina de pescado y satisfacción de requerimientos de aminoácidos, vitaminas y minerales, en condiciones de agua clara con diferentes salinidades y recambio de agua bajo.

Los organismos para los bioensayos fueron donados por la empresa acuícola Acuicultura Mahr (La Paz, Baja California Sur, México) con un peso aproximado de 1 g. Se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio por un periodo de al menos siete días antes de cada bioensayo ($27\pm 5^{\circ}\text{C}$, O.D. $5\pm 1\text{ mg L}^{-1}$, pH 7 ± 0.05 , 35 ± 1 ups, recambio diario de 90%, alimentación *at libitum*, fotoperiodo 12:12: horas luz:oscuridad). El bioensayo se realizó en unidades experimentales de 50 L de capacidad, donde previamente se aclimataron a las condiciones mencionadas.

En primera instancia, se evaluó el efecto en el rendimiento del alimento formulado y se comparó con una fórmula comercial elaborada con los mismos ingredientes y métodos que la experimental, la cual se utilizó como alimento control (Tabla 2). El alimento experimental fue formulado con requerimientos especiales (inclusión del 6% de harina de pescado, 26% de proteína total, adicionado con fósforo inorgánico, 4% de levaduras, fitoquímicos y astaxantina), y con base a los requerimientos de aminoácidos, vitaminas y minerales de acuerdo a la bibliografía más reciente (Tabla 3, 4 y 5) contra una fórmula comercial (20% harina de pescado, 40% proteína). Ambos alimentos fueron elaborados con los mismos ingredientes en la planta de alimentos del CIBNOR, con excepción de aminoácidos, vitaminas y minerales, los cuales fueron integrados como premezclas comerciales en el alimento control y como mezcla de ingredientes puros en el alimento experimental.

Se realizó el análisis químico proximal de los alimentos control y experimental (Tabla 6) de la siguiente manera: Las muestras secas fueron molidas a partículas finas, por medio de un molino de café. La composición química proximal de las muestras fue determinada por triplicado de conformidad con los procedimientos determinados por la AOAC International (Horwitz & Latimer, 2005) y el sistema de calidad del laboratorio de análisis químico proximal de CIBNOR. La humedad fue determinada por el método de pérdida de peso (100°C/24 hrs). El contenido de proteína cruda fue determinado por el método de combustión directa de Dumas (Ebeling, 1968), mediante el uso de analizador de nitrógeno LECO® FP-528 (LECO Instrument Corporation, St. Joseph, MI, USA). El contenido crudo de lípidos para la determinación de grasas se realizó mediante el empleo del método micro Foss Soxtec® Avanti (Foss, Hoganas, Sweden), con éter de petróleo como solvente extractor. La fibra cruda fue determinada por el método de hidrólisis sucesiva ácido/base. El contenido de cenizas fue determinado gravimétricamente por combustión en un horno Thermolyne® 6000 (Barnstead Thermolyne, Dubuque, Iowa, USA) a 600°C/5 hrs. La energía libre fue calculada mediante un calorímetro adiabático automatizado (Parr Instruments, modelo 1261, Moline, IL, USA). En la tabla 6 se muestra la composición proximal de los alimentos control y experimental, con relaciones carbohidrato:proteína de 1.071(g/g) y lípido:proteína de 200 (mg/g) para el alimento control tipo comercial y relaciones carbohidrato:proteína de 2.072 (g/g) y lípido:proteína de 344.8 (mg/g) para el alimento experimental.

El bioensayo tuvo una duración de 45 días y se llevó a cabo en sistemas híper-intensivos (12 organismos en acuarios de 50 L, equivalente a 240 organismos por m³) con cuatro alimentaciones diarias (9:00, 12:00, 15:00 y 18:00 h) en sistemas de agua clara con baja tasa de recambio de agua. Al estar vinculado al proyecto JICA con fines de uso acuapónico, el alimento se probó en agua marina y agua a baja salinidad (Tabla 1), para determinar el efecto de la salinidad, tipo de agua y alimento en el rendimiento de los organismos. Se utilizaron tres tipos de agua, agua proveniente de un pozo de agua dulce con filtraciones de agua marina (6 ups) de las zonas aledañas al CIBNOR, agua tratada por osmosis inversa (0.5 ups) y agua marina (35 ups). El agua marina se diluyó con agua tratada por osmosis inversa y sin tratar (agua de pozo) hasta alcanzar una salinidad de 6 ups.

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar la respuesta de *Litopenaeus vannamei* en agua marina y salinidades bajas.

Tratamiento	Factor 1: Salinidad	Factor 2: Agua	Factor 3: Alimento
1	0.5	Con ósmosis	Control
2	0.5	Con ósmosis	Experimental
3	6	Sin ósmosis	Control
4	6	Sin ósmosis	Experimental
5	6	Con ósmosis	Control
6	6	Con ósmosis	Experimental
7	35	Marina	Control
8	35	Marina	Experimental

Tabla 2. Ingredientes utilizados para la elaboración de los alimentos utilizados en el bioensayo 1.

Ingrediente	Control (%)	Experimental (%)
Harina de pescado	20	6
Harina de soya	37.2	24.1
Harina de trigo	35	4.5
Aceite de pescado	4	2.6
Lecitina de soya	3	5
Ácido algínico	0.75	2
Mezcla de vitaminas ¹	0.08	0.27
Mezcla de minerales ²	0.05	8.5
Levadura ³	0	4
Probiótico ⁴	0	1.2
Ácidos orgánicos ⁵	0	1
Astaxantina	0	0.5
Mezcla de aminoácidos ⁶	0	0.4

1.-Colina, hidroxitolueno butilado, colesterol, vitamina A, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12, B20, D, E y K. 2.-CaCO₃, KH₂PO₄, MgSO₄, H₂O, ZnSO₄+7H₂O, MnSO₄4H₂O, FeSO₄, CuSO₄7H₂O, NaSeO₃ KI, Na₂MoO₄. 3.- *Saccharomyces cerevisiae*. 4.- *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*. 5.- Ácidos propiónico, butílico, acético, nicótico. 6.- arginina, metionina, triptófano, trionina.

Tabla 3. Requerimientos mínimos de aminoácidos esenciales para *L. vannamei*.

Aminoácido	Peso total (%)	Referencias
Arginina	1.89-2.21	Feng <i>et al.</i> 2013; Qi-Cun et al 2012
Metionina	0.40	Fox <i>et al.</i> 2011
Lisina	2.11-2.51	Feng <i>et al.</i> 2013
Triptófano	0.60	Yu-Ping <i>et al.</i> 2015
Treonina	1.51	Qi-Cun <i>et al.</i> 2013

Tabla 4. Requerimientos mínimos de vitaminas para *L. vannamei*.

Vitamina	Peso total (mg)	Referencias
Colina	1000	Pv: 1000 mg/Kg (He, 1993)
Alfa-tocoferol (E)	99	Pv: 99 mg/kg (He & Lawrence, 1993)
Retinol (A)	1.625	Pv: 2600 IU/kg Pv: 1.625 mg/Kg (He, 1993)
Ácido ascórbico (c)	190	(Niu et al. 2009) Pv: 130 mg/Kg (Lavens et al. 1999)
Biotina (B7)	2.4	Pm: 2.0-2.4 mg/kg. (Shiau & Chin, 1998)
Inositol (B8)	3400	Pm: 3400 mg/kg (Shiau & Su, 2004)
Ácido fólico (B9)	20	Pv: 20 mg/kg (He, 1993)
Carnitina (B20)	500	Pi: 500 ppm (mg/Kg) (Jayaprakas & Sambhu, 1996)
Colecalciferol (D)	0.2	Pm: 0.2 mg/kg diet (Shiau & Hwang, 1994)
Menadiona (K)	40	Pm: 30-40 mg/kg (Shiau & Liu, 1994)
Tiamina (B1)	25	Pv: 25 mg/Kg (He, 1993)
Riboflavina (B2)	38	Pv: 38 mg/Kg (He, 1993)
Niacina (B3)	25	Pm 7.18 mg/kg (Shiau & Suen, 1994) Pi: 18.25 mg/kg (Reddy et al. 2001) Pm 6.4 mg/kg
Ácido pantoténico (B5)	120	Pm: 101-139 mg/kg (Shiau & Hsu, 1999) Pi: 69.5 mg/kg (Reddy et al. 2001)
Pyridoxina (B6)	120	Pv: 106.95-151.92 mg/kg (Li et al. 2010)
Cobalamina (B12)	0.2	Pm: 0.2 mg/kg (Shiau & lung, 1993)

Tabla 5. Requerimientos mínimos de minerales esenciales para *L. vannamei*.

Mineral	Peso total	Referencia
Fósforo	10.0 - 20.0 g P.Kg-1	Kanazawa <i>et al.</i> , 1984, Davis & Arnold, 1993
Calcio	10.0 - 20.0 g Ca.Kg-1	Kanazawa, 1984, Davis & Arnold, 1993
Potasio	11.0 - 18.0 g K.Kg-1	Shiau & Hsieh, 2001 (1.2%), Kanazawa, 1984 (0.1-0.5%), Sheng & He, 2005
Magnesio	2.6 - 3.46 g Mg.Kg-1	(2.60–3.46 g Mg kg ⁻¹)
Sulfato de Zinc	33 - 200 mg Zn.Kg-1	Davis <i>et al.</i> 2001
Sulfato de manganeso	2.1 mg Mn.Kg-1	Ahamad, 2000
Sulfato ferroso	12 mg Fe.Kg-1	Kanazawa, 1984
Sulfato de cobre	34 - 53 mg Cu.Kg-1	Davis <i>et al.</i> 2001
Selenio de sodio	0.2 - 0.4 mg Se.Kg-1	Davis, 1990
Yodo	30 mg I.Kg-1	Liu <i>et al.</i> 1995

Tabla 6. Análisis químico-proximal del alimento control y alimento tratamiento utilizados durante el presente bioensayo 1.

Alimento	Unidades	Control	Experimental
Proteína	(%)	40.4±0.2	26.1±0.1
Lípidos	(%)	8.1±0.1	9.0±0.05
Carbohidratos	(%)	43.3	54.1
Humedad	(%)	6.4±0.1	4.7±0.1
Nitrógeno	(%)	6.5±0.02	4.2±0.02
Fibra Cruda	(%)	1.0±0.1	0.6±0.1
Cenizas	(%)	7.2±0.04	10.2±0.02
Energía	(cal/g)	4809.6±3.1	4391.4±1.4
CBH/Proteína	(g/g)	1.071	2.072
Lípidos/Proteína	(mg/g)	200	344.8
Lípidos/CBH	(mg/g)	187.1	166.4

La aclimatación de los organismos a baja salinidad se llevó a cabo por medio de una reducción gradual de salinidad. Los organismos fueron separados en lotes de 400 individuos en contenedores de 500 L con agua marina. A cada lote se le disminuyó la salinidad de manera gradual con agua de pozo o agua tratada con ósmosis inversa a una tasa de 1 ups por hora durante 8 horas diarias. De manera general, el agua tratada por ósmosis inversa contiene una menor concentración de elementos que el agua de pozo (Tabla 7). Al llegar a 6 ups en cada lote,

los organismos fueron transferidos a las unidades experimentales (12 organismos por acuario), con una distribución de los tratamientos de manera aleatoria. Después de una semana de aclimatación, se suministraron los diferentes alimentos y se reguló la temperatura a $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Tabla 7. Análisis elemental del agua de pozo con (0.5 ups) y sin (6 ups) tratamiento de ósmosis inversa (mg L^{-1}).

Elemento	Sin osmosis (mg L^{-1})	Con osmosis (mg L^{-1})
Ag	--	--
Al	3	0.54
As	--	--
B	1.15	0.41
Ba	0.23	< 0.04
Ca	207	0.99
Cd	< 0.1	< 0.1
Co	< 0.2	--
Cr	< 0.2	--
Cu	--	< 0.2
Fe	< 0.2	< 0.2
K	26	2.04
Li	0.16	< 0.5
Mg	97.7	0.9
Mn	< 0.05	< 0.05
Mo	< 0.2	--
Na	1 311	56.7
Ni	< 0.3	< 0.3
Pb	0.13	--
Sr	6.02	0.61
Zn	< 0.2	< 0.2

Análisis realizados por el método de análisis elemental del Laboratorio de análisis elemental del CIBNOR.

Se evaluaron los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad y fotoperiodo de 12:12 luz: oscuridad) de manera diaria. Se realizaron biometrías semanales para ajustar la tasa de alimentación y se recambios semanales de agua del 90%.

6.2 Bioensayo 2: Selección experimental de una fuente química de fósforo apropiada para su inclusión en las fórmulas alimenticias que permitan evaluar sustratos energéticos.

Mediante el desarrollo del bioensayo 2 se determinó cual es la fuente de fósforo más eficiente para incorporar a los alimentos que favorece el rendimiento de los organismos a un porcentaje de inclusión de 1% P-PO₄. 12 organismos Juveniles de *L vannamei* (1± 0.5 g) fueron distribuidos aleatoriamente en 15 acuarios de 50 L, alimentados por 45 días con alimentos con diferentes fuentes fósforo en cinco razones diarias con base a la IDP. Para esto, se elaboraron cinco alimentos en la planta de formulación de alimentos del CIBNOR. Los alimentos fueron formulados con base a los resultados del bioensayo 1, con una inclusión de harina de pescado del 6.5% y proteína total de 25%, con una proporcionalidad lípido:proteína de 300 mg/g. Las fuentes de fósforo utilizadas fueron fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄), tripolifosfato de sodio (Na₅P₃O₁₀) y fosfato monoamónico (NH₄H₂PO₄) añadido directo a la mezcla y fosfato monoamónico incubado previamente con levadura (*S. cerevisiae*) en harina de soya para estimular la producción microbiológica de polifosfatos (Tabla 8).

Tabla 8. Formulación de alimentos para el bioensayo 4 con diferentes fuentes de fósforo.

Ingrediente	KH ₂ PO ₄ (%)	NaH ₂ PO ₄ (%)	Na ₅ P ₃ O ₁₀ (%)	NH ₄ H ₂ PO ₄ * (%)	NH ₄ H ₂ PO ₄ ** (%)
Harina de Pescado	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Pasta de soya	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5
Trigo	47.3	47.3	47.3	47.3	47.3
Aceite de Pescado	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
Lecitina	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
Levadura	4	4	4	4	4
Triptófano	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Ácido algínico	2	2	2	2	2
Metionina	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Arginina	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Fuente de fósforo	3.7	3.2	3.3	3.1	3.1
Ác. orgánicos	1	1	1		1
Ac pescado +					
Pigmentos	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Premezcla vitaminas	0.269	0.269	0.269	0.269	0.269
Premezcla minerales	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2

*Fosfato monoamónico sin fermentar, ** fosfato monoamónico fermentado con levadura

6.3 Bioensayo 3: 3. Determinación de las formulaciones matemáticas de ingesta diaria de proteína (IDP) para *L. vannamei* y la variación del rendimiento con base a diferentes niveles de aplicación de la ecuación de IDP en condiciones de densidad hiper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.

Con este bioensayo se determinó la fórmula matemática que relaciona la IDP (g proteína. Kg biomasa⁻¹. Día⁻¹) con el peso corporal individual de los organismos (g), que favorece el rendimiento del sistema en términos de proteína con la menor cantidad posible sin comprometer el crecimiento y supervivencia. Para determinar la IDP, se analizaron los datos de ingesta diaria de proteína (g de proteína.kg biomasa⁻¹.día⁻¹) relacionados con el peso corporal individual (g) a partir de datos de diferentes fuentes (Clifford, 1992; Kureshy & Davis, 2002; datos de empresas acuícolas como “SFR Feed Company” y datos de la industria acuícola mexicana, colombiana y de Ecuador) para determinar el mejor ajuste matemático en ambas variables. El mejor ajuste fue evaluado experimentalmente a cuatro niveles, 80, 100, 120 y 140 %. Para esto, un lote de post-larvas de 1±0.2 g fue repartido en grupos de 12 individuos en acuarios de 60 L, con cuatro tratamientos por triplicado, bajo un régimen alimenticio de IDP de 80, 100, 120 y 140 % con base a la ecuación obtenida que relaciona la IDP (g alimento.kg biomasa⁻¹.día⁻¹) con el peso promedio ($IDP = 43.174 BW^{-0.684}$, donde IDP es la ingesta diaria de proteína y BW el peso de los organismos en gramos). Se realizaron biometrías semanales para determinar el crecimiento y supervivencia de los organismos, así como recambios de agua del 90 % en cada acuario. Al final del experimento, se evaluaron los parámetros zootécnicos para identificar el mejor tratamiento en términos de crecimiento, supervivencia y FCA.

Tabla 9. Diseño experimental del Bioensayo 3 con las diferentes proporciones carbohidrato:proteína y lípido: proteína de acuerdo a la ingesta diaria de proteína en relación con el peso corporal para los diferentes tratamientos (IDP=Ingesta Diaria de Proteína).

	CBH/Prot (mg/g)	2.1	1.5	1.1	0.8	0.6
	% Proteína	24	29	35	38	42
	0.2	IDP	IDP	IDP	IDP	IDP
Lípidos/Prot	0.23	IDP	IDP	IDP	IDP	IDP
(mg/g)	0.3	IDP	IDP	IDP	IDP	IDP
	0.36	IDP	IDP	IDP	IDP	IDP

6.4 Bioensayo 4: Evaluación del efecto de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de *L. vannamei* sobre el desempeño zootécnico en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.

Mediante el bioensayo 4 se evaluaron los parámetros zootécnicos y la capacidad de respuesta inmune y antioxidante por el efecto de la variación carbohidrato:proteína y lípido:proteína mediante un mismo porcentaje de IDP. Para ello se elaboraron 20 alimentos formulados en el laboratorio de nutrición del CIBNOR, manufacturados en la planta de alimentos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, unidad Pichilingue. Estos alimentos se diseñaron con cinco niveles de proporcionalidad carbohidrato:proteína (2.1, 1.5, 1.1, 0.8 y 0.6 mg/g) y cuatro niveles lípido:proteína (200, 230, 300 y 360 mg lípido/g proteína⁻¹), (Tabla 9). De acuerdo al bioensayo 3, los organismos fueron alimentados con base a una IDP de 80% durante la primera semana, y del 120 % a partir de la segunda semana hasta finalizar el experimento.

El bioensayo duró 45 días, y se llevó a cabo en sistemas híper-intensivos con 12 organismos en acuarios de 50 L por triplicado. Se evaluaron los parámetros zootécnicos por biometrías semanales y se evaluó la capacidad de respuesta inmune por medio del conteo total de hemocitos, capacidad e índice fagocítico de los hemocitos, el daño oxidativo por medio de la cuantificación de TBARs y carbonilos proteicos y la actividad enzimática de la SOD y CAT en músculo, y hepatopáncreas (4 organismos para actividad inmune y 3 para actividad antioxidante).

Los alimentos para este bioensayo fueron formulados con el programa Nutrion[®] en el laboratorio de nutrición del CIBNOR. Las fuentes de proteína fueron harina de pescado (inclusión 6 % en todos los casos), pasta y concentrado proteico de soya. Los lípidos se obtuvieron por la adición de aceite de pescado y lecitina de soya, mientras que los carbohidratos se compensaron en su mayoría, mediante la harina de trigo (Tabla 10). Todos los alimentos fueron formulados de acuerdo al requerimiento mínimo de aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales requeridos a baja salinidad.

Tabla 10. Composición de 20 alimentos formulados con diferentes proporciones carbohidrato:proteína y lípido:proteína. Los ingredientes se muestran en porcentaje de peso seco (%).

Dieta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
CBH:P	2.1	2.1	2.1	2.1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.1	1.1	1.1	1.1	0.8	0.8	0.8	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6
Lip:P	0.2	0.23	0.3	0.36	0.2	0.23	0.3	0.36	0.2	0.23	0.3	0.36	0.2	0.23	0.3	0.36	0.2	0.23	0.3	0.36
Trigo	51.4	49.6	47.8	46	37.4	33.9	33.8	32	23.6	23	21.2	19.1	16.6	13.7	10.8	7.9	8.4	6.8	1.9	0
CPS¹	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	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	37	37	37.5	36.8	37	37.5	37.9	20.4	21.2	22	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	3.3	4.6	1	2.6	4.1	5.6	1.5	3.2	5	6.8	1.8	3.9	5.9	8	2.2	4.5	6.9	9.2
Levadura²	4	4	4	4	4	4	4	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Vitaminas³	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
Minerales⁴	6.3	6.3	6.3	6.4	6.1	6.1	6	6	5.8	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.7	5.8	5.8	5.8
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	5	5	5
Mezcla de aminoácidos⁵	0.4	0.4	0.4	0.4	0.14	0.13	0.14	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3
Ácido algínico	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mezcla de probióticos⁶	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Celulosa	0.8	0.8	0.8	0.7	0.16	1.07	0	0	1.6	0.2	0	0	1.6	1.6	1.7	1.7	1	0	0.9	0.2
	100	100	100	100	100	100	100	101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

1.- Concentrado proteico de soya, 2.- Levadura *S. cerevisiae*, 3.- Colina, DL-alfa-tocoferol, retinol, hidroxitolueno butilado, astaxantina, ácido ascórbico, biotina, inositol, ácido fólico, colecalciferol, menadiona, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, cobalamina, carnitina. 4.- NaH₂PO₄, CaCO₃, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·7H₂O, CoCl₂, Na₂SeO₃, KI. 5.- Metionina, arginina, triptófano. 6.- Ácidos Fórmico, propiónico, acético y cítrico.

Tabla 11. Análisis químico proximal de 20 fórmulas alimenticias con variaciones independientes en la proporción carbohidrato:proteína y lípido: proteína.

Dieta	CBH:P (g/g)	LIP:P (g/g)	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Lípidos crudos (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energy (cal/g)
1	2.1	0.2	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	0.3	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	0.2	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	0.3	10.1±0.03	32.1±0.1	10.0±0.03	0.4±0.0	10.54±0.03	47	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	0.2	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	0.3	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	0.2	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	0.3	11.9±0.1	41.9±0.1	13.1±0.1	0.9±0.1	10.1±0.2	34	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	0.2	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	0.3	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

El análisis químico proximal se realizó en el laboratorio de análisis químico proximal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. de conformidad con los métodos descritos en el bioensayo #1 y se puede apreciar en la tabla 11.

6.4.1 Calidad del sistema.

Se llevaron a cabo revisiones diarias del sistema en todos los bioensayos con el fin de mantener los parámetros físico-químicos estables a lo largo de los experimentos (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH), así como recambios de agua del 90% para mantener bajos los niveles de amonio, nitritos y nitratos. Se tomaron muestras semanales de 100 mL de agua para determinar los niveles amonio, nitritos, nitratos, fosfatos, y balance iónico calcio-magnesio. Se realizaron biometrías semanales para dar seguimiento al peso y supervivencia de los organismos y ajustar la ración diaria de alimento.

6.4.2 Rendimiento del sistema.

Los parámetros zootécnicos medidos para determinar el rendimiento del sistema fueron los siguientes:

1. Ganancia de peso (%) (WG)= $((\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}) * 100) / \text{peso inicial (g)}$.
2. Tasa de crecimiento específica (%) (SGR) = $100 * (\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)}) / \text{días de experimento}$.
3. Tasa de supervivencia (%) = $((\text{número inicial de organismos} - \text{número de organismos muertos}) / \text{número inicial de organismos}) * 100$.
4. Tasa de conversión alimenticia (FCR) = $\text{alimento suministrado (peso seco) (g)} / \text{ganancia de peso (g)}$.
5. Eficiencia proteica (PER)= $\text{ganancia de peso (g)} / \text{proteína en peso seco suministrada (g)}$.
6. retención de fósforo (PR)= $(\text{Fósforo en camarón} / \text{fósforo en alimento}) * 100$ (calculada con base en datos de análisis químico-proximal de los alimentos formulados y del promedio de contenido de fósforo en organismos reportados en experimentos realizados previamente).

La homocedasticidad de varianzas y normalidad de los datos recopilados fue verificada por medio de las pruebas de Bartlett y Shapiro Wilks. El efecto del IDP fue evaluado por medio de un análisis de varianza de una vía, mientras que el efecto de salinidad y alimento en el primer

bioensayo y el de la variación de lípidos y carbohidratos en el rendimiento del sistema, sistema inmune y sistema antioxidante fue evaluado por medio de análisis de varianza multifactoriales.

Los factores evaluados fueron considerados significativos a valores de significancia de $p < 0.05$.

Las diferencias entre medias para cada grupo fueron determinadas mediante el uso de la prueba *post hoc* de Tukey HSD.

6.5 valuación del efecto de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de *L. vannamei* sobre el sistema inmune y antioxidante en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.

Al final del bioensayo 4, se tomaron 200 μL de hemolinfa extraída de la parte ventral del cuerpo de los organismos, bajo el primer par de pleópodos con jeringas para tuberculina preparadas con 400 μL de solución anticoagulante (9: 1 PBS 1x- Solución buffer de heparina) previamente enfriada a 4 ° C. Las muestras fueron depositadas en tubos Eppendorf para su posterior evaluación. Para evaluar la eficiencia de los alimentos en términos inmunológicos se midieron los siguientes indicadores.

6.5.1 Conteo total de hemocitos (CTH).

Se tomaron 100 μL de hemolinfa con anticoagulante y se le agregaron 400 μL de formaldehído al 4%, y posteriormente se cuantificaron los hemocitos en una cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio óptico, con cuatro réplicas por tratamiento.

6.5.2 Evaluación de fagocitosis en hemocitos.

Se tomaron 200 μL de hemolinfa con jeringas de tuberculina preparadas previamente con 400 μL de solución anticoagulante (9:1 solución buffer PBS 1x-heparina). La muestra se centrifugó a 6,500 rpm (4.1 g) por 2 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el paquete de hemocitos con 300 μL de la solución anticoagulante. El paquete de hemocitos se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones y el sobrenadante fue descartado. El paquete de hemocitos se resuspendió en 100 μL de PBS 1X y se le adicionó 100 μL de perlas fluorescentes de látex de

~1.0 μm (Las perlas de látex vienen teñidas con fluoresceína que emite fluorescencia en el campo de los verdes). La mezcla se incubó por 30 min a TA (en este tiempo, los hemocitos reconocen a las perlas de látex como cuerpos extraños y las fagocitan). Posteriormente, 100 μL de la muestra fueron esparcidos de manera circular y uniforme en un portaobjetos. Se incubó por 30 minutos a 28°C en una cámara húmeda (en este paso los hemocitos se adhieren al portaobjetos). Posteriormente se lavó cuidadosamente con PBS 1X. La muestra se fijó con 100 μL de formaldehído al 4% y se incubó por 5 minutos a 28°C. A cada muestra se le agregaron 100 μL rodamina-B (1 mg/mL de PBS 1X) y se incubó nuevamente por 5 minutos (La Rodamina-B tiñe al hemocito y emite fluorescencia en el campo de los rojos). La muestra fue lavada cuidadosamente con PBS 1X y se dejó escurrir. Se agregó una gota de PBS 1X en el centro de la muestra y se colocó un cubreobjetos sobre ella, se procuró que la gota de PBS 1X se esparciera uniformemente entre la muestra y el portaobjetos. La muestra fue sellada por las orillas del cubreobjetos con barniz transparente. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia para obtener el porcentaje de hemocitos que fagocitaron las perlas de látex.

6.5.3 Superóxido dismutasa (SOD).

La actividad SOD se cuantificó en musculo y hepatopáncreas de acuerdo a la metodología descrita por Suzuki (2000). Se utilizaron el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante de $\text{O}_2^{\bullet-}$. El nitroazul de tetrazolio (NBT) reduce al $\text{O}_2^{\bullet-}$ y forma un producto de color rosa llamado formazán que es detectado a 560 nm cuando la SOD inhibe la reducción del NTB. En una celda de plástico se mezcló la solución de trabajo (solución amortiguadora sodio-carbono 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM, EDTA 0.1 mM), XO (1 U mL^{-1} en sulfato de amonio 2 M) y 25 μL de solución para homogenizar (blanco) o muestra. Se registró el cambio en la absorbancia cada 30 segundos durante cinco minutos en un espectrofotómetro y se obtuvo el cambio en la absorbancia por minuto a 560 nm. Los resultados son expresados en U SOD mg^{-1} proteína, donde cada unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la reacción del $\text{O}_2^{\bullet-}$ con el NBT (McCord & Fridovich, 1969; Stirpe & Della-Corte, 1969; Paoletti *et al.*, 1986; Suzuki, 2000).

6.5.4 Catalasa (CAT).

Para determinar la actividad CAT en músculo y hepatopáncreas se utilizó H_2O_2 como sustrato, se dio seguimiento al decremento continuo de la concentración de éste a 240 nm (Aebi, 1964). En una celda de cuarzo se leyó la absorbancia de la solución de trabajo (buffer de fosfatos 0.1 mM) y solución stock de H_2O_2 (20 mM) para calcular la concentración de H_2O_2 , manteniéndola en el rango de 0.45 a 0.5 mmol L^{-1} al agregar 10 μL de la muestra. Se registró la absorbancia cada 15 segundos durante tres minutos a 240 nm. Los resultados son expresados en U CAT mg^{-1} proteína, donde una unidad de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un μmol de H_2O_2 por minuto (Aebi, 1964).

6.5.5 Peroxidación de lípidos.

Se cuantificó el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinar la cantidad de peroxidación de lípidos en las muestras (Persky *et al.*, 2000). Los niveles de TBARS fueron evaluados mediante la medición de la concentración de malondialdehído (MDA) Se homogenizaron 50 mg de tejido y 50 μL de hemolinfa en 1 mL de solución salina para crustáceos (SIC) fría, para ser centrifugados a 3,000 rpm a 4°C por 10 minutos. Se tomaron 250 μL del sobrenadante para ser colocados en tubos incubados en un baño de agua con agitación continua a 37°C. Al pasar 15 minutos, los tubos se colocaron en un baño de agua con hielo y se les adicionó 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 12.5% (en HCl 1 M) para detener la reacción, seguido de 500 μL de TBA al 1% en agitación. Los tubos se incubaron nuevamente en un baño de agua a 90°C por 10 minutos, se enfriaron, y se centrifugaron por 10 minutos a 3,000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante de los tubos y se leyó la absorbancia a 532 nm. Los resultados fueron calculados a partir de una curva estándar preparada con una solución de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP, 10 $\mu\text{moles mL}^{-1}$), corrida en paralelo con las muestras, para ser expresados en nanomoles de TBARS g^{-1} de tejido (Persky *et al.*, 2000).

6.5.6 Proteínas carboniladas.

El daño oxidativo a proteínas en músculo y hepatopáncreas se evaluó mediante la cantidad de carbonilos proteicos que se forman a partir de reacciones en las que interactúan aldehídos procedentes de la peroxidación de lípidos o de la oxidación de carbohidratos con proteínas (Levine *et al.*, 1994; Stadtman & Levine, 2000). Para esto, se homogenizaron 50 mg de cada muestra de tejido y se agregó 1 mL de ácido sulfosalicílico frío al 5% para ser centrifugados a 15,000 rpm a 4°C por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM en ácido clorhídrico 2 M) a los precipitados. Se incubó por una hora a temperatura ambiente agitándose por lapsos de 40 segundos cada 15 minutos. Se adicionó 0.5 mL de TCA al 20% a los tubos para ser centrifugados nuevamente. Se desecharon los sobrenadantes y se lavó tres veces con una mezcla de etanol y acetato de etilo (1:1) con una centrifugación entre cada lavado. Los precipitados fueron disueltos en clorato de guanidina (6 M). Se incubaron por 15 minutos a 37°C y se centrifugaron de nuevo. Se recuperaron los sobrenadantes en celdas de plástico y fueron leídas en un espectrofotómetro con barrido en el rango de 360-410 nm. Se registró la absorbancia máxima para obtener la concentración final de proteínas carboniladas mediante el coeficiente de extinción de 22 mmol L⁻¹. En paralelo, se prepararon blancos en los que se reemplazó el DNPH con HCl (2 M). Los resultados son expresados en nanomoles de carbonilos proteicos por gramo de tejido húmedo (Levine *et al.*, 1994; Stadtman & Levine, 2000).

7. RESULTADOS

7.1 Bioensayo 1: Evaluación de la eficacia de un alimento formulado para *L. vannamei* con base en un nivel bajo de proteína total, inclusión de harina de pescado y satisfacción de requerimientos de aminoácidos, vitaminas y minerales, en condiciones de agua clara con diferentes salinidades y recambio de agua bajo.

7.1.1 Análisis de agua.

Los recambios de agua semanales fueron suficientes para mantener concentraciones de N-NH_4 menores a 3 mg L^{-1} en la mayoría de los tratamientos (Fig. 1), encontrándose la mayoría de las concentraciones de este en los tratamientos a salinidades de 0.5 ups. La concentración de N-NO_2 se mantuvo por debajo de los 5 mg L^{-1} en los tratamientos con alimento experimental a diferentes salinidades, mientras que en los tratamientos con alimento control sobrepasó este margen independientemente del tipo de agua y salinidad (Fig. 2). La concentración de N-NO_3 se mantuvo por debajo de los 5 mg L^{-1} en la mayoría de los casos, a excepción de los tratamientos con alimento experimental a 6 ups, en los cuales se observó un pico máximo en la primera semana (Fig. 3). La concentración de P-PO_4 se mantuvo bajo los 4 mg L^{-1} en todos los tratamientos con alimento control, y se elevó en los tratamientos con alimento experimental independiente del tipo de agua y salinidad (Fig. 4).

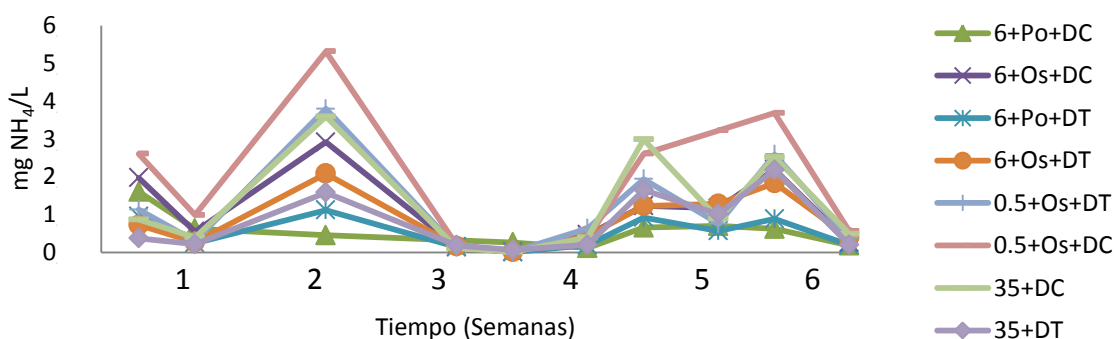


Figura 1. Concentración de N-NH_4 a lo largo del experimento en todos los tratamientos, donde Po= agua de pozo, Os= agua tratada por ósmosis inversa, DC= dieta control, DT= dieta tratamiento.

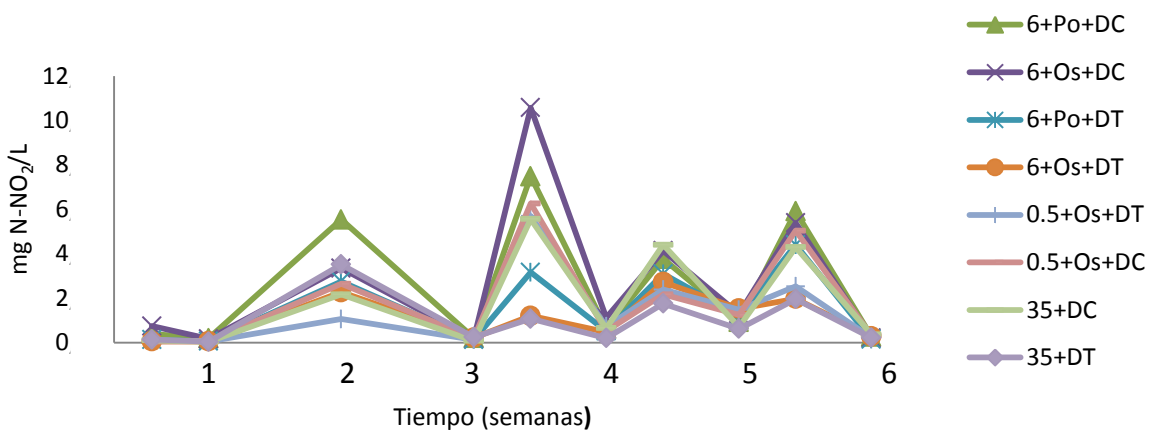


Figura 2. Concentración de N-NO₂ a lo largo del experimento en todos los tratamientos, donde Po= agua de pozo, Os= agua tratada por ósmosis inversa, DC= dieta control, DT= dieta tratamiento.

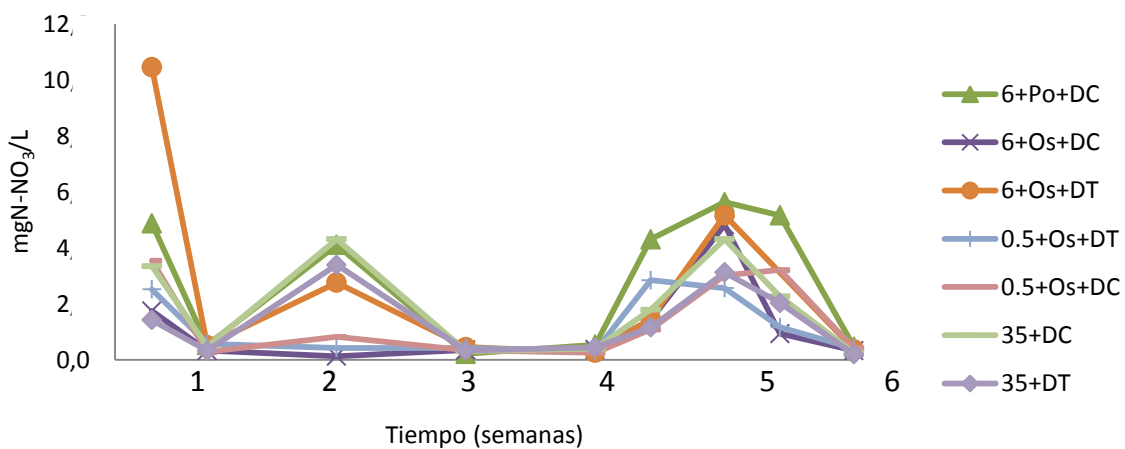


Figura 3. Concentración de N-NO₃ a lo largo del experimento en todos los tratamientos, donde Po= agua de pozo, Os= agua tratada por ósmosis inversa, DC= dieta control, DT= dieta tratamiento.

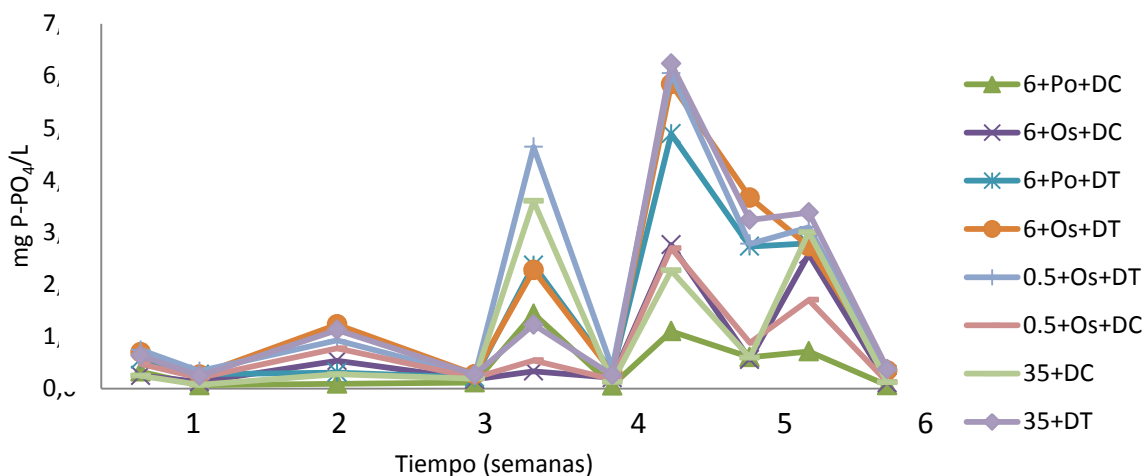


Figura 4. Concentración de P-PO₄ a lo largo del experimento en todos los tratamientos, donde Po= agua de pozo, Os= agua tratada por ósmosis inversa, DC= dieta control, DT= dieta tratamiento.

Tabla 12. Valores promedio y máximos observados en la concentración de N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃ y P-PO₄ en los diferentes tratamientos (DC= dieta control, DE= dieta experimental, Os= agua tratada por ósmosis inversa, Po= agua de pozo).

Tratamiento	Promedios				Máximos			
	NH ₄	PO ₄	NO ₂	NO ₃	NH ₃	PO ₄	NO ₂	NO ₃
35 ups, DC	1.4	0.9	1.9	1.8	4.4	7	7.6	7.7
35 ups, DE	0.8	1.8	1	1.4	2.5	6.8	9	6.2
6 ups, Os, DC	1.2	0.8	2.9	1.3	5.3	3.2	14	9
6 ups, Os, DE	0.9	1.8	1.1	2.1	3.1	7.3	5.7	13.3
6 ups, Po, DC	0.6	0.4	2.4	3.2	2.1	1.4	10	10
6 ups, Po, DE	0.6	1.5	1.7	3.8	1.6	5.2	8.3	11.3
0.5 ups, Os, DC	2.3	0.7	1.8	1.5	6.6	2.8	12.6	5
0.5 ups, Os, DE	1.2	1.8	1.3	1.3	4.5	7.3	5.3	6.8

Tabla 13. Diferencias significativas por el efecto de la salinidad, alimento, tipo de agua, tiempo y sus interacciones sobre la concentración de N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃ y P-PO₄ sobre los diferentes tratamientos.

Factor	NH ₄	NO ₂	NO ₃	PO ₄
Salinidad	NS	<0.05	<0.05	<0.05
Alimento	NS	<0.05	NS	<0.05
Tipo de agua	NS	NS	<0.05	<0.05
Tiempo	NS	<0.05	<0.05	<0.05
Salinidad*Alimento	NS	NS	<0.05	NS
Salinidad*Tipo de agua	>0.05	>0.05	NS	NS
Salinidad*Tiempo	NS	NS	<0.05	NS
Alimento*Tipo de agua	>0.05	>0.05	NS	NS
Alimento*Tiempo	>0.05	NS	NS	<0.05
Tiempo*Tipo de agua	NS	NS	NS	<0.05

7.1.2 Parámetros zootécnicos.

7.1.2.1 Crecimiento.

Debido a que los tratamientos a 0.5 ups sólo se realizaron con agua tratada por ósmosis inversa, la influencia del tipo de agua se descartó para analizar los datos de estos tratamientos junto con el resto. Se observó que los tratamientos a 0.5 ups presentaron un crecimiento significativamente menor al resto de los tratamientos, sin encontrar diferencias entre los organismos alimentados con ambos tipos de alimentos bajo esta salinidad (Fig. 5). A salinidad intermedia (6 ups) el crecimiento con ambos alimentos fue similar, mientras que a 35 ups se observó un mayor crecimiento ($p < 0.05$) en los organismos alimentados con la dieta control, que presentó el mayor crecimiento global (Fig. 5).

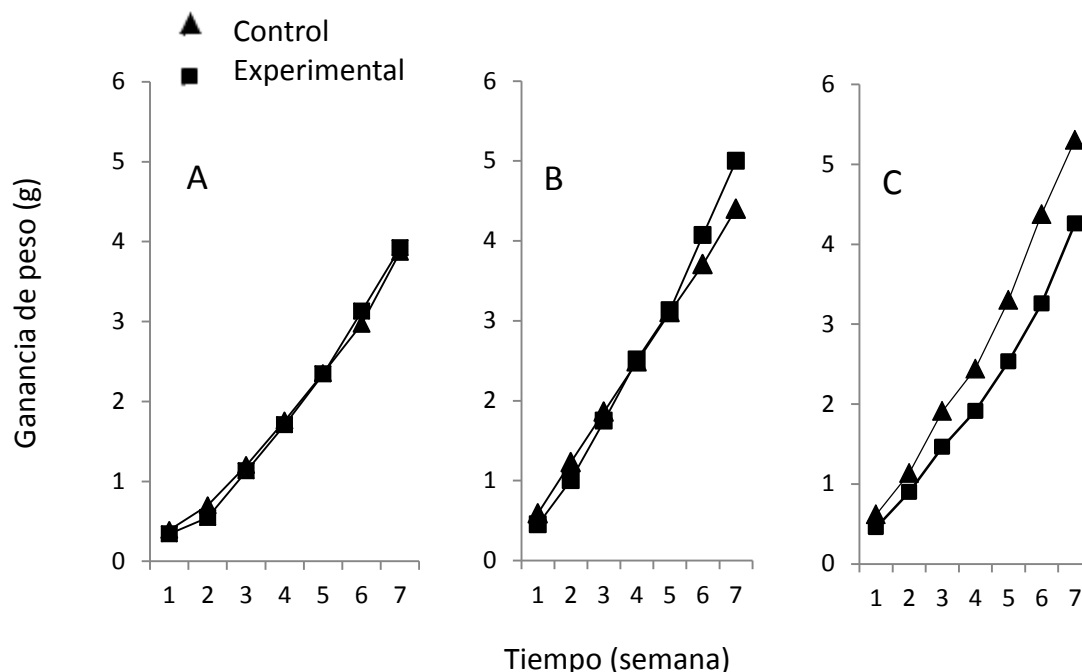


Figura 5. Ganancia en peso de juveniles de *L. vannamei* cultivados en laboratorio en condiciones de alta densidad (240 organismos m^3) diferentes salinidades (A) 0.5, (B) 6 y (C) 35 ups alimentados con el alimento experimental y control.

Tabla 14. Efecto de la salinidad, alimento y tiempo, así como sus interacciones sobre el crecimiento de los organismos cultivados a 0.5, 6 y 35 ups.

Factor	<i>p</i>
Salinidad	>0.05
Alimento	>0.05
Tiempo	>0.05
Salinidad*alimento	>0.05
Salinidad*tiempo	>0.05
Alimento*tiempo	0.6
Sal*Alim*tiempo	>0.05

7.1.2.2 Supervivencia.

No se observaron diferencias significativas en la supervivencia a 6 y 35 ups; con valores de 85 y 95% respectivamente. La supervivencia a 0.5 ups fue significativamente menor comparada con el resto de los tratamientos (35 %), donde se observó un efecto por la salinidad, en el tiempo y su interacción ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas por el tipo de alimento. El

tipo de agua tuvo un efecto significativo en la supervivencia ($p<0.05$), con la mayor supervivencia en los tratamientos cultivados con agua marina (95 %), seguido de agua tratada por ósmosis inversa (88 %) y con la menor supervivencia en agua de pozo (85 %).

7.1.2.3 Factor de conversión alimenticia (FCA).

El FCA presentó un efecto por la salinidad, ($p<0.05$), con los mayores valores a 0.5 ups durante todo el experimento, seguido de 6 ups, con el menor FCA en organismos cultivados con agua marina. No se encontraron diferencias significativas en el FCA por el tipo de agua, ($p>0.05$). El alimento control presentó el mayor FCA comparado con el alimento experimental ($p<0.05$).

Tabla 15. Supervivencia y factor de conversión alimenticia de *L. vannamei* cultivados en laboratorio bajo condiciones de alta densidad a 0.5, 6 y 25 ups, alimentados con el alimento control y experimental en tres tipos de agua.

Variable	Supervivencia (%)	FCA
0.5 ups	35±7	2.4±0.3
6 ups	85±5	1.9±0.2
35 ups	95±7	1.6±0.2
Alimento control	78±7	2.1±0.2
Alimento experimental	85±7	1.6±0.4
Agua osmosis	88±3	1.8±0.3
Agua pozo	85±3	1.7±0.4
Agua marina	95±4	1.5±0.5

7.2 Bioensayo 2.- Selección experimental de una fuente química de fósforo apropiada para su inclusión en las fórmulas alimenticias que permitan evaluar sustratos energéticos para *L. vannamei*.

7.2.1 Parámetros zootécnicos.

Se observaron diferencias significativas en diversos indicadores de producción según la fuente de fósforo en el alimento (Tabla 16).

Tabla 16. Indicadores de producción del bioensayo con diferentes fuentes de fósforo para los diferentes alimentos.

Parámetro	Alimento					ANOVA
	NaH ₂ PO ₄	NH ₄ H ₂ PO ₄	PolyP	KH ₂ PO ₄	NH ₄ H ₂ PO ₄ +Lev	
Ganancia de Peso (%)	106.54 ±5.23b	107.55 ±9.3bc	121.68 ±14.6c	112.29 ±9.3bc	87.51 ±6a	<i>p</i> <0.05
Tasa de crecimiento específica (%/día)	3.3 ±0.09ab	3.28 ±0.06a	3.48 ±0.1b	3.36 ±0.19ab	2.63 ±0.13c	<i>p</i> <0.05
FCA	2.04 ±0.14a	2.07 ±0.2a	1.96 ±0.49a	1.93 ±0.15a	2.7 7±0.33b	<i>p</i> <0.05
Supervivencia (%)	97.2 ±3.2a	95.8 ±5.3a	93 ±13.8a	98.61 ±2.7a	84.72 ±5.31b	<i>p</i> >0.05
Eficiencia proteica	1.97 ±0.1a	1.99 ±0.11ab	2.25 ±0.22c	2.21 ±0.15bc	1.49 ±0.11d	<i>p</i> <0.05

Las fuentes de fósforo con el mejor rendimiento fueron NH₄H₂PO₄, KH₂PO₄ y polyP, sin diferencias significativas entre ellas. la menor ganancia de peso se encontró con el fosfato monoamónico fermentado con levaduras como fuente de fósforo (*p*<0.05). La tasa de crecimiento específico y la eficiencia proteica fue superior en los organismos alimentados con KH₂PO₄ y polyP, los cuales mostraron diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El FCA y la supervivencia no mostraron diferencias significativas entre las diferentes fuentes de fósforo, lo que sugiere que KH₂PO₄ y polyP son las mejores opciones como fuente de este mineral.

7.3 Bioensayo 3: Determinación de las formulaciones matemáticas de ingesta diaria de proteína (IDP) para *L. vannamei* y la variación del rendimiento con base a diferentes niveles de aplicación de la ecuación de IDP en condiciones de densidad hiper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.

7.3.1 Determinación de las formulaciones matemáticas de Ingesta Diaria de Proteína (IDP) para *L. vannamei*, en relación con el peso corporal (PC).

El mejor ajuste para la función matemática que relaciona la IDP con el PC de los organismos, para todos los datos reportados para *L. vannamei* de manera explícita a través de experimentos de ingesta diaria de proteína o de manera implícita a través de tablas de alimentación reportadas en la literatura científica, acuicultura comercial y tablas de alimentación

proporcionadas por compañías de alimentos formulados para camarón fue $IDP=aPC^b$, como se puede apreciar en la figura 6, donde la IDP es expresada en $g\text{ proteína.kgbiomasa}^{-1}.\text{Día}^{-1}$ y el PC es expresado en gramos. La función matemática seleccionada a partir de datos obtenidos experimentalmente y reportados por Kureshy & Davis (2002) fue $IDP = 43.174 BW^{-0.684}$, los datos seleccionados correspondieron a la IDP suministrada en organismos de diferentes tamaños en los cuales se obtuvo la misma eficiencia proteica. Esta ecuación fue similar a la obtenida a partir de datos implícitos calculados a partir de las tablas de alimentación publicada por Clifford (1992), así como de datos implícitos calculados a partir de tablas de alimentación que reportan tasas de alimentación para cada peso corporal de los organismos y para cada concentración proteica, que se calculan con base en el porcentaje de biomasa. Los datos proporcionados por la fórmula matemática seleccionada se consideraron como el 100% de la IDP, en consecuencia, se generó una familia de ecuaciones correspondientes al 80%, 100%, 120% y 140% de la IDP que cubren toda la gama de posibilidades reportadas de manera implícita a través de las tablas de alimentación de la acuicultura de camarones de Ecuador, Colombia y México como se puede apreciar en la figura 7.

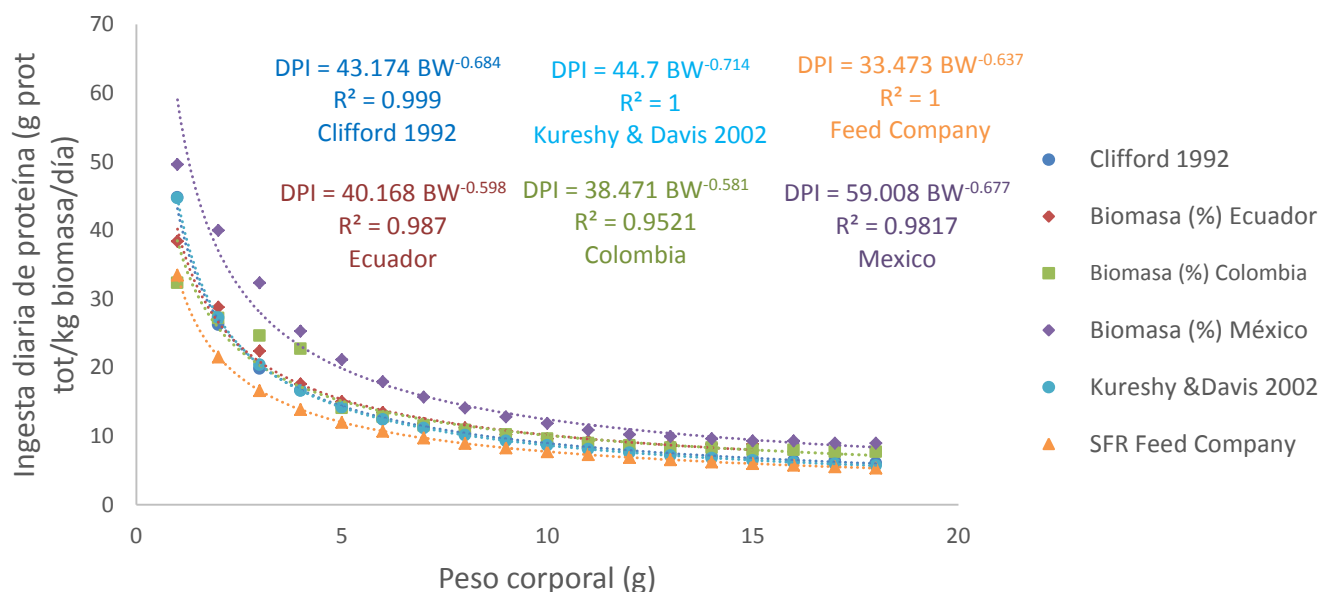


Figura 6. Funciones matemáticas de la ingesta diaria de proteína IDP expresada en $g\text{ prot.kg biomasa}^{-1}.\text{día}^{-1}$, en función del peso corporal PC expresado en gramos.

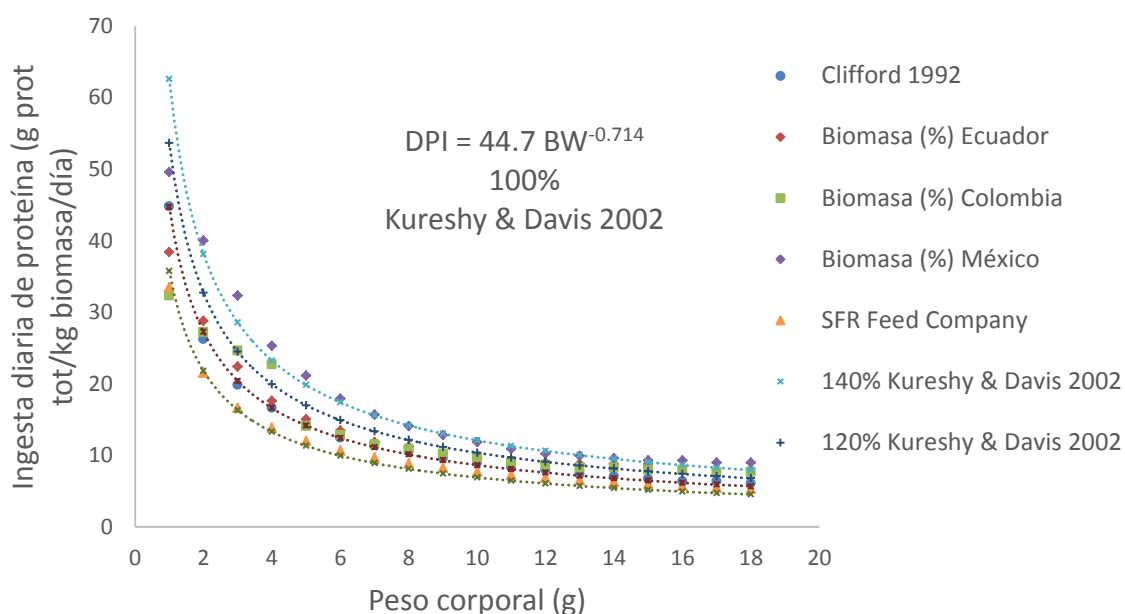


Figura 7. Ingesta diaria de proteína (g prot/kg biomasa/día) a 80, 100, 120 y 140 %, IDP = 44.7 $PC^{-0.714}$, donde PC se expresa en gramos de peso corporal individual.

7.3.2 Variación del rendimiento con base a diferentes niveles de aplicación de la ecuación de IDP en condiciones de densidad hiper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.

7.3.2.1 Crecimiento.

No se encontraron diferencias significativas en el aumento de peso de los organismos alimentados con las diferentes proporciones de proteína durante la primera semana del experimento. A partir de la segunda semana, el porcentaje de alimentación con 140% de proteína mostró los mayores crecimientos seguido del requerimiento diario de proteína de 120% (Fig. 8). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los organismos alimentados con la proporción de proteína 80 y 100% hasta la quinta semana del experimento, cuando el peso de los organismos es mayor a RDP mayores ($p < 0.05$).

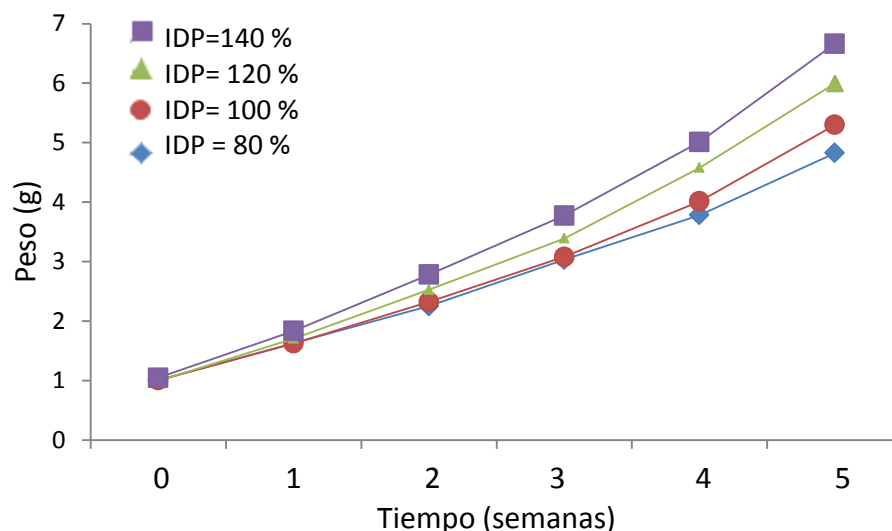


Figura 8. Crecimiento de *L. vannamei* cultivados en laboratorio en condiciones de alta densidad alimentados con base a una ingesta diaria de proteína (IDP) de 80, 100, 120 y 140 %.

7.3.2.2 Supervivencia.

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia en la última semana del experimento. La mayor supervivencia se encontró en los organismos alimentados con un requerimiento diario de proteína de 120 %, mientras que la menor se registró en los organismos alimentados con un requerimiento diario de proteína de 80 % (Tabla 17).

7.3.2.3 Factor de conversión alimenticia.

Se encontró un aumento gradual en el FCA con el paso del tiempo, sin embargo, al final del experimento no se encontraron diferencias significativas por el efecto de alimentar con diferentes porcentajes de IDP (Tabla 17) ($p>0.05$).

Tabla 17. Ganancia de peso (g), supervivencia (%) y factor de conversión alimenticia de *L. vanamei* cultivados en laboratorio en condiciones de alta densidad alimentados con base a una ingesta diaria de proteína de 80, 100, 120 y 140 % durante cinco semanas.

IDP (%)	Ganancia de peso (g)	Supervivencia (%)	FCA
80	4.82±0.54	84±7	0.97±0.09
100	5.2±0.61	86±7	1.07±0.1
120	5.99±0.93	92±5	1.18±0.12
140	6.66±0.93	86±5	1.24±0.13

7.4 Bioensayo 4: Evaluación del efecto de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de *L. vannamei* sobre el desempeño zootécnico en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.

7.4.1 Parámetros zootécnicos.

Encontramos un efecto significativo ($p < 0.05$) por el efecto de los carbohidratos sobre la ganancia de peso, tasa de crecimiento específico, tasa de conversión alimenticia y eficiencia proteica, así como un efecto por los carbohidratos y lípidos ($p < 0.05$) en el crecimiento semanal promedio y retención de nitrógeno. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de supervivencia. Se observó un gradiente en la ganancia de peso con respecto al aumento de carbohidratos, con diferencias significativas entre tratamientos con 2.1 y 1.5 frente a 1.1, 0.8 y 0.6. La tasa de crecimiento específico también presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, con valores más altos en 2.1 y 1.5. La tasa de conversión alimenticia y la eficiencia proteica mostraron los valores más altos en los niveles más altos de carbohidratos (2.1 y 1.5). El crecimiento promedio semanal mostró efecto por carbohidratos y lípidos, con valores más altos en 2.1, 1.5 y 1.1. Mientras tanto, las proporcionalidades de lípidos con respecto a la proteína de 0.2 y 0.36 mostraron el crecimiento semanal promedio más bajo y más alto respectivamente. La retención de nitrógeno fue estadísticamente mayor y menor en niveles de carbohidratos de 2.1 y 0.6 respectivamente. La tasa de supervivencia no se vio afectada por el efecto de ningún tratamiento ($p > 0,05$) (Tabla 18).

Tabla 18. Desempeño de *L. vannamei* cultivado en laboratorio con 20 dietas experimentales que incluyen variaciones carbohidrato:proteína y lípido:proteína, con una ingesta diaria de proteína (IDP) del 120% de la fórmula $IDP=43.174 PC^{-0.684}$, donde IDP se expresa en g proteína. Kg biomasa⁻¹. Día⁻¹ y PC es el peso corporal en gramos (WG= ganancia de peso, SGR= tasa de crecimiento específica, AWG= crecimiento semanal promedio, S= supervivencia, FCR= factor de conversión alimenticia, PE= eficiencia proteica, NR=retención de nitrógeno, RP=retención de fósforo)

Dieta	CBH:P (g/g)	Lip:P (g/g)	C:N	WG (%)	SGR (%.day ⁻¹)	AWG (g)	S (%)	FCR	PE	NR (%)	RP (%)
	2.1	0.2	12.15	323.3±15.7	2.3±0.1	1.27±0.12	86.5±5.8	2.25±0.08	1.84±0.07	30.65±1.93	10.11
2	2.1	0.23	12.05	297.3±26.1	2.2±0.2	1.12±0.24	80.5±11.1	2.76±0.38	1.55±0.19	25.54±6.43	8.26
3	2.1	0.3	11.99	323.4±12.6	2.3±0.1	1.26±0.12	86.1±5.5	2.37±0.08	1.71±0.05	28.66±1.55	9.63
4	2.1	0.36	12.07	320.1±7.4	2.3±0.1	1.26±0.04	94.9±2.6	2.29±0.04	1.82±0.03	29.89±0.93	9.99
5	1.5	0.2	9.87	297.4±7.6	2.2±0.1	1.14±0.06	94.4±2.8	2.16±0.04	1.6±0.03	25.87±0.78	10.27
6	1.5	0.23	9.97	286±11.1	2.1±0.1	1.05±0.13	100	2.26±0.19	1.56±0.13	25.17±3.07	9.85
7	1.5	0.3	10.05	303±15.8	2.2±0.1	1.14±0.06	88.9±7.3	2.08±0.25	1.72±0.21	28.24±6.09	10.7
8	1.5	0.36	9.93	319.4±20.4	2.3±0.1	1.05±0.13	89.7±5.1	1.94±0.14	1.78±0.14	29.36±4.05	11.49
9	1.1	0.2	8.51	267±1.5	2±0.1	1.14±0.19	89.5±6.7	2.07±0.01	1.4±0.001	23.33±0.13	10.44
10	1.1	0.23	8.59	274.6±10	2±0.1	1.23±0.17	89.7±5.1	2.07±0.09	1.42±0.06	23.61±1.79	11.44
11	1.1	0.3	8.57	315.3±13.4	2.3±0.1	0.97±0.01	83.8±4.8	1.74±0.06	1.68±0.05	27.88±1.54	10.45
12	1.1	0.36	8.70	291.2±6.7	2.1±0.1	0.99±0.07	89.5±6.7	1.85±0.08	1.58±0.07	26.75±1.93	12.45
13	0.8	0.2	7.64	269±9.7	2±0.1	1.22±0.12	92.3±7.7	1.95±0.08	1.37±0.06	22.28±1.67	11.74
14	0.8	0.23	7.45	281.±7.2	2.1±0.1	1.03±0.04	100	1.78±0.05	1.46±0.04	23.80±1.18	10.76
15	0.8	0.3	7.71	277.8±7.4	2±0.1	1.02±0.10	81.4±6.5	1.95±0.07	1.39±0.05	22.40±1.36	10.82
16	0.8	0.36	7.70	277±16.4	2±0.1	1.02±0.15	89.5±6.7	1.89±0.16	1.46±0.12	23.43±3.35	11.19
17	0.6	0.2	7.00	285.3±5.2	2.1±0.03	1.04±0.05	89.3±2.3	1.66±0.02	1.45±0.02	23.91±0.58	12.29
18	0.6	0.23	6.82	262.5±10.5	1.9±0.1	0.91±0.11	94.9±5.1	1.82±0.15	1.31±0.1	21.56±3.18	11.23
19	0.6	0.3	6.98	275.1±19.7	2±0.1	1.00±0.18	94.4±5.5	1.79±0.19	1.39±0.1	22.49±3.75	11.47
20	0.6	0.36	7.04	290±11.2	2.1±0.1	1.10±0.02	96.1±3.8	1.57±0.001	1.51±0.001	25.42±0.03	12.1

7.5. Evaluación del efecto de la variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína, lípidos:proteína y energía:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de *L. vannamei* sobre el sistema inmune y antioxidante en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.

7.5.1 Conteo total de hemocitos (CTH).

El CTH mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) (Tabla 19). Los tratamientos más altos de CBO: P (2.1 y 1.5 con 14.12 ± 1.6 y 14.55 ± 2.1 células $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ respectivamente) fueron superiores al CBH: P más bajo (1.1, 0.8 y 0.6 con 10.3 ± 1.7 , 7.72 ± 1.09 y 8.5 ± 0.9 células $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$), con una tendencia a incrementar el conteo de hemocitos con el aumento de la CBH, sin verse afectado por el efecto de la proporcionalidad de los lípidos con respecto a la proteína. La misma tendencia se observó entre la energía suministrada por cada gramo de IDP en dietas con el CTH, con una correlación directa entre estos factores ($R^2=0.7856$) como se aprecia en la figura 9.

7.5.2 Índice de fagocitosis.

El índice fagocítico no fue afectado por los carbohidratos o lípidos ($p > 0.05$), con valores estadísticamente similares en todos los tratamientos (Tabla 19). Sin embargo, encontramos un efecto en la capacidad fagocítica por proporcionalidad de carbohidratos con respecto a proteína, con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos con 2.1 y 1.5 CBH: P (1981.2 ± 358.9 y 1992.1 ± 532.6) con respecto al resto, que promedió 1249 ± 274 . Se observa una relación lineal ($R^2=0.5803$) de la capacidad fagocítica con la energía suministrada por cada gramo de IDP como se puede apreciar en la figura 10.

Tabla 19. Parámetros de respuesta inmune de juveniles de *L. vannamei* cultivados en laboratorio alimentados con 20 diferentes alimentos formulados con diferentes proporcionalidades carbohidratos:proteína, lípidos:proteína y energía:proteína, con base a una ingesta diaria de proteína (IDP) de 120 % de la fórmula $IDP=43.174 PC^{-0.684}$, donde IDP se expresa en g proteína. Kg biomasa⁻¹. Día⁻¹ y PC es el peso corporal en gramos.

Dieta	CBH:P (g/g)	Lip:P (g/g)	Energía/ proteína (Cal/g prot)	CTH	Índice fagocítico	Capacidad fagocítica
1	2.1	0.2	15.438	12.7±4.3a	133±24	1689.1±144.4
2	2.1	0.23	15.576	14.8±5a	167±46	2471.6±212.3
3	2.1	0.3	15.927	16.1±5.9a	108±24	1738.8±125.5
4	2.1	0.36	16.292	12.9±2.9a	157±44	2025.3±238
5	1.5	0.2	13.079	17.6±5.9a	158±25	2780.8±198.8
6	1.5	0.23	13.409	12.8±1.3a	131±50	1676.8±143.9
7	1.5	0.3	13.823	13.4±3a	124±38	1661.6±112.6
8	1.5	0.36	13.857	13.4±1.5a	138±12	1849.2±145.7
9	1.1	0.2	11.604	9±1.2b	144±42	1296±134.3
10	1.1	0.23	11.827	8.6±6.9b	131±50	1126.6±98.8
11	1.1	0.3	12.122	11.9±1.4ab	151±25	1796.9±135.3
12	1.1	0.36	12.661	11.7±4.2ab	89±18	1041.3±102.7
13	0.8	0.2	10.635	6.2±8.8c	135±19	837±75
14	0.8	0.23	10.576	7.9±1.4c	143±27	1129.7±110.6
15	0.8	0.3	11.192	8.8±2.2ab	147±50	1293.6±102.9
16	0.8	0.36	11.463	8±1.4ab	170±32	1360±121.3
17	0.6	0.2	9.996	9.2±9.2ab	154±36	1416.8±97.8
18	0.6	0.23	10.010	7.6±4.5c	117±22	830.6±87.3
19	0.6	0.3	10.308	9.4±1.32ab	156±33	1466.4±115
20	0.6	0.36	10.866	7.8±9.6c	179±57	1396.2±121.4

CTH=conteo total de hemocitos expresado en cels x10⁶ mL⁻¹, desviación estandar expresada en cels x10⁵ mL⁻¹, con una ingesta diaria de proteína (IDP) del 120% de la fórmula $IDP=43.174 PC^{-0.684}$, donde IDP se expresa en gproteína.Kg biomasa⁻¹. Día⁻¹ y PC es el peso corporal en gramos

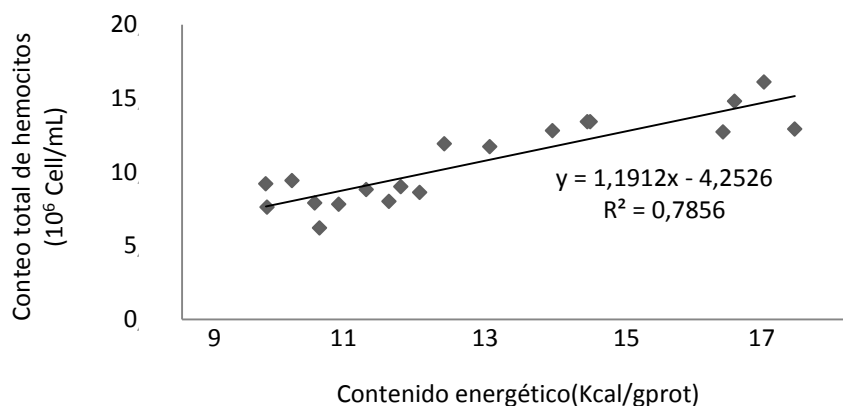


Figura 9. Conteo total de hemocitos (10⁶ Cell/mL) en *L. vannamei* relacionado al contenido de energía en el alimento (Kcal/g proteína) con diferentes proporcionalidades de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína de acuerdo a una ingesta diaria de proteína (g prot/Kg biomasa/día) de 120 %.

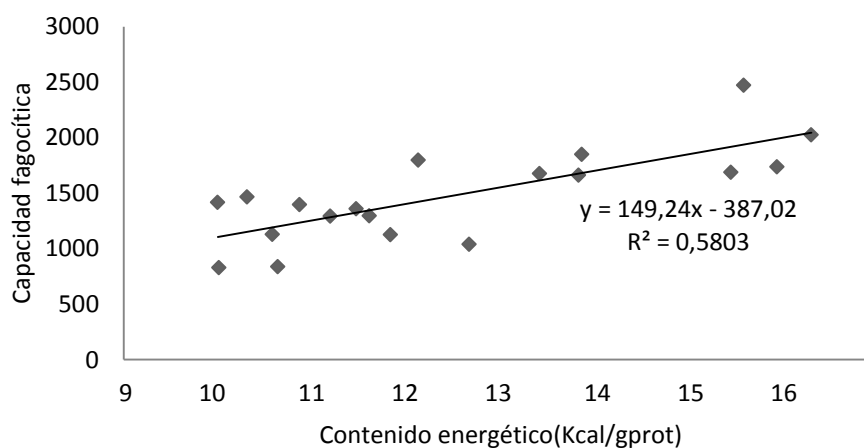


Figura 10. Capacidad fagocítica (10⁶ Cell/mL) en *L. vannamei* relacionado al contenido de energía en el alimento (Kcal/g proteína) con diferentes proporcionalidades de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína de acuerdo a una ingesta diaria de proteína (g prot/Kg biomasa/día) de 120 %.

7.5.3 Actividad de la Super Oxido Dismutasa (SOD) en músculo y glándula digestiva.

La actividad de la SOD fue similar en el músculo y la glándula digestiva. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de la SOD en el músculo debido al efecto de carbohidratos, lípidos y su interacción ($p > 0.05$). Se observó un efecto en la glándula digestiva por la acción de los carbohidratos y la interacción entre ambos sustratos energéticos ($p < 0.05$), con los valores más bajos de actividad en los niveles más altos de CBH y lípidos (Tabla 20, Fig. 11 y 12).

7.5.4 Actividad de la Catalasa (CAT) en músculo y glándula digestiva.

La actividad de CAT fue significativamente mayor en la glándula digestiva; este tejido no presentó diferencias significativas por efecto de la variación de sustratos energéticos. Se observó un efecto significativo en la actividad de CAT en el músculo por la interacción entre carbohidratos y lípidos ($p < 0.05$). La mayor actividad enzimática se encontró en los altos niveles combinados de carbohidratos y lípidos en ambos tejidos (Tabla 20, Fig. 11 y 12).

7.5.5 TBARS en músculo y glándula digestiva.

El músculo presenta niveles similares de TBAR en todos los niveles de CBH: P y lípidos: P ($p > 0.05$), sin embargo, se detectó un nivel más bajo de peroxidación lipídica en camarones alimentados con una mayor concentración de lípidos. La glándula digestiva mostró un efecto significativo debido a los niveles de lípidos, con un mayor daño oxidativo en organismos alimentados con bajos niveles de inclusiones de este sustrato energético (Tabla 20, Fig. 11 y 12).

7.5.6 Carbonilos proteicos en músculo y glándula digestiva.

Los niveles de carbonilos de proteínas fueron más altos en el músculo en comparación con la glándula digestiva. El músculo presenta un efecto significativo debido a los lípidos, pero con niveles similares de daño proteico a niveles altos de CBH. La carbonilación de proteínas en la glándula digestiva mostró diferencias significativas debido al efecto de CBH, con los mayores

niveles de proteínas carboniladas en los niveles más altos de inclusión de CBH, independientemente de los niveles de lípidos (Tabla 20, Fig. 11 y 12).

Tabla 20. Actividad antioxidante y daño oxidativo en músculo (M) y hepatopáncreas (DG) de juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas con diferentes niveles de proporcionalidad de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína a una tasa de IDP de 120%.

Dieta	CBH/P (g/g)	Lip/P (g/g)	SOD-M (U/mgP)	SOD-DG (U/mgP)	CAT-M (U/mgP)	CAT-DG (U/mgP)	CP-M (nm/mg)	CP-DG (nm/mg)	TBARS-M (nm/mg)	TBARS-DG (nm/mg)
1	2.1	0.2	0.12±0.03	0.123±0.02	2.72±0.8	38.5±4.5	11.8±1.8	5.3±1.2	0.111±0.04	1.35±0.21
3	2.1	0.3	0.08±0.02	0.059±0.01	8.98±1.6	59.4±8.2	11.3±2.4	6.6±0.9	0.124±0.02	0.496±0.14
9	1.1	0.2	0.13±0.06	0.078±0.03	3.64±0.9	39.1±5.7	11.4±2.6	4.7±0.8	0.125±0.03	1.44±0.6
11	1.1	0.3	0.1±0.04	0.058±0.06	4.23±1.2	69.5±8.7	4.2±1.7	4.1±1	0.217±0.03	0.572±0.16
17	0.6	0.2	0.11±0.03	0.125±0.04	5.26±0.8	41.2±6.3	10.4±3.3	1.7±0.6	0.092±0.02	1.42±0.09
19	0.6	0.3	0.21±0.07	0.188±0.07	4.12±0.7	41.9±6.4	4.1±1.3	0.9±0.3	0.426±0.02	0.426±0.12

CBH-P	NS	*	NS	NS	NS	*	NS	NS
Lip-P	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	*
CBH*Lip-P	NS	*	*	NS	NS	NS	NS	NS

*=Diferencia significativa ($p<0.05$), NS= No diferencia significativa, SOD= Super oxido dismutasa, CAT= catalasa, M=Músculo, DG= Hepatopancreas, CP= Carbonilos protéicos.

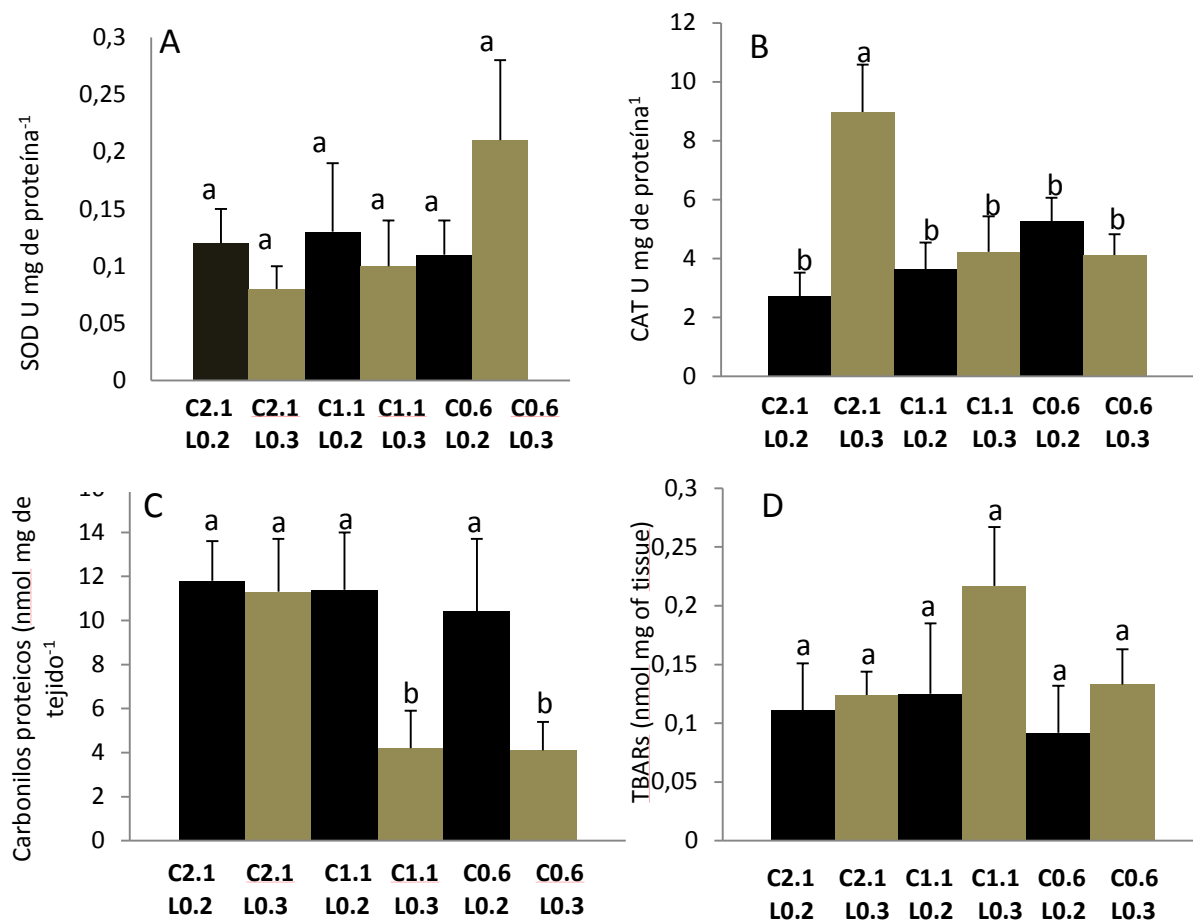


Figura 11. Actividad enzimática (U mg de proteína⁻¹) y daño oxidativo (nmol mg de tejido⁻¹) en músculo de juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de proporcionalidad de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína a una ingesta diaria de proteína de 120% (A: SOD, B: CAT) (C: Carbonilos proteicos, D: TBARs) (C= nivel de carbohidratos, L= nivel de lípidos).

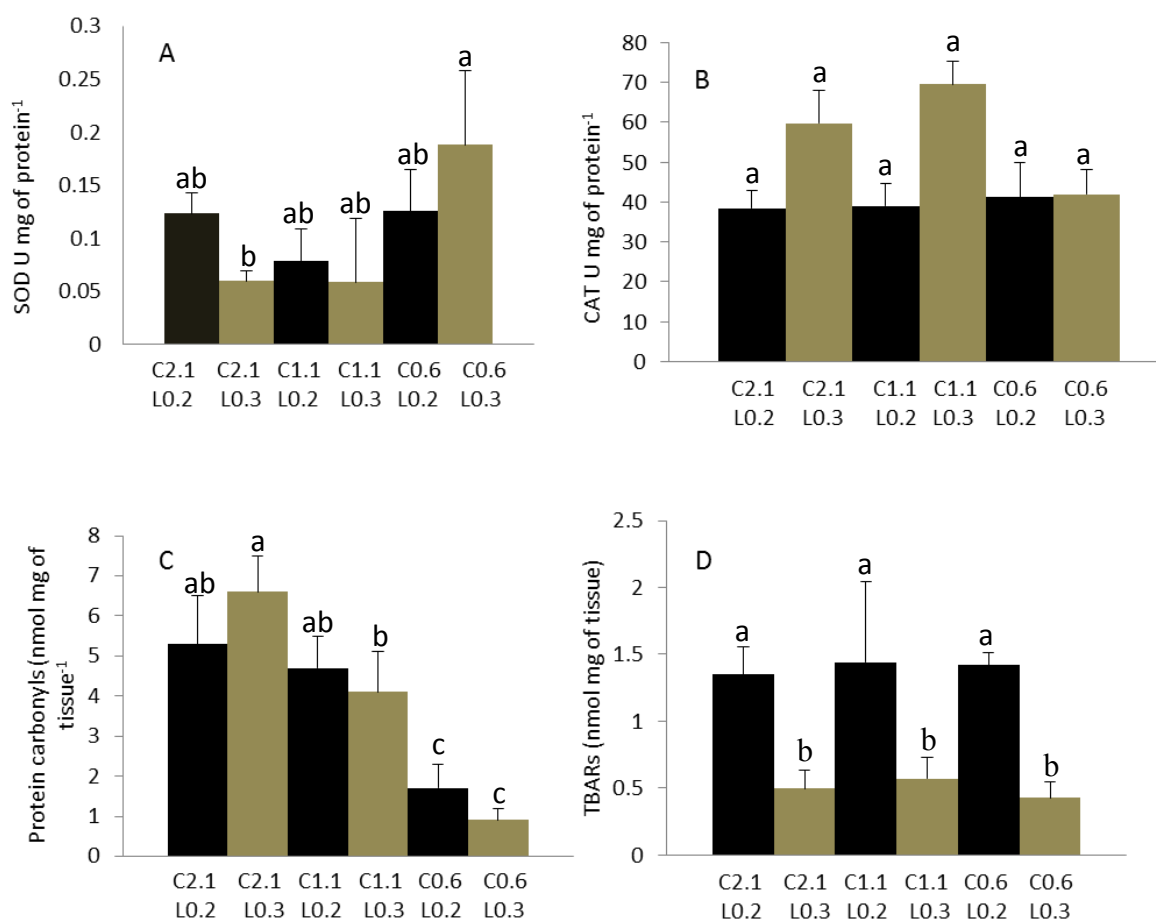


Figura 12. Actividad enzimática (U mg de proteína⁻¹) y daño oxidativo (nmol mg de tejido⁻¹) en hepatopáncreas de juveniles de *I. vannamei* alimentados con diferentes niveles de proporcionalidad de carbohidratos y lípidos con respecto a la proteína a una ingesta diaria de proteína de 120% (A: SOD, B: CAT) (C: Carbonilos proteicos, D: TBARS) (C= nivel de carbohidratos, L= nivel de lípidos).

8. DISCUSIÓN

El aumento de la demanda de alimentos acuícolas para la nutrición y alimentación humana requiere de la implementación de nuevas estrategias y tecnologías para mantener el uso eficiente de los recursos disponibles; entre ellas, encontramos la implementación de cultivos con salinidades bajas, y la generación de alimentos funcionales que permitan maximizar los recursos a menor costo (FAO, 2016). Sin embargo, la aplicación de este tipo de técnicas conlleva a situaciones adversas para el organismo, ya que se ha observado que a bajas salinidades disminuye el rendimiento y la respuesta fisiológica (Young *et al.*, 1989), debido a la alta demanda de energía metabólica requerida para hacer frente a los procesos de osmorregulación (Tseng & Hwang *et al.*, 2008).

8.1 Eficacia de un alimento formulado para *L. vannamei* con base en un nivel bajo de proteína total, inclusión de harina de pescado y satisfacción de requerimientos de aminoácidos, vitaminas y minerales, en condiciones de agua clara con diferentes salinidades y recambio de agua bajo.

La salinidad y la temperatura son los factores ambientales considerados con mayor influencia sobre las respuestas fisiológicas de los peneidos eurihalinos (Cheng *et al.*, 2005). En el presente estudio, el mayor crecimiento de *L. vannamei* se observó a 35 ups. Ello concuerda con los trabajos reportados por Cheng *et al.* (2005). A salinidades bajas, los camarones utilizan la proteína dietaria como fuente de aminoácidos no solo para la ganancia de peso, si no para el mantenimiento de la presión osmótica, por lo que los camarones marinos expuestos a bajas salinidades tienen requerimientos mayores de proteína (Shiau, 1998). Esto podría explicar las diferencias observadas en el crecimiento de los organismos alimentados con la dieta control a 0.5, 6 y 35 ups en el presente estudio. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con el tipo de alimento en el crecimiento de los organismos a 0.5 ups, ni a 6 ups, a pesar de que la dieta experimental presentó una menor concentración de proteína.

Además del diferente nivel de inclusión de proteína, el alimento experimental consta de un 4 % de levadura. Se ha demostrado que, al adicionar diversos tipos de microorganismos en el alimento, mejora el proceso de asimilación del mismo, con un incremento en el peso y la supervivencia de los organismos (Ismail & Soliman, 2010). A pesar de que *S. cerevisiae* es un

ingrediente limitado en la formulación de alimentos acuáticos debido a su bajo valor nutricional y por la indigestibilidad de la pared celular, puede ser procesada mediante aglomeramiento y fraccionamiento celular, lo que provoca una autólisis con la cual se obtienen paredes celulares y extracto de levadura con alto contenido proteico de aminoácidos esenciales y no esenciales (Perdomo *et al.* 2004), así como algunos inmunoestimulantes utilizados para la estimulación de la liberación O_2^- , profenoloxidasa (Chang *et al.*, 2000; Sajeevan *et al.*, 2009). Al someter a *S. cerevisiae* a condiciones de estrés salino, las células de la levadura permiten la acumulación de osmolitos, como aminoácidos y ácidos grasos, en su pared celular (Butinar *et al.*, 2005), donde pueden servir como un aporte nutricional adicional. En medios desfavorables nutricionalmente, esta levadura tiene la capacidad de acumular fósforo y procesarlo a polifosfatos (Rao *et al.*, 2009). Posiblemente, por esta razón la ganancia de peso y la supervivencia fueron similares en ambas salinidades con el alimento experimental y con el alimento control, a pesar del menor porcentaje de proteína del primero.

A diferencia de otros estudios en los que se ha observado que a salinidades bajas el requerimiento de proteína es mayor (Shiau, 1998), en el presente estudio los mayores crecimientos se encontraron en el alimento experimental a 6 ups. A pesar de la baja inclusión de proteína, se observó un mayor incremento de biomasa, debido probablemente al uso de lípidos y carbohidratos como fuente de energía y a la presencia de otros componentes, como la astaxantina, aminoácidos libres y fósforo inorgánico. El uso de antioxidantes en los alimentos para crustáceos sometidos a estrés salino mejora el rendimiento del sistema, con un incremento la capacidad osmótica de los organismos (Liu *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2007). El fósforo es un componente de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y de las membranas celulares; además, cumple una función importante en el metabolismo energético, ya que es un constituyente de la molécula del ATP y es parte integral de las coenzimas NAD^+ y $NADP^+$, que cumplen una función importante en la glucólisis y la respiración (Bertsch, 1999). Por ello, es posible que el fósforo añadido haya facilitado el metabolismo de carbohidratos mediante la fosforilación de la glucosa, lo que permite que la proteína se haya utilizado para el crecimiento.

Una manera de hacer frente a las adversidades que conlleva el cultivo de crustáceos a baja salinidad es el uso de alimentos con altos niveles de proteína. La proteína es un nutriente

indispensable requerido para la reparación de tejidos y para el mantenimiento general del organismo, altos niveles de proteína en el alimento a salinidades bajas pueden propiciar mejoras en el crecimiento, ya que esta contribuye a satisfacer los requerimientos energéticos y promover el crecimiento somático (Li *et al.*, 2011). Los requerimientos de concentración proteica en alimentos formulados para un óptimo crecimiento de *L. vannamei* a salinidades bajas (3 ups) se han reportado en niveles de 400 a 441 g kg⁻¹ (Li *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005), ya que estos altos niveles de concentración proteica en el alimento mejoran la capacidad osmorreguladora del camarón blanco.

Wang *et al.* (2015) encontraron mayores crecimientos en organismos alimentados con una proporción proteína lípidos de 34:19 respecto a valores de inclusión bajos de proteína (P26:CBH30) a una salinidad de 3 ups; sin embargo, encontraron mayor supervivencia en los tratamientos con bajos niveles de proteína. Los autores sugieren que la proporcionalidad óptima para crecimiento a salinidades bajas es de P34:CBH19, ya que ésta satisface los requerimientos energéticos y proteínicos de *L. vannamei*. En el presente estudio, se observó que el crecimiento de *L. vannamei* no es afectado cuando se cultiva a salinidad baja durante nueve semanas alimentados con dietas con un nivel de proteínas de 40 y 26%, con proporciones carbohidrato:proteína de 1.071 y 2.072 y lípido:proteína de 0.200y 0.344 respectivamente. A diferencia de estudios previos, en los que sólo varía el porcentaje de inclusión de proteínas, lípidos y carbohidratos, el alimento experimental resulto competente a salinidades bajas (0.5 ups) contra un alimento alto en proteína y nivel de inclusión de harina de pescado, ya que fue formulado con base a los requerimientos mínimos de vitaminas, minerales y aminoácidos en cultivos a bajas salinidades, así como algunos antioxidantes.

La suplementación de aminoácidos libres en el alimento para camarón presenta una mejora potencial en el rendimiento y capacidad osmorregulatoria en cultivos a bajas salinidades (Saoud *et al.*, 2007). Por otro lado, la suplementación de minerales es necesaria para una osmorregulación adecuada (Roy *et al.*, 2010). A bajas salinidades, la deficiencia de iones en la interface branquias-agua puede ser disminuida por la implementación dietaría de estos iones mediante el incremento en su disponibilidad y absorción en el tracto digestivo (Roy *et al.*, 2010). La correcta adición de minerales por medio del alimento permite que éstos sean utilizados

como componentes en diversos tejidos, cofactores enzimáticos, favorecen el balance de pH y los potenciales de membrana, y presentan un papel importante en los procesos osmorregulatorios (Pequeux, 1995; Davis & Lawrence 1997). La inclusión de antioxidantes, como la astaxantina, en el alimento para camarón mejora su crecimiento y estado fisiológico bajo condiciones de estrés salino, debido a que incrementan la capacidad osmótica a baja salinidad (Liu *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2007).

Por lo anterior, es posible que en un medio donde el estrés salino es relativamente fuerte (0.5 y 6 ups), el alimento experimental resulte competitivo a pesar de la inclusión de un bajo nivel de proteína (25%) y harina de pescado, mientras que cuando la presión osmótica no es un factor de riesgo (35 ups), un nivel alto de proteína (40%) y harina de pescado en el alimento control se traduce en un mejor rendimiento.

Más allá de la salinidad como tal, el principal efector sobre el crecimiento y la supervivencia de los camarones es la concentración de iones presentes en el agua. En el presente estudio, el agua marina fue diluida con agua tratada por ósmosis inversa y agua de pozo con filtraciones salinas hasta alcanzar una salinidad de 6 ups. El mayor crecimiento se observó al utilizar agua tratada por ósmosis inversa, por lo que, al estar en la misma salinidad en ambos tratamientos, el perfil iónico resultante tuvo un efecto directo sobre el rendimiento del cultivo, como se ha reportado en otros trabajos (Davis *et al.*, 2002). Las concentraciones de iones como Na, Ca y Mg en ambos tipos de agua son bajas comparadas con las reportadas por otros autores en sistemas a baja salinidad; sin embargo, se observó que la relación Na:K en el agua tratada por ósmosis inversa fue similar a la reportada en el agua de mar (27.8:1 y 28:1 respectivamente) (Golberg, 1963), lo que podría explicar los mayores crecimientos en este tipo de agua, mientras que en el agua de pozo se encontró una alta proporción de Na (50:1). Mantener esta relación puede favorecer a disminuir la presión osmótica en los organismos, ya que ésta es regulada en la hemolinfa en su mayoría por los iones Na^+ y K^- por medio de la NaK-ATPasa (Mantel & Farmer, 1983).

8.2 Fuente química de fósforo apropiada para su inclusión en las fórmulas alimenticias que permitan evaluar sustratos energéticos para *L. vannamei*.

La alimentación en organismos acuáticos debe incluir niveles adecuados de fósforo disponible, pero no debe exceder sus requerimientos ya que no puede ser almacenado en el organismo y es devuelto al sistema como productos de excreción (Pimentel-Rodríguez & Oliva-Teles, 2007). Se han reportado diferentes porcentajes de fósforo en el alimento en diferentes condiciones, con un requerimiento de 2 % en *Penaeus japonicus* con una tasa de Ca:P de 1:1 (Deshimaru & Yone, 1978), mientras que, en ausencia de Ca, Davies *et al.*, (1993) reportan que niveles de 0.4% son suficientes. El fósforo es suministrado en los alimentos por diferentes medios, donde el más importante son las mezclas de minerales. Otra fuente de fósforo es la harina de pescado, en la cual se reportan porcentajes que oscilan entre 0.83 hasta 1.25 % en harinas que incluyen carne y hueso (Ramos-Páez & Vásquez-Torres 2012). La harina de pescado no solo es una fuente importante de fósforo, también es la mayor fuente de proteínas en los alimentos formulados acuícolas (Olsen & Hasan, 2012), por lo que el incremento en la producción acuícola implica también un incremento en la demanda de este producto, lo que ha conducido a disminuir su inclusión en el alimento formulado, lo cual resulta vital para la sustentabilidad de la industria. Disminuir la inclusión de harina de pescado requiere entre otras cosas, aumentar la disponibilidad de ácidos grasos insaturados de cadena larga, aminoácidos y minerales, ya que esta tiende a ser reemplazada con harinas vegetales, en las cuales el contenido de fósforo es bajo, limitado generalmente a menos del 0.6 % de la materia seca (Cho & Bureau, 2001). Los resultados mostrados en el bioensayo 1 muestran que la inclusión adicional de fósforo, aminoácidos libres y la satisfacción rigurosa de los requerimientos de vitaminas y minerales permiten la disminución de harina de pescado a niveles de 6 %, donde se observó un rendimiento similar comparada con organismos alimentados con una inclusión de este ingrediente de 20 % en agua a baja salinidad (0.5 ups), lo que sugiere una alta competencia en agua a 35 ups. Estudios similares donde la harina de pescado ha sido reducida con resultados favorables han sido reportados. Xie *et al.* (2018), observaron el rendimiento de un cultivo de *L. vannamei* con alimentos con 25 y 10 % de inclusión de harina de pescado. Ellos encontraron que la inclusión de aminoácidos no es suficiente para suplir el efecto de la reducción de harina de pescado, es necesario aplicar un balance de micronutrientes para favorecer la absorción de

nutrientes y su utilización, sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos, la alta tasa de digestibilidad aparente en los camarones requiere un balance de micronutrientes más efectivo. Algunos aminoácidos como la arginina, isoleucina y taurina tienen un rol importante en la utilización de las proteínas (Geraert & Mercier, 2010), mientras que la adición de fósforo extra permite satisfacer las necesidades de este en el organismo, ya que es un componente de compuestos altamente energéticos como el adenosina trifosfato (ATP), ácidos nucleicos como el ADN, fosfolípidos y de algunos intermediarios metabólicos además trabaja en ocasiones como regulador de pH intra y extra-celular (Ramos-Páez & Vásquez-Torres 2012), lo cual favorece el rendimiento e iguala el crecimiento comparado con alimentos con alta inclusión de harina de pescado bajo ciertas condiciones.

En el bioensayo 2 se determinó que utilizar KH_2PO_4 y polyP produce resultados similares en el rendimiento del cultivo en términos de crecimiento, FCA, supervivencia y eficiencia proteica. A diferencia del bioensayo 1, en el bioensayo 2 se utilizó la misma inclusión de fósforo con la variación de la fuente de este, lo que sugiere que mientras los requerimientos de este mineral se encuentren satisfechos (0.4-2 %, Deshimaru & Yone, 1978; Davies *et al.*, 1993), la fuente de éste puede variar, a excepción de otros tratamientos como en los que se incluyó el tratamiento con levaduras, en las que el rendimiento fue significativamente menor, lo que sugiere que los camarones pueden hacer uso del fósforo, independientemente de la fuente de éste. Por otro lado, Davies & Arnold (1994) reportan que la disponibilidad de fósforo aparente en compuestos como KH_2PO_4 es mayor que en otros compuestos, lo que facilita la utilización de este por parte de los organismos.

8.3 Formulaciones matemáticas de ingesta diaria de proteína (IDP) para *L. vannamei* y variación del rendimiento con base a diferentes niveles de aplicación de la ecuación de IDP en condiciones de densidad híper-intensivas en agua marina clara con tasas bajas de recambio de agua.

Las variaciones en los niveles de IDP tienen un efecto directo sobre el rendimiento, con un incremento lineal en todos los parámetros zootécnicos. El éxito del cultivo de camarón es determinado en gran parte por la calidad del alimento utilizado. Para obtener un óptimo crecimiento es necesario otorgar la cantidad adecuada de proteína, este nivel puede llegar hasta el 50% de inclusión en el alimento de acuerdo con las particularidades del sistema de

cultivo (FAO, 1987). Se ha observado una variación de los requerimientos óptimos de concentración proteica en alimentos formulados para *L. vannamei* del 20 al 45% (Smith *et al.*, 1985; Kureshy & Davis, 2004, Hu *et al.*, 2008; Yaemssoksawat *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2015), donde estos pueden variar en función del sistema de cultivo y la densidad. Xia *et al.* (2010) informaron que los valores adecuados de concentración proteica en la dieta en condiciones de alta densidad en ausencia de productividad natural deben ser de al menos 43%, observándose un crecimiento lineal con el aumento de ésta con una leve disminución a porcentajes mayores. No se encontró una disminución en el crecimiento con el incremento en la concentración proteica suministrada, aunque no se encontraron diferencias significativas entre el IDP más alto, en términos de crecimiento y retención de nitrógeno, la alimentación con 120 % IDP es una mejor opción. Del mismo modo, Jang *et al.* (2014) encontraron una mayor ganancia de peso y tasa de crecimiento específico con una alimentación de 40 y 45% de concentración proteica, sin presentar diferencias significativas entre ellas, lo que sugiere que valores superiores al 40% no son necesarios. En el presente estudio no se encontró disminución de la eficiencia proteica con el aumento de la IDP, lo que sugiere que el resto de sustratos energéticos aportados en la dieta favorecen el uso adecuado de ésta. En cuanto a la IDP, los niveles utilizados concuerdan con el nivel de proteína diario requerido por *L.vannamei* determinado por Kureshy & Davies (2002), Clifford (1992) y Tacon (2002), así como el diario de aporte proteico utilizado por empresas acuícolas como Nicovita S.A., (Clifford, 1992) y SFR Feed Company.

8.4 Variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de *L. vannamei* sobre el desempeño zootécnico en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.

Si se considera que la proteína constituye el nutriente más caro en la formulación de alimentos, y que los alimentos con alta concentración proteica pueden disminuir la calidad del agua (Koshio *et al.*, 1993), determinar la IDP óptima para el mantenimiento y crecimiento de los organismos y experimentar con un gradiente amplio de lípidos y carbohidratos puede, no sólo favorecer el crecimiento de los organismos, sino disminuir considerablemente los costos de producción, ya que los carbohidratos representan la parte más barata en la elaboración de

alimentos y por los cuales se observó un efecto significativo en el crecimiento. La concentración proteica en la dieta se puede disminuir si la energía requerida proviene de otra fuente como los carbohidratos, lo que puede reducir la emisión de nutrientes residuales y los costos de alimentación (Zainuddin *et al.*, 2014).

Los organismos marinos poseen una digestibilidad baja de carbohidratos debido a la disponibilidad de la enzima α -amilasa y concentraciones bajas de glucosa en el plasma, causadas por la deficiencia de insulina (Zainuddin & Aslamyiah, 2014), por lo que aumentar la cantidad de carbohidratos en el alimento no siempre resulta en un mejor rendimiento. Sin embargo, si se aumenta el fraccionamiento de la ración diaria, por medio de un mayor número de raciones por día es posible aumentar el nivel de carbohidratos en la dieta y que éstos sean utilizados eficientemente, lo que favorece el proceso de lipogénesis y permite formar mayores reservas energéticas que se verán reflejadas como mayor crecimiento. Por otro lado, favorece que el alimento suministrado sea consumido en mayor proporción, lo que disminuye el estrés causado por el deterioro de la calidad del agua, originado por el alimento no consumido y una menor concentración de compuestos nitrogenados al disminuir el nivel de inclusión de proteína en el alimento.

Aumentar los niveles de carbohidratos en el alimento no siempre tiene un efecto positivo sobre los organismos; sin embargo, al racionarlo, estos mismos aumentos presentan diferentes resultados en el crecimiento. Zainuddin & Aslamyiah (2014) no observaron diferencias significativas en el crecimiento de juveniles de *L. vannamei* con alimentos que van de 26 a 44% de carbohidratos; sin embargo, al utilizar diferentes niveles de alimentación diaria observaron que el alimento es asimilado de forma diferencial, con un mejor uso de estos a niveles relativamente altos con al menos 4 alimentaciones diarias.

Los niveles de retención de nitrógeno y fósforo encontrados se encuentran dentro del rango adecuado en la acuicultura moderna, con valores promedio de 25 y 13 % respectivamente. Se ha determinado que, en promedio, el 20 % de nitrógeno y 10 % de fósforo son asimilados por los camarones (Edwards 1993). Los altos valores de retención de nitrógeno pueden ser explicados por el uso eficiente de la proteína explicado previamente, además del hecho de alimentar con base a la IDP, con una disminución al máximo de la cantidad de esta que entra al

sistema, sumado al hecho de que los ingredientes utilizados son de alta calidad. La asimilación eficiente de fósforo puede deberse a la fuente utilizada, Davies & Arnold (1994) reportan que la disponibilidad de fósforo aparente en compuestos como KH_2PO_4 es relativamente mayor que otros compuestos con este elemento, lo que facilita la utilización de este por parte de los organismos.

8.5 Variación de la proporcionalidad de carbohidratos:proteína y lípidos:proteína con un nivel similar de ingesta diaria de proteína en juveniles de *L. vannamei* sobre el sistema inmune y antioxidante en sistemas de agua marina clara con bajo recambio de agua.

En el presente estudio observamos que las variaciones en los niveles de energía aportados por las dietas tienen un efecto directo sobre algunos componentes del sistema inmunológico. El sistema inmune de los camarones requiere de las proteínas para su correcto funcionamiento, una alimentación deficiente de este sustrato energético puede generar una reducción en las funciones inmunes del organismo. La concentración de oxihemocianina aumenta con los niveles de proteína en el alimento, lo que sugiere que los camarones acumulan proteína como oxihemocianina. Además, también se ha observado que con menor proteína disminuye la cantidad de hemocitos, así como las funciones que estos realizan, como la fagocitosis (Pascual *et al.*, 2004). Los aminoácidos aportados por la proteína que son indispensables para el camarón suelen ser la metionina, lisina y arginina (Pascual y Kanazawa 1986). La arginina tiene funciones importantes en el sistema inmune, ya que está involucrada en la síntesis del óxido nítrico a través de la enzima óxido nítrico sintetasa (Jiang *et al.*, 2014), además de tener otros efectos positivos sobre la inmunidad mediada por células T en diversos modelos animales.

Cuando los organismos son alimentados con deficiencia proteica son más susceptibles a infecciones por patógenos; sin embargo, cuando se satisface el requerimiento proteico y los requerimientos de aminoácidos esenciales, aumentar estos niveles no parece incrementar la respuesta inmune. Cheng-Fang *et al.* (1999) encontraron una correlación positiva entre la concentración de ATP en la hemolinfa y el CTH derivado de la hematocitometría. La correlación indica que la concentración de ATP podría usarse para estimar el CTH, lo que sugiere que los niveles de energía en los camarones en forma de ATP se relacionan directamente la cantidad de hemocitos. Se determinó no solo que la proporción energía:proteína en las dietas afecta la

concentración de hemocitos, sino también que el aporte diferencial de energía puede ser suplido en gran medida por los carbohidratos sin presentar resultados adversos como la mortalidad (Ruvalcaba-Márquez *et al.*, 2020; en revisión). Se sabe que los camarones en condiciones de estrés inician la movilización de proteínas para satisfacer la demanda energética (Mercier *et al.*, 2006), en este caso, todos los camarones fueron alimentados con las mismas cantidades de proteínas, lo que indica que las diferencias en CTH se deben al efecto de diferencias en los niveles de carbohidratos. Hu *et al.* (2008) evaluaron dietas con diferentes niveles de carbohidratos, donde la menor concentración de proteína en el intestino se encontró en el grupo con los niveles más bajos de carbohidratos, lo que indica que el aumento en la cantidad de carbohidratos puede tener un efecto ahorrador de proteínas eficiente. Los carbohidratos pueden proporcionar una energía importante, sin embargo, su capacidad para utilizarlos es limitada, debido a su baja capacidad para digerir y regular las concentraciones de glucosa plasmática (Guo *et al.*, 2006). Zainuddin *et al.* (2014) encontraron que un nivel alto de carbohidratos (40%) produce el mejor rendimiento en comparación con niveles bajos siempre que se alimenten con una frecuencia alta en pequeñas cantidades, lo que favorece el uso de carbohidratos y aumenta las reservas de grasas con una lipogénesis más eficiente. En este trabajo, no se observaron diferencias significativas en el índice fagocítico, lo que sugiere que solo depende de proteínas. Xu & Pan (2014) no encontraron diferencias significativas en la actividad fagocítica en cuatro dietas con un nivel de proteína del 20, 25, 30 y 35%, lo que sugiere que, a excepción del rendimiento de crecimiento subóptimo de los camarones en el tratamiento de un nivel de proteína en la dieta del 20%, no se encontrarán diferencias en la actividad fagocítica en camarones alimentados con niveles de proteínas superiores al 25 %.

Es probable que los camarones sufran estrés oxidativo cuando se cultivan con altas densidades de población, por lo que requieren un sistema antioxidante eficiente para protegerse (Gao *et al.*, 2017). En el presente estudio, los valores más bajos de peroxidación de lípidos y actividad de SOD se encontraron en organismos alimentados con dietas con altos niveles de lípidos y carbohidratos. Podemos encontrar resultados similares en dietas con alto contenido en carbohidratos, donde se ha observado que disminuyen la susceptibilidad de los lípidos a peroxidarse en diferentes tejidos como el hígado (Castro *et al.*, 2015) y el músculo (Ivarez *et al.*, 1999; Pérez-Hidalgo *et al.*, 2009) de algunas especies de peces. Sarre *et al.* (2012) observaron

que la producción de superóxido aumenta rápidamente cuando las células se exponen a concentraciones bajas de glucosa, lo que sugiere un efecto antioxidante por sí mismo. Otro mecanismo por el cual las dietas ricas en carbohidratos pueden tener efecto sobre el estrés oxidativo es a través de la vía pentosa-fosfato, que genera un poder reductor como el NADPH, necesario para la eliminación de ROS a través de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPx (Elson & Cox, 2004). Castro *et al.* (2015) encontraron altas concentraciones de GSH y bajas concentraciones de su forma oxidada (GSSG) en *Dicentrarchus labrax* alimentados con dietas ricas en carbohidratos, lo que sugiere que las dietas ricas en carbohidratos favorecen la actividad de los GR hepáticos, que requiere NADPH para generar GSH a su forma oxidada. Lygren & Hemre (2001) reportaron una disminución en la actividad de CAT y SOD en dietas ricas en carbohidratos alimentadas con *Salmo salar*, lo que sugiere que el daño oxidativo bajo puede estar relacionado con altas concentraciones de NADPH y GSH, lo que permite que para actividades energéticas como la activación de antioxidantes primarios no se requirieran enzimas.

9. CONCLUSIONES

Si se suministran los requerimientos de vitaminas, minerales y aminoácidos libres y se añaden ácidos grasos insaturados de cadena larga por medio de premezclas específicas es posible igualar el rendimiento zootécnico en alimentos con baja inclusión de harina de pescado y proteína total, por lo menos en cultivos de agua clara a baja salinidad.

Utilizar KH_2PO_4 o polifosfatos como fuente de fósforo en el alimento para *L. vannamei* maximiza el rendimiento sin costo en la supervivencia, en el caso del primero su costo y facilidad de obtención en comparación de otras fuentes de fósforo utilizados en el presente trabajo, lo hacen el candidato ideal para suplir las necesidades de fósforo por medio de alimento formulado.

La formulación matemática más adecuada para determinar la ingesta diaria de proteína (g alimento.kg biomasa⁻¹.día⁻¹) en función del peso corporal individual fue $\text{IDP} = 43.174 \text{ PC}^{-0.684}$, donde IDP es la cantidad de proteína y PC el peso corporal de los organismos en gramos.

No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *L. vannamei* por alimentar con valores de ingesta diaria de proteína de 80, 100, 120 y 140 % durante la primera semana de cultivo (1 ± 0.5 g), por lo que se recomienda utilizar valores bajos cercanos al 80 % en condiciones similares a las realizadas en el presente trabajo. A partir de este punto es recomendable aumentar la ingesta diaria de proteína a 120 %, valor en el que se obtiene el mejor rendimiento sin diferencias significativas con porcentajes mayores.

Alimentar con base a una ingesta diaria de proteína de 120 % permite aumentar la cantidad de carbohidratos en el alimento sin efectos adversos en la supervivencia, lo que maximiza el rendimiento del cultivo en valores 2.1 gramos de carbohidratos por gramo de proteína.

El aumento de la proporción carbohidrato:proteína en el alimento anclado a valores fijos de ingesta diaria de proteína favorece el conteo total de hemocitos, lo que repercute favorablemente en la capacidad fagocítica de los organismos. La variación de lípidos parece no tener un efecto claro en estos parámetros, por lo menos a los niveles utilizados en este trabajo. La proporción energía:proteína en el alimento formulados tiene una relación directa con el conteo total de hemocitos y la capacidad fagocítica.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) no se ve afectada por ningún tratamiento en músculo, en hepatopáncreas, valores altos de carbohidratos favorecieron la actividad de esta enzima. La actividad de la enzima catalasa (CAT) no se vio afectada por ningún tratamiento en hepatopáncreas, mientras que la interacción de las proporciones carbohidratos:proteína y lípidos:proteína propició la mayor actividad en valores altos de ambos sustratos.

La peroxidación de lípidos solo se vio afectada por el efecto de la proporción lípidos:proteína en el hepatopáncreas, mientras que los valores mayores de carbonilos proteicos se encontraron en niveles altos de carbohidratos en ambos tejidos.

En términos generales, el alimento con mejor rendimiento en un régimen alimenticio con base a una ingesta diaria de proteína de 120 % es el que contiene 2.1 mg de carbohidratos y 0.3 mg de lípidos por gramo de proteína.

10. LITERATURA CITADA

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. En: Packer, L. Methods in enzymology, Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Inc. E.U.A. 105: 121-12.
- Akiyama, D. M. 1991. Soybean meal utilization by marine shrimp. In: Akiyama, D.M., Tan, R.K.H. (Eds.), Proc. Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. American Soybean Association, Singapore, pp 207-225.
- Amaya, E.A., D.A. Davis & D.B. Rouse. 2007. Replacement of fishmeal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*. 262: 393-401.
- Bharat, C.S., A. Subhendu & D. Lambodar. 2012. Carbon, nitrogen and phosphorus budget in shrimp (*Penaeus monodon*) culture ponds in eastern India. *Aquaculture International*. 21: 453-466.
- Butinar L., Sonjak S., Zalar P., Plemenitas A. & Gunde-Cimerman N. (2005) Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Botanica Marina*. 48 (1): 73-79.
- Carig, S. 2017. Understanding fish nutrition, feeds and feeding. *Virginia Cooperative Extension*. 420-256 (FST-269P).
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Coutinho, F., Díaz-Rosales, P., dos Reis-Serra, C.A. Panserat, S., Corraze, G., Peres, H. & Oliva-Teles, A. 2015. Dietary carbohydrates and lipid sources affect differently the oxidative status of European sea bass (*Dicentrarchus labax*) juveniles. *British Journal of Nutrition*. 114: 1548-1593.
- Chen, I. T., T. Aoki, Y.T. Huang, I. Hirono, T.C. Chen, J.Y. Huang, G.D. Chang, C.F. Lo & H.C. Wang. 2011. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Wargurg effect in shrimps hemocytes in the early stage of infection. *American Society for Microbiology*. 85 (24): 12919-12928.
- Cheng, W., L.U. Wang & J.C. Chen. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*. 250: 592-601.
- Chien Y.H., C.H. Pan & B. Hunger. 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*. 216: 177-191.
- Ching, 2019. Understanding shrimp hemocytes. *Global Aquaculture*. 9 pp.
- Civera, R. & J. Guillaume. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 77: 145-156.
- Cho, C.Y., Bureau, D.P., 2001. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research*. 32 (1): 349-360.
- 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.

- Davis D.A. & A.L. Lawrence. 1997. Minerals. In: D'Abramo L.R., D.E. Conklin, D.M. Akiyama (eds). *Crustacean Nutrition*, Vol. 6, pp. 150–163. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Davis, A.P., M. Shokouhian & S. Ni. 2001. Loading Estimates of Lead, Copper, Cadmium, and Zinc in Urban Runoff From Specific Sources. *Chemosphere*. 44(5): 997-1009.
- Davis, D.A., A.L. Lawrence & D.M. Gatlin. 1993. Response of *Penaeus vannamei* to dietary calcium, phosphorus and calcium:phosphorus ratio. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24: 504-515.
- Davis, D.A., I.P. Saoud, W.J. McGraw & D.B. Rouse. 2002. Considerations for *Litopenaeus vannamei* reared in inland low salinity waters. *Avances en Nutrición Acuícola: Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*: 73–94..
- Deshimaru, O. & Y. Yone. 1978. Requirement of prawn of dietary minerals. *Bulletin of Japanese Society for the Science of Fisheries*. 44: 907-910.
- Docampo, R., W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff & S.N. Moreno. 2005. Acidocalcisomes conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 251–261.
- Dorado-Mártinez, C., C. Rugeiro-Vargas & S. Rivas-Arancibia. 2003. Estrés oxidativo y neurodegradación. *Revista de la Facultad de Medicina*. 46(6): 229-235.
- Edwards, P. 1993. Environmental issues in integrated agriculture-aquaculture and waste water-fed fish culture systems. In: Pullin RSV (ed) *Environment and aquaculture in developing countries*. ICLARM 31. pp 139–170
- El-Missiry, M. 2012. Antioxidant Enzyme. InTech. Croatia. 400 pp.
- Elson, D.L. & Cox, M.M. 2004. Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In Lehninger Principles of Biochemistry, 4th ed., pp. 521–559. New York: W.H. Freeman.
- FAO. 2016. Programa de información de especies acuáticas. En; Briggs, M (ed). Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO.
- Feng, C., H.L. Wilson, J.K. Hurley, J.T. Hazzard, G. Tollin, K.V. Rajagopalan & J.H. Enemark. 2003. Essential role of conserved arginine 160 in intramolecular electron transfer in human sulfite oxidase. *Biochemistry*. 42: 12235-12242.
- Flores, I.J. 2007. Puntos críticos en la evaluación del impacto de la camaronicultura en el Pacifico de Nicaragua, durante su proceso productivo. *Universita*. 1(1): 33-36.
- Flores, M., F. Díaz, R. Medina & A. Licea. 2007. Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water. *Aquaculture Research*. 38: 740–747.
- Fox, J.M., M. Humes, Davis, D. & A. Lawrence. 2011. Evaluation of Methionine Supplements and Their Use in Grain-based Feeds for *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42: 676-678.

Galván-Álvarez, D., F. Mendoza-Cano, J. Hernández-López & A. Sánchez-Paz. 2012. Experimental evidence of metabolic disturbance in the white shrimp *Penaeus vannamei* induced by the Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). 111 (1): 60-67.

Gao, Y., He, Z., Vector, H., Zhao, B., Li, Z., He, J., Lee, J.Y. & Chu, Z. 2017. Effect of stocking density on growth, oxidative stress and HSP 70 of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17: 877-884.

Geraert P.A. & Y. Mercier. 2010. Amino acids: beyond the building blocks. ADISSEO. France.

González-Félix, M.L., D.M. Gatlin III, A.L. Lawrence & M. Pérez-Velázquez. 2002. Effect of various dietary lipid levels on quantitative essential fatty acid requirements of juvenile pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33(3): 330-340.

Guillaume, J., 1997. Protein and amino acids, pp 26-41. In. D'Abramo, R.L., Concklin, E.D. and Akiyama, D.M. (Eds.). Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture Society. Volume 6. The World Aquaculture Society. USA.

Guo, Hui, J.A. Xian, B.Li, C.X. Ye, Y.T. Miao & S.A. Liao. 2013. Gene expression of apoptosis-related genes, stress protein and antioxidant enzymes in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 56: 366-371.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 141(2): 312-322.

Halliwell, B. & M. Whiteman. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Journal of Pharmacology*. 142: 231-255.

He, H. 1993. Evaluation of dietary vitamin requirements of the white-leg shrimp, *Penaeus vannamei*. Doctoral dissertation. Texas A&M University, College Station, Texas, USA.

He, H. & A. Lawrence. 1993. Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 118(3-4): 245-255.

Hedrick, S. 2004. The acquired immune system a vantage from beneath. *Immunity*. 21(5): 607-615.

Hu, Y., B. Tan, K. Mai, Q. Ai, S. Zheng, & K. Cheng. 2008. Growth and body composition of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed different ratios of dietary protein to energy. *Aquaculture Nutrition*. 14: 499-506.

Hodar, A.R., R. Vasava & N.H. Joshi. 2020. Fish meal and fish oil replacement for aquaculture using alternative sources: a review. *Journal of Experimental Zoology India*. 23 (1): 13-21.

Ighodaro, O. & O. Akinloye. 2017. First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 54 (4): 287-293.

Ismail, M. & E. Soliman. 2010. Studies on Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria Against *Vibrio vulnificus* in freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *American Journal of Science* 6: 781-787.

Ivarez, M.L., López-Bote, C.J., Díez A., Corraze, G., Arzel, J., Kaushik, S.J. & Bautista, J.M. 1999. The partial substitution of digestible protein with gelatinized starch as an energy source reduces susceptibility to lipid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Animal Science*. 77:3322–3329.

Jang, I.K., E. Shahkar, S.K. Kim, H. Yun. 2017. Evaluation of optimum dietary protein level for juvenile whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Crustacean Biology*. 34 (5): 552-558.

Jayaprakas, V. & S. Chithambaran. 1996. Growth response of white prawn, *Penaeus indicus*, to dietary L-carnitine. *Asian Fisheries Society*. 9(3): 209-219.

Jia. X., F. Wang, Y. Lu, D. Zhang & S. Dong. 2014. Immune responses of *Litopenaeus vannamei* to thermal stress: a comparative study in freshwater and seawater conditions. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 47(2): 79-92.

Jiang, Z., C. Li, D.M. Arrick, S. Yang, A. Baluna & H. Sun. 2014. Role of Nitric Oxide Synthases in Early Blood-Brain Barrier Disruption following Transient Focal Cerebral Ischemia. *PLoS one*. 9(3): e93134.

Kanazawa, A., Teshima, S. and Sasaki, M., 1984. Requirements of the juvenile prawn for calcium, phosphorus, magnesium, potassium, manganese, and iron. *Mem. Fat. Fish.*, Kagoshima Univ. 33: 63-71.

Koshio, S. T.S. Teshima, A. Kanazawa & T. Watase. 1993. The effect of dietary protein content on growth, digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenil kuruma prawns, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*.113:101-114.

Kyoungho, S. 2007. Immune and inflamatory system. Nova Biomedical Books. E.U.A. 301 pp.

Kureshy, N. & D.A. Davis. 2000. Metabolic requeriment for protein by pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa & R. Civera-Cerecedo (Eds). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium de Nutrición Acuícola*. México.

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

- Kuroda, A., K. Nomura, R. Ohtomo, J. kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, N. Ohtake & H. Kornberg. 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science*. 293: 705-708.
- Lavens, P., G. Merchie, X. Ramos, A.L.H. Kujan, A.V. Hauwaert, A. Pedrazzoli, H. Nelis & A.D. Leenheer. 1999. Supplementation of ascorbic acid 2-monophosphate during the early postlarval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 5: 205–209
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32 (10): 1295-1309.
- Le Moullac, G. & P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*. 191 (1-3): 121-131.
- Lee, C.S. 2014. Dietary nutrients, additives and fish health. John Wiley & Sons. E.U.A. 376 pp.
- Levine, R.L., J.A. Williams, E.R. Stadman & E. Shacter. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology*. 233: 346-357.
- Li, G.L., C.H. Zhu & Q.C. Zhou. 2001. Effects of dietary protein level on the growth of *Penaeus vannamei*. *Marine Science*. 25: 1–4.
- Li, E.C., L.Q. Chen, C. Zeng, X.M. Chen, N. Yu, Q.M. Lai & J.G. Qin. 2007. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture*. 265: 385-390.
- Li, E.C., L. Arena, G. Lizama, G. Gzxiola, G. Cuzon, G., C. Rosas, L.Q. Chen & A. Van Wormhoud. 2011. Glutamate dehydrogenase and Na⁺-K⁺ ATPase expression and growth response of *Litopenaeus vannamei* to different salinities and dietary protein levels. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 29, 343–349.
- Limsuwan, C. & P. Junratchakoo. 2004. Shrimp Culture Industry of Thailand. Magic Publishing, Bangkok.
- Lin, C.K., Y. Yi & J.S. Diana. 1997. The effects of pond management strategies on nutrient budgets: Thailand. In: Fourteenth annual technical report. Pond dynamics/aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA, pp 19–24.
- Liu, D.H., J.G. He & Y.J. Liu. 2005 Effects of dietary protein levels on growth performance and immune condition of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles at very low salinity. *Acta Scientific*. 44: 217–223.
- Lygren, B. & G.I. Hemre. 2002. Influence of dietary carbohydrate on antioxidant enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture International*. 9(5): 421-427.
- Magallón-Servín, P. 2004. Programa de Estudios de Posgrado Evaluación de moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones agudas de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S.C. México.

Mantel, L.H. & L.L. Farmer. 1983. Osmotic and ionic regulation. Pp. 54–161 in *The Biology of Crustacea, Volume 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation*, L.H. Mantel, ed., Volume 5. New York: Academic Press.

McGrath, J.W. & J.P. Quinn. 2000. Intracellular Accumulation of Polyphosphate by the Yeast *Candida humicola* G-1 in Response to Acid pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (9): 4068-4073.

Mohankumar, K. & P. Ramasamy. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Research*. 115: 69–75.

Mercier, L., E. Palacios, A. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramírez, R. Hernández-Herrera & I. Racotta. 2006. Metabolic, and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*. 258: 633-640.

Morales-Cristóbal, Y. 2012. Evaluación del crecimiento y del contenido de hemocitos circulantes totales en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuestos a dietas experimentales con diferentes niveles de proteína y probióticos. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste. México. 109 pp.

Moreno, S. & R. Docampo. 2013. Polyphosphate and Its Diverse Functions in Host Cells and Pathogens. *PLOS Pathogens*. 9 (5): e1003230

Müller F., N.J. Mutch, W.A. Schenk, S.A. Smith & L. Esterl. 2009. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 139: 1143–1156.

Navarro-Meza, M & J.L. Orosco Ceballos. 2015. Cuidado y alimentación en la neurodegeneración, Alzheimer y Parkinson. Información básica. Editorial Universitaria. México. 96 pp.

Mathew, S., K.A. Kumar, R. Anandan, P.G. Viswanathan & K. Devadasan. 2007. Biochemical studies on changes associated with enzymes of glucose metabolism in white spot syndrome virus (WSSV) infected with *Penaeus monodon* (Fabricius). *African Journal of Biotechnology*. 6 (16): 1944-1948,

Niu, Z.Y., F.Z. Liu, Q.L. Yan, W.C. Li. 2009. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broiler under heat stress. *Poultry Science*. 88 (10):2101–2107.

Ogawa, N., J. De Risi & P.O. Brown. 2000. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Molecular Biology of the Cell*. 11:4309-4321.

Olvera-Novoa, M.A., C.A. Martínez-Palacios & E. Real de León. 2012. Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos. FAO. Italia. Documento digital: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab489s/AB489S00.htm#TOC>

- Olsen, R. L., & Hasan, M. R. 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*. 27: 120–128.
- Pandian, T.J. 1989. Protein requirements of fish and prawns cultured in Asia. *Proceedings third Asian Fish Nutrition Network Meeting. Filipinas*: 11-22.
- Pascual, C., E. Zenteno, G. Guzon, A. Sanchez, A. Gaxiola, G. Tabeada, J. Suarez, y T. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*. 236: 431-450.
- Pequeux A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of the Crustacean Biology*. 15: 1–60.
- Pascual, F.P. & A. Kanazawa. 1986. Specific amino acid-free semi-purified diets for *Penaeus monodon* juveniles. *Mem. Kagoshima Univ. Res. Center S; Pac*. 7: 65-72
- Pascual, C., E. Zenteno, G. Cuzon, A. Sánchez, G. Gaxiola, G. Taboada, J. Suarez, T. Maldonado & C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*. 1 (4): 431-450.
- Perdomo, M., R. Vargas & G. Campos, G. 2004. Valor nutritivo de la levadura de cervecería (*Saccharomyces cerevisiae*) y de sus derivados, extracto y pared celular, en la alimentación aviar. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 12 (3): 89-95.
- Persky, A.M., P.S. Green, L. Stublely, C.O. Howell, L. Zaulyanov, G.A. Brzaeau & W. Simpkins. 2000. protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle *in vivo* and *in vitro*. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 223: 59-66.
- Pimentel-Rodrigues A., Oliva-Teles, A., 2007. Phosphorus availability of inorganic phosphates and fish meals in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. *Aquaculture*. 267: 300–307.
- Ponce-Palafox, J., C.A. Martínez-Palacios & L.G. Ross. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*. 157: 107–111.
- Qi-Cun, Z., Z. Wen-Ping, W. Hua-Lang, W. Tuo, W. Yong-Li & X. feng-jun. 2012. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 364-365: 252-258.
- Qi-Cun, Z., W. Yong-Li, W. Hua-Lang & T. Bei-Ping. 2013. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 392-395: 142-147.
- Rao, N.N., M.R. Gomez-Garcia & A. Kornberg . 2009. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *The Annual Review of Biochemistry*. 78: 605–647.
- Rahman, T., I Honsen, M.M.T. Islam & H.U. Shekhar. 2012. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3: 997-1019.

- Ramos.Páez, R. & W. Vasquéz-Torres. 2012. Digestibilidad del fósforo en ingredientes de origen animal utilizados en dietas para cachama (*Piaractus brachypomus*). *Orinoquia Suplemento*. 16: 155-161.
- Reddy, H.V., A. Rai & T.S. Annappaswamy. 2001. Dietary requirements of juvenile white shrimp, *Penaeus indicus* for water soluble vitamins. *The Indian Journal of Animal Sciences*. 71(6): 593-596.
- Rowley, A. & A. Powell. 2007. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific or nonspecific?. *The Journal of Immunology*. 179 (11): 7209-7214.
- Roy, L.A., D.A. Davis, I.P. Saoud, C.A. Boyd, H.J. Pine & C.E. Boyd. 2010. Shrimp culture in inland low salinity waters. *Reviews in Aquaculture*. 2:191-208.
- Sánchez, E.L. & M. Lagunoff. 2015. Viral activation of cellular metabolism. *Virology*. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.038.
- Sajeevan, T.P., D.W. Lowman, D.L. Williams, S. Selven, A. Anas & P. Rosamma. 2009. Marine yeast diet confers better protection than its cell wall component(1–3)- β -D-glucanase as an immunostimulant in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture Research*. 40:1723–1730
- Sbarra, A.J. & R.R. Strauss. 1988. The respiratory burst and its physiological significance. Plenum Press. New York. 500 pp.
- Sarre, A., Gabrielli, J., Vial, G., Leverve, X.M. & Assimacopoulos-Jeannet, F. 2012. Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 52(1): 142-152
- Saoud, I.P., D.A. Davis, & D.B. Rouse. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture*. 217(1999): 191-199.
- Sheng, X.F. & L.Y. He. 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology*. 52(1): 66-72.
- Shiau, S.Y. 1997. Utilization of carbohydrates in warmwater fish with reference to tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 151: 79-96.
- Shiau, S.Y. & C.Q. Lung. 1993. Estimation of the vitamin B₁₂ requirement of the grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 117(1-2): 157-163.
- Shiau, S.Y. & Y.H. Chin. 1999. Estimation of the dietary biotin requirement of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 170: 171–178.
- Shiau, S.Y. & J.Y. Hwang. 1994. The dietary requirement of juvenile grass shrimp (*Penaeus monodon*) for vitamin D. *Journal of Nutrition*. 124 (12): 2445-2450.
- Shiau, S.Y. & S.L. Su. 2004. Dietary inositol requirement for juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 241(1-4): 1-8.

Shiau S.Y. & G. Suen. 1994. The dietary requirement of juvenile grass shrimp (*Penaeus monodon*) for niacin. *Aquaculture*, 125, 139-145.

Shiau S.Y. & J.S. Liu. 1994. Estimation of the dietary vitamin K requirement of juvenile *Penaeus chinensis* using menadiona. *Aquaculture*. 126: 129-135.

Shiau, S.Y. & C.W. Hsu. 1999. Dietary pantothenic acid requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*. *The Journal of Nutrition*. 129(3): 718-721.

Shiau, S.Y. & J.F.Hsieh. 2001. Quantifying the dietary potassium requirement of juvenile hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *British Journal of Nutrition*. 85(2) 213-218.

Siccardi III, A.J. 2006. Daily digestible protein and energy requirements for growth and maintenance of sub-adult pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de doctorado. Texas A & M University. E.U.A. 128 pp.

Sies, H. 1991. Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants. Academic Press, New York.

Sui L., M., G. & Y. Deng. 2015. Effect of dietary protein level and salinity on growth, survival, enzymatic activities and amino-acid composition of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) juveniles. *Crustaceana*. 88: 82–95

Smith S.A., N.J. Mutch, D. Baskar, P. Rohloff & R. Docampo. 2006 Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 103: 903–908.

Stadtman, E.R. & R.L. Levine. 2000. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Science*. 899: 191-208.

Soderhall, K. & L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 3–23.

Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. En: Taniguchi, N. & J. Gutteridge (Eds.). Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University Press. R.U. Pp 3855-3863.

Tacon, A.G.J. & D. Akiyama, 1997. Feed Ingredients, pp.411-472. In: Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Volume 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

Tseng, Y.C. & P.P. Hwang. 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 148: 419–429.

Vastag, L., E. Koyuncu, S.L. Grady, T.E. Shenk & J.D. Rabinowitz. 2011. Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathogens*. 7 (7): e1002124

Venereo-Gutierrez, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2): 126-133.

Velasco, M., A.L. Lawrence & W.H. Neil. 1997. Effects of dietary phosphorus level and inorganic source on survival and growth of *Penaeus vannamei* postlarvae in zero-water exchange culture tanks. *Aquatic Living Resources*. 1: 29-33.

Wasielesky, W., H. Atwood, A. Stokes & C.L. Browdy. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 258 (1-4): 396-403.

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. *Aquaculture Nutrition*. 21: 904-912.

Weber, R. 2009. Efecto del estrés y de la anestesia sobre indicadores primarios y secundarios de estrés y sobre los neurotransmisores monoaminérgicos cerebrales en el lenguado *Solen senegalensis* (Kaup 1858). Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España. 249 pp.

Xia, L.Z., L.Z. Yang & M.C. Yan. 2004. Nitrogen and phosphorus cycling in shrimp ponds and the measures for sustainable management. *Environmental Geochemistry and Health*. 26: 245-251.

Xia S., Y. Li, W. Wang, M. Rajkumar, K. Vasagam, K. Paramasivam. 2010. Influence of dietary protein levels on growth, digestibility, digestive enzyme activity and stress tolerance in white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), reared in high-density tank trials. *Aquaculture Research*. 41: 1845–1854.

Xu, J.W. & Pan, L.Q. 2014. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture*. 426-427: 181-188

Xie, S., J. Niu, W. Zhou, Y. Liu & L. Tian. 2018. Developing a low fishmeal diet for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using the nutritional value of FM as the reference profile. *Aquaculture Nutrition*. 00: 1-14.

Young, G., B.T. Björnsson, P. Prunet, R.D. Lin, & H.A. Bern. 1989. Smoltification and sea-water adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones and cortisol. *General and Comparative Endocrinology* 74: 335-345.

Yaemsooksawat, N., O. Jintataporn, N. Areechon, S. Puntuma-o-paas & C. Thongtuak. 2008. Effect of dietary protein level on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 31(1): 15-20.

Yoganandhan, K., S. Sahish, V. Murugan, R.B. Narayanan, A.S. Hameed. 2003. Screening the organ for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. *Aquaculture*. 215(1-4) 21-29.

Yu-Ping, S., G. Li-Zeng, X. Jie-Hua & X. Qian-Yun. 2015. Effects of L-tryptophan-supplemented dietary on growth performance and 5-HT and GABA levels in juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*. 23(1): 235-251.

Zainuddin, H., H. Haryati & S. Aslamyah. 2014. Effect of Dietary Carbohydrate Levels and Feeding Frequencies on Growth and Carbohydrate Digestibility by White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Under Laboratory Conditions. *J. Aquac. Res. Development*. 5:274. doi:10.4172/2155-9546.1000274.

Zhang, S.P., J. Li, X. Wu, W. Zhong, J. Xian, S. Liao, Y. Miao & A. Wang. 2013. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. (2013): 1-8.