

Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone)

César Molina-Poveda¹ & María E Morales²

¹Foundation CENAIM-ESPOL, Campus Politécnico Prosperina, Guayaquil, Ecuador

²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guayaquil, Ciudadela Universitaria 'Salvador Allende', Guayaquil, Ecuador

Correspondence: C Molina-Poveda, Foundation CENAIM-ESPOL, Campus Politécnico Prosperina, Vía perimetral Km 30.5, Casilla 09-01-4519, Guayaquil, Ecuador. E-mail: cemolina@cenaim.espol.edu.ec

Abstract

A combination of barley-based fermented grains (BFG) and wheat gluten (WG) meal (1:1 on a crude protein basis) was evaluated as an alternative protein-rich ingredient (BFG–WG) in diets for juvenile *Litopenaeus vannamei*. Four isocaloric diets were formulated to contain 44% protein in which protein from BFG–WG replaced 0% (A), 33% (B), 66% (C) and 100% (D) of the protein from marine animal protein (MAP: 69% shrimp head meal, 21% fish meal and 10% squid meal) in the diets. These diets were delivered twice a day for 6 weeks to shrimp (initial weight \pm standard error, 2.14 ± 0.02 g). Shrimp fed diets A (control) and B showed similar weight gain at the end of the experiment. There were no significant differences among the survival rates of different dietary treatments ($> 96\%$). The amount of uneaten food was positively and significantly ($r^2 = 0.57$, $P < 0.001$) related to the level of inclusion of BFG–WG in the diets, suggesting that diet palatability was a major factor influencing shrimp growth. Diet D had the highest apparent digestibility for protein and dry matter. The inclusion of BFG–WG had a positive effect ($r^2 = 0.75$, $P < 0.05$) on carbohydrate digestibility. A significant stimulation of amylase activity and soluble protein and glycogen concentrations in the hepatopancreas also was related to the amount of BFG–WG in the diet. Feed conversion ratio and protein efficiency ratio were not significantly different among diets containing substitution levels of 0%, 33% and 66% of MAP, which could suggest that if the balance of amino acids and the palatability in the diet can be improved, replacement level of the MAP may be increased to 66% without reducing growth.

Keywords: amylase, barley-based fermented grains, growth, digestibility, *Litopenaeus vannamei*, marine animal protein, wheat gluten meal

Introduction

The increasing demand of seafood for human consumption has resulted in a constant growth of global aquaculture production (FAO 1999). A fundamental component of diets used in the culture of aquatic commercial species is protein of marine animal origin (MAP). However, its cost and increasing demand are driving the search for alternative sources of protein for use in diets for fish and shrimp.

The recommended protein content of shrimp feeds varies from 30% to 55% (Akiyama 1991). In most cases, diets contain varying proportions of fish meal, shrimp head meal and squid meal (Akiyama 1991). These ingredients are of high nutritional value and palatability, but are relatively expensive. Feed costs represent the largest component of the cost of shrimp production. In semi-intensive culture, feed can account for 28% of the total costs (Treece 2000). As the marine protein source is one of the most expensive components of the feed, lowering its inclusion to a level that does not adversely affect the growth rate of the species in culture may result in lower production costs.

Numerous investigations have been made to evaluate alternative protein-rich ingredients in shrimp feeds: soybean (Akiyama 1991), canola (Cruz-Suarez, Ricque-Marie, Tapia-Salazar, McCallum & Hickling 2001), cottonseed (Lim 1996), peanut (Lim 1997), blood (Dominy & Ako 1988), fisheries by-product (Sudaryono, Hoxey, Kailis & Evans 1995) and poultry by-product meal

(Davis & Arnold 2000). At the experimental level, leaf meals of camote and papaya (Peñaflorida 1995) and meals of feed pea, cowpea and rice bean (Eusebio 1991; Cruz-Suarez *et al.* 2001) have also been evaluated.

Due to its nutritional value, relatively low cost and the consistent availability, soybean meal is frequently included in diets for fish and shrimp throughout the world. Davis and Arnold (2000), working with *Litopenaeus vannamei*, did not observe differences in survival, feed conversion and protein efficiency when they replaced up to 80% fish meal protein with co-extruded soybean meal and poultry by-product meal in isonitrogenous diets.

Stillage and distillers grains are obtained as by-products of the distillation industry in which starch grains are fermented to produce alcohol (Webster, Tidwell, Goodgame, Yancey & Mackey 1992). Traditionally, barley grain is an important cereal used in the brewing industry in Ecuador, and is used either on its own or in combination with rice to reduce the production costs of beer. Due to differences in the content of the seed coating of the barley, the fermented by-product is variable in its composition. The limited amount of data that has been published about the nutritional value of distilled grains is based on 100% barley. Wu (1986) reported that barley-based distillers grains (BFG) had 32.6% crude protein, 6% fat, 4.4% ash and 16.6% crude fibre. The effect of BFG on shrimp was initially investigated through the direct addition of BFG to culture ponds, where it was shown to contribute to the nutrition of *Macrobrachium rosenbergii* (Kohler & Krueger 1985). Tidwell, Webster, Yancey and D'Abramo (1993), working with *M. rosenbergii*, found that the replacement of 50% or 100% fish meal with a combination of soybean meal and distillers dried grains with solubles did not result in a reduction in weight gain, survival and yield when compared with the diet containing only fish meal. In order to consider the use of alternative protein sources, either as partial or total replacement of marine protein, the quality of these sources, including the proteins of marine origin, needs to be evaluated in terms of chemical composition, biological value and digestibility.

There appears to be no information in the scientific literature relating to the use of the BFG as a substitute for a mixture of fish, shrimp and squid meals. Hence, the objective of the present study was to evaluate BFG as an alternative protein source in diets of juvenile *L. vannamei*. However, since BFG has an intermediate level of protein (29.3% dry basis), wheat gluten meal

(WG) was used to create a mixed ingredient (BFG–WG) with a protein content of 45.9%.

Materials and methods

Experimental design

The feeding trial was conducted in the experimental facilities of the National Aquaculture and Marine Research Centre (CENAIM), San Pedro de Manglaralto (Guayas Province, Ecuador). Juvenile *L. vannamei* having a mean (standard error, SE) body weight of 2.14 (0.02) g, were randomly distributed with five shrimp in each of 20 × 50-L polyethylene aquaria (60 × 30 × 36 cm *L* × *W* × *H*) supplied with aerated seawater (flow 0.35 L min⁻¹, dissolved oxygen 6.3–8.3 mg L⁻¹; pH 7.6–8.8; salinity 32–34‰; temperature 26.0–27.4 °C). Aquaria were covered with 2-mm mesh netting to prevent shrimps from escaping. Photoperiod was controlled at 12D:12L.

Each of the four test diets was randomly assigned to five aquaria. Shrimp were fed at 10% of the body weight twice daily (09:00 and 16:00 hours) for 6 weeks in order to establish any differences in growth, biomass, survival and feed conversion ratio. During the first 2 days, dead shrimp were replaced with shrimp having similar weight. Uneaten feed, moults and faeces were siphoned out every morning before the first feeding. All shrimp were individually weighed every 15 days to evaluate growth and adjust feeding rations.

During the fourth week, over 3 consecutive days, the uneaten feed was collected 2 h after feeding by siphoning, dried at 60 °C for 24 h and weighed again. The amount of non-consumed feed by shrimp was expressed as a percentage of the biomass of shrimp in the aquaria and used as an indicator of diet palatability.

One week before the end of the growth experiment, shrimp were fed on their assigned diets that had been supplemented with 1% chromic oxide in order to acclimate shrimps to the new feed. After that period, faeces were collected twice a day, 2 h after feeding, and pooled for each aquaria. Faecal material collected during 10 days were frozen and freeze-dried before analyses.

The apparent digestibility (AD) of the test diets were calculated using the formula:

$$AD = 1 - \frac{(\% \text{ nutrient}/\% \text{ Cr}_2\text{O}_3) \text{ faeces}}{(\% \text{ nutrient}/\% \text{ Cr}_2\text{O}_3) \text{ diets}} \times 100.$$

At the end of digestibility trial, 10 shrimp in early premolt stage (Do) were randomly chosen between

09:00 and 11:00 hours (after 15-h fasting) from the experimental aquaria and sacrificed (Le Moullac, Klein, Sellos & Van Wormhoudt 1997). Immediately, their hepatopancreas were excised to measure amylase activity, soluble protein and glycogen content, and also to determine hepatosomatic index (HSI).

Diet formulation

Samples of dry BFG were supplied by The Cervecería Nacional del Ecuador brewery plant at Guayaquil, Guayas Province, Ecuador. The BFG consisted of the

post-fermentation by-product of a mixture of 80% barley, 10% rice and 10% lupulo/corn mixture. Four isocaloric diets were formulated containing 44% of protein, in which the mixture of marine animal protein composed of 69% shrimp head meal, 21% fish meal and 10% squid meal was replaced with 0%, 33%, 66% and 100% of a mixture of BFG and WG (1:1 on a crude protein basis) (Table 1). Because of the low protein content of BFG (29.3% dry basis), WG was included in the mixture to increase the protein content of the mixture. It was used because of its high digestibility (Akiyama, Coelho, Lawrence & Robinson 1989).

Table 1 Formulation and chemical composition of the experimental diets

| Ingredients (%) | A | B | C | D |
|---|-------|-------|-------|-------|
| Shrimp head meal*† | 33.40 | 22.40 | 11.40 | 00.00 |
| Fish meal‡ | 10.00 | 6.70 | 3.40 | 00.00 |
| Squid meal§ | 5.00 | 3.35 | 1.70 | 00.00 |
| ¶WG **–BFG†† | 2.95 | 23.56 | 44.18 | 65.31 |
| Soybean meal‡‡† | 20.00 | 20.00 | 20.00 | 20.00 |
| Cod liver oil§§ | 4.98 | 5.24 | 5.26 | 2.43 |
| Soybean lecithin† | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Cholesterol** | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Vitamin mix¶ | 4.50 | 4.50 | 4.50 | 4.50 |
| Mineral mix | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Binder Pegabind® | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Antioxidant Ethoxyquin® | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| Chromic Oxide (Cr ₂ O ₃)** | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Corn starch*** | 13.66 | 6.71 | 0.00 | 0.00 |
| Diatomaceous earth (SiO ₂)** | 0.00 | 2.08 | 4.15 | 2.25 |
| Proximate composition | | | | |
| Dry matter (% DM) | 89.7 | 88.6 | 89.5 | 86.4 |
| Crude protein (N × 6.25; % DM) | 43.7 | 43.8 | 44.2 | 44.9 |
| Lipids (% DM) | 12.4 | 13.0 | 12.2 | 8.0 |
| Total fibre (% DM) | 6.9 | 5.2 | 3.3 | 1.0 |
| Ash (% DM) | 15.5 | 15.1 | 14.3 | 15.0 |
| Calculated gross energy (kJ g ⁻¹ DM) | 15.6 | 16.1 | 16.4 | 15.8 |

*Commercial shrimp head meal (44.3% crude protein (c.p.); 5.8% lipid).

†Purchased from Alimentos S.A. (Guayaquil, Ecuador).

‡Produced by steam dry method (60.7% c.p.; 10.5% lipid); Polar (Salango, Ecuador).

§Processed in the laboratory by liophilized from commercial frozen baby squid *Loligo* sp. (61.7% c.p.; 10.1% lipid).

¶Wheat gluten (WG)/barley-based fermented grains (BFG) ratio of 0.4 in mixture except for diet A (0% BFG).

||WG contained 80.5% c.p.; 5.5% lipid.

**Purchased from Sigma Chemical.

††BFG contained 31.9% c.p.; 11.5% lipid; 4.5% fibre; 4.0% ash; 50.2% carbohydrate. The Cervecería Nacional del Ecuador, Guayaquil, Ecuador.

‡‡Defatted soybean meal (54.8% c.p.; 4.8% lipid).

§§Provided by Aristes (Wilton, USA).

¶||mg 100 g⁻¹ diet: *p*-aminobenzoic acid, 10; thiamin-HCl, 12; riboflavin, 20; pyridoxine-HCl, 12; choline chloride, 250; nicotinic acid, 75; calcium pantothenate, 50; inositol, 200; biotin, 0.5; folic acid, 1.5; ascorbic acid, 10; menadione, 4; α-tocopherol acetate, 40; cyanocobalamin, 0.03; cholecalciferol, 0.03; β-carotene, 1.15 × 10⁻³.

|||mg 100 g⁻¹ diet: calcium phosphate monobasic, 272; calcium lactate, 640.2; ferric citrate, 60; magnesium sulphate heptahydrate, 274; potassium phosphate, 480; sodium phosphate monobasic, 174; sodium chloride, 86; aluminium chloride, 0.4; potassium iodide, 0.3; cuprous chloride, 0.2; manganous sulphate monohydrate, 1.6; cobalt chloride hexahydrate, 2.1; zinc sulphate heptahydrate, 7.1; sodium selenite, 2.

***Purchased from Sumesa S.A. (Guayaquil, Ecuador).

The energy content of the diets was adjusted by varying corn starch and cod liver oil using physiological values for calculating the energy level (Lim 1997). Chromic oxide was included in the diets at a level of 1% as inert marker to evaluate dry matter (ADMD), protein (APD) and carbohydrate (ACD) digestibility.

Once all of the dry ingredients were mixed by hand, soy lecithin and oil were added. Finally, water was added gradually (400–500 mL kg⁻¹) until the resulting dough could be easily extruded. The moist mixture was extruded in a 2-mm diameter die of a meat mincer. The 'spaghetti-like' strands 5–10-cm long were dried in a fan-ventilated oven at 60 °C for 2 h. After drying, strands were broken up into pellets of about 1-cm length, packed in sealed plastic bags and then stored at –10 °C until use.

Analytical methods

Feed ingredients and diets were milled to fine powder (300 µm) and their proximate compositions were analysed according to standard laboratory procedures (AOAC 1990). Dry matter was calculated from weight loss after drying in an oven at 135 °C for 2 h; ash was determined after ignition of the samples at 550 °C for 4 h in a muffle furnace; crude protein (%N × 6.25) was measured using Kjeldahl method after acid digestion; crude fibre content was determined using Weende method on Fibermatic system (Mitamura Riken®, Tokyo, Japan). Total lipid was determined by a modification of the Folch method (Folch, Lees & Sloane-Stanley 1957).

For determination of APD, ACD and ADMD, protein content of faeces and diets was measured according to the procedure described by Foster and Gabbot (1971). Carbohydrate and chromic oxide were analysed in five replicates of the diets and faeces according to Nelson (1944) and McGinnis and Kasting (1964) respectively.

The hepatopancreas were weighed and homogenized in 1.5-mL deionized water. Homogenates were centrifuged for 5 min at 28 600 g and 4 °C and the supernatants free of the lipid layer were stored in 1-mL Eppendorf tubes at –20 °C until analysis. Amylase activity was determined using the method of Rick and Stegbauer (1984). Enzyme activity was expressed as units per milligram soluble protein (U mg⁻¹). Total soluble protein and glycogen were measured based on the methods described by Lowry, Rosebrough, Farr and Randall (1951) and Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers and Smith (1956) using bovine

serum albumin and glucose as standards respectively. All analyses were carried out in triplicate, except for digestibility analyses.

All data are presented as the mean values ± SE. The Anderson–Darling test was used to check for normality. Bartlett's test for homogeneity of variance was employed with α = 0.05 (Zar 1999). Analysis of variance and, when pertinent, *a posteriori* Fisher's pairwise comparisons were used to identify differences at the 0.05 probability level. Correlations were determined using linear regression analysis. Percent composition data was transformed to arcsine prior to analysis.

Results

The amount of uneaten food was positively ($r^2 = 0.57$, $P < 0.001$) related to the level of substitution of MAP in the diets (Fig. 1). Shrimp fed diets C and D showed a significantly ($P < 0.05$) lower consumption than those fed diet A, whereas there was no significant difference between diets A and B or between diets C and D.

At the end of the 45-day growth trial, there were no significant differences ($P > 0.05$) among survival rates of the different dietary treatments (>96%). The incremental increase in BFG–WG in diets produced a significant decrease ($P < 0.05$) in the final biomass (Table 2). Diets C and D yielded the lowest biomass gain in comparison with diets A and B. No significant difference ($P > 0.05$) was found in growth performance between shrimps fed diet B and the control diet (Table 2). Shrimp fed diet D containing no MAP showed the worst growth.

In this study, the APD and ADMD varied from 82.5% to 90.0% and from 69.1% to 78.8% respective-

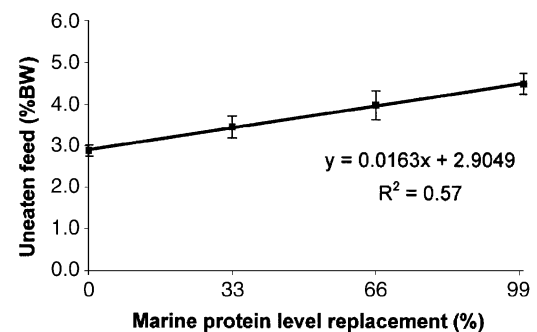


Figure 1 Relationship between the amount of non-consumed feed and the level of marine protein substitution in diets evaluated in juvenile *Litopenaeus vannamei* feeding experiment. Means ± SE.

Table 2 Physiological response observed in *Litopenaeus vannamei* fed with diets evaluated in this study for 6 weeks*

| Diets | Marine protein level replacement (%) | | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|--------------|
| | 0 | 33 | 66 | 100 |
| Weight gain (%)† | 256.8 ± 20.0a | 244.1 ± 23.5a | 192.7 ± 17.7b | 116.9 ± 3.2b |
| Survival (%) | 96a | 96a | 100a | 96a |
| Biomass (g) | 182.9a | 174.9a | 154.7b | 113.4b |
| FCR‡ | 2.3 ± 0.3a | 2.5 ± 0.2a | 3.0 ± 0.3a | 4.6 ± 0.4b |
| PER§ | 1.0 ± 0.1a | 0.9 ± 0.1a | 0.8 ± 0.1a | 0.5 ± 0.1b |
| Protein¶ | 315 ± 63.5a | 333 ± 43.4a | 453 ± 46.9b | 548 ± 61.7c |
| Glycogen¶¶ | 2.7 ± 0.4a | 2.1 ± 0.5a | 4.7 ± 0.7b | 5.2 ± 1.1b |
| HSI (%) | 4.1 ± 0.2a | 4.2 ± 0.3a | 4.5 ± 0.4a | 4.1 ± 0.3a |
| Amylase (U mg ⁻¹) | 10 ± 0.9a | 65 ± 8.5b | 77 ± 9.8bc | 97 ± 12.5c |

*Means ± SE in the same row not sharing a common letter were significantly different ($P < 0.05$).

†Weight gain (%) = (final weight – initial weight)/initial weight × 100.

‡Feed conversion ratio (FCR) = dry feed fed (g)/wet weight gain (g).

§Protein efficiency ratio (PER) = wet weight gain (g)/protein consumed (g).

¶Expressed as mg g⁻¹ hepatopancreas.

||Hepatosomatic index (HSI) = [hepatopancreas wet weight (g)/shrimp wet weight (g)] × 100.

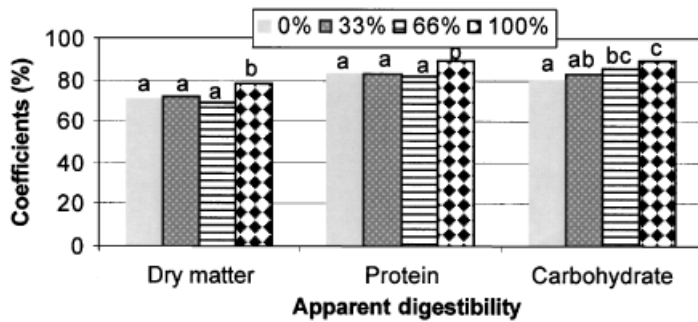


Figure 2 Apparent digestibility coefficients (%) for dry matter, crude protein and carbohydrate in diets containing different levels of marine animal protein replacement (0%, 33%, 66% and 100%). Mean values within the same group of bars followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

ly (Fig. 2). The diet with total substitution of MAP had a significantly ($P < 0.05$) higher digestibility when compared with the other diets. The digestibility of diets B and C were not significantly different from the control diet. The inclusion of BFG–WG had a significantly positive effect on ACD, since this was directly correlated with the substitution level of MAP in the rank of 0–100% (coefficient of Pearson correlation, 0.75, $P < 0.001$). Apparent carbohydrate digestibility in control diet A was significantly lower as compared with diets C and D containing 66% and 100% of replacement (Fig. 2).

A significant ($P < 0.05$) stimulation of amylase activity and soluble protein and glycogen concentrations in the hepatopancreas was related to replacement level of MAP (Table 2). An increase from 33% to 100% in the substitution level of dietary MAP increased substantially amylase specific activity (seven to nine times) in juvenile *L. vannamei*, compared with values reached in shrimps fed with control diet. Shrimp fed diet D showed the highest value of protein

concentration (548 mg g⁻¹ hepatopancreas), while no differences were observed between A and B diets. The glycogen content in the hepatopancreas of dietary treatments A and B was lower than diets C and D. This difference was at least 2 µg g⁻¹ hepatopancreas. Similarly, an increase in the HSI in relation to decrease of the MAP was observed, although significant differences were not found ($P > 0.05$) among evaluated diets.

Feed conversion ratio and protein efficiency ratio of diets containing between 0% and 66% of replacement were not significantly different ($P > 0.05$) (Table 2).

Discussion

The present study shows that a replacement more than 33% of MAP in shrimp feed adversely affect feed intake. This response seems to be related to a decrease in palatability of the feed as MAP is replaced with BFG–WG. Dietary inclusion levels of up to a maximum of 20% of WG has been suggested for penaeid

shrimp, its use being limited by cost rather than palatability (Tacon & Akiyama 1997). In the present study, dietary WG content (3–17%) was below the maximum recommended level. On the contrary, it has been reported that malt flour, obtained from the by-product of beer distillation, was not palatable for trout *Oncorhynchus mykiss* (Yamamoto, Marcouli, Unuma & Akiyama 1994). Yamamoto, Unuma, Akiyama and Kishi (1996) also noted that high inclusion levels of malt protein flour in the diet decreased the rate of feed consumption in red sea bream *Pagrus major*. The effect of BFG on diet palatability by *L. vannamei* has not previously been reported in the literature, but certain ingredients as beer yeast present in brewery by-products have been mentioned as having a repellent effect to fish (Métailler & Guillaume 2001). However, Kohler and Krueger (1985) indicated that BFG was a food source for freshwater prawn *M. rosenbergii* in pond culture and served as substrate for other organisms. However, this does not imply that BFG was the primary source of nutrients.

The body weight gain in the shrimp followed the trend of feed intake and decreased gradually with a decrease in MAP concentration of feed. The reductions in growth observed in experiments where fish meal or other MAP were replaced by alternative protein sources have been attributed to anti-nutritive factors and inadequate amino acid and mineral balance of tested sources (Lim & Dominy 1991). Barley-based fermented grains is constituted mainly of germinated barley which is known to be deficient in the essential amino acid lysine (Akiyama, Unuma, Yamamoto, Marcouli & Kishi 1995), like malt. Distillers grains with solubles have been shown to be a good diet ingredient for channel catfish at levels up to 30–40% of the diet without lysine supplementation (Webster, Tidwell & Yancey 1991; Webster, Tidwell, Goodgame & Johnsen 1993). Nevertheless, Webster and colleagues (1992) noted that channel catfish receiving a diet containing 0% fish meal and 35% distillers grains with solubles, but supplemented with lysine, showed improved weight gain. The inconsistency among these findings could be attributed to the trials being carried out in ponds where natural biota may have supplemented any amino acids imbalance in diets tested, whereas Webster and colleagues (1992) conducted their feeding experiment in aquaria. Since lysine is also the first limiting amino acid in WG (Akiyama *et al.* 1989), it is reasonable to assume that the replacement of MAP with BFG–WG under isonitrogenous and isocaloric conditions had also a negative effect on weight gain due to deficiency of

lysine or other amino acids in the diet. This fact can be inferred comparing results between diets B and C where there was no difference in feed intake but there was a difference in growth. Hence, the optimal supplementation of lysine and eventually other essential amino acids must be considered in future studies with shrimp.

Numerous investigations have demonstrated that utilization of dietary carbohydrates by shrimp varies with starch complexity and processing of the carbohydrate (Shiau & Peng 1992; Glass & Stark 1995). The brewing beer process involves two main steps, that is, mashing and yeast fermentation. During mashing starch is converted into dextrin, maltose and glucose, which are considered as soluble carbohydrates. In the present investigation, the ACD seemed to be related to a greater availability of soluble carbohydrates present in BFG (50%) as the level of this ingredient increased in the diet. Romero (1999) found an increase in ACD with the progressive inclusion of gelatinized cassava starch in isonitrogenous diets for *L. vannamei*. Apparently, the use of processed starch for gelatinization improves not only carbohydrate digestibility but also dry matter and energy digestibilities for marine shrimps (Davis & Arnold 1995) and some fish (Bergot & Bresque 1983).

The dietary fibre level decreased as MAP was replaced. This was attributed to a reduction in the amount of dietary shrimp head meal, which is rich in chitin (Akiyama *et al.* 1989). Akiyama and colleagues (1989) found that the high chitin or fibre contents (88%) in diets decreases the APD in *L. vannamei*. In this study, that finding is unlikely to apply as the differences in fibre content between control diet A and the other diets (6.9% vs. 1.0–5.2%) were not large. Our result is consistent with the results of Sudaryono, Tsvetnenko and Evans (1996) who concluded that changes in fibre content of *Penaeus monodon* diets did not appear to cause a change in APD. The highest APD obtained for diet D may be attributable to the greater inclusion level of WG. Wheat gluten is one of the most digestible protein sources (98%) among feedstuffs evaluated for *L. vannamei* (Akiyama *et al.* 1989). A protein:carbohydrate interaction could also explain observed increased digestibility of diet D, as reported by Romero (1999) for *L. vannamei*. Under these circumstances, clear conclusions for the observed increase in protein digestion cannot be made.

The higher amylase activity in shrimps fed diets containing BFG could also be a consequence of soluble carbohydrate content (50%) present in BFG unlike WG (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA),

which may have stimulated α -amylase secretion as described previously by Romero (1999). Glass and Stark (1995) demonstrated by means of digestibility *in vitro* that micronized and cooked grains are more susceptible to amylolytic attack than non-treated crude starch grains. Rosas, Cuzon, Gaxiola, Arena, Lemaire, Soyez and Van Wormhoudt (2000) also observed that increasing carbohydrate level from 1% to 33% in diet, resulted in a stimulation of α -amylase and α -glucosidase activities in the hepatopancreas of *Litopenaeus stylirostris*.

Evidence for an enhanced glycogen content in shrimp hepatopancreas with BFG–WG treatments suggested improved absorption and assimilation of glucose from the carbohydrate component in these diets. This was more evident at diets C and D as compared with the hepatopancreatic glycogen measured in the control group. Shrimp fasted for 15 h prior to the hepatopancreas extraction showed a noticeable glycogen deposition close to 6 mg g^{-1} hepatopancreas in those fed diets C and D. This result is comparable with the level of $4.3\text{--}6.9 \text{ mg g}^{-1}$ found in *L. stylirostris* (Rosas *et al.* 2000). These authors reported a maximum glycogen storage capacity with 21% dietary carbohydrates for *L. stylirostris* and 23% carbohydrates in diet for *L. setiferus* and *L. vannamei*. A saturation degree may explain the limited capacity of penaeids to store and digest dietary carbohydrates. Changes in the shrimps hepatopancreas weight have been attributed to variations in glycogen deposition (Gibson & Barker 1979). No significant effect was observed in the present study for any dietary treatments on the HSI, probably due to the high data variability observed.

Conclusions and recommendations

1. Substitution of the MAP up to 33% did not alter growth performance or feed utilization compared with the control diet.
2. These results suggest that if amino acid balance and palatability can be improved, the dietary level of MAP could be replaced up to 66% without lowering performance of shrimp grown in the absence of natural biota.
3. The Cervecería Nacional del Ecuador produces daily around 50 m^3 containing 750 kg of protein. This amount is sufficient to produce approximately 5000 tonnes of feed containing 44% protein with 16% of BFG for 330 days.
4. The experiment should be repeated under pond conditions.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Stanislaus Sonnenholzner for English corrections and Dr Patrick Sorgeloos and Dr David Smith for constructive comments on the paper. We would also like to thank Yela Paredes for her kind support and Ma. Elena Solórzano for her technical assistance. Special thanks to the Cervecería Nacional del Ecuador for providing the fermented grain.

References

- Akiyama D.M. (1991) Soybean meal utilization by marine shrimp. In: *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop*. (ed. by D.M. Akiyama & R.K.H. Tan), pp 207–225. American Soybean Association, Singapore, September 19–25.
- Akiyama D.M., Coelho S.R., Lawrence A.L. & Robinson E.H. (1989) Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* BOONE. *Nippon Suisan Gakkaishi* **55**, 91–98.
- Akiyama T., Unuma T., Yamamoto T., Marcouli P. & Kishi S. (1995) Combinational use of malt protein flour and soybean meal as alternative protein sources of fish meal in fingerling rainbow trout diets. *Fisheries Science* **61**, 828–832.
- AOAC (1990) *Official Methods of Analysis*, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 1298pp.
- Bergot F. & Bresque J. (1983) Digestibility of starch by rainbow trout: effects of physical state of starch and of the intake level. *Aquaculture* **34**, 203–212.
- Cruz-Suarez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., McCallum I.M. & Hickling D. (2001) Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* **196**, 87–104.
- Davis D.A. & Arnold C.R. (1995) Effects of two extrusion processing conditions on the digestibility of four cereal grains for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **133**, 287–294.
- Davis A.D. & Arnold C.R. (2000) Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **185**, 291–298.
- Dominy W.G. & Ako H. (1988) The utilization of blood meal as a protein ingredient in the diet of the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **70**, 280–299.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. & Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350–356.
- Eusebio P.S. (1991) Effect of dehulling on the nutritive value of some leguminous seeds as protein sources for juvenile tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **99**, 297–308.
- FAO (1999) Aquaculture production statistics 1988–1997. Fisheries Circular, No 815, Revision 11: Rome, Italy, 203pp.
- Folch J., Lees M. & Sloane-Stanley G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids

- from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 497–509.
- Foster J.R. & Gabbot P.A. (1971) The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* **51**, 943–961.
- Gibson O. & Barker P.L. (1979) The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology Annual Reviews* **17**, 285–346.
- Glass H.J. & Stark J.R. (1995) Carbohydrate digestion in the European lobster *Homarus gammarus* (L.). *Journal of Crustacean Biology* **15**, 424–433.
- Kohler C. & Krueger S. (1985) Use of pressed brewer's grain as feed for freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of the World Mariculture Society* **16**, 181–182.
- Lee W.J., Sosulski W.F. & Sokhansanj S. (1991) Yield and composition of soluble and insoluble fractions from corn and wheat stillages. *Cereal Chemistry* **68**, 559–562.
- Le Moullac G., Klein B., Sellos D. & Van Wormhoudt A. (1997) Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **208**, 107–125.
- Lim C. (1996) Substitution of cottonseed meal for marine animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* **27**, 402–409.
- Lim C. (1997) Replacement of marine animal protein with peanut meal in diets for juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture* **7**, 67–78.
- Lim C. & Dominy W. (1991) Utilization of plant proteins by warm water fish. In: *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop* (ed. by D.M. Akiyama & R.K.H. Tan), pp. 163–172. American Soybean Association, Singapore, September 19–25.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin–phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265–275.
- McGinnis A.J. & Kasting R. (1964) Colorimetric analysis of chromic oxide to study food utilization and consumption of food by phytophagous insects. *Agricultural and Food Chemistry* **12**, 259–262.
- Métailler R. & Guillaume J. (2001) Raw materials and additives used in fish foods. In: *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans* (ed. by J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot & R. Métailler), pp. 281–296. Springer-Praxis, Cornwall, UK.
- Nelson N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry* **153**, 375–381.
- Peñaflorida V.D. (1995) Growth and survival of juvenile tiger shrimp fed diets where fish meal is partially replaced with papaya (*Carica papaya* L.) or camote (*Ipomea batatas* Lam.) leaf meal. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **47**, 25–33.
- Rick W. & Stegbauer H.P. (1984) Alfa-amylase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 5 (ed. by H.U. Bergmeyer & M. Grab), pp. 885–889. Chemie Verlag, Weinheim, Germany, Academia Press, New York, USA.
- Romero I. (1999) *Efecto del balance proteína/energía en dietas para camarones juveniles Litopenaeus vannamei*. BSc thesis, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Santafé de Bogotá, Colombia, 55pp.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Arena L., Lemaire P., Soyez C. & Van Wormhoudt A. (2000) Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **249**, 181–198.
- Shiau S.Y. & Peng C.Y. (1992) Utilization of different carbohydrates at different dietary levels in grass prawn *Penaeus monodon*, reared in seawater. *Aquaculture* **101**, 241–250.
- Sudaryono A., Hoxey M.J., Kailis S.G. & Evans L.H. (1995) Investigation of alternative protein sources in practical its for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **134**, 313–323.
- Sudaryono A., Tsvetnenko E. & Evans L.H. (1996) Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Pendaeus monodon*. *Aquaculture* **143**, 331–340.
- Tacon A.G.J. & Akiyama D.M. (1997) Feed ingredients. In: *Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture*, Vol. 6 (ed. by L.R. D'Abramo, D.E. Conkklín & D.M. Akiyama), pp. 411–472. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Tidwell J.H., Webster C.D., Yancey D.H. & D'Abramo L.R. (1993) Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and distillers' by-products in diets for pond culture of the freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture* **118**, 119–130.
- Treece G. (2000) Shrimp culture. In: *Encyclopedia of Aquaculture* (ed. by R.R. Stickney), pp. 798–868. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Webster C.D., Tidwell J.H. & Yancey D.H. (1991) Evaluation of distiller's grains with solubles as a protein source in diets for channel catfish. *Aquaculture* **96**, 179–190.
- Webster C.D., Tidwell J.H., Goodgame L.S., Yancey D.H. & Mackey L. (1992) Use of soybean meal and distillers grains with solubles as partial or total replacement of fish meal in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* **106**, 301–309.
- Webster C.D., Tidwell J.H., Goodgame L.S. & Johnsen P.B. (1993) Growth, body composition, and organoleptic evaluation of channel catfish fed diets containing different percentages of distillers' grains with solubles. *The Progressive Fish-Culturist* **55**, 95–100.
- Wu Y.V. (1986) Fractionation and characterization of protein-rich material from barley after alcohol distillation. *Cereal Chemistry* **63**, 142–145.
- Yamamoto T., Marcouli P.A., Unuma T. & Akiyama T. (1994) Utilization of malt protein flour in fingerling rainbow trout diets. *Fisheries Science* **60**, 455–460.
- Yamamoto T., Unuma T., Akiyama T. & Kishi S. (1996) Utilization of malt protein flour in the diets for fingerling red sea bream. *Fisheries Science* **62**, 59–63.
- Zar J.H. (1999) *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Prentice-Hall, New Jersey, USA, 663pp.

Importancia del ciclo de muda y del horario de alimentación en el cultivo del *Litopenaeus vannamei*

El conocimiento de una sincronización de la muda de los camarones en sistemas de cultivo comerciales y una probable correlación con el ciclo lunar, puede ayudar a simplificar el suministro de alimento, con el consecuente ahorro que implica el no proporcionar nutrientes en etapas de menor consumo.

*César Molina, Eduardo Costero, Fermín Ordoñez**

El éxito en el cultivo de camarón depende en gran parte de una adecuada nutrición y un buen manejo del alimento. La alimentación en las piscinas camaroneras está basada, en su mayoría, en tablas para calcular las raciones diarias a partir de un porcentaje de la biomasa y del peso promedio de los camarones presentes en el estiaque, las cuales no consideran ni los hábitos de alimentación ni el estado fisiológico por el que atraviesa el camarón. Además, en crustáceos se ha encontrado que fenómenos biológicos como secreción de enzimas digestivas y actividad alimenticia ocurren rítmicamente alrededor de la misma hora (ritmo circadiano).

Por lo tanto, es relevante encontrar estrategias de alimentación que permitan disminuir los gastos generados por éste rubro e incrementar la producción en camaronicultura.

ESTUDIOS REALIZADOS

Tasa de ingestión y actividad enzimática

Durante el período de estudio se pudo observar una ritmicidad lunar con el ciclo de muda, encontrándose cerca de la mitad de

la población de camarones mudada en cuarto menguante, alcanzado el pico máximo en luna nueva (80%) durante los primeros cinco días de quiebra (marea baja) y agüaje (marea alta), respectivamente.

Después de determinar la tasa de ingestión durante tres ciclos de muda (A y B son etapas de Post-muda; C es de Intermedia y Do, D1, D2 y D3 son de Premuda), se pudo establecer una disminución de alrededor de 18% en el consumo de alimento en la etapa previa posterior a la muda (D3-A). En el presente estudio, los estadios B, C y Do, que presentaron la mayor actividad específica de proteasa (Figura 1) coincidieron con la etapa donde el camarón consume más alimento. Las mayores actividades específicas de amilasa y lipasa se presentaron en Do y D2, y la menor en D3 durante el ciclo de muda.

Figura 1. Actividades específicas de proteasa, lipasa y amilasa por ciclo de muda en el juvenil *L. vannamei*, donde A y B son etapas de Post-muda; C es etapa de Intermedia; Do, D1, D2 y D3 son etapas de Premuda.

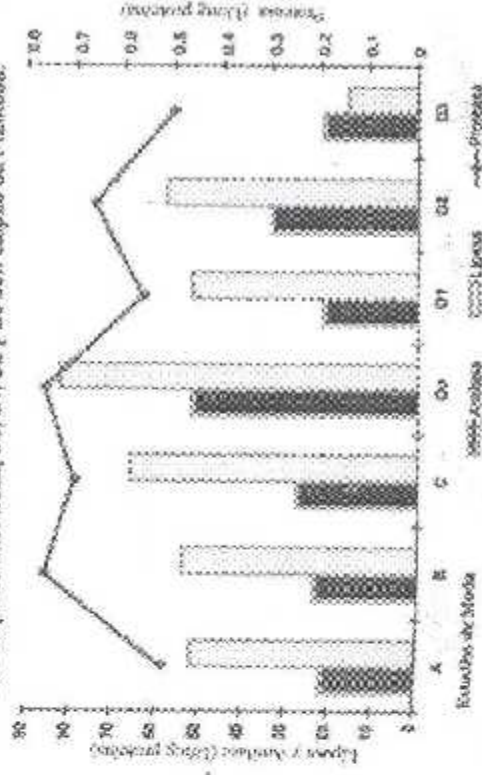


Tabla 1. Valores promedio (± error estándar) enzimáticos después de ocho semanas de alimentación a juveniles *L. vannamei*.

| Determinaciones | Tabla de alimentación | Enz. amilasa | Enz. lipasa |
|------------------------------------|-----------------------|--------------|-------------|
| Peso promedio (mg/g) | 125±2.04 | 1.26±0.11 | 1.60±0.10 |
| Peso promedio (mg/g) | 275±2.24 | 4.87±0.20 | 4.87±0.10 |
| Biomasa (mg/g) | 92.45±3.24 | 12.46±0.71 | 13.06±0.71 |
| Biomasa (mg/g) | 11.26±0.77 | 21.71±0.79 | 23.99±1.03 |
| Supervivencia (%) | 75.8±2.6 | 81.25±0.21 | 80.37±0.28 |
| Factor de conversión alimenticia | 3.12±0.12 | 3.49±0.10 | 3.26±0.10 |
| Tasa de Eficiencia proteica (%) | 0.33±0.02 | 0.21±0.01 | 0.26±0.01 |
| Tasa de crecimiento específico (%) | 1.75±0.15 | 1.88±0.14 | 1.94±0.13 |

Porcentaje de error estándar de una muestra de 100 peces distribuidos en tres repeticiones.

Las tres enzimas evaluadas muestran dos picos de actividad enzimática, el primero es considerado como una respuesta al estímulo alimenticio, en este caso una denominada enzima digestiva se expresará en mayor o menor grado dependiendo de la cantidad y origen de los nutrientes. En tanto que el segundo pico puede ser atribuido principalmente a una estimulación endocrina de la síntesis de enzimas digestivas, por la alta producción de ecdisteroides observados en Premuda D2 para la mayoría de especies de crustáceos decápodos, entre esas el *L. vannamei*.

Una mayor acumulación de glicógeno se observó, a excepción de D2 desde el estadio I3 hasta A, en parte por el consumo de almidón y además, probablemente por la reabsorción de la quitina presente en el viejo exosqueleto.

La mayor cantidad de alimento consumido equivalente al 1.3 y 1.0% de la biomasa fue observado a las 12h y 14h, respectivamente disminuyéndose gradualmente hasta alcanzar el 0.1% a las 24h e incrementándose a partir de las 30h. Este patrón es similar al ritmo circadiano biológico de las tres enzimas analizadas (amilasa, lipasa y lipasa), cuando los camarones fueron sometidos a las 12h y 30h. En este caso, la mayor actividad específica de las enzimas citadas se produjo a las 14h, con un segundo pico de menor intensidad alrededor de las 30h.

Este comportamiento biológico, pero menor en actividad enzimática, fue también observado en el horario de 10h y 18h ensayados en la presente investigación. En tanto que los animales que fueron alimentados a las 14h y 22h no presentaron picos enzimáticos definidos. Esta diferencia en respuestas de las enzimas digestivas indica el efecto que tienen las horas de alimentación, es decir, el estímulo alimenticio, sobre la aparición del pico enzimático. Estos resultados sugieren alimentar en mayor proporción a las 12h, que es cuando se produce la mayor ingestión del alimento seguida por la mayor actividad de las tres enzimas digestivas estudiadas, y el segundo pico enzimático observado entregar la segunda ración a las 30h.

Tabla 2. Valores promedio (± error estándar) obtenidos después de ocho semanas de alimentación en diferentes horarios a juveniles *L. vannamei*.

| Determinaciones | 08h y 16h | 10h y 18h | 12h y 20h | 04h y 20h |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Peso promedio (mg/g) | 1.99±0.21 | 1.36±0.10 | 1.09±0.07 | 1.05±0.06 |
| Peso promedio (mg/g) | 6.03±0.21 | 6.71±0.20 | 4.81±0.21 | 6.06±0.20 |
| Biomasa (mg/g) | 5.74±0.28 | 5.20±0.24 | 4.75±0.17 | 5.22±0.08 |
| Biomasa (mg/g) | 45.30±1.27 | 45.24±1.30 | 28.15±0.93 | 47.02±0.30 |
| Supervivencia (%) | 72.6±0.26 | 87.6±0.14 | 90.8±0.04 | 81.2±0.38 |
| Factor de conv. ali. | 2.12±0.19 | 2.29±0.20 | 1.99±0.10 | 2.29±0.19 |
| Tasa de eficiencia proteica | 1.19±0.07 | 1.12±0.04 | 1.24±0.05 | 1.09±0.05 |
| Tasa de crecim. esp. (%) | 3.05±0.07 | 3.05±0.07 | 3.17±0.07 | 3.09±0.04 |

Porcentaje de error estándar de una muestra de 100 peces distribuidos en tres repeticiones.

Crecimiento y supervivencia

Entre los tres raciones alimenticias evaluadas (tabla de alimentación, 6% de la biomasa y de acuerdo al estado de muda), no se encontró diferencias en términos de biomasa ganada (Tabla 1). En cuanto a los horarios de alimentación estudiados, a pesar de que se encontró una mayor actividad enzimática y biomasa ganada de manera significativa en los camarones alimentados a las 12h y 30h no se observó esta misma respuesta a nivel de peso final (Tabla 2), esto pudo ser debido a que la segunda ración fue suministrada varias horas antes de que se produjera el segundo pico de mayor actividad enzimática.

Un aumento progresivo de la supervivencia (del 3 al 11%), fue observado a medida que el alimento fue suplido en raciones sucesivas al ciclo de muda y al horario de alimentación (Tabla 1 y 2). La causa fisiológica para este incremento de supervivencia no es conocida, pero puede ser relacionado a que el suministro de alimento, en cantidades ajustadas a la capacidad de ingestión del camarón, promueve un mejor aprovechamiento del alimento. Esto es posible ya que el camarón está recibiendo nutrientes en los momentos de mayor actividad enzimática y en los momentos de muda u horas de mayor consumo de alimento, tal como lo evidenciado por la mejor conversión alimenticia y eficiencia productiva obtenida en este trabajo (Tabla 1 y 2).

Conclusiones

El conocimiento de una sincronización de la muda de los camarones en sistemas de cultivo convencionales y una probable correlación con el ciclo lunar, puede ayudar a simplificar el suministro de alimento, con el consiguiente ahorro que implica el no proporcionar nutrientes en etapas de menor consumo.

El establecer el momento del día en que el camarón se encuentra fisiológicamente preparado para aprovechar el alimento que se le está suministrando es un importante aspecto que no siempre es considerado. Razón por la cual el uso frecuente de alimentación cercana a los picos de actividad enzimática y en cantidades acordes, permitirían obtener un máximo aprovechamiento del alimento, disminuir el tiempo de exposición del alimento al agua, evitando así la consiguiente pérdida de nutrientes por lixiviación y estabilidad física del balanceado. Así también, podría optimizarse el uso de alimentos medicados (cuando éstos son requeridos por el desarrollo de alguna patología), suministrándolos en el momento que más pronto van a ser aprovechados por los animales, evitando además los efectos colaterales que trae el recargar el sistema de residuos de drogas terapéuticas y alimentos no consumidos.

*Citar según: *Revista de Nutrición*

Unión Nacional de Escuelas e Investigaciones Científicas "Eduardo Arosemena" (UNECI) Campus Población, P.O. Box 09-01-4570, Guayaquil, Ecuador. Tel: (593-4)916132 Fax: (593-4)781129 Email: unecia@unecia.espol.edu.ec

Edwards Castro Facultad de Medicina y Ciencias del Deporte, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Población, P.O. Box 09-01-4570, Guayaquil, Ecuador.

Fernán Orjuela

Facultad de Agronomía, Horticultura y Acuicultura, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

† Correspondencia

Información originalmente publicada en el libro científico "Avances en Nutrición Acuática", V. Memorias del Quinto Simposio Internacional de Nutrición Acuática, 13-21 de noviembre, Mérida, Yucatán, Ed. Cruz-Salazar L.E., Ricardo-María R., Tapia Salazar M., Rivera-Villanova S.A., y Chirra-Carreón R. ISBN: 978-694-52-8, publicado por la CAZL.

Importancia del ciclo de muda y del horario de alimentación en el cultivo del *Litopenaeus vannamei*

El conocimiento de una sincronización de la muda de los camarones en sistemas de cultivo comerciales y una probable correlación con el ciclo lunar, puede ayudar a simplificar el suministro de alimento, con el consecuente ahorro que implica el no proporcionar nutrientes en etapas de menor consumo.

*César Molina, Eduardo Costero, Fermín Ordoñez**

El éxito en el cultivo de camarón depende en gran parte de una adecuada nutrición y un buen manejo del alimento. La alimentación en las piscinas camaroneras está basada, en su mayoría, en tablas para calcular las raciones diarias a partir de un porcentaje de la biomasa y del peso promedio de los camarones presentes en el estiaque, las cuales no consideran ni los hábitos de alimentación ni el estado fisiológico por el que atraviesa el camarón. Además, en crustáceos se ha encontrado que fenómenos biológicos como secreción de enzimas digestivas y actividad alimenticia ocurren rítmicamente alrededor de la misma hora (ritmo circadiano).

Por lo tanto, es relevante encontrar estrategias de alimentación que permitan disminuir los gastos generados por éste rubro e incrementar la producción en camaronicultura.

ESTUDIOS REALIZADOS

Tasa de ingestión y actividad enzimática

Durante el período de estudio se pudo observar una ritmicidad lunar con el ciclo de muda, encontrándose cerca de la mitad de

la población de camarones mudada en cuarto menguante, alcanzado el pico máximo en luna nueva (80%) durante los primeros cinco días de quiebra (marea baja) y agüaje (marea alta), respectivamente.

Después de determinar la tasa de ingestión durante tres ciclos de muda (A y B son etapas de Post-muda; C es de Intermedia y Do, D1, D2 y D3 son de Premuda), se pudo establecer una disminución de alrededor de 18% en el consumo de alimento en la etapa previa posterior a la muda (D3-A). En el presente estudio, los estadios B, C y Do, que presentaron la mayor actividad específica de proteasa (Figura 1) coincidieron con la etapa donde el camarón consume más alimento. Las mayores actividades específicas de amilasa y lipasa se presentaron en Do y D2, y la menor en D3 durante el ciclo de muda.

Figura 1. Actividades específicas de proteasa, lipasa y amilasa por ciclo de muda en el juvenil *L. vannamei*, donde A y B son etapas de Post-muda; C es etapa de Intermedia; Do, D1, D2 y D3 son etapas de Premuda.

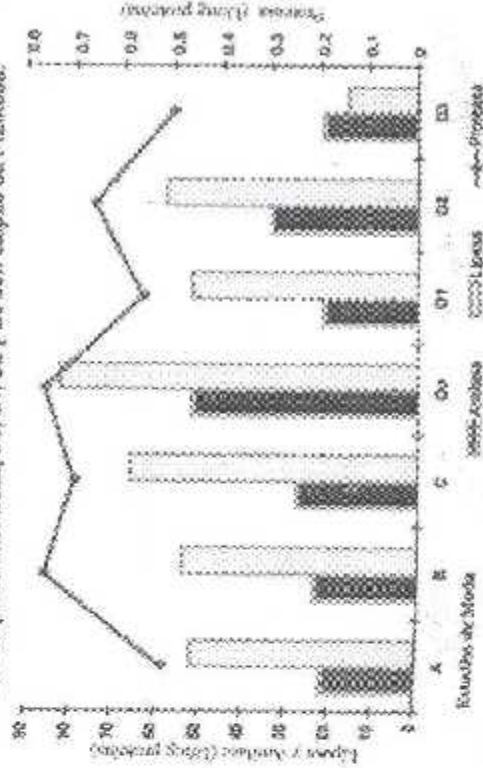


Tabla 1. Valores promedio (± error estándar) enzimáticos después de ocho semanas de alimentación a juveniles *L. vannamei*.

| Determinaciones | Tabla de alimentación | Enz. amilasa | Enz. lipasa |
|------------------------------------|-----------------------|--------------|-------------|
| Peso promedio (mg/g) | 125±2.04 | 1.26±0.11 | 1.60±0.10 |
| Peso promedio (mg/g) | 275±2.24 | 4.37±0.20 | 4.37±0.10 |
| Biomasa (mg/g) | 9245±3.34 | 12.46±0.11 | 13.06±0.11 |
| Biomasa (mg/g) | 1126±2.77 | 21.11±0.19 | 23.99±0.19 |
| Supervivencia (%) | 75.8±2.6 | 81.25±0.21 | 82.37±0.28 |
| Factor de conversión alimenticia | 3.12±0.12 | 3.49±0.10 | 3.26±0.10 |
| Tasa de Eficiencia proteica (%) | 0.33±0.02 | 0.21±0.01 | 0.26±0.01 |
| Tasa de crecimiento específico (%) | 1.75±0.15 | 1.88±0.14 | 1.94±0.13 |

Porcentaje de agua en el peso seco de los alimentos suministrados (%)

Las tres enzimas evaluadas muestran dos picos de actividad enzimática, el primero es considerado como una respuesta al estímulo alimenticio, en este caso una denominada enzima digestiva se expresará en mayor o menor grado dependiendo de la cantidad y origen de los nutrientes. En tanto que el segundo pico puede ser atribuido principalmente a una estimulación endógena de la síntesis de enzimas digestivas, por la alta producción de ecdisteroides observados en Premuda D2 para la mayoría de especies de crustáceos decápodos, entre esas el *L. vannamei*.

Una mayor acumulación de glicógeno se observó, a excepción de D2 desde el estadio I3 hasta A, en parte por el consumo de almidón y celulosa, probablemente por la reabsorción de la quitina presente en el viejo exosqueleto.

La mayor cantidad de alimento consumido equivalente al 1.3 y 1.0% de la biomasa fue observado a las 12h y 14h, respectivamente disminuyendo gradualmente hasta alcanzar el 0.1% a las 24h e incrementándose a partir de las 30h. Este patrón es similar al ritmo circadiano biológico de las tres enzimas analizadas (proteasa, amilasa y lipasa), cuando los camarones fueron ofrecidos a las 12h y 30h. En este caso, la mayor actividad específica de las enzimas citadas se produjo a las 14h, con un segundo pico de menor intensidad alrededor de las 30h.

Este comportamiento biológico, pero menor en actividad enzimática, fue también observado en el horario de 10h y 18h ensayados en la presente investigación. En tanto que los animales que fueron alimentados a las 14h y 22h no presentaron picos enzimáticos definidos. Esta diferencia en respuestas de las enzimas digestivas indica el efecto que tienen las horas de alimentación, es decir, el estímulo alimenticio, sobre la aparición del pico enzimático. Estos resultados sugieren alimentar en mayor proporción a las 12h, que es cuando se produce la mayor ingestión del alimento seguida por la mayor actividad de las tres enzimas digestivas estudiadas, y el segundo pico enzimático inducido entregar la segunda ración a las 30h.

Tabla 2. Valores promedio (± error estándar) obtenidos después de ocho semanas de alimentación en diferentes horarios a juveniles *L. vannamei*.

| Determinaciones | 08h y 16h | 10h y 18h | 12h y 20h | 04h y 20h |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Peso promedio (mg/g) | 1.99±0.21 | 1.36±0.10 | 1.09±0.07 | 1.05±0.06 |
| Peso promedio (mg/g) | 6.03±0.21 | 6.71±0.20 | 4.81±0.21 | 6.06±0.20 |
| Biomasa (mg/g) | 5.74±0.28 | 5.20±0.14 | 4.75±0.11 | 5.22±0.08 |
| Biomasa (mg/g) | 4530±1.47 | 4524±1.50 | 2815±0.92 | 4132±0.50 |
| Supervivencia (%) | 72.6±0.26 | 87.6±0.14 | 90.8±0.04 | 81.2±0.18 |
| Factor de conv. ali. | 2.12±0.19 | 2.29±0.20 | 1.99±0.10 | 2.29±0.19 |
| Tasa de eficiencia proteica | 1.19±0.07 | 1.12±0.04 | 1.24±0.05 | 1.09±0.05 |
| Tasa de crecim. esp. (%) | 3.05±0.07 | 3.05±0.07 | 3.17±0.07 | 3.09±0.04 |

Porcentaje de agua en el peso seco de los alimentos suministrados (%)

Crecimiento y supervivencia

Entre los tres raciones alimenticias evaluadas (tabla de alimentación, 6% de la biomasa y de acuerdo al estado de muda), no se encontró diferencias en términos de biomasa ganada (Tabla 1). En cuanto a los horarios de alimentación estudiados, a pesar de que se encontró una mayor actividad enzimática y biomasa ganada de manera significativa en los camarones alimentados a las 12h y 30h no se observó esta misma respuesta a nivel de peso final (Tabla 2), esto pudo ser debido a que la segunda ración fue suministrada varias horas antes de que se produjera el segundo pico de mayor actividad enzimática.

Un aumento progresivo de la supervivencia (del 3 al 11%), fue observado a medida que el alimento fue suplido en raciones sucesivas al ciclo de muda y al horario de alimentación (Tabla 1 y 2). La causa fisiológica para este incremento de supervivencia no es conocida, pero puede ser relacionado a que el suministro de alimento, en cantidades ajustadas a la capacidad de ingestión del camarón, promueve un mejor aprovechamiento del alimento. Esto es posible ya que el camarón está recibiendo nutrientes en los momentos de mayor actividad enzimática y en los momentos de muda u horas de mayor consumo de alimento, tal como lo evidenciado por la mejor conversión alimenticia y eficiencia productiva obtenida en este trabajo (Tabla 1 y 2).

Conclusiones

El conocimiento de una sincronización de la muda de los camarones en sistemas de cultivo convencionales y una probable correlación con el ciclo lunar, puede ayudar a simplificar el suministro de alimento, con el consiguiente ahorro que implica el no proporcionar nutrientes en etapas de menor consumo.

El establecer el momento del día en que el camarón se encuentra fisiológicamente preparado para aprovechar el alimento que se le está suministrando es un importante aspecto que no siempre es considerado. Razón por la cual el uso frecuente de alimentación cercana a los picos de actividad enzimática y en cantidades acordes, permitirían obtener un máximo aprovechamiento del alimento, disminuir el tiempo de exposición del alimento al agua, evitando así la consiguiente pérdida de nutrientes por lixiviación y estabilidad física del balanceado. Así también, podría optimizarse el uso de alimentos medicados (cuando éstos son requeridos por el desarrollo de alguna patología), suministrándolos en el momento que más pronto van a ser aprovechados por los animales, evitando además los efectos colaterales que trae el recargar el sistema de residuos de drogas terapéuticas y alimentos no consumidos.

*Citar según: *Revista Científica*

Unión Nacional de Escuelas e Investigaciones Científicas "Español Arriaga 56" (UNION) Campus Politécnico, P.O. Box 09-01-4570, Guayaquil, Ecuador. Tel: (593-4)916132 Fax: (593-4)781129 Email: union@union.espol.edu.ec

Edwards Castro Facultad de Medicina y Ciencias del Deporte, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Politécnico, P.O. Box 09-01-4570, Guayaquil, Ecuador.

Fernán Orjuela

Facultad de Agronomía, Horticultura y Acuicultura, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

† Correspondencia

Información originalmente publicada en el libro científico "Avances en Nutrición Acuática", V. Memorias del Quinto Simposio Internacional de Nutrición Acuática, 13-21 de noviembre, Mérida, Yucatán, Ed. Cruz-Salazar L.E., Riqueza María R., Tapia Salazar M., Rivera-Vázquez S.A., y Chirra-Carreón R. ISBN: 970-694-52-8, publicado por la CAZL.

Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de marea.¹

César Molina^{2,3}, Eduardo Cadena³, Fermín Orellana³

¹Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, "El Algarrobo", CENAIMA, Campaña Pecuaria Prosperina, Vía perimetral Km 36.3, Cañita 09 01 4518, Guayaquil, Ecuador. Teléfono 593 4 816132 Ext. 207, Fax: 593 4 916128, ce.molina@cenaima.espol.edu.ec

²Facultad de Medicina y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Politécnico Prosperino, Vía perimetral Km 30.5, Guayaquil, Ecuador.

³Facultad de Agronomía, Veterinaria y Acuicultura, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

RESUMEN. La alimentación en aguas salinas, con luz, está asociada en el ciclo de alimentación para el cálculo de la marea. Los estudios realizados en los hábitos naturales de alimentación en el modelo fisiológico por el que se activa el caridino. En fase a, es el presente trabajo, evaluar el efecto que tiene el ritmo circadiano y el ciclo de marea sobre la actividad enzimática y su relación con el crecimiento y conversión alimenticia. Los resultados de este estudio muestran una alta relación de la marea con el ciclo de actividad enzimática en cuatro especies de camarones: el 57% en la población de camarones machos, alcanzando el pico máximo en las mareas altas (80%) que corresponden a los primeros 5 días de marea alta y alta. Las mayores actividades enzimáticas de amilasa y lipasa se presentaron en los estados C₁ y D₂, y la menor en D₃ durante el ciclo de marea. Asimismo, por sus procesos en los resultados de la actividad enzimática, se observó un alto nivel de actividad enzimática en los estados A₁, D₁ y D₂. La actividad enzimática de amilasa y lipasa, controlando con la etapa de marea, en las mareas altas (80%) fue significativa (p < 0.05), durante el ciclo de marea (10:00h-18:00h, 12:00h-20:00h y 14:00h-22:00h) en las mareas altas y asociada de las mareas altas. Los camarones administrados a las 12:00h-20:00h presentaron la mayor actividad específica de proteasa, amilasa y lipasa, con un pico máximo a las 14:00h y un segundo de menor intensidad a las 03:00h. En camarones administrados 2 veces al día, no se observó diferencias estadísticas (p < 0.05) en términos de luminosidad entre las 3 mareas durante el ciclo de marea. En el momento de la marea alta, el ciclo de marea se asoció de marea alta, en tanto que si se observó una biomasa mínima (p < 0.05) más alta en las mareas altas (a las 12:00h-20:00h) que en las mareas bajas (a las 03:00h) más allá de la super-saturación (del 5 al 18%). Las conversiones y eficiencias que se alimente las 4 horas en mareas altas, la alimentación y el hambre de alimentación (12:00h-20:00h). Así mismo, las eficiencias más altas en términos de alimentación y de eficiencia fueron obtenidas por el grupo de camarones administrados en función del estado de marea y en el horario de 12:00h-20:00h. Una estrategia de alimentación adecuada a los hábitos naturales de alimentación de la especie en cultivo, y al ciclo de marea, permitiría maximizar la eficiencia de utilización del alimento, reducir los costos de alimentación, disminuir el desperdicio de alimento al agua, evitar la contaminación por nutrientes por las heces y exuvias de los camarones.

PALABRAS CLAVES: alimentación, caridino, ciclo de marea, actividad enzimática.

INTRODUCCIÓN

El éxito en el cultivo de las diferentes especies de camarón depende en gran parte de una adecuada nutrición y un buen manejo de alimento (Avilés *et al.*, 1996). La alimentación en las piscas de camarones se basa en su mayor en tablas para calcular las raciones diarias a partir de un porcentaje de la biomasa y del peso promedio de los camarones presente en el estanque, las cuales

no consideran ni los hábitos de alimentación ni el estado fisiológico ni el que atraviesa el camarón (Molina y Pita, 1994). Además, si se considera que el costo del alimento balanceado puede representar hasta el 50% del costo de producción, dependiendo del sistema de cultivo utilizado, especie, manejo, calidad de agua y tipo de alimento, es relevante encontrar estrategias de alimentación que permitan disminuir los gastos generados por este rubro (Molina y Pita, 1999).

Para alcanzar este objetivo es necesario estudiar los procesos fisiológicos del organismo que afectan la capacidad de consumo y digestión del alimento, en el cual la actividad enzimática cumple una acción de vital importancia (Dall, 1993). La actividad de estas enzimas, presentes en el hepatopancreas, son las que controlan los procesos de digestión y varían por factores como: ayuno (Caton, 1980), edad y tamaño de los animales (Lacy y Lawrence, 1982, 1985), cantidad y frecuencia de alimentación (Sridhar *et al.*, 1995), fase y nivel de problema del alimento (Le Moullac *et al.*, 1994, 1997), estimulantes alimenticios (Jalki *et al.*, 1988), estado de marea (Van Wormhout *et al.*, 1992a), y ritmo circadiano (Van Wormhout, 1997).

Estudios realizados sobre el comportamiento de los camarones, indican que existe una relación entre la actividad lunar y el proceso del ciclo de marea (Dall *et al.*, 1990), esta observación fue retomada por Robertson *et al.* (1987) quienes concluyeron la necesidad de determinar esta posible relación y su importancia en el manejo de sistemas de cultivo de camarón. Griffin y Wiegswirth (1993) realizaron en Ecuador y Colombia trabajos con *M. vannamei* y *P. setiferus* relacionando el crecimiento con las fases lunares, encontrando un crecimiento mínimo de más de 1g por semana durante luna nueva y llena. Así también, Dall (1986) y Chan *et al.* (1988) han demostrado que existen etapas dentro del ciclo de marea del camarón donde el consumo del alimento se incrementa o disminuye, proceso que no se vinculó en consideración al aplicar el alimento balanceado.

Por otro lado, en crustáceos se ha encontrado que otros factores biológicos ocurren principalmente alrededor de la misma luna (ritmo circadiano, De Coursey, 1983). Por lo observado en muchos aspectos, desde la actividad reproductiva con la concentración de proteínas, aminoácidos libres (Richard *et al.*, 1979; Bøghen y Casati (1987), acidos grasos (Naburam *et al.*, 1984), pigmentos y absorción de colorantes azules (Van Wormhout, 1977) hasta otros como la actividad alimenticia (Hernandez-Cruz *et al.*, 1998), Nozaki (1998) en crustáceos y Heilmann y Spuler (1999) en peces, reportan y hacen referencia a varios autores que señalan una sincronización diaria de la alimentación, como una estrategia para incrementar la producción en acuicultura.

Los diversos criterios sobre el comportamiento alimenticio de los camarones hacen que las técnicas de alimentación utilizadas difieran entre productores, acarreando en muchos casos elevadas tasas de conversión alimenticia y por ende un menor rentabilidad.

Por lo tanto, para hacer más efectiva y apropiada la alimentación de camarones se debe considerar los hábitos naturales de alimentación en términos de horario, frecuencia y cantidad, sobre todo en vista de que en la producción económica el suministro del alimento artificial está orientado a conseguir mejores producciones en el menor tiempo posible.

Consecuentemente, para poder asociar conceptos de nutrición, optimización alimenticia y saludabilidad económica, es necesario obtener información que permita ajustar las tablas de alimentación, considerando el marcado efecto que tienen el ciclo de marea y el ritmo circadiano sobre la actividad de las enzimas digestivas y el correspondiente aprovechamiento del alimento consumido. Con esta expectativa y procurando mejorar la eficiencia de los alimentos suministrados, en este estudio se evaluó el efecto que tienen estos 2 procesos fisiológicos sobre la actividad enzimática y su relación con el crecimiento y conversión alimenticia.

¹ Molina, C., Cadena, E., Indacojea, J., 2002. Alimentación de camarones en Ecuador. C.A. Acuicultura Prosperina. Una respuesta científica y tecnológica sobre la marea. In: C.A. Acuicultura Prosperina. Una respuesta científica y tecnológica sobre la marea. Eds. C. Molina, E. Cadena, J. Indacojea, M. Orellana, A. y Pita. Guayaquil, Ecuador. 1994. 200pp.

MATERIALES Y METODOS

Evaluación de la tasa de ingestión

Ciclo de Muda

Cinco camarones en un mismo estadio de muda fueron colocados por acuario (60x22x36 cm) de 50 l. Las animales con peso promedio de 2,69±0,30 g (n=50) fueron alimentados con una dieta de 40% de proteína a las 08:00h y 15:00h suministrando el 10% de su biomasa en cada ocasión. El ensayo se realizó durante 3 ciclos de muda (1 mes) utilizando 6 réplicas (acuarios). La observación e identificación del estado de muda en el camarón se lo realizó en los atropodados de semillas a lo descrito por Smith y Dall (1985) y Robertson *et al.* (1987) para *P. esculentus*, *P. argenteus* y *P. duorarum*. Durante este ensayo se estuvo la duración del ciclo de muda y sus sub-estados (postmuda temprana A, postmuda media B, intermuda C, pre muda temprana D₁ y D₂, pre muda media D₂ y D₃).

Ensayo Circadiano

Seis camarones (6,25-0,29 g n=60) por acuario de 50 l fueron alimentados cada 2h con 1,5 g de balanceado con 40% de proteína. Este estudio se realizó durante 24h con 10 réplicas. Para determinar la tasa de ingestión, en ambos ensayos el alimento no consumido fue sifoneado sobre una malla previamente pesada. Después de 2 horas de haber sido suministrado. Este tratamiento fue lavado con agua destilada y secado en estufa durante 24 horas a 60°C, posteriormente fue pesado para determinar el porcentaje de alimento ingerido en base a la biomasa de cada acuario. Adicionalmente se realizó un blanco (acuario sin camarón, solo agua) con el objeto de determinar un factor de corrección por pérdida de alimento, debido al movimiento de agua, aireación, sifoneo y lavado de los substratos. Este blanco contó con igual número de réplicas al utilizado en ambos ensayos.

La tasa de ingestión se fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de ingestión} = \frac{\text{Alimento suministrado} - (\text{Alimento no consumido} \times B)}{\text{Biomasa del acuario}} \times 100$$

$$\text{Blanco (B)} = \frac{\text{Alimento suministrado}}{\text{Alimento recuperado}}$$

El factor de conversión alimenticia (FCA) fue calculado de acuerdo a la fórmula presentada por Cruz-Ricoque y Guillaume (1987) y la tasa de eficiencia proteica con la fórmula PER = biomasa panesalproteica suministrada.

Análisis de la actividad enzimática

Ciclo de Muda

Camarones entre 3 y 5h obtendidos de una granja camaronesa fueron acclimatados a las condiciones del laboratorio y alimentados con una dieta de 40% proteína. Después de 2 semanas, diez camarones por estadio de muda fueron disecados para extraer sus hepatopancreas, manteniéndolos a -80°C hasta la realización de los análisis. Quince horas previas a la selección de animales se sifoneó el alimento no consumido y las heces. El muestreo se realizó en el mismo horario (entre las

08:00h-11:00h), para evitar cualquier efecto del ritmo circadiano en la actividad de las enzimas digestivas y nutrientes a analizar (Cuzco *et al.* 1982; Le Moullac *et al.* 1997).

Ritmo Circadiano

Un total de 660 minutos de peso promedio inicial de 1,31±0,14 g fueron disecados en 4 líneas extensoras articulares de 10 Tin y alimentados con una dieta de 50% de proteína. El alimento fue repartido 2 veces al día con una ración equivalente al 10% de su biomasa. A cada línea se asignó un horario diferente de alimentación (08:00h-18:00h, 10:00h-18:00h, 12:00h-20:00h y 14:00h-22:00h). Este ensayo tuvo una duración de 15 días, con una tasa de recambio diario de agua de 150%, y fotoperíodo natural (06:00-18:00). En el último día del experimento, el alimento sobrante fue sifoneado 2h después de la segunda ración, y se murieron y los camarones en yuno por 48h. Concluido este período, fueron disecados los camarones en intermuda, para extraer el hepatopancreas, manteniéndolos a -80°C hasta la realización de los análisis. El muestreo se realizó en esta rutina cada 2h para cada tratamiento (balanceo de alimentación), en un período de 24h.

Preparación del suero sustrato y métodos de análisis

Un micro homogenizador de téjila (Wheaton®) fue utilizado para macerar el hepatopancreas en 0,5 ml de agua desionizada y empujado hasta 1,5 ml en tubos de microensayo (Eppendorf®). Los tubos fueron mantenidos en hielo hasta su centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C, tocando pa a cada análisis alícuotas individuales del sobrenadante, las cuales fueron congeladas a -80°C. En la Tabla 1 se resumen los métodos empleados para la determinación de la actividad enzimática y de nucleótidos en el hepatopancreas.

Tabla 1. Características de las metodologías empleadas en los sueros de enzimas y nucleótidos a temperatura de 24°C.

| Enzimas (Activ) | Sustrato | Secuenciación | Actividad enzimática | Longitud de onda (nm) |
|-----------------|---------------------------------------|--|--|-----------------------|
| Glicógeno (3) | | Tris-HCl, pH 7,2 | 10 mg de glucógeno / 1 mg de proteína / 10 min | 495 |
| Fosfatasa (2) | | Tris-HCl, pH 7,2 | 10 mg de fosfatasa / 10 min | 395 |
| Amilasa (3) | Almidón soluble (1%) Azúcares (2%) | Fosfato de sodio, pH 6,9 Tris-HCl, pH 7,2 | 10 mg maltoamilasa / 10 min 100 μM fosfotungstato | 510 |
| Fosfatasa (4) | | Tris-HCl, pH 7,2 | 100 μM fosfotungstato | 410 |
| Lipasa (5) | 1-4001 capulgo (200 mM) | Tris-HCl, pH 7,2 pH 7,2 | 100 μM fosfotungstato 100 μM fosfotungstato | 340 |

(1) Dahlborg *et al.* 1956; (2) Breeford, 1976; (3) Black y Sieglman, 1974; (4) García-Castaño y Bana, 1991.

Los resultados de las determinaciones enzimáticas fueron calculados de acuerdo a lo descrito por Berghöfer *et al.* (1974) y expresados como cantidad de producto liberado (nmol/min/mg) de proteína presente en el hepatopancreas (actividad específica = 1/mg proteína), excepto para la determinación de lipasa que se estableció como una unidad de actividad al incrementar de 0,001 de absorbancia.

En el ensayo de ciclo de muda se pesaron los camarones y hepatopancreas disecados para estimar el Índice hepatopancreático (IHS).

$$\text{Índice hepatopancreático (IHS)} = \frac{\text{Peso del hepatopancreas}}{\text{Peso del camarón}}$$

Ensayo de crecimiento

Ciclo de Muda

Tres raciones de alimento (A, B, y C) fueron evaluadas mediante crecimiento, para lo cual se sembraron ocho camarones (1.53±0.17 g, ± 192) en acuarios de 50 l, empleándose 8 replicas por tratamiento. Para el tratamiento A se utilizó una ración de alimentación (Achiyana y Chusca, 1982). El tratamiento B recibió el 65% de la biomasa, en cual se calculó el promedio de la ración de cada uno de los estados de muda obtenida en el ensayo anterior, más el 1.5% producido de la pérdida de alimento reportada en el blanco. En el tratamiento C la cantidad de alimento fue suministrada en base a la biomasa por estado de muda. El ensayo fue realizado usando los valores determinados en el ensayo de tasa de ingestión para cada estado de muda, reemplazando estos en la siguiente fórmula:

$$\bar{Y}_t \times n_t = (Y_g/100 \times NC_t) \times PP$$

Donde:

\bar{Y}_t = porcentaje de la biomasa correspondiente a cada estado
 NC_t = número de camarones en determinado estado de muda
 PP = peso promedio de la población presente en el acuario
 E_t = estado de muda

Los animales de los tres tratamientos fueron alimentados a las 08:00h y 16:00h con una dieta de 40% de proteínas, durante 60 días. Los camarones fueron pesados cada quince días para ajustar la ración de alimento a suministrar.

En el tratamiento C, cada dos días se identificó los estados de muda del 50% de la población de cada acuario, y de todos los animales durante el muestreo de biomasa.

Prueba Circulatoria

Cuatro horcones de alimentación (08:00h, 16:00h, 18:00h, 12:00h, 20:00h y 14:00h-22:00h) fueron evaluados usando 6 vechuelas (acuarios de 50 l) por tratamiento (durante de alimentación). Un total de 216 juveniles (1.09±0.01 g) fueron sembrados y alimentados a saciedad 2 veces al día con una dieta de 40% de proteína, reemplazándose la cantidad de alimento diariamente suministrando por un lapso de 2 meses.

Condiciones del cultivo

Durante los ensayos el fotoperíodo fue 12h luz y 12h oscuridad. La tasa de recambio de agua fue 1200% diario, y el agua de mar fue previamente filtrada por arena y filtro de tela y tratada con UV.

Los parámetros físicos del agua medidos semanalmente en los siguientes parámetros: temperatura 34±0.5°C (n=6), oxígeno disuelto 5.08±0.23 ppm (n=6), pH 8.36±0.01 (n=10) y salinidad 34±1 ppt (n=9).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el programa Data Desk. La prueba de Análisis de Varianza fue realizada para establecer la normalidad de los datos y la prueba de Bartle para homogeneidad de varianzas. Los datos de actividad específica de las enzimas digestivas obtenidos en el estado del ciclo calculado fueron evaluados por un análisis de regresión múltiple. Los resultados expresados como porcentaje fueron transformados por arco seno previo a un análisis de varianzas (ANOVA). Una vez que se verificaron diferencias significativas ($P < 0.05$) los datos fueron analizados por la prueba de mínima diferencia significativa (Diferencia Diferencial, LSD) para contrastos entre tratamientos.

RESULTADOS

Ciclo de muda

Duración

Durante el período de estudio se pudo observar que el ciclo de muda en los juveniles F, varían entre un peso promedio de 2.69±0.30 g tuvo una duración aproximada de 11.05±1.13 días. La fase de pre-muda representó el 50%, incrementa 33.32% y la post-muda 16.67% de todo el ciclo de muda (Tabla 2).

Tabla 2. Duración del ciclo de muda en el juvenil F, varían entre un peso promedio de 3 etapas de muda (valor estándar)

| Duración (días) | Etapas de muda | | | | | |
|-----------------|----------------|---|--------|----------------|----------------|----------------|
| | A | B | C | D ₁ | D ₂ | D ₃ |
| | 1 | 1 | 2.0.19 | 1.0.24 | 2.0.29 | 2.0.19 |

La figura 1 muestra la relación entre las fases lunares y el número de camarones mudados. En luna nueva, aproximadamente el 80% de camarones mudaron en los primeros 5 días contados desde el inicio del ensayo, mientras que en luna llena solo mudaron alrededor del 30% de la población en el mismo período de tiempo. Durante los próximos 5 días de quiebra (marca roja) en cuartos crecientes, un 30% de la población de camarones mucho, mientras que en cuartos menguante se incrementó al 47% en el último lapso de tiempo.

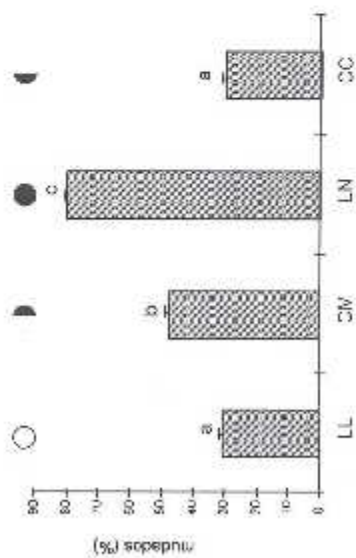


Figura 1. Larvas que mudaron por instar de larva. Larva Iera (L1); Curculionidae (CML); Larva Iera (LN); Curculionidae (CC).

Tasa de ingestión

La cantidad de alimento consumido en los estadios B, C y D0 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que en los estadios A, D1, D2 y D3. No se encontró diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre B, C y D0 ni entre A, D1, D2 y D3. La figura 2 muestra desde promoción D1 hasta postmuda A, un período de consumo de alimento inferior al 3% de la biomasa. Es a partir de postmuda tardía B hasta postmuda temprana D0 que los camarones incrementan en el mesos un 33% su ingestión de alimento alcanzando en postmuda (C) un consumo superior al 50% de lo observado durante postmuda D1 a postmuda A.

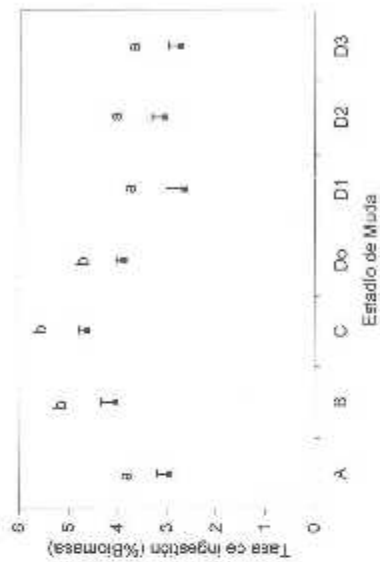


Figura 2. Tasa de ingestión de juveniles que mudaron por estado de muda obtenida después de 3 ciclos de muda. Las letras distintas indican el error estándar (n=6). Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Índice hepatosomático y glicogélico

La figura 4 muestra que los camarones alcanzan un índice hepatosomático (3.7%) significativamente ($P < 0.05$) mayor en los estadios B, C, D0 y D2 comparado con A, D1 y D3 aunque postmuda temprana A no es estadísticamente diferente ($P < 0.05$) de postmuda tardía B.

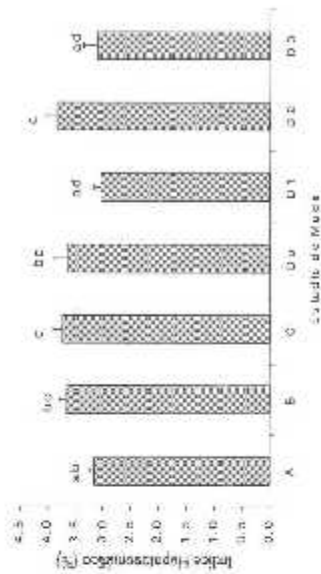


Figura 3. Índice hepatosomático por estado de muda. Las letras distintas indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$).

En lo que respecta a glicógeno en el hepatocáncer del camaron, se encontró que existe una concentración significativamente ($P < 0.05$) mayor de este nutriente en los estadios de postmetamorfosis A y D3 y D2. Además se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los estadios A y B (Fig. 4).

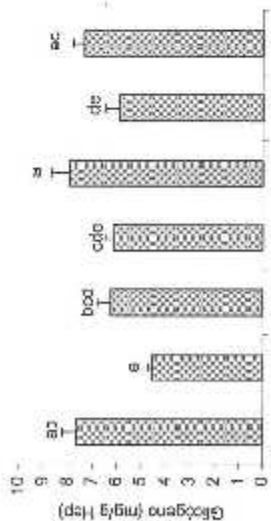


Figura 4. Concentración de glicógeno en el hepatocáncer del camaron *Nauplius* (n=10) por estadio de modo. Los errores estándares indican el error estándar ($n=10$). Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

Actividad enzimática

El LSD determinó la mayor actividad específica (U/mg de proteína) de amilasa en los camarones en estadio D0 el cual fue estadísticamente superior ($P < 0.05$) a D1, D2, A, B y C aunque no significativamente diferente ($P < 0.05$) a D3. No hubo diferencias significativas entre la actividad de amilasa en el estadio D2 y los registrados en B y C pero sí las diferentes con respecto a D3 y A (Fig. 5).

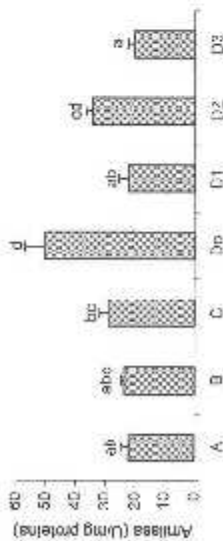


Figura 5. Actividad específica de amilasa por estadio de modo. Los errores estándares indican el error estándar ($n=10$). Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

La actividad específica de lipasa fue significativamente ($P < 0.05$) menor en el estadio D3. La mayor actividad específica fue encontrada en el estadio D0 siendo estadísticamente diferente ($P < 0.05$) a los otros estadios a excepción de C y D2. La actividad de lipasa en los estadios D1, D2, A, B y C no mostraron ser diferentes estadísticamente ($P > 0.05$) entre ellos (Fig. 6).

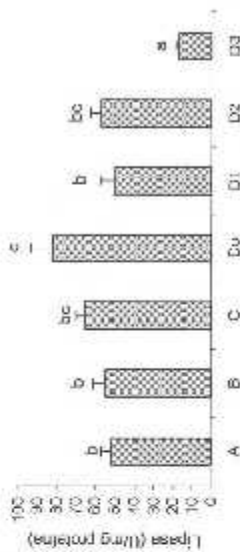


Figura 6. Actividad de lipasa por estadio de modo. Los errores estándares indican el error estándar ($n=10$). Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

La actividad específica de proteasa en los estadios A, D1 y D3 fue significativamente menor ($P < 0.05$) a los estadios B, C, D0 y D2. No se encontró diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre A, D1 y D3 ni entre B, C y D0 (Fig. 7). Un segundo pico de actividad fue registrado en D2 el cual no fue significativamente diferente ($P > 0.05$) de ninguno de los otros estadios a excepción de D3.

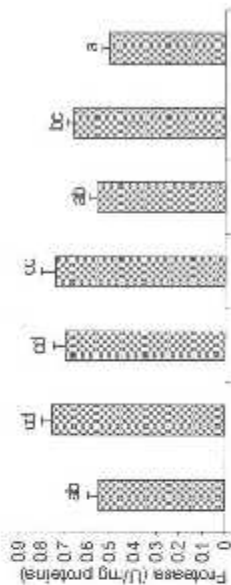


Figura 7. Actividad de proteasa por estadio de modo. Los errores estándares indican el error estándar ($n=10$). Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

Crecimiento

Después de 60 días de cultivo el ANOVA no reportó diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre las biomasa finales y tanto el crecimiento específico de los camarones alimentados con las 3 raciones alimenticias (Tabla 3). En tanto que sí se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los pesos promedio finales. Las camarones alimentados en base a la ración de alta proteína crecieron 0,78 g significativamente ($P < 0.05$) más que los otros dos tratamientos. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos B y C. Es importante resaltar que a pesar de que se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre supervivencias (Tabla 3), los camarones alimentados en función del estado de muda presentaron una menor mortalidad y variabilidad de resultados entre sus réplicas en comparación con los otros tratamientos aun bajo el continuo acceso a su alimento. El grupo de camarones alimentados en función del estado de muda presentó un factor de conversión alimenticia significativamente menor ($P < 0.05$) a los tratamientos A y B (Tabla 3). No se encontraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre estos dos últimos tratamientos. Así también la mejor tasa de eficiencia proteica fue presentada por el tratamiento C y la menor por el tratamiento A (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio (± error estándar) obtenidos después de 8 semanas de alimentación a juveniles *P. vannamei*.

| Tratamientos | Tabla de alimentación | | Biomasa | Crecimiento |
|------------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|-------------|
| | A | B | | |
| Peso promedio inicial (g) | 1,56 ± 0,01 | 1,56 ± 0,01 | 6340 ± 23 | |
| Peso promedio final (g) | 4,75 ± 0,26 | 4,75 ± 0,26 | 4,97 ± 0,38 | |
| Biomasa inicial (g) | 12,48 ± 0,24 | 12,48 ± 0,11 | 10,06 ± 0,11 | |
| Biomasa final (g) | 32,14 ± 2,06 | 32,14 ± 2,14 | 32,98 ± 1,54 | |
| Supervivencia (%) | 71 ± 2,78 | 31,25 ± 3,27 | 82,8 ± 2,58 | |
| Factor de conversión alimenticia | 3,12 ± 0,18 | 2,43 ± 0,18 | 1,13 ± 0,10 | |
| Tasa de eficiencia proteica | 0,82 ± 0,02 | 1,21 ± 0,01 | 1,66 ± 0,04 | |
| Tasa de crecimiento específico (%) | 1,72 ± 0,16 | 1,66 ± 0,14 | 1,64 ± 0,09 | |

Valores con letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

Ratmo Circundiano

Tasa de Ingestión

La mayor cantidad de alimento consumido equivalente al 1,3 y 1,0% de la biomasa fue observado a las 12:00h y 14:00h, respectivamente disminuyendo paulatinamente hasta detenerse el 0,1% a las 24:00h (Fig. 6).

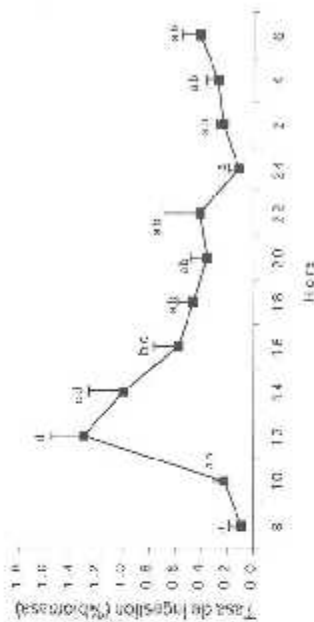


Figura 6. Tasa de ingestión (%) de *P. vannamei* a diferentes horas del día. Los errores estándares indican el error estándar ($n=6$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tasa de conversión

Los 4 grupos de camarones alimentados en cada uno de los horarios de alimentación ensayados no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$) entre sí en valores de peso promedio final, tasa de crecimiento específico y supervivencia después de 2 meses de cultivo (Tabla 4). En tanto que se observó una significativamente ($P < 0.05$) mayor biomasa final cuando fueron alimentados en el horario de las 12:00h y 20:00h con respecto a los otros 2 horarios de alimentación. La mejor utilización de la proteína (EP) y del alimento (FCA) fue obtenida cuando el alimento fue suministrado en el horario de 12:00h y 20:00h, estos valores fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) a los otros 2 horarios como lo muestra la Tabla 4. No se encontró diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre estos últimos 2 tratamientos.

Tabla 4. Valores promedio (± error estándar) obtenidos después de 8 semanas de alimentación a juveniles *P. vannamei*.

| Lista de nutrientes | Horario de Alimentación | | Biomasa final (g) | Crecimiento específico (%) |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|----------------------------|
| | 12:00h y 20:00h | 14:00h y 22:00h | | |
| Peso promedio inicial (g) | 1,08 ± 0,01 | 1,08 ± 0,05 | 1,040 ± 0,07 | 1,040 ± 0,05 |
| Peso promedio final (g) | 6,20 ± 0,21 | 6,01 ± 0,29 | 6,72 ± 0,28 | 6,28 ± 0,28 |
| Biomasa inicial (g) | 6,73 ± 0,06 | 6,76 ± 0,04 | 3,79 ± 0,15 | 4,05 ± 0,04 |
| Biomasa final (g) | 46,85 ± 1,47 | 46,81 ± 1,55 | 58,19 ± 2,06 | 47,62 ± 2,24 |
| Supervivencia (%) | 79 ± 6,3* | 87,04 ± 5,8 | 92,6 ± 5,5* | 83,3 ± 6,8* |
| Factor de conversión alimenticia | 2,13 ± 0,15 | 2,24 ± 0,05 | 1,86 ± 0,04 | 2,35 ± 0,13 |
| Tasa de eficiencia proteica | 1,04 ± 0,07 | 1,12 ± 0,04 | 1,44 ± 0,04 | 1,08 ± 0,05 |
| Tasa de crecimiento específico (%) | 3,03 ± 0,07 | 3,05 ± 0,07 | 3,15 ± 0,07 | 3,09 ± 0,06 |

Valores con letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

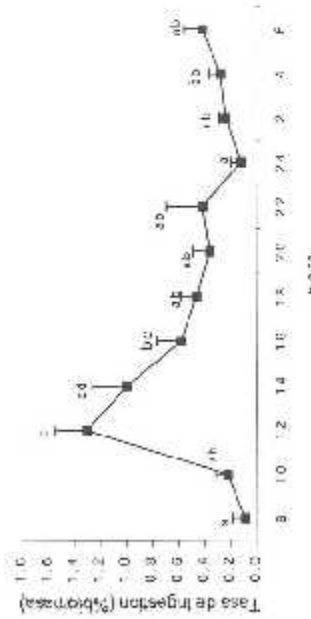


Figura 8. Tasa de ingestión del *P. wawonii* a diferentes horas del día. Los errores estándares indican el error estándar (E.E.). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tasa de crecimiento

Los 4 grupos de camarones alimentados en cada una de los horarios de alimentación ensayados no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$) entre sí en términos de peso promedio final, tasa de crecimiento específica, y supervivencia después de 2 meses de cultivo (Tabla 4). En tanto que se observó una significativamente ($P < 0,05$) mayor biomasa final cuando fueron alimentados en el horario de las 12:00h y 20:00h con respecto a los otros 3 horarios de alimentación. La mejor sobrevivencia de la postcua (EP) y del alimento (PCA) fue obtenida cuando el alimento fue suministrado en el horario de 12:00h y 20:00h, esos valores fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) a los otros 3 horarios como lo muestra la Tabla 4. No se encontraron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre estos últimos 3 tratamientos.

Tabla 4. Valor de mortalidad y sobrevivencia (EP) y sobrevivencia (PCA) de 8 semanas de alimentación a juveniles *P. wawonii*.

| D. Alimentaciones | Horarios de alimentación | | |
|------------------------------------|--------------------------|----------------|----------------|
| | 08:00 y 16:00h | 12:00 y 18:00h | 14:00 y 20:00h |
| Peso promedio final (g) | 1,68±0,01 | 1,03±0,005 | 1,04±0,007 |
| Peso promedio final (%) | 6,03±0,31* | 6,30±0,204 | 5,42±0,213 |
| Biomasa inicial (g) | 9,74±0,06 | 9,78±0,04 | 9,78±0,04 |
| Biomasa final (g) | 16,55±1,47 | 46,14±1,53 | 78,19±2,005 |
| Sobrevivencia (%) | 79,6±3* | 87,0±5,42 | 92,0±5,56 |
| Factor de conversión alimenticio | 2,13±0,1242 | 2,41±0,054 | 1,69±0,0496 |
| Tasa de eficiencia y sobrevivencia | 1,18±0,075 | 1,12±0,034 | 1,94±0,036 |
| Tasa de crecimiento específico (%) | 1,36±0,003 | 3,05±0,072 | 3,17±0,274 |
| | | | 5,29±0,292 |

Valores con letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente ($P > 0,05$).

Actividad enzimática

El análisis de regresión múltiple mostró una actividad específica (U/mg de proteína) de amilasa, lipasa y proteasa significativamente superior a las 14:00h independientemente del horario de alimentación. Hubo efecto significativo de la hora en que se cobró el alimento sobre la magnitud y aparición de los picos enzimáticos (Fig. 9, 10 y 11). Las mayores actividades de proteasa y lipasa promedio se determinaron en los camarones alimentados en el horario de las 12:00h y 20:00h, significativamente superior a los obtenidos en los otros 3 horarios de alimentación (Tabla 5). La actividad promedio de amilasa a las 08:00h y 16:00h produjo una significancia ($P > 0,05$) mayor actividad de amilasa seguida por los alimentados a las 12:00h y 20:00h, 14:00h y 18:00h y 14:00h y 20:00h (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad específica promedio de las enzimas amilasa, lipasa y proteasa de acuerdo al horario de alimentación e independiente de la hora del día.

| Enzimas | Horarios de alimentación | | |
|----------|--------------------------|----------------|----------------|
| | 08:00 y 16:00h | 12:00 y 18:00h | 14:00 y 20:00h |
| Amilasa | 11,1±0,75 | 4,9±0,41 | 8,5±0,22 |
| Lipasa | 64,0±7,46 | 76,2±3,56 | 96,8±12,16 |
| Proteasa | 0,8±0,0016 | 0,8±0,0016 | 1,0±0,0016 |

Valores con letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente ($P > 0,05$).

DISCUSION

Ciclo de muda

Existen diferentes resultados entre los penidos respecto a la duración del ciclo de muda. Robertson *et al.* (1987) trabajando entre 27 y 29 °C con camarones adultos (43-57 g) *P. setiferus* y *P. apolloensis* determinaron que la duración del ciclo de muda fue de 13,6 y 11,5 días para cada especie. En *P. vannamei*, Charmanier *et al.* (1994) y Benasour *et al.* (1993) reportaron respectivamente una duración del ciclo de muda de aproximadamente 14 días en juveniles de 10 g y 11,7 días en adultos de 55 g a temperaturas de 28 °C. Estos resultados son similares a los encontrados en la presente investigación, en la cual camarones de 3 g mantenidos a 25 °C mudaron en un promedio de 11 días. Contrariamente, Chan *et al.* (1988) reportaron un ciclo de muda de 28-40 días para *P. vannamei* de 11,5-13 cm de longitud. Esta diferencia entre los resultados de los 3 estudios anteriores en *P. vannamei* y el de Chan *et al.* (1988) puede deberse a la baja temperatura del agua (20-22°C) con la que se desarrolló este último. El prolongamiento del ciclo de muda pudo presentarse como consecuencia de una reducción del metabolismo, ocasionada por un descenso en la temperatura, tal como fue evidenciado para el *P. japonicus* por Choe (1971).

Es conocido que condiciones ambientales como las fases lunares ejercen influencia sobre la fisiología de los crustáceos originando respuestas diversas en éstos (DeCoursey, 1983; Dail *et al.*, 1990; Griffith y Wigglesworth, 1993). Así, tenemos por ejemplo que el atlipodo *Tadotus valator* presenta una sincronización de la muda con el ciclo lunar (DeCoursey, 1983).

Los resultados de esta investigación muestran una ritmicidad lunar con el ciclo de muda, encontrándose cerca de la mitad de la población de camarones mudada en cuarto menguante alcanzando el pico máximo en luna nueva (80%). Una sincronización lunar también fue establecida en *P. oharuru*, donde se observó que en luna llena un alto porcentaje de la población de camarones muda en coincidencia con la luna nueva (Fuss y Ogren, 1966).

Tasa de ingestión

Ciclo de muda

Después de determinar la tasa de ingestión durante 3 ciclos de muda, se pudo observar un 18% más de consumo de alimento desde el estado de postmuda tardía B hasta premuda temprana Dn, aunque en términos de duración, este período y el comprendido entre D1 y A son iguales, de aproximadamente 6 días cada uno. Esta disminución del consumo de alimento en los estados previos a la muda también ha sido observado en *P. eschscholtzi* (Thall, 1986) y en *P. vannamei* por (Chan *et al.*, 1988) y ha sido recientemente relacionada en crustáceos con la presencia de receptores de ecdisteroides en el esfago anterior los cuales podrían reducir la ingestión de alimento (Gueckler *et al.*, 1999). Esta reducción podría tener validez si consideramos que en *P. japonicus* y *M. rosenbergii* la concentración total de ecdisteroides alcanza su máximo nivel en premuda temprana D1'''' y regresa a los valores basales en postmuda temprana A (Blais *et al.*, 1994). Este último es justamente el período donde se observó una reducción del consumo de alimento en este trabajo.

La disminución de la ingestión del alimento en la etapa previa y posterior a la muda (D3-A) junto con el elevado número de camarones que mudan durante luna nueva reportados en el presente trabajo

también la sido observados en *P. brasiliensis* y *P. pasadenae* por Hrissov (1977) descrito por Dall et al. (1950) pero de manera distinta. Hilos solían en el ciclo lunar sobre la ingestión de alimento e indican el mes bajo consumo de alimento en luna llena, seguido de un incremento en cuarto menguante y luna nueva hasta alcanzar el máximo consumo en cuarto creciente. El conocimiento de una sincronización de la muda de los camarones en sistemas de cultivo comerciales y una posible correlación con el ciclo lunar, puede ayudar a simplificar el suministro de alimento, con el consiguiente ahorro que implica el no proporcionar nutrientes en etapas de menor consumo.

Ritmo Circadiano

Varios autores afirman que existe, dependiendo de la especie, una alimentación circadiana en los camarones adultos, que se incrementa en horas de la tarde y/o noche. En *P. vannamei* (Robertson et al. 1993) y *P. kerrierae* (McTigue y Feller, 1988) encontraron una conducta alimenticia diurna y nocturna mientras que en *P. eschscholtzi* (Dall, 1986), *P. jayakeri* (Raymond y Lagardere, 1990) y *P. monodon* (Cuzon et al., 1982) se observó una alimentación preferentemente nocturna. En el presente estudio los camarones alcanzaron el mayor consumo de alimento durante la tarde entre las 12:00h y 14:00h resultado que coincide con lo encontrado por Dall et al. (1990) quienes reportan que el *P. chinensis* también se alimenta al mediodía.

Uno de los problemas asociados con la alimentación de camarones es que la dieta artificial tiene una estabilidad limitada en el agua lo que se refleja en una discriminación de la tasa de ingestión a medida que el alimento pasa a través de un escurridor (Sick et al. 1975). Razón por la cual algunos autores consideran que es conveniente alimentar varias veces al día. Robles et al. (1993) y Cortés-Jacinto et al. (1998) sugieren que el *P. vannamei* debería ser alimentado con una frecuencia de por lo menos cinco veces al día, aunque estos autores difieren entre alimentos durante el día o la noche. Por el contrario, recientemente Velasco et al. (1998) determinó, en un sistema de cultivo continuo sin productividad natural y sin suministro de agua, que el incremento de la frecuencia alimenticia no tiene un efecto significativo en el crecimiento y supervivencia del *P. vannamei*, aunque hubo una menor acumulación del nitrógeno total inorgánico cuando alimentaron 2 veces al día (08:00h y 20:00h). Estos 2 contrapuestos resultados en frecuencias alimenticias pueden ser debido a que no se consideraron la hora del día en que hay una mayor actividad de alimentación, o que la cantidad de alimento suministrada al animal en la hora en que realmente fue requerido, resultó ser insuficiente. De ahí que el ritmo circadiano de alimentación debe ser tomado en consideración para optimizar la conversión del alimento en biomasa y disminuir la cantidad de alimento no consumido.

Actividad enzimática

Ciclo de Muda

Muchos estudios se han realizado con el fin de determinar las enzimas digestivas presentes en camarones (Carrillo y Gonzalez, 1998) pero pocos trabajos han evaluado el efecto que tiene el ciclo de muda en la actividad de estas enzimas y su incidencia en la utilización del alimento.

En el presente estudio, los autores B, C y Do, que presentaron la mayor actividad específica de proteasa concuerdan con la creencia donde el camarón consume más alimento. No obstante, estos resultados difieren de los encontrados para la misma especie por Van Wormhoudt et al. (1995a) y Klein et al. (1996), donde el primer autor señala una mayor actividad específica de quitinasa medida con BAPNA, en el estudio D2, mientras que el segundo autor reportó una mayor actividad

específica de tripsina medida con SAPPNA, en D1. Esta diferencia probablemente se debe a la naturaleza de estos substratos que son específicos, a diferencia de la azocaseína, usada en el presente estudio.

El total de lípidos presente en el hepatoplasma del camarón es mayormente utilizado como reserva de energía durante el ayuno y la muda (Barclay et al. 1983). Ando et al. (1977) y Teshima et al. (1977) reportan que el *P. japonicus* alcanza la mayor concentración de lípidos en hepatoplasmas en D0 y en todo el animal en D2, respectivamente. Teshima et al. (1977) también señalan una caída del nivel de lípidos en el estudio de premuda tardía. Considerando que la enzima lipasa actúa sobre los lípidos, esto podría explicar por qué en este estudio en el estadio D0 se produjo a máxima actividad de lipasa y en la etapa previa a la muda D3 la actividad más baja.

Según Van Wormhoudt et al. (1995b), la amilasa representa el 1% de la proteína soluble del hepatoplasma del *P. vannamei*. Verdine et al. (1997), refiriéndose a estudios de Van Wormhoudt (1974), indican que el *Penaeus setiferus* tuvo picos máximos de actividad de amilasa en C1 y D1-D2 y el *P. kerrierae* en A2, C3-4 y D2. En reproductores *P. notialis*, Verdine et al. (1997) encontraron que la mayor actividad de amilasa en el hepatoplasma se presentó en la fase de inmersión, sucediendo lo contrario en el estómago donde se incrementó desde premuda temprana alcanzando la máxima actividad en D1 y decreciendo hasta llegar a nivel más bajo en D4. En el presente trabajo los juveniles *P. vannamei* alcanzan la mayor actividad específica de amilasa en D0 y D2, y la menor en D3 durante el ciclo de muda.

Las tres enzimas evaluadas muestran 2 picos de actividad enzimática el primero es considerado como una respuesta al estiramiento alimenticio, en este caso una determinada enzima digestiva se expresará en mayor o menor grado dependiendo de la cantidad y origen de los nutrientes (Le Moullac et al., 1992, 1997). En tanto que el segundo pico puede ser atribuido principalmente a una estimulación endógena de la síntesis de enzimas digestivas, por la alta producción de ecdisteroides observados en premuda D2 para la mayoría de especies de crustáceos decapodos (Skinner, 1985; Chan et al., 1988; Ulais et al., 1994). Cecolati (1987) también mencionó la aparición de este segundo pico, solo durante las estadios del año donde los crustáceos, están en un período de intenso crecimiento y por lo tanto mudando frecuentemente.

El nivel de glucógeno del hepatoplasma estuvo alrededor de los 6 mg/g encontrado en Melarromus por Dall (1965). Una mayor acumulación de glucógeno se observó, a excepción de D2, desde el estadio D1 hasta A, en parte por el consumo de alimento y además probablemente por la realización de la quitinga presente en el viejo exoesqueleto. Esta última observación puede ser sustentada por el aumento de la actividad de la quitingasa en la fase de premuda tardía en *P. japonicus* (Kouo et al. 1995). La menor concentración de glucógeno en el estadio D2 probablemente se debió por el aumento de actividad de la amilasa (Figura 5) y una mayor concentración de la hormona crustácea hiperglucémica (GHH) producida por los cuales se genera una cantidad adicional de glucosa para cubrir el requerimiento energético o de síntesis de quitinga.

Ritmo Circadiano

En crustáceos se ha encontrado que ciertos fenómenos biológicos ocurren rítmicamente alrededor de la misma hora (De Coursey, 1983). La duración cotidiana del fotoperíodo juega un papel importante en el ritmo circadiano de la actividad enzimática, siendo así, como para el *Penaeus setiferus* se llegó a evidenciar por Van Wormhoudt (1977) que el punto máximo de la actividad enzimática se produce en

las horas de la mañana, 5 horas después de la transición oscuridad luz, y el segundo en la tarde, doce horas después del primero. En 1998 Sugai y colaboradores, encontraron una mayor actividad de amilasa y maltasa en dos horas del día (04:00h y 18:00h) en juveniles *P. penicillatus* González *et al.* (1995) determinaron que en organismos adultos de *P. schwanii* y *P. novae* la tripsina, quimotripsina y proteolisis general es tienen un ritmo bifásico con una separación aproximada de 12 horas entre los dos picos.

Estos resultados son coincidentes con los encontrados en este estudio, observándose en juveniles *P. vanzoni* un ritmo circadiano bifásico claramente definido, de las 3 enzimas analizadas (tripsina, amilasa y lipasa), evidenciado cuando los camarones fueron alimentados a las 12:00h y 20:00h. En este caso la mayor actividad específica de las enzimas ensadas se produjo a las 14:00h, con un segundo pico de menor intensidad alrededor de las 02:00h. Un respuesta similar de 2 picos enzimáticos fue referida por Nishida (1998) en la misma especie pero en horarios distintos de 11:00h y 23:00h, ésta diferencia fue causada probablemente por el foto período en que fue realizado el estudio.

Este comportamiento bifásico, pero menor en actividad enzimática, fue también observado en el horario de 10:00h y 18:00h ensayado en la presente investigación. En tanto que los animales que fueron alimentados a las 14:00h y 22:00h, no presentaron picos circadianos definidos. Esta diferencia en respuestas de las enzimas digestivas indica el efecto que tienen las horas de alimentación, es decir el estímulos alimenticio, sobre la aparición del "pico enzimático". González *et al.* (1995) reportaron en *P. schwanii* la máxima actividad fue alcanzada para la tripsina a las 4:00h, y para quimotripsina y proteolisis generales a las 6:00h; mientras que su alimentación, en tanto que para el *P. novae* el pico encontrado para las mismas tres enzimas fue después de 7.5 horas. Díaz-Granda (1997) en experimentos relacionados al horario de alimentación en *P. schwanii* bajo condiciones de cultivo semi-intensivo encontró que los camarones alimentados en diferentes horarios presentan picos de actividad enzimática en diferentes horas, aunque en ciertos horarios se mantienen independientes de la hora de alimentación. En ese trabajo la actividad de las enzimas y la hora del día en que aparecieron los picos circadianos se vio afectada por el horario en que se entregó el alimento aunque en algunas ocasiones la mayor actividad se expresaba entre las 12:00h y 14:00h.

Estas resultados sugieren alimentar en mayor proporción a las 12:00h que es cuando se produce la mayor ingestión del alimento seguida por la mayor actividad de las 3 enzimas digestivas estudiadas. El segundo pico enzimático sugiere entregar la ración a las 02:00h que en base a lo observado sería conveniente alimentarlo 24 horas.

El cumplimiento de algunas especies como anecdote con los Penicidos, hace que una gran cantidad de alimento suministrado no sea consumido inmediatamente, sino en pequeñas dosis durante un lapso de tiempo bastante largo (Chamberlain, 1988). Newkirk (1979) y Jery (1995) sugieren alimentar de 3 a 4 veces al día, como una práctica para mejorar crecimiento y conversión alimenticia pudiendo ser una técnica muy efectiva para evitar la pérdida de nutrientes solubles en el agua, tal como ha sido comprobado por Revmond y Lazardere (1994).

Supervivencia y Crecimiento

Un aumento progresivo de la supervivencia (del 5 al 11%), fue observado a medida que el alimento fue suplido en raciones acordes al ciclo de muda y al horario de alimentación. La causa física lógica para este incremento de supervivencia no es conocida, pero puede ser relacionado a que el suministro de alimento, en cantidades ajustadas a la capacidad de ingestión del camarón, promueve un mejor aprovechamiento del alimento. Esto es posible ya que el camarón está recibiendo nutrientes, en las

momentos de mayor actividad enzimática y en los estadios de muda, a horas de mayor consumo de alimento, tal como fue evidenciado por la mayor conversión alimenticia y eficiencia proteica obtenida en este trabajo.

De las tres raciones alimenticias evaluadas, el mayor peso final fue observado en el tratamiento que seguía la tabla de alimentación, aunque no se encontraron diferencias en términos de biomasa ganada entre las 3 raciones. En cuanto a las horas de alimentación, estabamos, a pesar de que se encontró una significativa mayor actividad enzimática y biomasa ganada en los camarones alimentados a las 12:00h y 20:00h no se observó esta misma respuesta a nivel de peso final, esto pudo ser debido a que la segunda ración fue suministrada varias horas antes de que se produjera el segundo pico de mayor actividad enzimática. Esta mayor ganancia de biomasa en este horario es producto del mayor consumo de alimento y la más alta actividad enzimática encontrada, entre las 12:00h y 14:00h en esta investigación, y puede ser la explicación de por que Robertson *et al.* (1993) observaron un mayor incremento en peso al alimentar dos veces en el día a *P. vanzoni*, que al alimentarlos por la noche en igual dosis.

El establecer el momento del día en que el camarón se encuentra fisiológicamente preparado para aprovechar el alimento que se le está suministrando es un importante aspecto que no siempre es considerado. Hazón por la cual el usar frecuencias de alimentación cercanas a los picos de actividad enzimática y en cantidades acordes al estado de muda, permitirán obtener un máximo aprovechamiento del alimento.

Por lo tanto, una estrategia de alimentación adecuada a los hábitos naturales de alimentación de la especie en cultivo, y las etapas fisiológicas por las que atraviesa este organismo, permitirá maximizar la eficiencia de utilización del alimento, reducir los excesos de alimentos no consumidos, disminuir el tiempo de exposición del alimento al agua evitando así la consiguiente pérdida de nutrientes por lixiviación y estabilidad física del balanceado.

REFERENCIAS

- Alvarez, D.M., Chwang, S.T.M., 1989. Shrimp feed requirements and feed management. In: Aoyama, D. M. (Ed.), Proceedings of the S.E. Asia shrimp farm management workshop. American Shrimp Association, Singapore. 75-82.
- Ardo, T., Karasava, A., Techara, S., 1977. Variations in the levels of tissues during the molting cycle of a new. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43, 1143-1149.
- Arbog, M.A., James, P. y Graham, J., 1986. Menos del alimento en el organismo semi-intensivo del camarón blanco (*Penaeus vanzoni*) alimentado con dietas controladas. Rev. Cub. Inv. Pisc. 20 (1), 10-14.
- Bailey, M.C., Dail, W., Smith, D.M., 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the molting cycle in the blue shrimp, *Penaeus monodon* Hawell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68, 229-244.
- De gowen, J.M., Beal, E., Grassl, M., Michá, C., 1973. Methods in Enzymology. Academic Press, New York, Vol. 1 pp. 388-397.
- Benarant, J., Caldeire, J., Sage, A., 1983. Estudios de muda en hembras adultas de *Penaeus vanzoni*. Aquaculture Tropical 1, 13-15.
- Uain, C., Bertani, M., Loulle, J.Y., Seyez, D., 1994. A new regulation of subsistence by Y-origins of *Penaeus vanzoni* (Crustaceo, Decapodo). Correlation with neoclypeal lines. Invert. Record. Decr. 26, 1-13.
- Dodéte, R., 1983. Survival strategies of penaeid shrimp and their significance for shrimp culture. Proceedings of the first international conference in Warsaw-Aquaculture 9-11 February 1983, Warsaw, 1, 13-15.
- Bauman, A.D., Corneil, F.J., 1997. Cycle Circadian des Amides d'Acides Protéiques et des Protéines de l'Hémolymph chez *Caridea*. Biolum. Syst. Ecol. 15, 479-486.
- Head, J.M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 245-254.
- Carillo, O., González, R., 1998. Control de la Digestión en camarones. Manuscrito del IV Simposio de Nección Acuicola, 15-18 Noviembre 1998, La Paz, Baja California Sur, México. 1 París.

- Cuevas, H. J., 1987. In digestión de los crustáceos. In: *Esponjas de los Mares de la Bahía de La Paz*, G. (Ed.), Nutrición en Acuicultura Vol. 1. Editorial Graficas Imparta pp. 67-84.
- Creswell, H. J., 1989. Anatomy and Physiology of digestive tract of *Caridacus*. *Deepsea research in zooculture*. AQUACOP FEMMEK. Actes de Colloques. Advances in Tropical Aquaculture, 20 February - 4 March 1989. Tahiti, 203-259.
- Cortes Echarri, F., Villares, C. H., Portillo, C. G., 1995. Fructosos y disacáridos alimenticia en el cultivo intensivo de juveniles del camarón *Penaeus vannamei*. *Resúmenes del IV Simposio de Nutrición de Nutrición Acuicola*, 15-18 Noviembre 1995. La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- Cuñe-Roque, L.E., Guillanore, J., Cruz, G., Alvarez, G., Alvarez, 1987. Social Protein effect on growth of four prawn shrimp. *Penaeus*. *World Aquacult. Soc.* 18 (6), 259-271.
- Cuzco, G., Colla, C., Aldiza, P., Menager, H., 1983-86. G. Mével, M., 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. *Proc. World Maricult. Soc.* 11, 413-422.
- Cuzco, G., Irujo, M., Canale, D., Sotomayor, P., 1982. Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp. *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 29, 33-41.
- Czako, S., Adl, B., Rankin, S. M., Keeley, L.L., 1988. Characterization of the moult stages in *P. vannamei*. *Soft-shell and Carapace*, 44, *Sevier, C. Aquacult.* 396. Effect of molting stage and biomass on compensatory capacity in the juvenile shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 178, 233-241.
- Czako, S., 1971. Body increases during moulting cycle of the colonial brown shrimp *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.* 9, 31-37.
- Dall, W., 1966. Studies in the physiology of a shrimp, *Metapenaeus op*. (Crustacea: Decapoda). *Penaeid*. *IV. Carbohydrate metabolism*. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 16, 133-387.
- Dall, W., 1972. Feeding, digestion and respiration in Penaeidae. In: Allan, G. D., Dall, W. (Eds.), *Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop*. Australia, 57-63.
- Dall, W., 1976. Estimation of routine metabolic rate in a prawned prawn, *Penaeus orientalis* Huxwell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 95, 57-74.
- Dall, W., Hill, H., Krollshagen, P.F., Swales, D.J., 1969. The Biology of the Penaeidae. In: *Reviews*, 111 (5), *Southward A.J. (Ed.) Advances in Marine Biology* Vol. 27. Academic Press, Cornwall, 489 pp.
- DeCoursey, P.J., 1983. Biological timing. In: *Vernberg, F.J., Vernberg, W. D. (Eds.), The Biology of crustacea*. Vol. 7. *Academic Press*, New York, pp. 167-182.
- Diaz-Olivares, E., 1997. *Historia de la acuicultura del camarón, Penaeus vannamei de cultivos semi-intensivos*. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Maritimas, Facultad de Biología, Universidad de La Paz, La Paz, Baja California Sur, México.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1976. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
- Fernandez, J., Salazar, H., Vega, F., Oliva, M., Van Wazerhoush, A., 1998. Nutrición en camarón. *Objetivos en función del ciclo de vida en el camarón rosa Penaeus vannamei*. *Resúmenes del IV Simposio de Nutrición Acuicola*, 15-18 Noviembre 1998. La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- García-Carrillo, P.L., Huid, N.E., 1985. Caracterización de proteínas de la larva (Phenoloxyside Phosphoryl) and carapal (Phenoloxyside Phosphoryl) en *Penaeus vannamei*. *J. Food Biochem.* 17, 97-113.
- González, K., Gómez, M., Carrillo, G., 1993. Variaciones oceanológicas en la actividad de las principales enzimas proteolíticas de *Penaeus vannamei*. *Resúmenes del IV Simposio de Nutrición Acuicola*, 17-18 Noviembre 1998. La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- Griffes, D.R., Wiggertson, J.M., 1993. Growth rhythms in the shrimp *Penaeus vannamei* and *Penaeus schmitti*. *Mar. Biol.* 115, 285-299.
- Grober, B., Heitzel, H.-G., Tonniesch, K.-H., 1999. Multihouse-associated oysteracid receptors in demipod crustaceans. *Chemical Sensitivity and Neuronal Integration*.
- Hallam, M., Spicer, R.E., 1999. The daily feed-glycogen cycle in uncultured brooders and the effects of limited meal-feeding on the growth of juveniles of the prawn, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 180, 53-64.
- Hernández-Castro, P., Quintero-Sieffman, W., Naranjo de Tero, M.A., Pineda, G., Cárdena-Carmelo, F.F., 1998. Time lapse in food ingestion and proteolytic activity of digestive system in juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*. *Resúmenes del IV Simposio de Nutrición Acuicola*, 15-18 Noviembre 1998. La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- Klein, B., Le Moullac, G., Salles, D., Van Wazerhoush, A., 1998. Molecular Cloning and Sequencing of tyrosine cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Resúmenes del IV Simposio de Nutrición Acuicola*, 15-18 Noviembre 1998. La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- Kooy, M., Walker, M., Maitland, F., Fardmer, K., Sopp, D., Aoba, K., 1995. Chitinolytic Enzymes activities in the hepatopancreas, Gill (G) and Hemolymph of *Katuna Pavo*. *P. japonicus* during the Molt cycle. *Fish Sci.* 61(4), 747-758.
- Le Boulou, C., Hertzog, A.V., Salles, D., 1998. Cloning and expression of cathepsin L-like proteolysis in the hepatopancreas of the shrimp *P. vannamei* during the molt cycle. *J. Comp. Physiol.* 166, 319-318.
- Le Moullac, G., Van Wazerhoush, A., AQUACOP, 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence enzyme and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aqua Liv Res.* 7, 203-210.
- Le Moullac, G., Klein, B., Salles, D., Van Wazerhoush, A., 1997. Acquisition of tyrosin, chitinolytic and a pectinase in the hepatopancreas and proventriculus in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 208, 107-127.
- Lee, P.-G., Lawrence, A.L., 1995. Effects of food and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* Latreille. *J. World Aquacult. Soc.* 18, 275-287.
- Lee, P.-G., Lawrence, A.L., 1982. A quantitative analysis of digestive enzymes in prawn shrimp *Penaeus* in relation to diet age and species. *Physiological*, 25, 211.
- McEligott, J.A., Keller, R.J., 1989. Feeding of juvenile white shrimp *P. setiferus*: periodic or continuous? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 52, 227-237.
- Morera, C.F., Hazzouli, C.T., Trivelpy, H.J., 1984. Variaciones Carcinales de *Artemia* Boscianus en (Hemolymph) de *Penaeus japonicus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 12, 107-107.
- Nakano, H., 1998. *Accidental eramication digestive tracts crustáceos y su relación con la alimentación de camarón*. *Memorias del IV Simposio de Nutrición Acuicola*, 15-18 Noviembre 1998. La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- Reynold, H., Lapierre, J.P., 1993. Feeding rhythms and food of *P. japonicus* Tate (Crustacea, Penaeidae) in salt marsh ponds. *Bull. of halophytic environment*. *Aquaculture* 84, 175-184.
- Richard, P., Van Wazerhoush, A., Casado, H.J., 1979. Variations Carcinales des Anelles Antérieures Libres du Muscle de *Penaeus setiferus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 7, 63-67.
- Rish, W., Sugiura, H., P., 1979. *Acumylase*. In: *Bogoyevich, H.L. (Ed.), Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, Vol. II, pp. 885-894.
- Robertson, J., Bray, W., Long-Juñillo, J., Lawrence, A., 1987. Practical Molt Staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus japonicus*. *World Aquacult. Soc.* 18(2), 140-145.
- Robertson, L., Lawrence, A., Casado, H.J., 1993. Effect of feeding frequency and feeding rate in growth of the *Penaeus vannamei* (Hemolymph). *Environ. Fish Manage.* 24, 1-6.
- Sass, L., White, D., Epler, 1973. The effect of duration of feeding amount of food, light intensity, and nutrient size on rate of ingestion of pelleted food by juvenile prawn shrimp. *Prog. Fish Cult.* 35(1), 23-26.
- Skinner, D.V., 1987. Molt and regeneration. In: *Bliss, D.L., Marvel, L.H. (Eds.), The Biology of crustacea*. Vol. 9. *Academic Press*, New York, pp. 83-146.
- Smith, D., Dall, W., 1985. Moulting stages in the large prawn *Penaeus esakabatai*. *Tr. South Australian National Seminar*. PC. *Rochester Hill, B. and Staple, D. (Eds.) (Crustacea)* Australia pp. 85-95.
- Stichar, M., Nair, N.J., Srinivas, V., 1999. Tyrosin activity as a function of variation in shrimp *Penaeus*: studies (Crustacea: Decapoda). *Indian J. Mar. Sci.* 28, 110-112.
- Sugan, J., Ohera, C., Lopez, K., 1998. Variaciones carcinales de la actividad de la amilasa y maltasa en juveniles del camarón rosa *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Resúmenes del IV Simposio de Nutrición Acuicola*, 15-18 Noviembre 1998. La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- Tawilamuth, S., Srinivas, K., 1982. Effect of feeding rate and feeding frequency on protein digestibility in the freshwater shrimp *Macrobrachium esakabatai*. *J. World Aquacult. Soc.* 13, 63-72.
- Tokii, K., Shimizu, S., Takeda, M., Kaneko, S., 1986. The effect of feeding stimulus in diet on digestive enzyme activities of eel. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52, 1495-1504.
- Tran, H., Kawanishi, A., Okamoto, H., 1977. Variation in lipid classes during the molting cycle of the *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.* 28, 129-136.
- Van Wazerhoush, A., 1977. *Actividad enzimática digestiva de *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda)*. *Resúmenes del IV Simposio de Nutrición Acuicola*, 15-18 Noviembre 1998. La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- Van Wazerhoush, A., Salles, D., Douville, A., Pineda-Grau, S., Le Moullac, G., 1995a. Chitinolytic gene expression during the moulting cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Physiol.* 51, 139-145.
- Van Wazerhoush, A., Douville, G., Le Moullac, G., 1995b. Amylase polymorphism in crustacea decapoda. *Scampharmatose and mammalian studies*. *Biochem. Syst. Ecol.* 23, 126-140.
- Velasco, M., Lawrence, A.L., Costello, F.L., 1999. Effect of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of shrimp *Penaeus vannamei* (Shrimp), in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture* 179, 141-148.