



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

" SOBREVIVENCIA Y METAMORFOSIS LARVAL DE *Penaeus vannamei* (BOONE) ALIMENTADO CON *Chaetoceros gracilis* PRODUCIDA CON FERTILIZANTES AGRICOLAS "



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO

PRESENTA:

ROBERTO PEREZ CASTAÑEDA

ENSENADA, B.C.

DICIEMBRE DE 1992

" SOBREVIVENCIA Y METAMORFOSIS LARVAL DE *Penaeus vannamei* (BOONE) ALIMENTADO CON *Chaetoceros gracilis* PRODUCIDA CON FERTILIZANTES AGRICOLAS "

TESIS QUE PRESENTA:

ROBERTO PEREZ CASTAÑEDA

APROBADA POR:



**PRESIDENTE DEL JURADO
OC. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA**



**SINODAL PROPIETARIO
OC. VICTOR GENDROP FUNES**



**SINODAL PROPIETARIO
OC. CARLOS GRANADOS MACHUCA**

RESUMEN

Se comparó la sobrevivencia y metamorfosis larval de *Penaeus vannamei* alimentada con *Chaetoceros gracilis* producida con fertilizantes agrícolas, y medio f/2 (control). Las microalgas se cultivaron en agua de mar natural fertilizada con 35.285 mgL^{-1} N- NH_4NO_3 y 3.548 mgL^{-1} P- P_2O_5 , como sustitutos de nitrógeno y fósforo del medio f/2. La alimentación de la larva durante el estadio Nauplios (N₅) a Zoeas (Z₃) se mantuvo a una densidad de $100\text{-}150 \times 10^3$ cél/mL. De Mysis₁ (M₁) a Postlarva₁ (PL₁) se empleó *Artemia* como única fuente alimenticia en ambos tratamientos. El crecimiento promedio de *C. gracilis* con fertilizantes fue mayor al control. Se encontraron diferencias significativas al nivel del 5% de significancia en el segundo, tercero y cuarto día de cultivo pero no difieren al quinto día. La sobrevivencia de la larva al estadio Mysis alimentada con *C. gracilis* producida con fertilizantes fue 69% y 77.5% con f/2. Se encontraron diferencias significativas al 95% de confianza para este estadio. Sin embargo, en PL₁ no se encontraron diferencias. Se concluye que el uso de fertilizantes agrícolas constituyen una alternativa viable para el cultivo de *C. gracilis* y su uso como alimento para larvas de *P. vannamei*.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California por haberme facilitado el laboratorio de acuicultura sección microalgas. Y por darme acceso a las computadoras para procesar los datos y elaborar el escrito. Especialmente a mi director de la tesis Oc. Enrique Valenzuela Espinoza jefe del proyecto "producción de microalgas" del IIO, por el tiempo dedicado para orientarme en la elaboración del trabajo, por proveerme el material para imprimir la tesis, además le agradezco por enseñarme las técnicas de cultivo de microalgas y sobre todo por brindarme su amistad. A mis sinodales Oc. Victor Gendrop Funes y Oc. Carlos Granados Machuca por sus atinadas sugerencias para mejorar el escrito.

Al secretario del Centro de Investigaciones Acuícolas y Pecuarias (CIAP) de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, M.V.Z. Domingo García Guerra por brindarme la oportunidad de realizar el experimento en el laboratorio de producción de postlarva de camarón "Unidad Marina", así como al jefe del laboratorio M.V.Z. Jaime Rábago Castro.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

RICARDO PEREZ VARGAS Y

ENEDELIA CASTAÑEDA PESINA

QUIENES CON SU ESFUERZO LOGRARON MI FORMACION
PERSONAL Y PROFESIONAL.

A MI ABUELA:

CLEMENCIA VARGAS VDA. DE PEREZ

A MIS HERMANOS:

RICARDO, ERENDIRA Y OMAR

C O N T E N I D O

	Pág.
1.- INTRODUCCION	1
1.1 ANTECEDENTES	5
1.2 OBJETIVO	8
2.- MATERIALES Y METODOS	9
2.1 CULTIVO DE MICROALGAS	9
2.2 CULTIVO DE LARVAS	11
3.- RESULTADOS	14
3.1 CULTIVO DE MICROALGAS	14
3.2 CULTIVO DE LARVAS	17
4.- DISCUSIONES	21
5.- CONCLUSIONES	27
6.- LITERATURA CITADA	28

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA I. Secuencia del cultivo larvario experimental	13
TABLA II. Valores poblacionales promedio de <i>Chaetoceros gracilis</i> con el medio f/2 de Guillard (1975)	16
TABLA III. Valores poblacionales promedio de <i>Chaetoceros gracilis</i> con NH_4NO_3 y P_2O_5 como sustitutos de nitrógeno y fósforo del medio f/2 de Guillard (1975)	16
TABLA IV. Supervivencia de larvas de <i>Penaeus vannamei</i> con <i>Chaetoceros gracilis</i> producida con f/2	19
TABLA V. Supervivencia de larvas de <i>Penaeus vannamei</i> , alimentadas con <i>Chaetoceros gracilis</i> producida con fertilizantes agrícolas	19

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Crecimiento promedio de <i>Chaetoceros gracilis</i> con el medio f/2 (A) y con fertilizantes (B)	15
FIGURA 2. Promedio del número de larvas sobrevivientes de <i>Penaeus vannamei</i> , durante los días del cultivo larvario	18
FIGURA 3. Sobrevivencia promedio de <i>Penaeus vannamei</i> en sus diferentes fases larvarias	20

1. INTRODUCCION

La mayoría de las algas pueden utilizar nitratos, nitritos y amonio como principales formas inorgánicas de nitrógeno, y como forma orgánica la urea. Sin embargo, el nitrato y el amonio son las dos formas más importantes de nitrógeno combinado que pueden limitar la productividad o biomasa fitoplanctónica, tanto en ambientes marinos como en sistemas de cultivo (Syrett, 1981).

Los medios más comunes para el cultivo de microalgas son los químicamente definidos, como el f/2 de Guillard (1975) y el Matthiessen y Torner (1966). En años recientes diversos investigadores han desarrollado medios de cultivo sustituyendo los nutrientes mayores como el nitrógeno y el fósforo por fertilizantes agrícolas que contienen estos elementos (Boyd *et al.*, 1981; Herrera-Treviño, 1988; Wilburn-González, 1990; Ocampo-Aranda, 1990).

En cultivos de camarones peneidos existen varias especies de microalgas que se usan como alimento para larvas zoeas, en función de sus diferentes requerimientos nutricionales. Como *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* muestran extremada dependencia por diatomeas entre las que se encuentra *Chaetoceros gracilis* que es

nutricionalmente superior a las fitoflageladas para la metamorfosis larval (Kuban *et al.*, 1985). *C. gracilis* es una diatomea céntrica solitaria, perteneciente a la clase Bacillariophyceae. Es de forma rectangular y mide 8-12 x 7-10 μm excluyendo las setas (Simon, 1978; Darley, 1987). Los métodos más usados para la producción algal son: Uno llamado producción a gran escala o método abierto, que consiste en añadir nutrientes a los tanques de cultivo larvario, para inducir un "bloom" fitoplanctónico. Y otro llamado producción a pequeña escala o método cerrado, que consiste en cultivar una sola especie o mezcla de microalgas en tanques individuales y en condiciones controladas, añadiendo únicamente la cantidad requerida de microalgas por estadio larval (Liao *et al.*, 1983). En ambos métodos las fuentes de nitrógeno y fósforo para las microalgas, en su mayoría, han sido de grado reactivo como NaNO_3 KNO_3 y NaHPO_4 (Cook y Murphy, 1969). Aunque en cultivos larvarios de otros organismos, como moluscos bivalvos, donde se requieren grandes volúmenes de alimento, se ha experimentado con éxito el uso de fitoplancton producido con fertilizantes agrícolas (Ocampo-Aranda, 1990). Poco se ha investigado sobre el efecto de las microalgas para alimentar larvas zoeas de camarón, empleando un medio de cultivo que contenga

nitrato de amonio (NH_4NO_3) y ácido fosfórico (P_2O_5). Si bien, el amonio es el principal producto de excreción de los crustáceos (Hartenstein, 1972), es considerado como uno de los tóxicos más comunes en los sistemas de cultivo intensivo (Campbell, 1973). La forma ionizada (NH_4^+) se transforma por hidrólisis a (NH_3) la cual tiene una alta solubilidad lipídica, por lo tanto es capaz de pasar a través de las membranas celulares de las branquias (Fromm y Guillete, 1968) y de esta manera incrementa su concentración en la sangre a un nivel tóxico, y su concentración en el medio depende de la temperatura, salinidad y pH (Whitfield, 1974; Bowel, 1978). En cultivos larvarios se ha establecido un nivel máximo aceptable de 0.1 mg NH_3/L para postlarvas de peneidos (Wickins, 1976). Valores más conservadores se han calculado para *Penaeus monodon* de 0.025 ppm de NH_3 durante todo el cultivo (Jayasankar y Muthu, 1983) y 0.01 mg NH_3/L específicamente para nauplios (Chin y Chen, 1987). Se espera que los niveles de amonio en el medio de cultivo de las microalgas sean bajos al tercero y cuarto día de su inoculación, debido a que es la fuente de nitrógeno más reducida y su asimilación no implica un gasto energético por las microalgas (Syrett, 1981). Así mismo, Lui y Roels (1972) indican que las células

remueven el amonio del medio, de 2.3 a 2.4 veces más rápido que los nitratos y nitritos en las primeras 24 horas de su inoculación. El crecimiento de las células en el medio de amonio convierten el nitrógeno en proteína celular más rápido, que aquellas que se cultivan con nitratos o nitritos. De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se plantea si *Chaetoceros gracilis* cultivada con nitrato de amonio y ácido fosfórico tendrá efectos significativos como alimento en la sobrevivencia y metamorfosis larval de *Penaeus vannamei* así como en la obtención final de postlarvas.

1.1 ANTECEDENTES

Desde que se realizaron los primeros desoves de camarón en laboratorio (Hudinaga, 1942), se han desarrollado técnicas para mejorar la producción de larvas. En estadios larvales uno de los aspectos más importantes es la alimentación (Preston, 1985). En años recientes se han realizado estudios para reducir costos y simplificar el cultivo con el uso de alimentos artificiales (New, 1976) en base a partículas de soya (Hirata *et al.*, 1975), yema de huevo (Fuze *et al.*, 1985), tejido de crustáceos en suspensión (Tacon, 1986) y microencapsulados (Jones *et al.*, 1973) entre otras. Sin embargo, el alimento por naturaleza es el fitoplancton vivo (Treece y Yates, 1988), el cual es utilizado por la mayoría de los laboratorios como alimento exclusivo para larvas zoeas de camarón.

Investigaciones sobre el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno para el cultivo de microalgas han sido realizados por Lui y Roels (1972) quienes demostraron que *Biddulphia aurita* puede crecer indistintamente en un medio con nitratos, nitritos o amonio. Sin embargo, mencionan que el NH_4^+ es removido más rápido del medio que los otros compuestos. Así mismo,

Syrett (1981) demostró que dicha asimilación preferencial de las microalgas por el amonio (NH_4^+) se debe a su estado reducido el cual no requiere actividad enzimática ni representa un gasto energético para las células.

Por otra parte Herrera-Treviño (1988) y Wilburn-González (1990) desarrollaron cultivos masivos de *Tetraselmis suecica* y *Pavlova lutheri* respectivamente, con fertilizantes agrícolas como fuente de nitrógeno y no encontraron diferencias entre la densidad poblacional obtenida con los fertilizantes y el f/2 de Guillard (1975).

Actualmente las técnicas de producción de microalgas con los medios de cultivo en base a fertilizantes agrícolas se han implementado para la alimentación de larvas de moluscos bivalvos como *Mytilus edulis* (Ocampo-Aranda, 1990). Pero también puede ser factible para larvas de crustáceos, ya que, Simon (1978) realizó un estudio sobre el cultivo de *Chaetoceros gracilis* y su uso como alimento para larvas zoeas de *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris*. Encontró que al fertilizar tanques de 40m^3 con NH_4NO_3 y NaH_2PO_4 alcanzó concentraciones entre 30×10^3 y 100×10^3 cél/mL y obtuvo sobrevivencias en larvas de zoea a mysis de 84.8% para *P. stylirostris* y 79.3% para *P. vannamei*. No obstante, un problema común fueron

los crecimientos acelerados de las microalgas de 100×10^3 hasta 450×10^3 cél/mL con un subsecuente colapso del cultivo que provocó mortalidades masivas de las larvas. Métodos alternos para evitar lo anterior es añadir únicamente la concentración de alimento requerida por estadio larval (Liao *et al.*, 1983) preferentemente en la fase exponencial donde el cultivo presenta una composición bioquímica estable (Guillard, 1975).

Experimentos de sobrevivencia de nauplio a PL realizados por Cook y Murphy (1969); Mock (1974) en cultivos larvarios de *Penaeus aztecus* reportan 69.6% y 48% respectivamente. Para *P. japonicus* Jones, *et al.* (1979) de 65%. Y en *P. indicus* el 74% (Emmerson y Andrews, 1981). Para *P. vannamei* se obtienen sobrevivencias a PL de 65-80% (Aquacop, 1983). Fuze (1985) y Kuban, *et al.* (1985) presentan datos de 87.8% y 86.45% respectivamente.

En las investigaciones anteriores las microalgas utilizadas como alimento para larvas zoeas se cultivaron en medios preparados con nutrientes grado analítico lo cual incrementa los costos. En este trabajo se utilizó NH_4NO_3 y P_2O_5 derivados de fertilizantes agrícolas para la producción de *C. gracilis*. Aunque se ha observado que el (NH_4^+) es tóxico para cultivos larvarios (Jayasankar y

Muthu, 1983; Chin y Chen, 1987), también es cierto que esta fuente de nitrógeno la captan y asimilan más rápido que otras formas nitrogenadas, y poco se ha incursionado en la alimentación de larvas de camarón con microalgas cultivadas con fuentes reducidas de nitrógeno derivadas de fertilizantes agrícolas. Bajo este contexto, se plantea la hipótesis que el nutriente utilizado para la producción de *Chaetoceros gracilis* no tendrá efectos significativos en la sobrevivencia de larvas de *Penaeus vannamei* como en la obtención de postlarvas.

1.2 OBJETIVO

Evaluar la sobrevivencia y metamorfosis larval de *Penaeus vannamei*, hasta la obtención de postlarvas (PL₁), alimentado con *Chaetoceros gracilis* cultivada con fertilizantes agrícolas como sustitutos de nitrógeno y fósforo del medio f/2.

2. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de producción de postlarva de camarón "Unidad Marina" perteneciente al Centro de Investigaciones Acuícolas y Pecuarias (CIAP) de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT). Dicho centro está ubicado en el Ejido "La Pesca", Tamaulipas; y cuenta con un sistema de bombeo desde un manto freático, que abastece al sistema. El agua de mar es tratada con filtros de carbón activado, filtros de cartucho de 10, 5 y 1 μm , y con un sistema de luz ultravioleta.

2.1 CULTIVO DE MICROALGAS

La cepa de *Chaetoceros gracilis* se adquirió de Texas A&M University y se mantuvo en el laboratorio a una temperatura controlada entre 22.5 y 24°C con el medio f/2 de Guillard (1975). La secuencia del cultivo fue en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo cada uno 150 mL de medio y se continuó en Fernbach con capacidad de 2.8 L, con un volumen de 1.5 L de medio de cultivo. Estos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb/pulg² de presión durante 10 minutos. Cada Erlenmeyer se inoculó con 7 mL de cepa para posteriormente inocular los

Fernbach con 150 mL en condiciones controladas. Los cultivos en Erlenmeyer y Fernbach crecieron en iluminación continua, proporcionada por lámparas fluorescentes (General Electric de 40 W) por un período de cuatro días, y se agitaron diariamente para evitar el asentamiento de células y que ocurriera una difusión de CO₂. Los garrafones con capacidad de 20 L fueron lavados y el agua de mar utilizada fue tratada con una solución de hipoclorito de sodio (0.25 mL/L) y tiosulfato (0.1 mL/L) como lo describe Pruder y Bolton (1978).

En estos garrafones se experimentó con los dos medios de cultivo. El f/2 de Guillard (1975) y el medio con los fertilizantes. La concentración de nitrato de amonio (35.285 mgL⁻¹) marca Fertimex y ácido fosfórico (3.548 mgL⁻¹) marca Sudbury, se calcularon en función del peso molecular del nitrógeno y fósforo del medio f/2. Se prepararon las soluciones stock de fertilizantes, los cuales fueron pesados y disueltos en agua destilada para después ser esterilizados a 121°C y 15 lb/pulg² de presión por 10 minutos.

A cada garrafón se le agregaron los nutrientes correspondientes (1 mL/L) y se inocularon con 800 mL de cultivo logrado en Fernbach. Posteriormente se colocaron en una fuente de luz constante con cuatro lámparas

fluorescentes (Solar de 75 W) y un flujo de aire constante. Estuvieron bajo estas condiciones de 3 a 4 días para después alimentar a las larvas de camarón.

La cuantificación de los cultivos se realizó con una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad, mediante un microscopio compuesto (Zeiss).

2.2 CULTIVO DE LARVAS

Para evitar diferencias en las razones de desarrollo y posible canibalismo de estadios avanzados sobre los estadios inferiores (McVey y Fox, 1983), los nauplios de *Penaeus vannamei* fueron producto de una sola hembra adulta silvestre, la cual se indujo a madurar mediante ablación unilateral en la sala de maduración del CIAP. Posteriormente en la sala de desove se obtuvieron los nauplios, los cuales se aclimataron a las condiciones del experimento y se colocaron cinco réplicas de cada tratamiento a una densidad de 80 nauplios/L en conos tipo imhoff de polietileno con 1.5 L de agua de mar, este procedimiento es similar al utilizado por Kuban, *et al.* (1985); Fuze, *et al.* (1985) y Chin y Chen (1987). El agua fue tratada con EDTA-Na₂ a una concentración de 10 mgL⁻¹ (Mock, 1974; Castille y Lawrence, 1981). Se mantuvieron

con un flujo de aire constante y en baño maría para mantener una temperatura estable (27-28°C).

Durante los últimos subestadios naupliares inició el experimento con los dos tratamientos. En cinco conos se alimentaron las larvas con *Chaetoceros gracilis* producida con el f/2 y en otros cinco con la producida con fertilizantes. Se inició con una densidad de alimento de 100×10^3 cél/mL. A partir del estadio zoea₁ la densidad se mantuvo en 150×10^3 cél/mL; y de zoeas a mysis₁ se hizo un recambio de agua del 100% y el alimento consistió de 100×10^3 cél/mL de microalgas (SEAFDEC, 1978) y 0.2 nauplios/mL de *Artemia* viva línea Franciscana. Por último, de mysis₁ hasta mysis₃ los recambios de agua fueron del 75% y se alimentaron con 0.5 nauplios/mL de *Artemia* viva. Esta secuencia del cultivo a partir de mysis₁ es parecida a la seguida por Aquacop (1983). Una vez que las larvas de cada tratamiento metamorfizaron al estadio PL₁ se suspendió el experimento (Tabla I). Se llevaron registros diarios del desarrollo larvario tomando una muestra reemplazable de 5 larvas de cada cono con una pipeta Pasteur, y se tomaron dos muestras reemplazables de 250 mL de cada cono para obtener los porcentajes de sobrevivencia en cada estadio. También se registraron algunas variables como la temperatura, con un

termómetro de mercurio ($\pm 1^\circ\text{C}$), salinidad con un refractómetro Reichert-Jung ($\pm 1\text{‰}$) y pH con un Hach portable water test kit (± 0.5).

Se empleó un análisis de homogeneidad de varianzas de Bartlett como requisito para estadística paramétrica. Para evaluar diferencias significativas entre las medias de ambos tratamientos se realizó un ANOVA de una vía para cada estadio larval (Zar, 1987).

Tabla I. Secuencia del cultivo larvario experimental.

FECHA	ESTADIO	ALIMENTO		% DE RECAMBIO DE AGUA
		<i>C. gracilis</i> cél/mL	<i>Artemia</i> np/mL	
18/VI	Np	100,000	-	-
19/VI	Z ₁	150,000	-	-
20/VI	Z ₁ -Z ₂	150,000	-	-
21/VI	Z ₂	150,000	-	-
22/VI	Z ₂ -Z ₃	150,000	-	-
23/VI	Z ₃	150,000	-	-
24/VI	Z ₃ -M ₁	100,000	0.2	100
25/VI	M ₁	-	0.5	75
26/VI	M ₂	-	0.5	75
27/VI	M ₂ -M ₃	-	0.5	75
28/VI	M ₃	-	0.5	75
29/VI	PL ₁			COSECHA

Np Nauplio
 Z₁-Z₃ Zoea
 M₁-M₃ Mysis
 PL₁ Postlarva

3. RESULTADOS

3.1 CULTIVO DE MICROALGAS

Se cultivó *Chaetoceros gracilis* a temperatura entre 22.5 y 24°C con un valor medio de 23.1 \pm 0.14°C. El pH varió entre 8.0 y 9.0 con un valor medio de 8.4 \pm 0.08. La salinidad se mantuvo en 32 ‰. El crecimiento de *C. gracilis* en las condiciones antes descritas, se muestra en la figura 1. Donde la concentración inicial promedio para ambos medios de cultivo fueron similares (Tablas II, III). Para los días 2, 3 y 4 se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) donde, las concentraciones de células obtenidas con los fertilizantes fueron mayores a aquellas obtenidas con el medio f/2. Al quinto día se registraron crecimientos máximos de 3 315 000 y 3 165 000 cél/mL respectivamente (Figura 1; Tablas II, III). Durante las primeras 48 horas del cultivo la tasa de crecimiento máxima (μ) y las divisiones por día (div/día) para las microalgas producidas con fertilizantes ($\mu=1.58$; div/día=2.28) fueron mayores que las cultivadas con el medio f/2 ($\mu=1.40$; div/día=2.01). Sin embargo, al tercer día la tasa de crecimiento del cultivo en fertilizantes disminuyó de 1.57 a 0.29 y las div/día de 2.26 a 0.42. En f/2 la tasa de crecimiento disminuyó de 1.21 a 0.67 y las

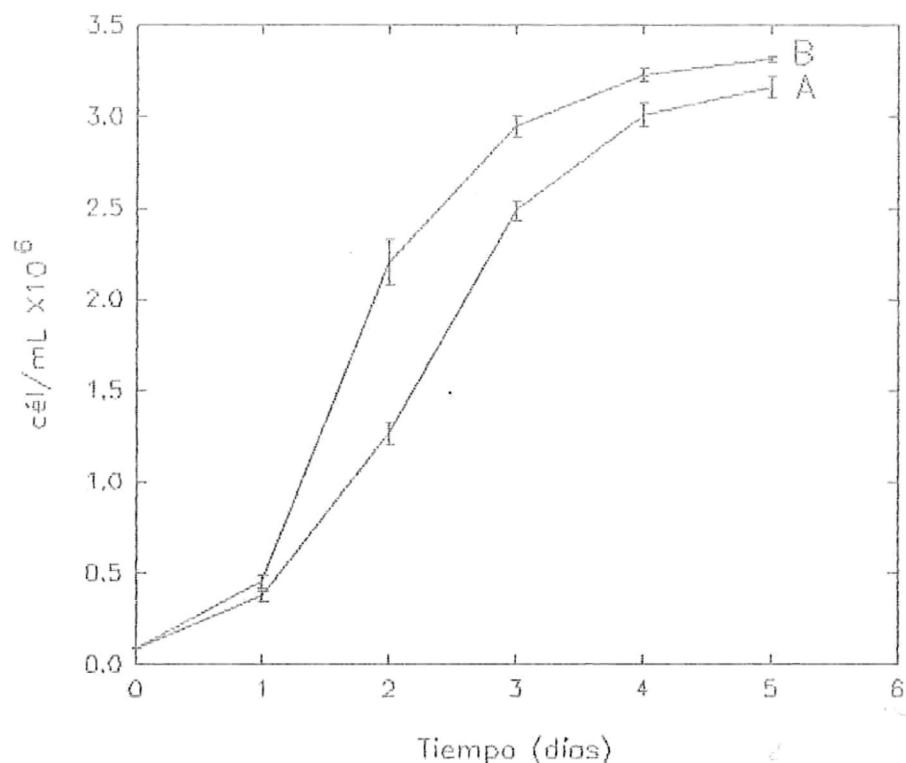


Figura 1. Crecimiento promedio de *Chaetoceros gracilis* con el medio f/2 (A) y con fertilizantes (B).

div/día de 1.75 a 0.97 (Tablas II, III). Estos parámetros presentaron la misma tendencia hasta el quinto día, donde se registró una μ de 0.05 y 0.07 div/día para el medio control. Con el medio alterno se obtuvo una μ de 0.02 con 0.04 div/día. Los tiempos de duplicación (TD) fueron inversamente proporcionales a los parámetros arriba descritos en ambos tratamientos.

De acuerdo a lo anterior, se determinó que la fase de crecimiento exponencial para ambos tratamientos está comprendida entre los días 1-3. Sin embargo, los tiempos de cosecha se realizaron a los días 3 y 4.

Tabla II. Valores poblacionales promedio de *Chaetoceros gracilis* con el medio f/2 de Guillard (1975).

Tiempo (días)	Concentración (cél/mL)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/mL)
0	92,750	-	-	-	---
1	375,750	1.40	0.49	2.01	283,000 \pm 28,795
2	1,268,500	1.21	0.57	1.75	892,750 \pm 42,915
3	2,490,375	0.67	1.02	0.97	1,221,815 \pm 74,509
4	3,012,250	0.19	3.64	0.27	521,875 \pm 49,379
5	3,165,000	0.05	14.01	0.07	152,750 \pm 42,426
PROMEDIOS		$\mu=1.09$	TD=0.69	D=1.57	

Tabla III. Valores poblacionales promedio de *Chaetoceros gracilis* con NH_4NO_3 y P_2O_5 como sustitutos de nitrógeno y fósforo del medio f/2 de Guillard (1975).

Tiempo (días)	Concentración (cél/mL)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/mL)
0	94,000	-	-	-	---
1	458,750	1.58	0.43	2.28	364,750 \pm 37,510
2	2,205,250	1.57	0.44	2.26	1,748,500 \pm 114,352
3	2,950,500	0.29	2.37	0.42	747,250 \pm 88,299
4	3,228,750	0.09	7.75	0.13	276,250 \pm 44,306
5	3,315,000	0.02	26.29	0.04	86,250 \pm 10,606
PROMEDIOS		$\mu=1.14$	TD=1.08	D=1.65	

3.2 CULTIVO DE LARVAS

La temperatura en el cultivo de larvas se mantuvo en un intervalo de 27 a 28°C con una media de 27.5 ± 0.13 °C. El pH fluctuó entre 8.0 y 9.0 con un valor medio de 8.2 ± 0.07 y la salinidad se mantuvo en 32 ‰. En estas condiciones la sobrevivencia de *Penaeus vannamei* disminuyó gradualmente conforme transcurrieron los días del desarrollo larvario. Sin embargo, no hubo diferencias en los tiempos de metamorfosis cuando se probaron las diferentes dietas (Figura 2). Así mismo, se encontró que al utilizar microalgas con el medio control (f/2) el número promedio de larvas en estadio zoea fue 104.4 ± 2.58 (87%), 93 ± 2.12 (77.5%) para mysis y 78.8 ± 2.92 (65.6%) postlarvas a los días 2, 8 y 12 del cultivo larvario respectivamente (Figura 2; Tabla IV). Al alimentar las larvas con microalgas producidas con fertilizantes el número promedio de sobrevivencia de zoeas fue 97.8 ± 2.78 (81.5%), 82.8 ± 2.03 (69%) para mysis y 72.2 ± 2.22 (60.1%) postlarvas para el mismo intervalo de tiempo que el control (Figura 2; Tabla V). La sobrevivencia de la larva después de 7 días de experimentación (estadio mysis), alimentada con *Chaetoceros gracilis* producida con el medio f/2 fue mayor al obtenido con el tratamiento alterno. Se encontraron diferencias significativas al 95%

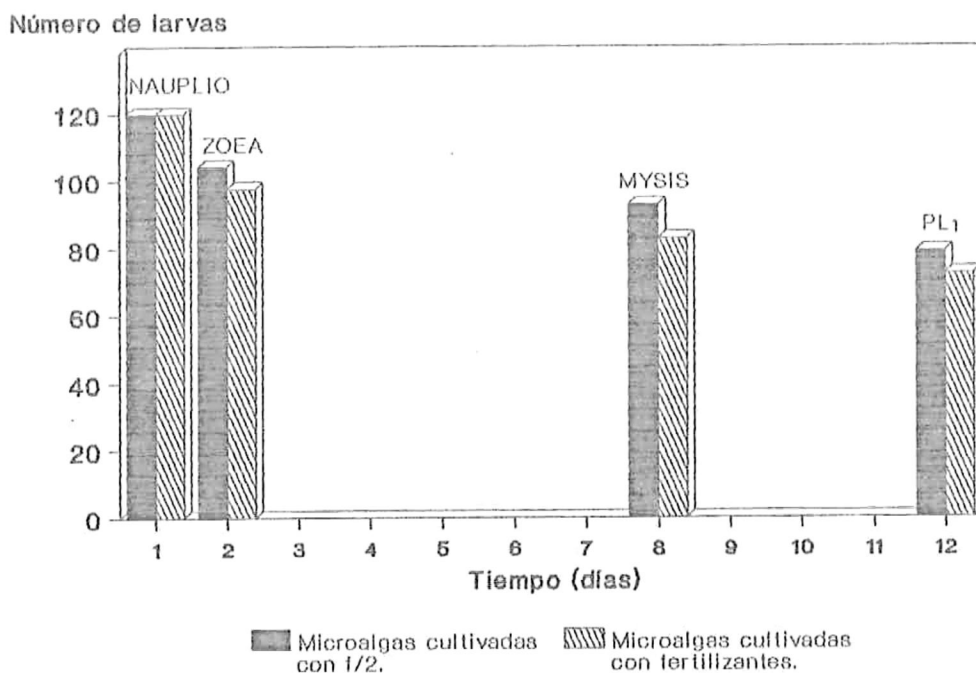


Figura 2. Promedio del número de larvas sobrevivientes de *Penaeus vannamei*, durante los días del cultivo larvario.

de confianza en ambos tratamientos. Sin embargo, al final del experimento la sobrevivencia de postlarvas obtenidas con ambos tratamientos no fueron significativamente diferentes ($P \geq 0.05$) (Figura 3; Tablas IV, V).

Tabla IV. Sobrevivencia de larvas de *Penaeus vannamei*, alimentadas con *Chaetoceros gracilis* producida con f/2.

ESTADIO	DIA	LARVAS POR REPLICA					MEDIA	% DE SOBREV
		1	2	3	4	5		
NAUPLIO	1	120	120	120	120	120	120.0	100.0
ZOEA	2	105	96	108	111	102	104.4 ±2.58	87.0
MYSIS	8	93	87	99	96	90	93.0 ±2.12	77.5
PL ₁	12	84	74	70	85	81	78.8 ±2.92	65.6

Tabla V. Sobrevivencia de larvas de *Penaeus vannamei*, alimentadas con *Chaetoceros gracilis* producida con fertilizantes agrícolas.

ESTADIO	DIA	LARVAS POR REPLICA					MEDIA	% DE SOBREV
		1	2	3	4	5		
NAUPLIO	1	120	120	120	120	120	120.0	100.0
ZOEA	2	99	93	105	90	102	97.8 ±2.78	81.5
MYSIS	8	81	78	81	84	90	82.8 ±2.03	69.0
PL ₁	12	72	69	67	73	80	72.2 ±2.22	60.1

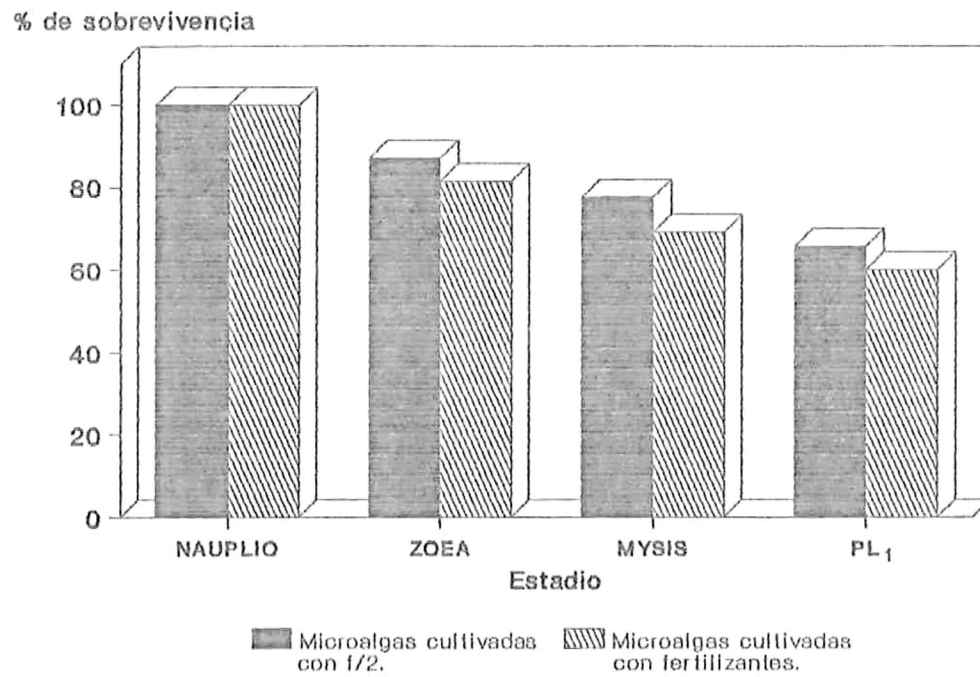


Figura 3. Sobrevivencia promedio de *Penaeus vannamei* en sus diferentes fases larvarias.

4. DISCUSIONES

Entre los principales factores que influyen en la producción algal está la temperatura, pH y salinidad, los cuales se mantuvieron en el intervalo reportado para la especie *Chaetoceros gracilis* (Trecece y Yates, 1988).

La producción que se obtuvo al utilizar fertilizantes agrícolas comerciales (NH_4NO_3 y P_2O_5) fue mayor que aquella obtenida con el medio control (f/2 de Guillard, 1975) para los días 2, 3 y 4 del cultivo (Figura 1; Tablas II, III). Esta diferencia probablemente se debe a que el mecanismo de transporte del amonio es por difusión a través del plasmalema y debido al gradiente electroquímico negativo de la membrana celular, es más fácil de tomar por el fitoplancton (Wheeler, 1983). Por otra parte, el amonio es la forma más reducida del nitrógeno y cuando ambas formas de nitrógeno están presentes en el medio de cultivo se inhibe la nitrato reductasa, debido a la presencia del amonio, el cual es asimilado directamente para la formación de aminoácidos (Syrett, 1981; Lobban *et al.*, 1985). Estudios hechos con *Biddulphia aurita* han mostrado que el amonio es asimilado a una razón de 2.3 a 2.4 veces más rápido que los nitratos y nitritos (Lui y Roels, 1972). La respuesta del

crecimiento de las células con el medio f/2 fue más lento porque su fuente de nitrógeno (NO_3^-) requiere de actividad enzimática de la nitrato y nitrito reductasa para transformar el nitrato a nitrito y por último a amonio antes de ser asimilado por la célula, lo cual implica un gasto de energía (ATP) (Syrett, 1981; Wheeler, 1983) reflejándose en una menor producción en los primeros días del crecimiento (Figura 1).

Esta preferencia de las microalgas por el amonio se tradujo en una tasa de crecimiento (μ) y div/día (D) mayores con los fertilizantes durante las primeras 48 horas. Para los días subsecuentes se registraron valores poblacionales menores para el cultivo con fertilizantes que con el control (Tablas II, III). Esta diferencia es atribuida a la rápida asimilación del amonio por las microalgas. Droop (1975) establece que la tasa de crecimiento disminuye cuando el abastecimiento de nutrientes es escaso para las necesidades metabólicas de la población algal. Sin embargo, al quinto día de cultivo la concentración celular no fue significativamente diferente ($P \geq 0.05$) en ambos tratamientos (Figura 2; Tablas II, III).

Debido a la importancia de la calidad nutricional de las microalgas para proveer una dieta adecuada para

larvas de camarón (Preston *et al.*, 1992) la cosecha del cultivo algal se realizó durante la última etapa de su crecimiento exponencial, entre los días 3 y 4, para ambos tratamientos porque se ha demostrado que en esta fase las células se encuentran en su mejor estado fisiológico (Guillard, 1975).

Los factores físicos (temperatura, salinidad y pH) en el cultivo larvario de *Penaeus vannamei* estuvieron dentro del intervalo recomendado (Aquacop, 1983; Treece y Yates, 1988) por lo tanto, se asume que no influyeron en su sobrevivencia y desarrollo. Sin embargo, estos factores rigen el porcentaje de disociación de NH_4^+ a NH_3 en el medio de cultivo (Whitfield, 1974; Bowel, 1978) y de acuerdo a los valores promedio de los parámetros físicos y mediante la ecuación de Whitfield (1974) se calculó un porcentaje de la forma tóxica (NH_3) de 7.86. Aunque no se midió la concentración total de NH_4^+ , el cual es el principal producto de excreción de los crustáceos (Hartenstein, 1972) y que pudo verse incrementado por la adición del medio de cultivo con fertilizantes, se asume que no fue así por su rápida asimilación por parte de las microalgas (Lui y Roels, 1972; Syrett, 1981). Además, mediante la aireación

también se elimina su fuente tóxica por ser la forma gaseosa del nitrógeno (Whitfield, 1974).

Los cambios de estadio son críticos para la larva y están aunados a una cierta mortalidad natural (Aquacop, 1983; McVey y Fox, 1983) a la cual se le añade la inducida por manipuleo. Con la finalidad de disminuirla, en este trabajo no se muestreó la población durante subestadios (Figura 3). No obstante, las mortalidades de nauplio a zoea fueron mayores que las obtenidas en los estadios siguientes (Figura 3, Tablas IV, V), lo cual puede atribuirse a la calidad del nauplio, ya que según estudios realizados por Aquacop (1983) se ha encontrado que su viabilidad varía de acuerdo a las condiciones de los reproductores. Tomando estas consideraciones, para evitar que esta mortalidad influya, la mayoría de los trabajos de sobrevivencia en larvas de peneidos se han realizado a partir del estadio zoea₁ (Fuze *et al.*, 1985; Kuban *et al.*, 1985; Kurmaly *et al.*, 1989). Sin embargo, en los laboratorios comerciales las microalgas son suministradas a partir del estadio naupliar 5 (McVey y Fox, 1983) además se requiere comprobar la posible toxicidad del medio de cultivo con fertilizantes y debido a que los nauplios son los menos tolerantes al NH₃

(Jayasankar y Muthu, 1983), se inició la fase experimental a partir de este estadio (Tabla I).

Al metamorfizar a mysis se observaron diferencias significativas en sobrevivencia, con 8.5% menor al suministrar las microalgas producidas con fertilizantes (Figura 4; Tablas IV, V), lo cual probablemente indica que durante los estadios de zoea si influyó este alimento. Posteriormente en ambos tratamientos se utilizó *Artemia* como única fuente alimenticia (Tabla I) y debido a que no hubo diferencias significativas en la sobrevivencia a PL₁, se comprueba que el alimento producido con fertilizantes no repercutió en el desarrollo de la larva.

Los porcentajes resultantes en este trabajo fueron menores a los obtenidos por Fuze, *et al.* (1985) sin embargo, están dentro del intervalo reportado por Aquacop (1983); esto posiblemente debido a diferentes condiciones de cultivo o inclusive a diferencias entre lotes de larvas (Emmerson y Andrews, 1981).

Por otra parte, la metamorfosis de los estadios larvales fueron simultáneos con ambos tratamientos (Figura 2) lo cual indica que no hubo diferencias en cuanto a la calidad del alimento producido con ambos medios de cultivo; esto concuerda con los resultados

obtenidos por Cebrero-Nuñez (en preparación) quien encontró valores similares en la determinación de proteínas, lípidos y carbohidratos de *Chaetoceros gracilis* cultivada con NH_4NO_3 y P_2O_5 . Aunque el cultivo algal monoespecífico producido en laboratorio con nutrientes grado reactivo contribuyen a incrementar el valor comercial del producto final (postlarvas de camarones peneidos), es claro que el uso de fertilizantes agrícolas como sustitutos de nitrógeno y fósforo involucra una reducción de gastos con respecto al medio f/2, por lo tanto se presenta como una alternativa viable para cultivar *C. gracilis* destinada a la alimentación de larvas de *Penaeus vannamei*, ya que no mostró efectos significativos en la producción de postlarvas ni en su metamorfosis.

5. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo mayor producción de *Chaetoceros gracilis* al utilizar fertilizantes agrícolas que en medio f/2.

2. La sobrevivencia de *Penaeus vannamei* hasta postlarva₁ (PL₁) no fue significativamente diferente ($P \geq 0.05$) con ambos tratamientos.

3. El uso de fertilizantes agrícolas constituyen una alternativa viable para el cultivo de *C. gracilis* y su uso como alimento en el desarrollo larval de *Penaeus vannamei*.

6. LITERATURA CITADA

- Aquacop, 1983. Penaeid larval rearing in the Centre Océanologique du Pacifique. In: J. McVey (Ed), CRC Handbook of Mariculture. Vol.I. Crustacean Aquaculture, 123-127.
- Bower, C.E. y J.P. Bidwell, 1978. Ionization of ammonia in seawater: Effects of temperature, pH and salinity. J. Fish. Res. Board Can., 35:1012-1016.
- Boyd, E.C., Y. Musig y L. Tucker, 1981. Effects of three phosphorus fertilizers on phosphorus concentrations and phytoplankton production. Aquaculture, 22:175-180.
- Campbell, J.W., 1973. Nitrogen excretion. In: C.L. Prosser (Ed) Comparative Animal Physiology. Third Edition W.D. Edition W.D. Saunders, Toronto, Ont. 966 págs.
- Castille, F.L. y A.L. Lawrence, 1981. The effects of EDTA (Ethylenedinitrotetraacetic acid) on the survival and development of shrimp nauplii (*Penaeus stylirostris* Stimpson) and the interactions of EDTA with the toxicities of cadmium, calcium, and phenol. J. World Maricult. Soc. 12(2):292-304.
- Cabrero-Núñez, F., (en preparación). Determinación bioquímica de *Chaetoceros gracilis* (Schutz) cultivada con fertilizantes agrícolas, en condiciones de laboratorio. Ensenada B.C., UABC, FCM, Tesis de licenciatura.
- Chin, T.S. y J.C. Chen, 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture, 66:247-253.
- Cook, H.L. y M.A. Murphy, 1969. The culture of larval penaeid shrimp. Trans. Amer. Fish. Soc., 4:751-754.
- Darley, M.W., 1987. Biología de las algas. Enfoque fisiológico. Ed. Limusa, 236 págs.
- Droop, M.R., 1975. The nutrient status of alga cells in batch culture. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 55:541-555.

- Emmerson, W.D. y B. Andrews, 1981. The effect of stocking density on the growth, development and survival of *Penaeus indicus* Milne Edwards larvae. *Aquaculture*, 23:45-57.
- Fromm, P.O. y J.R. Gillette, 1968. Effect of ambient ammonia on blood ammonia and nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 26:887-896.
- Fuze, D.M., J.S. Wilkenfeld y A.L. Lawrence, 1985. Studies on the use of boiled chicken egg yolk as a feed for rearing penaeid shrimp larvae. *The Texas Journal of Science*, 37(4):371-382.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Publishing Co., New York, 29-60.
- Hartenstein, R., 1970. Nitrogen metabolism in non-insect arthropods. In: J. W. Campbell (Ed) *Comparative biochemistry of nitrogen metabolism. I. The invertebrates*. Academic Press, New York, 299-372.
- Herrera-Treviño, J.R., 1988. El fertilizante agrícola como alternativa en cultivos externos para la producción masiva de *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. Ensenada B.C., UABC, FCM, Tesis de licenciatura, 47 págs.
- Hirata, H., Y. Mori y M. Watanabe, 1975. Rearing of prawn *Penaeus japonicus*, fed soy-cake particles and diatoms. *Mar. Biol.*, 29:9-13.
- Hudinaga, M., 1942. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate. *Jap. J. Zool.* 10:305-393.
- Jayasankar, P. y M.S. Muthu, 1983. Toxicity of ammonia to the larvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian Journal of Fisheries*, 30(1):1-12.
- Jones, D.A., A. Kanazawa y S.A. Rahman, 1979. Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 17:33-43.

- Kuban, F.D., A.L. Lawrence y J.S. Wilkenfeld, 1985. Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. *Aquaculture*, 47:151-162.
- Kurmaly, K., D.A. Jones, A.B. Yule y J. East, 1989. Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa 1 to postlarva 1, on live feeds, artificial diets and on combinations of both. *Aquaculture*, 81:27-45.
- Liao, I.C., H.M. Su y J.H. Lin, 1983. Larval foods for penaeid prawns. In: J. McVey (Ed), *CRC Handbook of Mariculture*. Vol. I. Crustacean Aquaculture, 43-69.
- Lobban, C.S., P. Harrison y M.J. Duncan, 1985. *The physiological ecology of seaweeds*. Cambridge University Press, New York, 75-110.
- Lui, N.S.T. y O.A. Roels, 1972. Nitrogen metabolism of aquatic organisms. II. The assimilation of nitrate, nitrite, and amonia by *Biddulphia aurita*. *J. Phycol.* 8: 259-264.
- Matthiessen, G.C. y R.C. Torner, 1966. Possible methods of improving the shellfish Industry of Martha's Vineyard, Duke's Contry, Massachusetts, *Mar. Res Found. Mass.*, IV + 138.
- McVey, J.P. y J.M. Fox, 1983. Hatchery techniques for penaeid shrimp utilized by Texas A&M-NMFS Galveston Laboratory Programm. In: J. McVey (Ed), *CRC Handbook of Mariculture*. Vol.I. Crustacean Aquaculture, 129-154.
- Mock, C.R., 1974. Larval culture of penaeid shrimp at the Galveston Biological Laboratory. NOAA Tech. Rep. NMFS Circ. 388, 33-40.
- New, M.B., 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture*, 9:101-144.
- Ocampo-Aranda, F.J., 1990. Efecto de *Monochrysis lutheri* cultivada con fertilizantes agrícolas sobre el crecimiento de larvas de *Mytilus edulis* hasta su metamorfosis. Ensenada, B.C., UABC, FCM, Tesis de licenciatura, 42 págs.

- Preston, N.P., 1985. The combined effects of temperature and salinity on hatching success and the survival, growth and development of the larval stages of *Metapenaeus bennettiae* (Racek and Dall). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 85:57-74.
- Preston, N.P., M.A. Burford, F.E. Common y P.C. Rothlisberg, 1992. Natural diet of larval *Penaeus merguensis* (Decapoda: Penaeidae) and its effect on survival. Mar. Biol., 113:181-191.
- Pruder, G.D. y E.T. Bolton, 1978. System configuration and performance: Bivalve molluscan mariculture. Proc. of the ninth Annual Meeting World Mariculture Society, 747-759.
- Simon, C.M., 1978. The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for penaeid protozoal larvae. Aquaculture, 14:105-113.
- Southeast Asian Fisheries Development Center, 1976. Annual Report 1978. Aquaculture Departament. Southeast Asian Fisheries Development Center. Aquaculture Departament. Tigbauan, Iloilo, Philippines, 37 Págs.
- Syrett, P.J., 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. In: Platt (Ed), Physiological bases of phytoplankton ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210:182-210.
- Tacon, A.G.J., 1966. Larval shrimp feeding. Crustacean tissue suspension: A practical alternative for shrimp culture. United Nations Development Programme. FAO. 30 págs.
- Treece, G.D. y M.E. Yates, 1988. Laboratory Manual for the Culture of Penaeid Shrimp Larvae. Marine Advisory Service. Sea Grant College Program. Texas A&M University, 95 págs.
- Wheeler, P.A., 1983. Phytoplankton nitrogen metabolism. In: Nitrogen in the marine environment. Academic Press, 309-346.
- Whitfield, M., 1974. The hidrolisis of ammonium ions in sea water-a theoretical study. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 54:565-580.

- Wickins, J.F., 1976. The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture*, 9:19-37.
- Wilburn-González, J.G., 1990. Cultivo masivo de *Pavlova lutheri* (Droop) Green. Con fertilizantes agrícolas como fuente de nitrógeno y bióxido de carbono. Ensenada B.C., UABC, FCM, Tesis de licenciatura, 50 págs.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical analysis*. (Ed), Prentice-Hall (second edition), 718 págs.