

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**USO POTENCIAL DE LA MACROALGA VERDE *Ulva clathrata* EN EL  
CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei***

**Por**

**ALBERTO PEÑA RODRÍGUEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biotecnología**

**Junio, 2011**

**USO POTENCIAL DE LA MACROALGA VERDE *Ulva clathrata* EN EL  
CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei***



**Comisión de tesis**

**DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUAREZ**  
**Director de Tesis**

**DRA. MARTHA GUADALUPE NIETO LOPÉZ**  
**Secretario**

**DR. DENIS RICQUE MARIE**  
**Vocal 1**

**DRA. MIREYA TAPIA SALAZAR**  
**Vocal 2**

**DRA. LILIA MORALES**  
**Vocal 3**

## TABLA DE CONTENIDO

| Sección  | Página |
|--|--------|
| LISTA DE TABLAS .....  | v      |
| LISTA DE FIGURAS .....   | viii   |
| LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIACIONES .....  | xi     |
| RESUMEN.....   | xv     |
| ABSTRACT.....  | xvi    |
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 1      |
| 2. HIPÓTESIS .....   | 3      |
| 2.1 Hipótesis general .....  | 3      |
| 2.2 Hipótesis particulares .....   | 3      |
| 3. OBJETIVOS .....   | 4      |
| 3.1 Objetivo general .....   | 4      |
| 3.2 Objetivos particulares .....   | 4      |
| 4. ANTECEDENTES .....  | 5      |
| 4.1 Aspectos generales de la biología y cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> ..... | 5      |
| 4.1.1 Importancia de WSSV en el cultivo de camarón .....                             | 7      |
| 4.2 Aspectos generales de la biología y cultivo de <i>Ulva clathrata</i> .....       | 8      |
| 4.2.1 Composición química y valor nutricional de algas del genero <i>Ulva</i> .....  | 10     |
| 4.3 Utilización de algas marinas en cultivo de camarón .....                         | 13     |
| 4.3.1 Estabilidad en el agua de los alimentos .....                                  | 13     |
| 4.3.2 Parámetros zootécnicos y composición corporal .....                            | 14     |
| 4.3.3 Digestibilidad de nutrientes.....  | 16     |
| 4.3.4 Cocultivo y control de calidad de agua .....                                   | 17     |
| 4.3.5 Efecto inmunoestimulante y antiviral .....                                     | 17     |
| 4.4 Expresión de genes de camarón .....  | 18     |
| 5 MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 20     |
| Estrategia general.....  | 20     |
| 5.1 Lugar de trabajo .....   | 21     |
| 5.1.1 Programa Maricultura (UANL).....   | 21     |
| 5.1.2 Laboratorio Algalimentos de Aonori Aquafarms .....                             | 22     |
| 5.1.3 Laboratorio de bioensayos infecciosos de TVMDL (Texas A&M) .....               | 23     |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 5.2     | Material biológico .....  | 24 |
| 5.2.1   | Origen y manejo de los camarones .....  | 24 |
| 5.2.2   | Muestras de <i>Ulva clathrata</i> y sistemas de cultivo .....   | 25 |
| 5.2.3   | Resumen de origen de las diferentes muestras de <i>U. clathrata</i> y camarones utilizados en los experimentos .....  | 26 |
| 5.3     | Alimentos experimentales .....  | 30 |
| 5.3.1   | Formulación y elaboración de alimentos experimentales .....   | 30 |
| 5.3.2   | Determinación de estabilidad en el agua de alimentos experimentales .....   | 31 |
| 5.4     | Análisis químicos cuantitativos y cualitativos de los alimentos y muestras de <i>U. clathrata</i> y camarón.....  | 32 |
| 5.4.1   | Análisis bromatológico, azúcares totales, monosacáridos y óxido de cromo (UANL) .....   | 32 |
| 5.4.2   | Métodos análisis bromatológico, ácidos grasos, colesterol, carotenoides y pigmentación (VEPINS).....  | 33 |
| 5.4.3   | Métodos analíticos de ácidos grasos y esteroides (CIBNOR) .....   | 33 |
| 5.4.4   | Análisis de firmeza en el músculo de camarón (UNISON).....  | 34 |
| 5.4.5   | Métodos analíticos de lípidos, ácidos grasos, proteína, aminoácidos, carotenoides, ceniza, minerales y monosacáridos (AESCL, UM).....   | 35 |
| 5.4.6   | Método de análisis de aminoácidos por el laboratorio de Evonik-Degussa .....  | 36 |
| 5.5     | Parámetros zootécnicos evaluados en los camarones.....  | 36 |
| 5.6     | Estrategia experimental de las evaluaciones <i>in vivo</i> .....  | 38 |
| 5.6.1   | Efecto de la inclusión de harina de <i>U. clathrata</i> en el alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 1).....  | 38 |
| 5.6.2   | Efecto del procesado de <i>U. clathrata</i> y del alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 2).....  | 38 |
| 5.6.3   | Efecto sobre la digestibilidad aparente del alimento con inclusión de <i>U. clathrata</i> (Experimento 3) .....   | 40 |
| 5.6.4   | Efecto del consumo de <i>U. clathrata</i> fresca en condiciones controladas de laboratorio sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 4).....                      | 41 |
| 5.6.5   | Efecto del consumo de <i>U. clathrata</i> fresca sobre los ácidos grasos y esteroides en el músculo de camarón en condiciones controladas de laboratorio (Experimento 5)..... | 42 |
| 5.6.6   | Cocultivo de <i>U. clathrata</i> y camarón en tanques piloto.....   | 44 |
| 5.6.6.a | Cocultivo de <i>U. clathrata</i> y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 28°C (primavera) (Experimento 6) .....   | 44 |
| 5.6.6.b | Cocultivo de <i>U. clathrata</i> y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 30°C (verano) (Experimento 7).....   | 44 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 5.6.7   | Determinación de contribuciones nutricionales de carbono y nitrógeno en el camarón a partir de <i>U. clathrata</i> y alimento artificial, mediante el análisis de isotopos estables (Experimento 8)..... | 45 |
| 5.6.7.a | Análisis de isotopos estables y estimación de contribuciones nutricionales   | 46 |
| 5.6.7.b | Estimación de tasa de recambio de carbón y nitrógeno.....  | 47 |
| 5.6.8   | Efecto antiviral de harina entera y extracto de <i>U. clathrata</i> en el alimento contra WSSV (Experimento 9).....  | 48 |
| 5.6.8.a | Inóculo e infección con WSSV.....  | 49 |
| 5.6.8.b | Diagnostico histológico y por PCR.....   | 50 |
| 5.6.9   | Expresión diferencial de 292 genes en hepatopáncreas de camarón bajo consumo de <i>U. clathrata</i> y alimento artificial (Experimento 10).....  | 50 |
| 5.6.9.a | Toma de muestras para extracción de mRNA.....  | 51 |
| 5.6.9.b | Protocolo de microarreglos (CIAD, Hermosillo, Son.).....   | 51 |
| 5.7     | Análisis estadísticos.....   | 52 |
| 6       | RESULTADOS.....  | 54 |
| 6.1     | Composición química de <i>Ulva clathrata</i> .....   | 54 |
| 6.2     | Efecto de la inclusión de harina de <i>U. clathrata</i> en el alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón (experimento 1).....   | 60 |
| 6.3     | Efecto del procesado de <i>U. clathrata</i> y del alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 2).....   | 62 |
| 6.4     | Efecto sobre la digestibilidad aparente del alimento con inclusión de <i>U. clathrata</i> (Experimento 3).....   | 65 |
| 6.5     | Efecto del consumo de <i>Ulva</i> fresca en condiciones controladas de laboratorio sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 4).....   | 67 |
| 6.6     | Efecto del consumo de <i>U. clathrata</i> fresca sobre los ácidos grasos y esteroles en el musculo de camarón en condiciones de laboratorio (Experimento 5).....   | 71 |
| 6.6.1   | Integración de resultados de crecimiento de ensayos con <i>U. clathrata</i> fresca en condiciones controladas de laboratorio (Experimentos 4 y 5).....   | 76 |
| 6.7     | Evaluación del cocultivo de <i>U. clathrata</i> y camarón en tanques piloto.....   | 78 |
| 6.7.1   | Cocultivo de <i>U. clathrata</i> y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 28°C (primavera) (Experimento 6).....   | 78 |
| 6.7.2   | Cocultivo de <i>U. clathrata</i> y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 30°C (verano) (Experimento 7).....  | 88 |
| 6.8     | Determinación de contribuciones nutricionales de carbono y nitrógeno en el camarón a partir de <i>U. clathrata</i> y alimento artificial, mediante el análisis de isotopos estables (Experimento 8)..... | 92 |
| 6.9     | Valores promedio de composición química de los lotes de <i>U. clathrata</i> y de los alimentos experimentales utilizados en los experimentos.....  | 99 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 6.10 | Efecto antiviral de harina entera y extracto de <i>U. clathrata</i> en el alimento contra WSSV (Experimento 9).....                              | 102 |
| 6.11 | Expresión diferencial de 292 genes en hepatopáncreas de camarón bajo consumo de <i>U. clathrata</i> y alimento artificial (Experimento 10) ..... | 106 |
| 7    | DISCUSIÓN .....  | 111 |
| 7.1  | Composición química de la macroalga <i>Ulva clathrata</i> .....  | 111 |
| 7.2  | Efecto de diferentes niveles y procesos de inclusión de <i>U. clathrata</i> en el alimento para camarón .....                                    | 116 |
| 7.3  | Efecto del consumo de <i>U. clathrata</i> fresca en el camarón en condiciones controladas de laboratorio .....                                   | 118 |
| 7.4  | Evaluación del cocultivo de <i>U. clathrata</i> y camarón en tanques piloto.....   | 121 |
| 7.5  | Determinación de contribuciones nutricionales de carbono y nitrógeno en el camarón mediante el análisis de isotopos estables .....               | 124 |
| 7.6  | Efecto del consumo de harina de <i>U. clathrata</i> y un extracto acuoso de <i>U. clathrata</i> en el alimento contra la infección WSSV .....    | 128 |
| 7.7  | Expresión diferencial de 292 genes de hepatopáncreas en camarones alimentados con <i>U. clathrata</i> y alimento artificial.....                 | 129 |
| 8    | CONCLUSIONES .....   | 131 |
| 9    | ANEXOS .....   | 136 |
| 10   | LITERATURA CITADA .....  | 141 |
|      | RESUMEN BIOGRÁFICO .....   | 164 |

## LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página   |
|-------|--|
| 1     | Composición bromatológica de algas del genero <i>Ulva</i> , extraídas del medio natural y de cultivo .....11   |
| 2     | Mezcla de sales para la preparación de agua marina sintética .....23   |
| 3     | Lotes de <i>U. clathrata</i> muestreados de diferentes sistemas de cultivo.....28  |
| 4     | Origen de lotes de <i>U. clathrata</i> y camarones utilizados en cada experimento. ...29   |
| 5     | Fórmula base utilizada para la elaboración de las dietas experimentales .....30  |
| 6     | Protocolo de colecta de heces.....40   |
| 7     | Diseño experimental del desafío viral con WSSV .....49   |
| 8     | Composición proximal de <i>Ulva clathrata</i> producida en diferentes sistemas de cultivo.....55   |
| 9     | Concentración de metales en muestras de <i>U. clathrata</i> .....59  |
| 10    | Composición de la <i>U. clathrata</i> utilizada en alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de harina del alga (experimento 1). .....60  |
| 11    | Composición proximal y estabilidad en el agua de los alimentos con diferentes niveles de inclusión de harina del alga (experimento 1) .....61  |
| 12    | Parámetros zootécnicos de camarones alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de harina de <i>U. clathrata</i> (experimento 1) .....61  |
| 13    | Composición de <i>U. clathrata</i> utilizada en alimentos experimentales bajo diferentes procesos de inclusión de <i>U. clathrata</i> (experimento 2).....62   |
| 14    | Composición proximal y estabilidad en el agua de dietas elaboradas bajo diferentes procesos de inclusión de <i>U. clathrata</i> (experimento 2).....62   |
| 15    | Parámetros zootécnicos de camarones alimentados con dietas elaboradas bajo diferentes procesos de inclusión de <i>U. clathrata</i> (experimento 2).....63  |
| 16    | Composición bromatológica y estabilidad en el agua de alimentos con 0 y 6% de inclusión de harina de <i>U. clathrata</i> (experimento 3).....65  |
| 17    | Composición de ácidos grasos de camarones alimentados con dietas con 0% y 6% de inclusión de harina de <i>U. clathrata</i> (experimento 3). .....67  |
| 18    | Composición bromatológica y estabilidad en el agua del alimento artificial (comercial) y composición de la <i>U. clathrata</i> utilizados en experimento 4.....68  |
| 19    | Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con un alimento artificial y <i>U. clathrata</i> fresca con diferentes regímenes alimenticios en condiciones controladas de laboratorio (experimento 4).....69 |
| 20    | Composición del alimento artificial y <i>U. clathrata</i> (experimento 5) .....71  |

|    |  |    |
|----|--|----|
| 21 | Resultados zootécnicos sobre los camarones alimentados bajo diferentes regímenes con alimento artificial y <i>U. clathrata</i> (experimento 5).....  | 71 |
| 22 | Perfil de ácidos grasos del alimento artificial y <i>U. clathrata</i> (experimento 5). ...   | 73 |
| 23 | Perfil de esteroides del alimento artificial y la <i>U. clathrata</i> (experimento 5).....   | 74 |
| 24 | Composición de ácidos grasos en el músculo de camarones alimentados con alimento artificial y/o <i>U. clathrata</i> (experimento 5). ....  | 75 |
| 25 | Composición de esteroides en el músculo de camarones alimentados con alimento artificial y/o <i>U. clathrata</i> (experimento 5). ....   | 76 |
| 26 | Parámetros de calidad de agua durante el experimento de cocultivo en época de primavera (experimento 6). ....  | 78 |
| 27 | Análisis de producción natural por tipo de célula en experimento de cocultivo en primavera (experimento 6). ....   | 79 |
| 28 | Análisis de producción natural según al tamaño de las células en experimento de cocultivo en primavera (experimento 6). ....   | 79 |
| 29 | Composición proximal del alimento artificial y la <i>U. clathrata</i> , utilizados en el bioensayo de cocultivo en época de primavera (experimento 6). ....  | 80 |
| 30 | Perfil de ácidos grasos del alimento artificial y la <i>U. clathrata</i> del cocultivo en época de primavera (experimento 6). ....   | 81 |
| 31 | Parámetros zootécnicos de los camarones en cocultivo (experimento 6). ....   | 82 |
| 32 | Composición proximal de los camarones de cocultivo (experimento 6) ....  | 84 |
| 33 | Perfil de ácidos grasos de camarones de cocultivo (experimento 6).....   | 85 |
| 34 | Análisis de pigmentación por reflectancia del músculo de los camarones de cocultivo (experimento 6) ....   | 87 |
| 35 | Análisis de textura de los camarones del cocultivo (experimento 6).....  | 87 |
| 36 | Parámetros de calidad de agua durante el experimento de cocultivo en época de verano (experimento 7) ....  | 88 |
| 37 | Composición proximal del alimento artificial y la <i>U. clathrata</i> del bioensayo de cocultivo (experimento 7) ....  | 89 |
| 38 | Parámetros zootécnicos de los camarones en cocultivo (experimento 7) ....  | 90 |
| 39 | Composición proximal de los camarones de cocultivo (experimento 7). ....   | 90 |
| 40 | Perfil de ácidos grasos de camarones de cocultivo (experimento 7).....   | 91 |
| 41 | Composición de carotenoides en camarones de cocultivo (experimento 7). ....  | 92 |
| 42 | Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con diferentes regímenes alimenticios de <i>U. clathrata</i> y alimento artificial (experimento 8).....  | 93 |
| 43 | Tasa de crecimiento ( <i>k</i> ), tasa metabólica estimada ( <i>m</i> ) y tiempo medio ( <i>t</i> <sub>50</sub> ) de carbono y nitrógeno en los camarones alimentados con regímenes alimenticios a diferentes proporciones de alimento artificial y <i>U. clathrata</i> fresca. .... | 96 |



|    |   |     |
|----|---|-----|
| 44 | Estimación relativa de proporciones del total de material seca, carbono y nitrógeno a partir del alimento artificial y la <i>U. clathrata</i> fresca, y contribución al crecimiento de los camarones (experimento 8)..... | 98  |
| 45 | Porcentaje de sobrevivencia de los camarones después de la exposición a WSSV (experimento 9). .....   | 102 |
| 46 | Resultados generales del análisis del microarreglo (experimento 10) .....   | 107 |
| 47 | Expresión diferencial de genes de hepatopáncreas de camarón alimentados con alimento artificial y <i>U. clathrata</i> fresca respecto a camarones alimentados solo con alimento artificial (experimento 10).....          | 108 |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura |  | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Principales países productores de <i>L. vannamei</i> (Estadísticas Pesqueras de la FAO, 2006).....   | 5      |
| 2      | Ciclo de producción de <i>L. vannamei</i> (FAO, 2006) .....  | 6      |
| 3      | a) Imagen modificada de Durand <i>et al.</i> (1996) que muestra los viriones del virus WSSV b) Esquema de la estructura de viral de WSSV ..... | 7      |
| 4      | Macroalga verde <i>Ulva clathrata</i> .....  | 9      |
| 5      | Estrategia general del desarrollo del trabajo de tesis .....   | 20     |
| 6      | a) y b) Sala de bioensayos del programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.....                                      | 22     |
| 7      | a) Tanques experimentales para cocultivo <i>Ulva</i> /camarón; b) Tanques con tapas de plástico durante la lluvia.....                         | 23     |
| 8      | a) Cuarto libre de WSSV (limpio); b) Cuarto para infección con WSSV (contaminado).....   | 24     |
| 9      | Cultivo de <i>U. clathrata</i> en laboratorio del Programa Maricultura (UPM).....  | 27     |
| 10     | a) Sistema de cultivo a gran escala (LSS); b) Sistema de cultivo de mediana escala (MSS) .....   | 27     |
| 11     | Sistema piloto de cocultivo <i>Ulva</i> /camarón (CCp).....  | 27     |
| 12     | Estrategia general de elaboración de dietas con <i>U. clathrata</i> en el alimento (experimento 2) .....                                       | 39     |
| 13     | a)“Pacas” de <i>U. clathrata</i> envueltas con tela de gasa; b) Camarones consumiendo <i>U. clathrata</i> .....                                | 42     |
| 15     | Camarones alimentados con <i>U. clathrata</i> con dispositivos tipo “sándwich”.....  | 43     |
| 14     | Regímenes alimenticios en los camarones y días de muestreo para análisis isotópico de C y N.....   | 45     |
| 16     | Estrategia de infección con WSSV por exposición <i>Per os</i> . .....  | 50     |
| 17     | Estrategia de muestreo y preservación de hepatopáncreas.....   | 51     |
| 18     | Estrategia general de análisis de expresión génica de hepatopáncreas de camarón con microarreglos .....  | 52     |
| 19     | Valores promedio de fibra dietética en muestras de <i>U. clathrata</i> .....   | 54     |
| 20     | Perfil de aminoácidos de <i>U. clathrata</i> cultivadas en sistema LSS y MSS.....  | 56     |
| 21     | Perfil promedio de ácidos grasos de <i>U. clathrata</i> .....  | 57     |
| 22     | Promedio de ácidos grasos de las familias de omega 3, 6 y 9 en <i>U. clathrata</i> ....  | 58     |
| 23     | Perfil de azúcares de <i>U. clathrata</i> .....  | 58     |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 24 | Contenido de carotenoides de <i>U. clathrata</i> .....  | 59 |
| 25 | Características físicas de los alimentos experimentales bajo diferentes procesos de inclusión de <i>U. clathrata</i> .....  | 64 |
| 26 | Crecimiento de los camarones alimentados con las dietas elaboradas bajo diferentes procesos de inclusión de <i>U. clathrata</i> .....   | 64 |
| 27 | Digestibilidad aparente de la materia seca de las dietas experimentales con 0 y 6% de inclusión de <i>U. clathrata</i> .....  | 66 |
| 28 | Digestibilidad aparente de la proteína de las dietas experimentales con 0 y 6% de inclusión de <i>U. clathrata</i> .....  | 66 |
| 29 | Consumo de <i>U. clathrata</i> fresca de los diferentes regímenes alimenticios (experimento 4). .....   | 68 |
| 30 | Crecimiento de los camarones alimentados con los diferentes regímenes alimenticios (experimento 4).....   | 70 |
| 31 | Consumo y tasa de conversión alimenticia (experimento 4).....   | 70 |
| 32 | Tasa de crecimiento relativo de los diferentes tratamientos experimentales con <i>U. clathrata</i> fresca en los experimentos en condiciones de laboratorio.....                                    | 77 |
| 33 | Tasa de sobrevivencia relativa de los diferentes tratamientos experimentales con <i>U. clathrata</i> fresca en los experimentos en condiciones de laboratorio.....                                  | 77 |
| 34 | Análisis de turbidez en los estanques experimentales de cocultivo en época de primavera (experimento 6) .....   | 80 |
| 35 | Tasa de crecimiento relativo de los diferentes tratamientos experimentales con <i>U. clathrata</i> en cocultivo.....  | 82 |
| 36 | Foto de heces de camarón alimentados con alimento artificial y <i>U. clathrata</i> en cocultivo. ....   | 83 |
| 37 | Correlación entre el contenido de grasa en el camarón completo y la cantidad de alimento artificial suministrado en cocultivo (experimento 6). ....   | 84 |
| 38 | Camarones cosechados y cocidos provenientes de cocultivo con <i>U. clathrata</i> (experimento 6) .....  | 86 |
| 39 | Correlación negativa entre el contenido de carotenoides en los camarones y el alimento artificial consumido en cocultivo (experimento 6). ....  | 86 |
| 40 | Análisis de turbidez en los estanques experimentales de cocultivo en época de verano (experimento 7). ....  | 89 |
| 41 | Tasa de crecimiento de camarones alimentados con diferentes regímenes alimenticios con <i>U. clathrata</i> fresca y alimento artificial .....   | 93 |
| 42 | Cambios en los valores isotópicos de carbono (‰) en el cuerpo completo de los camarones alimentados con diferentes regímenes alimenticios de alimento artificial y <i>U. clathrata</i> fresca. .... | 95 |

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 43 | Cambios en los valores isotópicos de nitrógeno (‰) en el cuerpo completo de los camarones alimentados con diferentes regímenes alimenticios de alimento artificial y <i>U. clathrata</i> fresca .....              | 95  |
| 44 | Análisis dual de isotopos de carbono y nitrógeno (‰) de cuerpo completo y de tejido muscular de camarón alimentados con diferentes regímenes alimenticios de alimento artificial y <i>U. clathrata</i> fresca..... | 99  |
| 45 | Composición química promedio de los lotes de <i>U. clathrata</i> y los alimentos experimentales utilizados en los diferentes ensayos biológicos.....   | 100 |
| 46 | Contribución energética promedio por nutriente de los lotes de <i>U. clathrata</i> y los alimentos experimentales utilizados en los diferentes ensayos biológicos. ....  | 100 |
| 47 | Perfil de ácidos grasos promedio de los lotes de <i>U. clathrata</i> y los alimentos experimentales utilizados en los diferentes ensayos biológicos.....   | 101 |
| 48 | Perfil de aminoácidos promedio de los lotes de <i>U. clathrata</i> y los alimentos experimentales utilizados en los diferentes ensayos biológicos.....   | 101 |
| 49 | Sobrevivencia de los camarones post-exposición a WSSV alimentados con cuatro dietas experimentales .....   | 103 |
| 50 | Camarón moribundo después al día 2 post-exposición <i>per os</i> a WSSV .....  | 103 |
| 51 | Mudas de cefalotórax de camarón con “manchas blancas” .....  | 104 |
| 52 | Corte histológico de epitelio de estomago de una camarón 48 h después de haber sido expuesto a WSSV. ....  | 105 |
| 53 | PCR positivo para camarones a dos días de ser expuestos a WSSV.....  | 105 |
| 54 | Laminillas de microarreglos correspondientes a hepatopáncreas de camarones alimentados con alimento artificial (control) y <i>U. clathrata</i> fresca .....  | 106 |
| 55 | Porcentaje de genes estimulados, reprimidos o sin diferencia en los camarones alimentado con alimento artificial y <i>U. clathrata</i> fresca.....   | 107 |
| 56 | Porcentaje de genes expresados diferencialmente divididos de acuerdo a su función biológica.....   | 108 |

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIACIONES

|          |   |
|----------|---|
| AA       | aminoácido  |
| AAE      | aminoácido esencial                                       |
| AA NE    | aminoácido no esencial                                    |
| AAqua    | Aonori Aquafarms, Inc.                                    |
| AESCL    | Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories     |
| AM       | antes meridiano   |
| aprox    | aproximadamente   |
| ARA      | ácido araquidónico  |
| A100     | monocultivo con ración normal de alimento artificial      |
| BA       | biomasa del acuario                                       |
| CA       | consumo de alga   |
| cel      | células   |
| CCp      | <i>Ulva</i> cultivada en sistema de cocultivo con camarón |
| CGM      | camarones de granja comercial                             |
| CI       | consumo de alimento artificial                            |
| CIAD     | Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. |
| CIBNOR   | Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.    |
| cm       | centímetro  |
| CMP      | camarones de “Maricultura del Pacífico”                   |
| CrD      | óxido de cromo en la dieta                                |
| CrH      | óxido de cromo en las heces                               |
| Dctrl    | dieta control   |
| Cy3      | cianina (verde)   |
| Cy5      | cianina (rojo)  |
| C100     | 100% de ración de alimento artificial                     |
| d        | día   |
| DHU      | dieta con 2% de inclusión de harina de <i>Ulva</i>        |
| DAA      | solo alimento artificial                                  |
| DAMS     | digestibilidad aparente de la materia seca del alimento   |
| DAP      | digestibilidad aparente de la proteína del alimento       |
| DAU      | alimento artificial más <i>Ulva</i> fresca                |
| DLU      | dieta con 2% de inclusión de <i>Ulva</i> licuada          |
| DCU      | dieta recubierta con 2% inclusión <i>Ulva</i> fresca      |
| DCC      | dieta control con 1% óxido de cromo                       |
| DEC      | dieta con 6% harina de <i>Ulva</i> y 1% óxido de cromo    |
| DU-6%    | dieta con 6% inclusión harina de <i>Ulva</i>              |
| DFu-0.4% | dieta con 0.4% inclusión de fucoïdan                      |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>DHA</b>           | <b>ácido docosahexanoico</b>  |
| <b>DM</b>            | <b>materia seca</b>   |
| <b>DUU</b>           | <b>solo <i>Ulva</i> fresca</b>  |
| <b>DEx-0.7%</b>      | <b>dieta con 0.7% inclusión de extracto de <i>Ulva</i></b>                                |
| <b>EA25</b>          | <b>cocultivo <i>Ulva</i>/camarón suplementado con 25% a ración de alimento artificial</b> |
| <b>EA50</b>          | <b>cocultivo <i>Ulva</i>/camarón suplementado con 50% a ración de alimento artificial</b> |
| <b>EFA</b>           | <b>ácido graso esencial</b>   |
| <b>ELN</b>           | <b>extracto libre de nitrógeno</b>  |
| <b>EPA</b>           | <b>ácido eicosapentanoico</b>   |
| <b><i>et al.</i></b> | <b>Et alii: locución latina que significa “y otros”</b>                                   |
| <b>EST</b>           | <b>etiqueta de secuencia de expresión</b>   |
| <b>E100</b>          | <b>cocultivo <i>Ulva</i>/camarón sin alimento artificial</b>                              |
| <b>EUA</b>           | <b>Estados Unidos de América</b>  |
| <b>FA</b>            | <b>ácido graso</b>  |
| <b>FAO</b>           | <b>Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación</b>             |
| <b>FDT</b>           | <b>fibra dietética total</b>  |
| <b>FDI</b>           | <b>fibra dietética insoluble</b>  |
| <b>FDS</b>           | <b>fibra dietética soluble</b>  |
| <b>F100</b>          | <b>monocultivo con ración normal de alimento artificial</b>                               |
| <b>g</b>             | <b>gramo</b>  |
| <b>GP</b>            | <b>ganancia en peso</b>   |
| <b>h</b>             | <b>hora</b>   |
| <b>Hp</b>            | <b>caballos de fuerza</b>   |
| <b>HUFA</b>          | <b>ácido graso altamente insaturado</b>   |
| <b><i>k</i></b>      | <b>tasa de crecimiento específico</b>   |
| <b>Kcal</b>          | <b>kilocaloría</b>  |
| <b>kg</b>            | <b>kilogramo</b>  |
| <b>L</b>             | <b>litro</b>  |
| <b>LA</b>            | <b>ácido linoleico</b>  |
| <b>LCO</b>           | <b>camarones de “Langostinos y Camarones de Oriente”</b>                                  |
| <b>LNA</b>           | <b>ácido linolénico</b>   |
| <b><i>log</i></b>    | <b>logaritmo</b>  |
| <b>LSS</b>           | <b><i>Ulva</i> cultivada en sistema gran escala (estanque de camarón)</b>                 |
| <b>M</b>             | <b>molar</b>  |
| <b><i>m</i></b>      | <b>tasa metabólica</b>  |
| <b>mg</b>            | <b>miligramo</b>  |
| <b>min</b>           | <b>minuto</b>   |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>mL</b>             | <b>mililitro</b>                                       |
| <b>mM</b>             | <b>milimolar</b>                                       |
| <b>mm</b>             | <b>milímetro</b>                                       |
| <b>mRNA</b>           | <b>transcrito maduro</b>                               |
| <b>MSS</b>            | <i>Ulva</i> cultivada en sistema de mediana escala     |
| <b>MUFA</b>           | <b>ácido graso monosaturado</b>                        |
| <b>ND</b>             | <b>no determinado o no detectado</b>                   |
| <b>nm</b>             | <b>nanómetro</b>                                       |
| <b>NPU</b>            | <b>utilización neta de la proteína</b>                 |
| <b>P</b>              | <b>probabilidad</b>                                    |
| <b>PCR</b>            | <b>reacción en cadena de la polimerasa</b>             |
| <b>PD</b>             | <b>proteína en la dieta</b>                            |
| <b>PER</b>            | <b>tasa de eficiencia proteica</b>                     |
| <i>per os</i>         | <b>por vía oral</b>                                    |
| <b>PH</b>             | <b>proteína en las heces</b>                           |
| <b>pH</b>             | <b>potencial de hidrogeno</b>                          |
| <b>PM</b>             | <b>pasado meridiano</b>                                |
| <b>PMS</b>            | <b>pérdida de materia seca</b>                         |
| <b>PP</b>             | <b>pérdida de proteína</b>                             |
| <b>ppt</b>            | <b>partes por mil</b>                                  |
| <b>ppm</b>            | <b>partes por millón</b>                               |
| <b>pTCA</b>           | <b>tasa de conversión relativa alimento artificial</b> |
| <b>PUFA</b>           | <b>ácido graso poliinsaturado</b>                      |
| <b>RNA</b>            | <b>ácido ribonucleico</b>                              |
| <b>rpm</b>            | <b>revoluciones por minuto</b>                         |
| <b>S</b>              | <b>sobrevivencia</b>                                   |
| <b>SFA</b>            | <b>ácido graso saturado</b>                            |
| <b>SPF</b>            | <b>camarones libres de patógenos específicos</b>       |
| <b>SSI</b>            | <b>Sinaloa Seafields International</b>                 |
| <b>TAMU</b>           | <b>Texas A&amp;M University</b>                        |
| <b>TC</b>             | <b>tasa de crecimiento</b>                             |
| <b>TCA</b>            | <b>tasa de conversión alimenticia</b>                  |
| <b>TCE</b>            | <b>tasa de crecimiento específico</b>                  |
| <b>TM</b>             | <b>toneladas métricas</b>                              |
| <b>tTCA</b>           | <b>tasa de conversión alimenticia total</b>            |
| <i>t<sub>50</sub></i> | <b>tiempo medio de residencia</b>                      |
| <b>UANL</b>           | <b>Universidad Autónoma de Nuevo León</b>              |
| <b>UV</b>             | <b>ultravioleta</b>                                    |
| <b>UC</b>             | <b>University of California</b>                        |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>UC50</b>                     | <b><i>Ulva</i> fresca más 50% de ración de alimento artificial</b>         |
| <b>UC75</b>                     | <b><i>Ulva</i> fresca más 75% de ración de alimento artificial</b>         |
| <b>UF55</b>                     | <b>cocultivo <i>Ulva</i>/camarón con 55% ración de alimento artificial</b> |
| <b>UF90</b>                     | <b>cocultivo <i>Ulva</i>/camarón con 90% ración de alimento artificial</b> |
| <b>UNISON</b>                   | <b>Universidad de Sonora</b>   |
| <b>UPM</b>                      | <b>sistema de propagación de <i>Ulva</i> en el programa maricultura</b>    |
| <b>U100</b>                     | <b>cocultivo <i>Ulva</i>/camarón sin alimento artificial</b>               |
| <b>VEPinsa</b>                  | <b>Vegetales y Pigmentos Naturales S.A.</b>                                |
| <b>W</b>                        | <b>peso</b>  |
| <b>WA</b>                       | <b>absorción de agua</b>   |
| <b>WSSV</b>                     | <b>virus del síndrome de mancha blanca</b>                                 |
| <b>100U</b>                     | <b>solo <i>Ulva</i> fresca</b>   |
| <b>75U/25F</b>                  | <b>proporción 75% <i>Ulva</i> fresca 25% alimento artificial</b>           |
| <b>50U/50F</b>                  | <b>proporción 50% <i>Ulva</i> fresca 50% alimento artificial</b>           |
| <b>25U/75F</b>                  | <b>proporción 25% <i>Ulva</i> fresca 75% alimento artificial</b>           |
| <b>100F</b>                     | <b>solo alimento artificial</b>  |
| <b>°C</b>                       | <b>grado centígrado</b>  |
| <b>%</b>                        | <b>partes por cien</b>   |
| <b>‰</b>                        | <b>partes por mil</b>  |
| <b><math>\alpha</math></b>      | <b>alpha</b>   |
| <b><math>\beta</math></b>       | <b>beta</b>  |
| <b><math>\Delta</math></b>      | <b>delta</b>   |
| <b><math>\Sigma</math></b>      | <b>sumatoria</b>   |
| <b>&lt;</b>                     | <b>menor que</b>   |
| <b>&gt;</b>                     | <b>mayor que</b>   |
| <b><math>\leq</math></b>        | <b>menor o igual que</b>   |
| <b><math>\geq</math></b>        | <b>mayor o igual que</b>   |
| <b><math>\mu</math></b>         | <b>micras</b>  |
| <b><math>\mu\text{m}</math></b> | <b>micrómetro</b>  |



## RESUMEN

La utilización de nuevas tecnologías para el cultivo de algas en México, ha permitido el inicio del cultivo comercial del alga verde *Ulva clathrata*, también llamada *Enteromorpha clathrata* o comúnmente conocida como Ao-nori, la cual posee una composición química con compuestos únicos difíciles de encontrar en otras fuentes dietarias. En el presente trabajo se describe la composición química de *U. clathrata* cultivada y su variación en función de las condiciones de cultivo y de procesamiento, su potencial como ingrediente práctico en dietas y en cocultivo con camarón *Litopenaeus vannamei*, así como su potencial efecto antiviral contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Dentro la composición química (en base seca) de la *U. clathrata*, se destaca una concentración alta de proteína (entre 16 y 27%), rica en fibra dietética (30%), minerales (hasta 49%), carotenoides (hasta 450 mg kg<sup>-1</sup>), y lípidos de las familias de omega 3 y 6 (27% del total de lípidos), la mejor composición química en cuanto a contenido de proteína y de ácidos grasos poliinsaturados se presenta en los sistemas de cultivo de mediana escala, con luz natural y fertilización estrictamente controlada. La inclusión de harina de *U. clathrata* en alimentos para camarón resulta en una mejora en la estabilidad del pelet en el agua con mayor capacidad de absorción de agua. Se evidencia que los procesos térmicos de deshidratación y de peletización, disminuyen el valor nutricional de *U. clathrata* para el camarón. La inclusión de 6% harina de *U. clathrata* en el alimento artificial, mejora la digestibilidad aparente de la proteína de la dieta. En medio controlado, se demuestra que la *U. clathrata* fresca tiene “*per se*” un efecto promotor del crecimiento como alimento natural complementario y este efecto se manifiesta aun en ausencia de producción natural aunque de manera menos eficaz. Por medio del análisis de isotopos estables, se demuestra una mayor contribución de carbono, nitrógeno y de materia seca en el camarón (crecimiento y recambio metabólico) a partir de la *U. clathrata* fresca respecto al alimento artificial. Se comprueba que el cocultivo de *U. clathrata* y camarón es una alternativa sustentable para reducir la necesidad de alimento artificial, mejorar la calidad de agua en los estanques y para mejorar la calidad del camarón cosechado como producto final. El consumo de *U. clathrata* resulta en una reducción en el contenido de lípidos y un aumento en la pigmentación de los camarones. Los polisacáridos sulfatados de la *U. clathrata* presentan actividad antiviral contra macha blanca, sin embargo esta observación no es concluyente. Un análisis de expresión diferencial por medio de un microarreglo, permite correlacionar algunos de los resultados de las pruebas *in vivo* con la expresión de algunos genes en los camarones.

## ABSTRACT

The use of new technologies for the cultivation of seaweeds in Mexico, has allowed the beginning of commercial cultivation of green alga *Ulva clathrata*, also called *Enteromorpha clathrata* or commonly known as Ao-nori, which has a unique chemical profile difficult to find in other dietary sources. The present work describes the chemical composition of *U. clathrata* produced by aquaculture, its potential use as practical foodstuff in diets and co-culture with white shrimp *Litopenaeus vannamei*, and its potential as antiviral against white spot syndrome virus (WSSV). Within the chemical composition (dry basis) of the *U. clathrata*, stands a high concentration of protein (16 to 27%), high in dietary fiber (30%), minerals (up to 49%), carotenoids (up to 450 mg kg<sup>-1</sup>), and lipids of omega 3 and omega 6 families (27% of total lipids), being the medium scale crop system (natural light and strictly controlled fertilization) the best production method for chemical composition in terms of content of protein and polyunsaturated fatty acids. The inclusion of *U. clathrata* meal in shrimp feed results in improved pellet stability in water with higher water absorption capacity. It is evidenced that thermal processes of dehydration and pelletization can affect the nutritional value of *U. clathrata* on shrimp. The inclusion of 6% *U. clathrata* meal in the artificial feed improves the protein digestibility of the diet. In a controlled environment, it is shown that fresh *U. clathrata* has “*per se*” a promoting effect on growth as natural complementary feed, and this effect is manifested even in the absence of natural production but less effectively. Through the analysis of stable isotopes, it was shown that a greater contribution of carbon, nitrogen and dry matter was supplied to shrimp (growth and metabolic turnover) from fresh *U. clathrata* with respect to artificial feed. It is shown that co-culture of *U. clathrata* and shrimp is a sustainable alternative to reduce the need for artificial feed, improve water quality in ponds and improve the quality of shrimp harvested as a final product. Consumption of *U. clathrata* results in a reduction of lipid content and an increase of shrimp pigmentation. Apparently, sulfated polysaccharides from *U. clathrata* have antiviral activity against white spot virus, but this observation is not conclusive. An analysis of differential expression using a microarray was performed in order to correlate some of the results of the assays *in vivo* with the expression of some genes in shrimp.

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una práctica en constante crecimiento que inclusive para algunas especies, ha llegado a ser superior en producción a lo obtenido por captura (pesca). En el caso del camarón, la producción total de camarón por acuicultura a nivel mundial se estimó en 3.4 millones de toneladas para el año 2008 (FAO, 2008), siendo el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* la especie más utilizada representando un 70% del total de especies cultivadas. México ocupa el segundo lugar en el continente americano después de Ecuador, con una producción total de camarón blanco de 130,000 toneladas registradas para el 2008 (FAO, 2008). En producción de macroalgas marinas, el cultivo contribuye con más del 90% de la demanda global, siendo el resto colectada del medio natural (FAO, 2004). Las macroalgas han sido utilizadas con muchos propósitos diferentes, mayormente para consumo humano, pero también como ingredientes prácticos en alimentos tanto para animales terrestres como acuáticos. *Ulva clathrata*, es una macroalga verde de la familia *Ulvaceae*, con distribución mundial que en su composición química posee compuestos únicos o que no se pueden encontrar comúnmente en otras fuentes dietarias como: minerales, pigmentos naturales, vitaminas e incluso polisacáridos sulfatados de los cuales se ha reportado un efecto antiviral contra virus envueltos de DNA.

Aun y cuando la producción global y nacional de camarón se ha ido incrementando a través de los últimos años, es de considerar para futuras proyecciones, los retos que se avecinan con el alza de precios y escasez de ingredientes prácticos como la harina de pescado, y también la constante problemática de las patologías como la infección con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés) las cuales generan grandes pérdidas económicas para los camaronicultores. La utilización de algas marinas incluyendo *Ulva clathrata*, como insumo en alimentos para camarón o la implementación de nuevas tecnologías para la integración de cultivos acuícolas, como el de camarón y *Ulva*, abre ampliamente una gama de posibilidades para el desarrollo de alimentos de mejor calidad física y nutricional, y/o elevar la productividad de las granjas camaronícolas con procesos más sustentables. Por lo tanto,

la finalidad de este proyecto de tesis fue, la de explorar el potencial del uso de la macroalga verde *Ulva clathrata* en la fase de engorda en el cultivo de camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*.

Se realizó la caracterización química completa de *U. clathrata* proveniente de diferentes sistemas de cultivo, estableciendo los rangos de variabilidad para cada compuesto. Se determinó el efecto de diferentes niveles de inclusión de *U. clathrata* en el alimento artificial para camarón, determinando su estabilidad en el agua, así como el efecto en la digestibilidad de la dieta y sobre parámetros zootécnicos en el camarón *L. vannamei*. Se llevaron a cabo bioensayos para determinar la contribución nutricional de *U. clathrata* fresca en el camarón en condiciones controladas de laboratorio. Se llevaron a cabo pruebas de cocultivo de *Ulva*/camarón en tanques piloto al exterior. Se determinó el efecto del consumo de *U. clathrata* fresca y en forma de harina, sobre la composición bromatológica, perfil de lípidos y pigmentación del camarón. Se probaron tanto la harina entera de *U. clathrata* como un extracto de las misma, como agente antiviral contra WSSV. Se analizó el efecto del consumo de *U. clathrata*, sobre la expresión diferencial de 292 genes en el hepatopáncreas de camarón, con la finalidad de relacionar estos resultados con los obtenidos en la pruebas *in vivo*.

Los resultados de este estudio muestran que la macroalga *Ulva clathrata* producida por acuacultura, es una alternativa real para mejorar el rendimiento del cultivo y calidad del camarón *Litopenaeus vannamei*, generando beneficios económicos y ambientales para México y los países productores de camarón.

## 2. HIPÓTESIS

### 2.1 Hipótesis general

La productividad del cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se verá mejorada con la incorporación de *Ulva clathrata* en la dieta del camarón.

### 2.2 Hipótesis particulares

- i. La composición química de *U. clathrata* cultivada presenta un alto valor nutricional para el camarón.
- ii. La inclusión de harina de *U. clathrata* en el alimento mejora el crecimiento y otros parámetros zootécnicos del camarón.
- iii. El procesado de *U. clathrata* y del alimento puede modificar el valor nutricional del alga en el camarón.
- iv. La digestibilidad aparente del alimento se ve mejorada con la inclusión de *U. clathrata*.
- v. El consumo de *U. clathrata* fresca en condiciones controladas de laboratorio mejora el crecimiento y otros parámetros zootécnicos del camarón, además de modificar el perfil y contenido de ácidos grasos y esteroides en el músculo de camarón.
- vi. El cocultivo de *U. clathrata* y camarón es una alternativa sustentable para la producción de camarón.
- vii. La contribución nutricional de *U. clathrata* fresca es similar a la del alimento artificial en el camarón.
- viii. La inclusión de harina o un extracto de *U. clathrata* en el alimento tiene un efecto antiviral contra WSSV en el camarón.
- ix. El consumo de *U. clathrata* fresca modifica la expresión de genes de respuesta inmune en el hepatopáncreas de camarón.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Definir el potencial del uso de la macroalga *Ulva clathrata* cultivada, en el cultivo de camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*.

#### 3.2 Objetivos particulares

- I. Determinar la composición química de *U. clathrata* de diferentes lotes de cultivo
- II. Evaluar el efecto de la inclusión de harina de *U. clathrata* en el alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón
- III. Evaluar el efecto del procesado de *U. clathrata* y del alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón
- IV. Determinar la digestibilidad aparente del alimento con inclusión de *U. clathrata*
- V. Evaluar el efecto del consumo de *U. clathrata* fresca en condiciones controladas de laboratorio sobre parámetros zootécnicos del camarón
- VI. Evaluar efecto del consumo de *U. clathrata* fresca sobre los ácidos grasos y esteroides en el músculo de camarón
- VII. Evaluar el cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 28°C (primavera)
- VIII. Evaluar el cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 30°C (verano)
- IX. Determinar las contribuciones nutricionales de carbono y nitrógeno en el camarón a partir de *U. clathrata* y alimento artificial, mediante el análisis de isótopos estables
- X. Evaluar el efecto antiviral de harina entera y extracto de *U. clathrata* en el alimento contra WSSV
- XI. Determinar la expresión diferencial de 292 genes de hepatopáncreas de camarón bajo consumo de *U. clathrata* y alimento artificial

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Aspectos generales de la biología y cultivo de *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei*, es la especie más cultivada en el mundo. Es un crustáceo decápodo de la familia de los peneidos, nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México al Norte, hacia Centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú, en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C durante todo el año (FAO, 2006).

Como características morfológicas tiene un rostrum moderadamente largo con 7–10 dientes dorsales y 2–4 dientes ventrales. En el caso de los adultos, los machos maduran a partir de los 20 g presentando un petasma simétrico y semi abierto con espermatóforos complejos (masa espermática encapsulada), mientras que las hembras maduras, a partir de los 28 g, tienen el télico abierto. Las etapas larvarias se dividen en seis: nauplios, tres proto-zoeas, y tres etapas de mysis. Normalmente su coloración es blanca translúcida pero puede dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua (FAO, 2006). Los camarones adultos pueden llegar a una talla máxima de 23 cm.

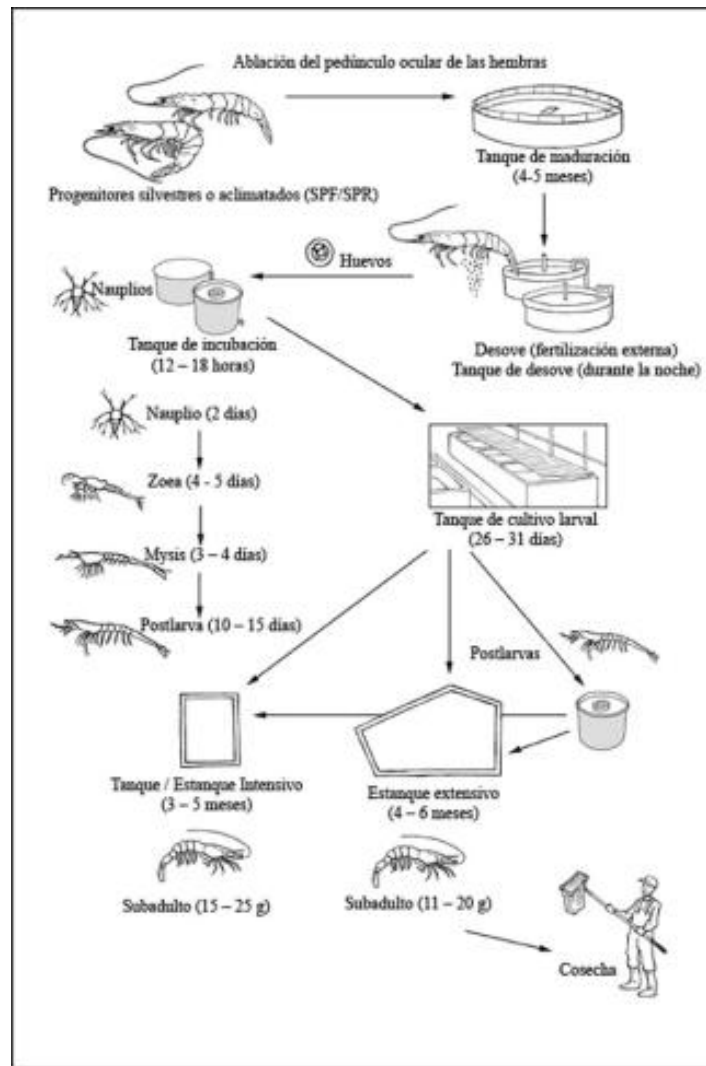
En la actualidad, la acuicultura es una actividad productiva de rápido crecimiento, donde específicamente el cultivo de camarón representa una industria económicamente importante a nivel mundial incluyendo países Latinoamericanos y del Caribe (Wurmann *et al.*, 2004). Dentro de los principales países productores se encuentran: China, Tailandia, Indonesia, Brasil, Ecuador, México, India, entre otros (Figura 1).



**Figura 1.** Principales países productores de *L. vannamei* (Estadísticas Pesqueras de la FAO, 2006)

México es el segundo productor del continente Americano después de Ecuador. En 2008 se reportó en nuestro país, una producción total de 187 mil toneladas de camarón, de las cuales 128 mil toneladas que representan el 69%, se produjeron a través de la acuicultura, correspondiendo el resto a captura tanto en altamar como en ribera (CONAPESCA, 2009).

Los sistemas de cultivo de camarón se pueden clasificar según el grado de tecnificación así como de densidad de siembra en los estanques (Parker *et al.*, 1974; FAO, 1988). En la actualidad, todo el ciclo de cultivo se lleva a cabo de forma controlada desde la reproducción hasta las cosecha del camarón (Figura 2).



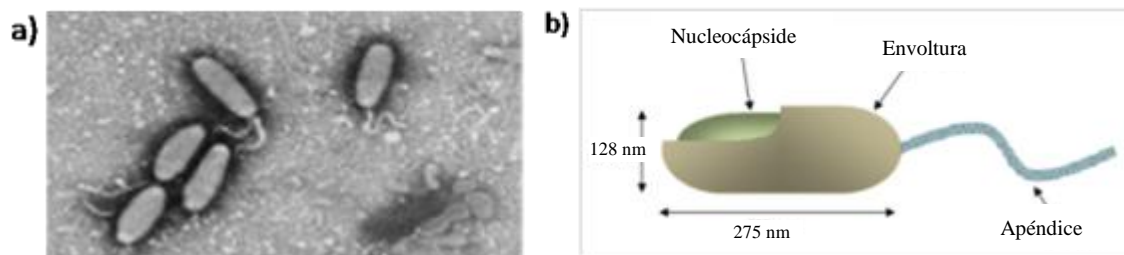
**Figura 2.** Ciclo de producción de *L. vannamei* (FAO, 2006)



Existen trabajos donde se describe el potencial del uso de sistemas integrados para mejorar la sustentabilidad y rendimiento de los cultivos (Chopin *et al.*, 2001; Neori *et al.*, 1998, 2008; Reid *et al.*, 2007). En el caso del camarón se han reportado policultivos con tilapia (Muangkeow *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2010), pepino de mar (Purcell *et al.*, 2006) y algas marinas, estas últimas como controladores de la calidad de agua (Marinho-Soriano *et al.*, 2002; Paul y de Nys, 2008; Mai *et al.*, 2010).

#### 4.1.1 Importancia de WSSV en el cultivo de camarón

El virus del síndrome de mancha blanca ó WSSV (White Spot Syndrome Virus, por sus siglas en inglés) es un virus circular envuelto no-ocluido, de doble cadena de DNA, de forma baciliforme a elíptica, dotado de un apéndice (Chou *et al.*, 1995; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). Los viriones pueden medir entre 210 y 380 nm de largo y entre 70 y 167 nm de ancho (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** a) Imagen modificada de Durand *et al.*(1996) que muestra los viriones del virus WSSV b) Esquema de la estructura de viral de WSSV

El virus WSSV es considerado una amenaza a la industria de la camaronicultura debido a su gran capacidad infectiva con mortalidades que pueden llegar hasta el 100% (Sahul *et al.*, 2001). La enfermedad se caracteriza por la aparición de manchas blancas en el exoesqueleto del camarón infectado, además de observarse una reducción considerable de consumo de alimento, letargo, coloración entre rosada y rojiza-café debido a la expansión de cromatóforos cuticulares y escasas manchas blancas (Lightner *et al.*, 1998).

Existen algunas recomendaciones para prevenir la infección por WSSV en las granjas camaronícolas: uso de cepas libres de patógenos específicos (SPF); lavar y desinfectar los huevos/nauplios con yodo, formalina; tamizar y separar los reproductores, los nauplios, las postlarvas y los juveniles; evitar cambios bruscos de calidad del agua; mantener temperatura del agua  $>30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; evitar el estrés; evitar uso de alimentos frescos; minimizar recambio de agua para evitar entrada de portadores de virus; tratamiento a estanques e incubadoras infectados con cloro a 30 ppm para matar el camarón infectado y a los portadores; desinfección de equipo (FAO, 2006). Por otro lado, existe investigación encaminada al combate y prevención de la infección de WSSV por medio de vacunas a partir de proteínas de envoltura del virus (Du *et al.*, 2006; Jha *et al.*, 2006; Ning *et al.*, 2009), anticuerpos específicos de animales inmunizados (Lu *et al.*, 2008), ARN de interferencia (Westenberg *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007) extractos de diferentes plantas (Balasubramanian *et al.*, 2007; Rameshthangam y Ramasamy, 2007) y polisacáridos sulfatados de algas marinas como el fucoidán (Takahashi *et al.*, 1998; Cruz-Suarez *et al.*, 2000).

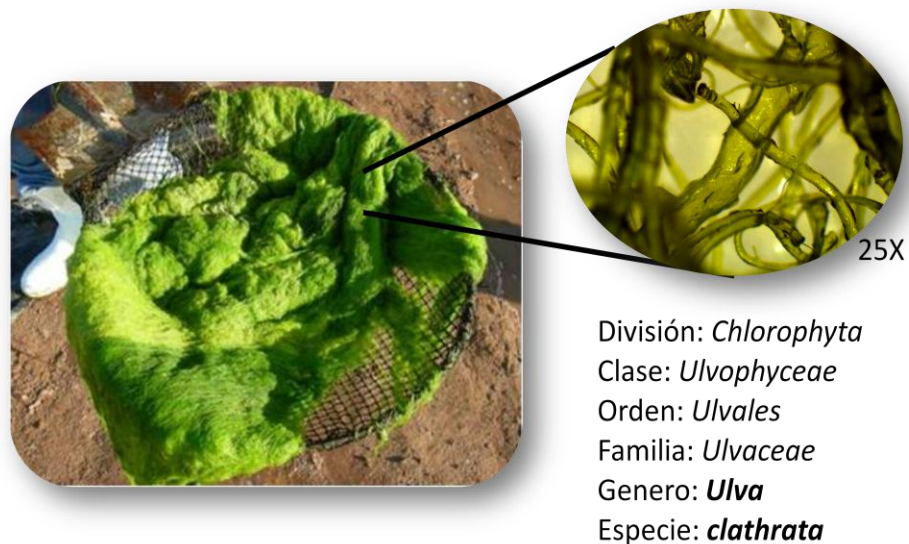
#### **4.2 Aspectos generales de la biología y cultivo de *Ulva clathrata***

La utilización global de macroalgas va en acenso, y en términos de biomasa cosechada por año, las macroalgas están entre las más importantes de los organismos marinos cultivados. De acuerdo con la FAO, entre 1981 y 2002, la producción total de macroalgas se incrementó de 3 millones de toneladas a cerca de 13 millones de toneladas (en peso húmedo). En general, los bancos naturales de algas marinas viablemente cosechables, son insuficientes para cubrir la creciente demanda mundial; como consecuencia, el cultivo de estas algas contribuye ahora con más del 90% de las necesidades de mercado global (McHugh, 2003). Por otro lado, el cultivo de algas constituye uno de las principales producciones por acuicultura a nivel global, teniendo un mínimo de requerimientos energéticos con un impacto ambiental muy bajo o nulo. Se tiene un estimado (en los trópicos) de 2.5 toneladas por hectárea de rendimiento por cada tres meses de cultivo, superando el potencial de captura de carbono que con cualquier otra actividad agrícola en una superficie equivalente (FAO, 2010). Las macroalgas marinas más explotadas son las algas café con 6 millones de toneladas, seguido por las

algas rojas con 3 millones de toneladas y en una porción menor las algas verdes con menos de 100,000 toneladas (Barsanti y Gualtieri, 2006).

La macroalga verde *Ulva clathrata* (Figura 4), es una alga marina de la familia de las *Ulvaceas* y cuya distribución es mundial. Es de talo laminar, tubular, más estrecho en la zona basal y formado por dos capas de células, mide hasta 40 cm de largo. También conocida como *Enteromorpha clathrata* (Hayden *et al.*, 2003) ó comúnmente llamada Aonori en países asiáticos como Japón, donde es consumida de forma masiva. Esta alga ha demostrado ser de gran potencial para el desarrollo de cultivo debido a sus características de rápido crecimiento y con un rango amplio de tolerancia a salinidades y temperaturas (Moll y Deikman, 1995).

En México actualmente se ha iniciado la explotación y el cultivo de esta alga con fines de uso comercial, tanto para nutrición humana como animal. La tecnología del cultivo de esta alga, ya patentada por la empresa Aonori Aquafarms (antes Sinaloa Seafields), es por medio de una cepa seleccionada (Moll, 2004) cultivada en laboratorio para posteriormente ser crecida en estanques, del mismo tipo que los utilizados en el cultivo de camarón y otras especies marinas.



**Figura 4.** Macroalga verde *Ulva clathrata*

#### 4.2.1 Composición química y valor nutricional de algas del genero *Ulva*

Las algas marinas pertenecientes a la familia de las *Ulvaceas* tiene una composición química interesante que las hace atractivas para su explotación comercial en distintas áreas como la nutricional, farmacológica, cosmética, entre otras. Son utilizadas actualmente como alimento en el continente Asiático, y como suplemento nutricional en China, Japón, EUA, Francia y Chile; el género *Ulva* es utilizado para preparar “Aonori” (laminas delgadas de alga deshidratada), el cual es incluido en una gran variedad de platillos, como ensaladas, sopas, galletas y condimentos (Aguilera-Morales *et al.*, 2005).

Aunque la composición de las algas del genero *Ulva* de ciertas regiones del mundo han sido documentadas, la investigación se ha centrado especialmente en las especies *U. lactuca*, *U. pertusa*, *U. fasciata*, *U. rigida*, *E. flexuosa*, *E. intestinalis* y *E. compressa*. Pocos estudios se han hecho sobre especímenes cultivados; sin embargo se han llevado a cabo numerosos trabajos de algas colectadas de costas y lagunas, donde la composición química varía dependiendo de la temporada y distribución geográfica, siendo la temperatura, salinidad, luz y disponibilidad de nutrientes los principales factores ambientales que afectan su composición (Ito y Hori, 1989; Marinho-Soriano *et al.*, 2006). Además de los factores ambientales, el manejo y el método de secado, pueden modificar el valor nutricional y las propiedades fisicoquímicas de las algas (Wong y Cheung 2001). En la Tabla 1 se presentan la composición bromatológica de algas del genero *Ulva* colectadas del medio natural y de cultivo.

El contenido de proteína en las algas verdes puede ser variado, con valores que van desde 7 a 29% de proteína cruda en base seca (Hashim y Mat-Saat, 1992; Wahbeh, 1997; Ventura y Castañón, 1998; Wong y Cheung, 2000, 2001; Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Marsham *et al.*, 2007), llegando a ser 2 ó 3 veces mayor que lo encontrado comúnmente en algas café (Burtin, 2003). En la mayoría de las algas, el ácido aspártico y el ácido glutámico constituyen gran parte de los aminoácidos totales, en el caso de las algas verdes, se ha reportado el nivel de estos dos aminoácidos entre 26 y 32% del total de aminoácidos en las especies *U. rigida* y *U. rotundata* respectivamente (Fleurence *et al.*, 1995). En el caso de aminoácidos esenciales para camarón, se ha reportado valores de 1.77, 6.33 y 5.14% del total de aminoácidos para metionina, lisina y arginina

respectivamente, en la especie *Ulva lactuca* (Mai *et al.*, 1994). Aguilera-Morales *et al.* (2005) encontraron que en *Enteromorpha sp.*, 9 de los 10 aminoácidos esenciales están presentes en mayor proporción en la proteína del alga que en la proteína de soya.

**Tabla 1.** Composición bromatológica de algas del genero *Ulva*, extraídas del medio natural y de cultivo (g 100 g<sup>-1</sup> en base seca)

|               | Especie              | Proteína cruda   | Lípidos totales   | Fibra cruda        | Ceniza  | ELN               |
|---------------|----------------------|--|---|--------------------|---|-------------------|
| Medio natural | <i>U. lactuca</i>    | 29 <sup>m</sup> , 21.1 <sup>f</sup> , 15-25 <sup>e</sup> , 10-21 <sup>c</sup> , 7.1 <sup>i</sup> | 0.5 <sup>m</sup> , 1.7 <sup>f</sup> , 1.6 <sup>i</sup> , 0.6-0.7 <sup>e</sup> | 2.8 <sup>m</sup> , | 17.8 <sup>m</sup> , 17.5 <sup>f</sup> , 13-22 <sup>e</sup> , 21.3 <sup>i</sup> , 23.6 <sup>j</sup> , 21a, 20 <sup>b</sup> |                   |
|               | <i>U. rigida</i>     | 5.9-6.4 <sup>g</sup> , 29.5 <sup>l</sup> , 18.6 <sup>o</sup>                                     | 1.7 <sup>h</sup> , 0.3-0.6 <sup>g</sup> , 1.4 <sup>l</sup> , 2.0 <sup>o</sup> | 4.7 <sup>h</sup>   | 52-47 <sup>g</sup>  | 56.1 <sup>o</sup> |
|               | <i>U. pertusa</i>    | 20 <sup>c</sup> , 26 <sup>d</sup>  |   |                    | 29.9 <sup>k</sup>   |                   |
|               | <i>U. fasciata</i>   | 14.3 <sup>o</sup>  | 1.8 <sup>o</sup>  |                    |   | 46.7 <sup>o</sup> |
|               | <i>U. reticulata</i> | 16.7 <sup>o</sup>  | 2.0 <sup>o</sup>  |                    |   | 57.9 <sup>o</sup> |
| Cultivada     | <i>U. clathrata</i>  | 27.2 <sup>n</sup>  | 1.1 <sup>n</sup>  | 5.4 <sup>n</sup>   | 18.6 <sup>n</sup>   | 47.8 <sup>n</sup> |

<sup>a</sup>Paine y Vadas (1969); <sup>b</sup>Carefoot (1973); <sup>c</sup>Arasaki y Arasaki (1983); <sup>d</sup>Nisizawa *et al.* (1987); <sup>e</sup>Indeergard y Minsaas (1991); <sup>f</sup>Ventura y Castañón (1998); <sup>g</sup>Foster y Hodson (1998); <sup>h</sup>Ventura *et al.* (1994); <sup>i</sup>Wong y Cheung (2000); <sup>j</sup>Lamare y Wing (2001); <sup>k</sup>Pengzhan *et al.* (2003); <sup>l</sup>Valente *et al.* (2006); <sup>m</sup>Marsham *et al.* (2007); <sup>n</sup>Cruz-Suarez *et al.* (2009); <sup>o</sup>Kumar *et al.* (2010).

El contenido de lípidos en las *Ulvaceas* puede variar entre valores de 0.2 a 5.6% de acuerdo a las condiciones de cultivo y la temporada del año en que se cosechan (Wong y Cheung, 2000; Carrillo-Dominguez *et al.*, 2002; Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Marsham *et al.*, 2007; Shanmugan y Palpandi, 2008; Kumar *et al.*, 2010). Aun y cuando el contenido total de lípidos de las *Ulvas* puede ser relativamente bajo (<6%), se ha reportado que son ricas en ácidos grasos poliinsaturados del tipo omega 3 y omega 6 (Wahbeh 1997; Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2008), los cuales tienen un papel crucial como componentes de fosfolípidos y como precursores de prostaglandinas en el camarón (Akiyama, 1991). Para *U. lactuca* se ha reportado valores de 66.3% de ácidos grasos poliinsaturados del total de ácidos grasos (Wahbeh, 1997). En *Enteromorpha sp.* se ha reportado para ácidos grasos esenciales en camarón, valores entre 6.9% y 9.1% para 18:2n-6, entre 3.5 y 6.4% para 18:3 n-3 y valores entre 2.8 y

5.7% para 20:5n-3 (Aguilera-Morales *et al.*, 2005). En cuanto a los fitoesteroles presentes en las Ulvas, el más abundante es el isofucoesterol (Fattorusso *et al.*, 1980; Siddhanta *et al.*, 2002), sin embargo en algunos casos, el esterol predominante puede ser el fucoesterol según las características del lugar y la época del año en que se cosecha (Popov *et al.*, 1985).

El contenido de fibra cruda reportado en harinas de algas verdes va de 2.8 a 5.5% (Hashim y Mat-Saat, 1992; Wahbeh, 1997; Ventura y Castañón, 1998; Wong y Cheung, 2000, Wong y Cheung, 2001; Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Marsham *et al.*, 2007). En términos de fibra dietaria, esta se puede dividir en dos fracciones, la soluble que es la fracción predominante (Mabeau y Fleurence, 1993) y la fracción insoluble. Se ha reportado un contenido de fibra soluble en *Enteromorpha sp.* de entre 17.5 y 21.7% de la materia seca (Aguilera-Morales *et al.*, 2005). En general, el contenido de fibra insoluble en materia seca varía entre 1 y 8%, pero en algunos casos puede ser mayor al 10% (Foster *et al.*, 1998; Wong y Cheung, 2000; Marinho-Soriano *et al.*, 2005). Dentro de la fracción soluble, encontramos un polisacárido sulfatado llamado ulvan. El ulvan es un heteropolisacárido, principalmente compuesto por ramnosa, xilosa, glucosa, ácido glucurónico, ácido idurónico y sulfato, con pequeñas cantidades de manosa, arabinosa y galactosa (Lahaye y Jegou, 1993; Jimenez-Escrig y Sanchez-Muñiz, 2000; Paradossi *et al.*, 2002).

La fracción de minerales presente en las Ulvas puede alcanzar más del 40% de la materia seca (Tabla 1). El alto contenido de calcio en las algas, hace que sean una de las más importantes fuentes vegetales para este mineral, alcanzando hasta un 7% del peso seco del alga (Burtin, 2003). *Enteromorpha sp.* tiene un contenido de calcio 28 veces más elevado que las espinacas y 26 veces más que el nopal (Morales de León *et al.*, 2000), además en el caso del fósforo contiene más de 30 veces la cantidad de cualquier vegetal común, por lo que se puede considerar seriamente como fuente nutricional para estos minerales (Aguilera-Morales *et al.*, 2005). Por su alto contenido de yodo, se consideran como una buena fuente dietaria; entre 13 y 18 mg kg<sup>-1</sup> en base seca reportado para *U. pertusa* (Houa *et al.*, 1997)

En cuanto a vitaminas, se ha reportado valores de vitamina C de 2200 mg kg<sup>-1</sup> en *U. fasciata* (McDermid y Stuercke, 2003) de vitamina A valores de 600–1500 mg kg<sup>-1</sup>

para *Ulva sp.* (Darcy-Vrillon, 1993), de vitamina E de 239 mg kg<sup>-1</sup> para *E. compressa* (Mamatha *et al.*, 2007). Por otro lado, la composición de carotenoides de las algas verdes es similar a aquella de las plantas superiores: los principales carotenoides presentes son luteína, B-caroteno, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina y neoxantina (Burtin, 2003), siendo la luteína (pigmento amarillo) la más abundante en *U. clathrata* y la cual se tiene evidencia de que puede ser metabolizada por el camarón hasta astaxantina (pigmento rojo) (Vernon-Carter *et al.* 1996; Arredondo-Figueroa *et al.*, 1999; Cruz-Suárez *et al.*, 2009).

### **4.3 Utilización de algas marinas en cultivo de camarón**

#### **4.3.1 Estabilidad en el agua de los alimentos**

La estabilidad del alimento consiste en la capacidad para mantener la forma y textura en el agua el tiempo necesario para que el organismo lo consuma. En el caso del camarón que es una especie con hábitos relativamente lentos de consumo, además de manipular el alimento antes de consumirlo, la estabilidad en el agua es de suma importancia.

La fibra insoluble y soluble de las algas marinas comparten la habilidad de retener agua y modular la viscosidad (Jimenez-Escrig y Sanchez-Muñiz, 2000). Sin embargo, estas características varían de acuerdo con la especie en cuestión, contenido de fibra, proceso de secado y también el tipo de polisacáridos presentes en el alga (Percival, 1968; Sharp, 1987; Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991; Ray y Lahaye, 1995; Jimenez-Escrig y Sanchez-Muñiz, 2000; Marais y Joseleau, 2001; Obluchinskaia *et al.*, 2002; Paradossi *et al.*, 2002; McHugh, 2003). Algunos estudios han reportado que el uso de algas puede ser un excelente aglutinante en alimentos acuícolas, sin embargo el nivel óptimo de inclusión puede variar dependiendo de las especies de algas (Storebakken 1985; Storebakken y Austreng 1987; Cuzon *et al.* 1994; Briggs and Funge-Smith 1996; Peñaflores y Golez 1996).

En un estudio de Hashim y Mat-Saat (1992) describen la inclusión de cuatro algas marinas al 5% en alimento para peces *Channa striatus*, un alimento con *Ulva sp.* presentó la mejor estabilidad en el agua después de una hora de inmersión (1.5% PMS),

seguido por la harina de *Sargassum sp.* (1.8% PMS), la harina de *Polycavernosa sp.* (1.8% PMS) y la harina de *Gracilaria sp.* (2% PMS). Peñaflores y Golez (1996) reportaron estabilidades en agua entre 93-94% y 88% en dietas para camarón suplementadas con harinas de *Kappaphycus alvarezii* y *Gracilaria heteroclada* después de una y cuatro horas de inmersión en agua marina. Cruz-Suárez *et al.* (2000) observaron que la inclusión de 3.2% de la harina de kelp en el alimento, resultó en una mayor estabilidad en el agua (5% PMS) que para las dietas suplementadas con un aglutinante sintético (9% PMS).

En el caso de la absorción de agua en los alimentos, se ha reportado que los fosfolípidos, polisacáridos (Fleury y Lahaye, 1991; Pomeranz, 1991), harina y gluten de trigo, harina de algas (Cerecer-Cota *et al.*, 2005) y el proceso de extrusión (Hilton *et al.*, 1981) tienden a incrementar la capacidad de absorción de agua, mientras que los aglutinantes artificiales (Cruz-Suárez *et al.*, 2000; Cerecer-Cota *et al.*, 2005) reducen significativamente la capacidad del alimento para absorber agua. Cruz-Suarez *et al.* (2000) observaron una capacidad de absorción mayor en dietas suplementadas con 3% de alginato (180%) que en dietas suplementadas con 2 (130%) y 4% (150%) de harina de kelp. En este mismo estudio se encontró que la inclusión de un aglutinante comercial (Maxibond) resultó en una menor absorción de agua (70%) que la inclusión de 3.2% de harina de kelp (105%). Wong y Cheung (2000) observaron mayor capacidad de retención de agua y de hinchazón en harina de alga *Hypnea japonica*, conteniendo 7% de fibra total dietética y 27% de proteína cruda, que las harinas de *H. charoides* y *U. lactuca*, las cuales contienen 18-19% de proteína cruda y 55% fibra dietética total (FDT).

#### **4.3.2 Parámetros zootécnicos y composición corporal**

Además de la palatabilidad, otro de los factores determinantes en el consumo de un alimento artificial para acuicultura, es la atractabilidad, la cual es la responsable de que el organismo detecte por quimiorrepción el alimento ofrecido. Se ha reportado que algunos compuestos de algas marinas, como aminoácidos y fosfolípidos pueden actuar como atractantes en dietas peletizadas para abulón (Sakata y Ina, 1985; Sakata *et al.*, 1991). En peces, este efecto atractivo se ha observado en dietas suplementadas con



harina de *Ulva sp.* (Hashim y Saat, 1992). En general, el uso de harinas de algas marinas incluidas en el alimento para camarón, reflejan un incremento en el consumo de la dieta (Cruz-Suárez *et al.*, 2000; Suárez-García, 2006; Cruz- Suárez *et al.* 2009; Da Silva and Barbosa, 2009).

Los efectos de las harinas de algas sobre el crecimiento del camarón son variados. Peñaflorida y Golez (1996) observaron la mayor ganancia en peso (111%) en camarones pequeños de *P. monodon* (200 mg) donde el alimento incluía 5% de harina de *Kappaphycus alvarezii*, mientras que el alimento que otorgo menor crecimiento fue el suplementado con 3% de harina de *Gracilaria heteroclada*. Sin embargo, en un segundo ensayo con camarones de 500 mg, no hubo diferencias significativas. Cruz-Suárez *et al.* (2000) encontraron diferencias significativas en el crecimiento (53-68%) de juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas que contenían con 2 y 4% de harina de kelp Mexicana (*Macrocystis pyrifera*), por otro lado, en un ensayo con harina de kelp Chileno (*M. pyrifera*) con 4 y 8% de inclusión en la dieta, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los camarones. Suárez-García (2006) concluyó que la inclusión de harina de *Sargassum sp.* (2-4%) o harina de kelp *M. pyrifera* (4%) produce un crecimiento similar a un alimento que contiene 3% de alginato puro incluido como aglutinante. En contraste, Briggs y Funge-Smith (1996) (citados por Peñaflorida y Golez, 1996) observaron una reducción significativa en el crecimiento de *P. monodon* con dietas con 30% de inclusión de *Gracilaria spp.*

Las algas son la única fuente de síntesis de carotenoides que tienen los crustáceos en su ambiente natural, los cuales pueden modificar una gran parte de las xantofilas, desde poco oxidadas (equinona) de color amarillo, hasta altamente oxidadas (astaxantina) de color rojizo (Latscha, 1991). Se ha reportado que menos del 20% de los carotenoides dietarios contribuyen en la pigmentación de la carne en organismos acuáticos (Torrissen *et al.*, 1989; Storebakken y No, 1992). Vernon-Carter *et al.* (1996) y Arredondo-Figueroa *et al.* (1999) encontraron que la luteína extraída de *Tagetes erecta*, carotenoide mas abundante en la *Ulva sp.*, era metabolizada hasta astaxantina y depositada en el camarón *L. vannamei*. En *P. monodon* no se encontraron diferencias en la pigmentación del cuerpo entre las dietas con la microalga *Dunaliella salina* y astaxantina pura (Boonyaratpalin *et al.*, 2001).

El perfil de ácidos grasos (FA) y esteroides en diversas especies de camarón de importancia económica como el camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*, ha sido bien documentado (Bragagnolo y Rodríguez-Amaya, 2001; Palacios *et al.*, 2002; González-Félix *et al.*, 2003; Cheng y Hardy, 2004; Cabrera *et al.*, 2005). En un estudio de dietas para camarón, se determinó que era factible el remplazo de aceite de pescado por un aceite producto de fermentación de microalgas heterotróficas (Patriak *et al.*, 2006). Se ha reportado que algas marinas incluyendo el género *Ulva* tienen efecto sobre la movilización y utilización de lípidos en diversas especies de peces y animales terrestres (Nakagawa *et al.*, 1987; Nakagawa, 1997a; Wong *et al.*, 1999; Pengzhan *et al.*, 2003; Carrillo *et al.*, 2008; Ergun *et al.*, 2009). Existen trabajos donde se ha visto una disminución en el contenido de colesterol en ratas y huevos de gallina ponedora alimentadas con dietas con *Ulva sp.* y *Enteromorpha sp.* (Wong *et al.*, 1999; Pengzhan *et al.*, 2003; Carrillo *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Casas-Valdez *et al.* (2006), se demostró que una dieta con 4% de inclusión del alga *Sargassum* disminuía significativamente el contenido de colesterol en músculo de camarón café *Farfantepenaeus californiensis*.

#### **4.3.3 Digestibilidad de nutrientes**

Ventura *et al.* 1994 concluyeron que *Ulva rigida* no era un ingrediente conveniente para alimentos para pollos debido a su baja cantidad de energía metabolizable. Nandeeshá *et al.* (2001) encontraron un incremento significativo en la digestibilidad de la proteína en alimentos con *Spirulina sp.* para los peces *C. catla* y *L. rohita*. Wong y Cheung (2001) determinaron la digestibilidad *in vitro* de *Ulva lactuca*, mediante un método multi-enzimático compuesto de tripsina de cerdo, quimiotripsina bovina y peptidasa porcina, obteniendo un valor de 85.7% de digestibilidad de la proteína. Villarreal-Cavazos (2011) determinó que la digestibilidad de aminoácidos de *U. clathrata* era superior al 90% en camarones juveniles de *L. vannamei*. En un trabajo realizado por Suárez-García (tesis de licenciatura, 2006), no se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad aparente de proteína y materia seca entre una dieta control y dietas con 2 y 4% de harina de *Sargassum sp.* y otra con 4% de harina de *M. pyrifera*.

#### **4.3.4 Cocultivo y control de calidad de agua**

Existen muchas investigaciones en las que se han llevado con éxito el cocultivo de diferentes macroalgas con organismos acuáticos en sistemas abiertos (Petrell *et al.* 1993, Hirata y Kohirata 1993, Hirata *et al.* 1994, Petrell y Alie 1996, Troell *et al.* 1999, Chopin *et al.* , 1999a, 2001), con organismos cultivados en encierros flotantes (Bodvin *et al.* 1996) y con organismos cultivados en estanques (Jiménez del Rió *et al.* 1994 y 1996, Neori *et al.* 1998, 2000) en los que se ha utilizado a las macroalgas para proveer mejores condiciones de calidad de agua mediante la toma de nutrientes (materia orgánica) por biofiltración (Hamano *et al.* 2007; Paul y de Nys 2008; Copertino *et al.* 2009), obteniendo mayor biomasa y enriquecimiento de nutrientes (Chopin *et al.* 1999b, Neori y Shpigel 1999, Neori *et al.* 2000). Existen pocos reportes sobre los beneficios nutricionales que puede traer el consumo de las algas a los organismos en cultivos integrados. Porchas-Cornejo *et al.* (1999) reportan un crecimiento hasta 3 veces mayor en el camarón café *Farfantepenaeus californiensis* en presencia del alga *Caulerpa sertularioides* que en ausencia de ella. En otros estudios se observó que el consumo de *Enteromorpha sp.* fresca induce la maduración de *Penaeus indicus* (Emerson 1980; Emerson *et al.* 1983). También se ha reportado que algunas algas marinas flotantes, sirven como refugio y/o alimento para algunas especies de peces (Vandendriessche *et al.*, 2007).

#### **4.3.5 Efecto inmunoestimulante y antiviral**

Los inmunoestimulantes han sido usados para aumentar la resistencia de camarones contra bacterias e infecciones virales (Sung *et al.*, 1994). La finalidad del uso de inmunoestimulantes es la de alertar al sistema inmune previo al contacto con el agente patógeno. Existen estudios donde se ha utilizado diferentes compuestos como estimulantes del sistema inmune, entre los que tenemos los beta-glucanos de pared celular de levaduras (Raa, 1996), péptidoglicanos presentes en bacterias Gram positivas (Whitt, 1994) y lipopolisacáridos presentes en bacterias Gram negativas (Espinosa *et al.* 2002). Se ha descrito que el laminarán sulfatado tiene propiedades inmunomodulatorias en los macrófagos *in vitro* del Salmón *Salmo salar* (Dalmo y Seljelid, 1995). Se ha demostrado que el extracto de *Gracilaria tenuistipitata* tiene un efecto

inmunoestimulante y de resistencia en *L. vannamei* contra *Vibrio alginolyticus* (Hou y Chen, 2005). Para el caso del humano, se ha reportado una actividad estimulante del sistema inmune por extractos de algas (Liu, 1997; Shan *et al.* 1999). Balasubramanian *et al.* (2007) reportan un efecto de inactivación del virus de WSSV en *P. monodon*, a partir de cinco extractos de plantas medicinales comúnmente utilizadas en India.

Desde hace varias décadas, los polisacáridos sulfatados presentes en las algas han sido objeto de estudio por su efecto farmacológico. En el caso de las algas cafés, los polisacáridos presentes son los alginatos, laminaranes y los fucoidanes (Ponce *et al.*, 2003) y en el caso de las algas verdes como las del género *Ulva* o *Enteromorpha* encontramos el ulvan (Lahaye y Jegou, 1993; Paradossi *et al.*, 1999; Jimenez-Escrig y Sanchez-Muñiz, 2000). Takahashi *et al.*, (1998) demostraron que la administración de fucoidan, extraído de *C. okamuranus*, mejora la sobrevivencia de *P. japonicus* desafiado con virus de mancha blanca, concluyendo que el fucoidan inhibe la adsorción del virus. Para el caso de *L. vannamei*, Cruz-Suárez *et al.* (2006) reportan que el fucoidan extraído del alga *C. okamuranus* es efectivo contra la infección con virus de mancha blanca. También se ha visto que la administración oral de fucoidan crudo extraído de *Sargassum polycystum* puede reducir el impacto de la infección de virus de mancha blanca (WSSV) en el camarón tigre *P. monodon* (Chotigeat *et al.*, 2004).

#### **4.4 Expresión de genes de camarón**

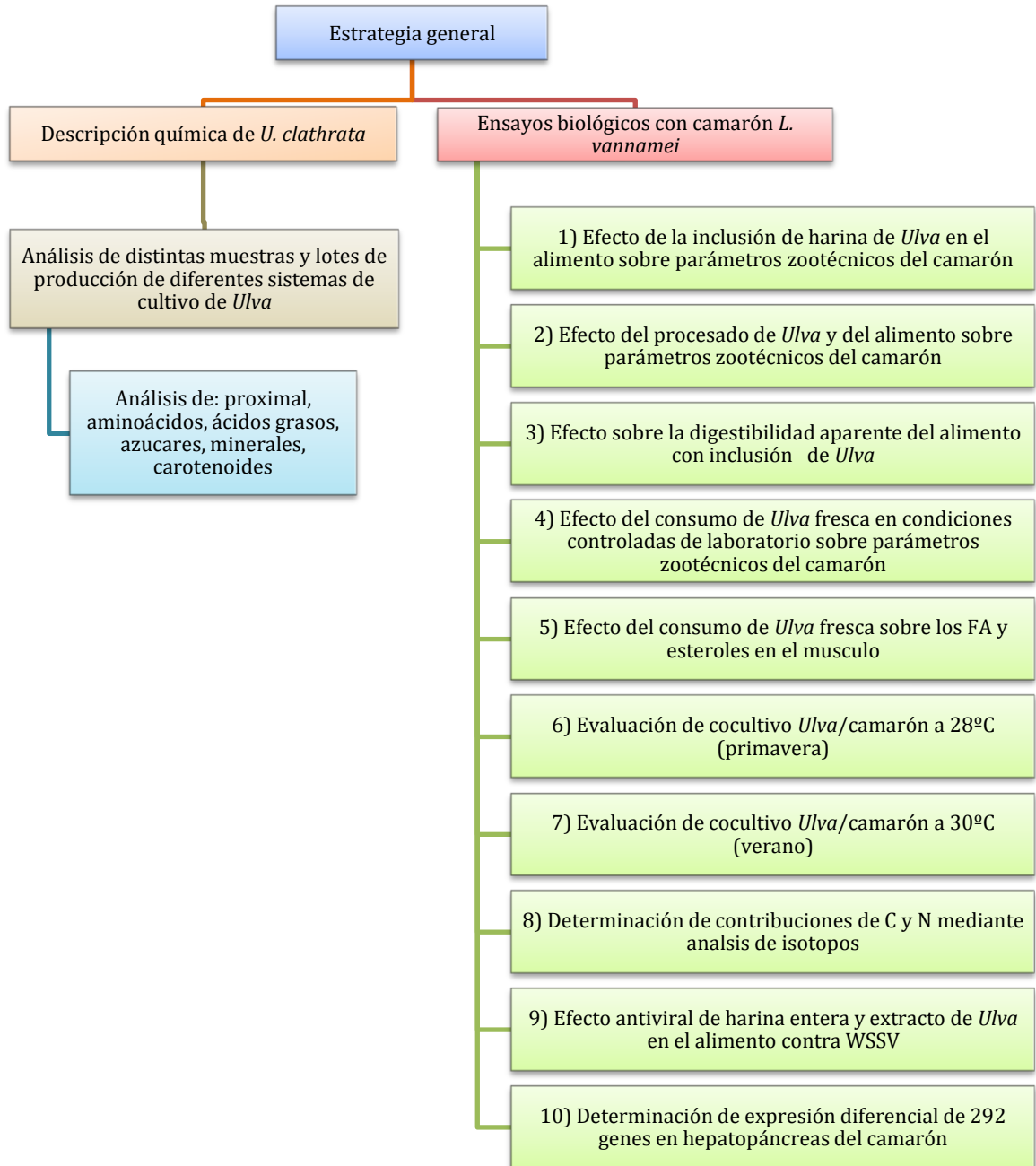
En la actualidad se cuenta con herramientas de análisis molecular para conocer las respuestas fisiológicas bajo condiciones específicas como: diferentes fuentes nutricionales, agentes patológicos o cualquier estresante en el sistema de cultivo del camarón. Los diferentes componentes dietarios pueden modificar toda la respuesta fisiológica del camarón, por lo tanto si conocemos estos mecanismos moleculares y como manipularlos, podemos optimizar la utilización de los nutrientes para mejorar la salud y productividad del sistema de cultivo (Bonneau y Laarveld, 1999; Paoloni-Giacobino *et al.*, 2003; Chavez-Calvillo *et al.*, 2010). Existen trabajos de nutrigenómica (ciencia que estudia la expresión de los genes en relación con la nutrición y el desarrollo de enfermedades asociadas a dicha expresión) mayoritariamente en humanos (Anderle *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2007; Kaput *et al.*, 2007), pero también en diversas especies

tanto terrestres como acuáticas (Corthesy-Theulaz *et al.*, 2005; Collins, 2006; Murray *et al.*, 2010).

Hasta el momento la herramienta mayormente utilizada para el análisis de expresión diferencial de genes en las distintas especies de camarón, es el microarreglo, con un número variable de clones en el chip que van desde 100 EST's (Dhar *et al.*, 2003), 2036 EST's (Pongsomboon *et al.*, 2008; Fagutao *et al.*, 2008), 2469 EST's (Robalino *et al.*, 2007), 3136 EST's (Wang *et al.*, 2006) hasta 3853 EST's (de la Vega *et al.*, 2007). En el caso específico de camarones la mayoría de los estudios de expresión diferencial de genes se han llevado a cabo en las especies *L. vannamei* y *P. monodon* con un enfoque sobre respuesta inmune, analizando el efecto de la infección con virus de importancia económica como WSSV (Leu *et al.*, 2007) y YHV (Pongsomboon *et al.*, 2008) además de bacterias como *Vibrios* (Wang *et al.*, 2006). También se han identificado genes relacionados con la resistencia a WSSV (He *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007), donde se ha visto una relación con la expresión de proteínas involucradas con rutas mitocondriales, de producción de energía, homeostasis regulada por calcio, síntesis de ácidos nucleicos, glicólisis y gluconeogénesis, entre otros procesos celulares (Wang *et al.*, 2007). En estudios relacionados con expresión diferencial de genes por un estímulo nutricional, se ha visto que dietas basadas en ingredientes vegetales pueden alterar de forma significativa la expresión de genes en peces y camarón (Jordal *et al.*, 2005; Chávez-Calvillo *et al.*, 2010; Leaver *et al.*, 2008; Panserat *et al.*, 2009).

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### Estrategia general



**Figura 5.-** Estrategia general del desarrollo del trabajo de tesis

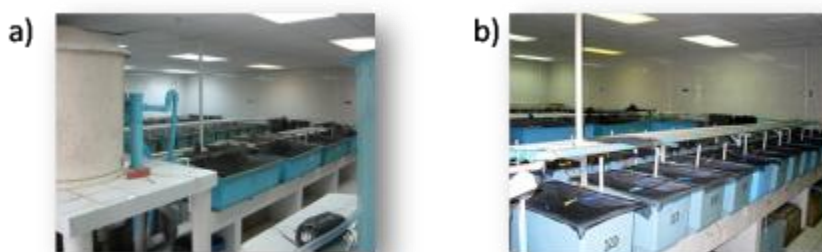
## **5.1 Lugar de trabajo**

Con la finalidad de cubrir los diferentes objetivos del proyecto de tesis, se trabajó en distintos laboratorios, siendo el laboratorio del Programa Maricultura de la UANL el principal lugar de trabajo, seguido de los laboratorios de “*Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratories*” (TVMDL) de la Universidad de Texas A&M, Laboratorio de Metabolismo de Lípidos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) en La Paz, B.C. y el Laboratorio de Propagación de Algas de la empresa Algalimentos de Aonori Aquafarms en Los Mochis, Sinaloa. Además se contó con la colaboración de otras universidades y laboratorios para la realización de análisis y determinaciones químicas de algunas de las muestras tanto de *U. clathrata* como de camarones, enlistando a continuación dichas instituciones: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) de Hermosillo, Son., Laboratorio de Productos Marinos de la Universidad de Sonora (UNISON), Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Vegetales y Pigmentos Naturales S.A. de C.V. (VEPINS) y con el laboratorio de “*Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories*” de la Universidad de Missouri (AESCL)

### **5.1.1 Programa Maricultura (UANL)**

El programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas cuenta con una sala de bioensayos (Figura 6) la cual consta de un sistema de recirculación de agua marina sintética (8TM), 4 tanques de pre-engorda de 500 L cada uno con doble fondo y sistema de recirculación (“air lift”), dos tanques colectores que funcionan como tanques de sedimentación de 1500 L que se encuentran en la parte inferior del sistema, un tanque de succión que se encuentra entre los dos colectores y recibe el agua de ellos; en la parte superior del sistema se encuentran dos tanques con un sistema de regulación de temperatura por intercambio y que suministran de agua al sistema por medio de gravedad, un filtro (contactor) biológico, filtro de perlas, filtro de luz UV, filtro de carbón activado, filtros de cartucho de 50 micras, y espumadores. En esta sala de bioensayos se monitoreó la calidad del agua marina, registrando diariamente la temperatura, salinidad y semanalmente el pH, amonio, nitratos y nitritos durante todos los experimentos. La unidades experimentales para los distintos bioensayos constan de

acuarios de 60 y 120 L de fibra de vidrio (tasa de recirculación de  $300\% \text{ d}^{-1}$ ), conectados al sistema de recirculación de agua marina, equipados con un doble fondo cubierto de una tela de gasa de color negro (el cual no fue utilizado en todos los experimentos) y un sistema de recirculación interna ("air lift"). En todos los experimentos realizados en el laboratorio del Programa Maricultura se monitoreó la calidad del agua (FasTest, Aquarium Systems, France) manteniendo los parámetros en los siguientes rangos: temperatura  $30\pm 2^\circ\text{C}$ , salinidad  $35\pm 2$  ppt, pH  $8.0\pm 0.5$ ,  $\text{N-NH}_3 < 0.1$  ppm,  $\text{N-NO}_2 < 0.1$  ppm y  $\text{NO}_3 < 40$  ppm. El fotoperiodo durante los experimentos en este laboratorio fue de 12:12 h luz:oscuridad.



**Figura 6.** a) y b) Sala de bioensayos del programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL

### **5.1.2 Laboratorio Algalimentos de Aonori Aquafarms**

El laboratorio de propagación de algas de la empresa “Aonori Aquafarms” cuenta con 12 tanques de lona y marco metálico, cuyas dimensiones son:  $1.5 \times 1.5 \times 0.90\text{m}$  y capacidad de 2000 L, y en los cuales se suministra aireación nocturna con la ayuda de piedras arreadoras (una por tanque) alimentadas por un compresor de aire de  $\frac{3}{4}$  Hp (Figura 7).

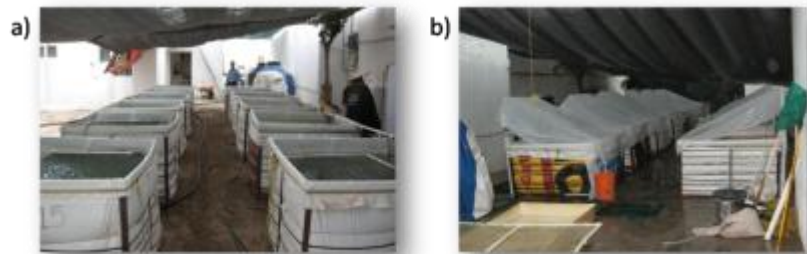
En los tanques experimentales se utilizó agua marina sintética, preparada de forma manual e individual para cada estanque con una la mezcla de sales que se presenta en la Tabla 2.



**Tabla 2.** Mezcla de sales para la preparación de 2000 L de agua marina sintética (35 ppt de salinidad)

| Compuesto            | Cantidad |
|----------------------|----------|
| Cloruro de Sodio     | 50 kg    |
| Sulfato de Magnesio  | 12 kg    |
| Cloruro de Magnesio  | 10 kg    |
| Cloruro de Calcio    | 2.5 kg   |
| Cloruro de Potasio   | 2 kg     |
| Acido Bórico         | 50 g     |
| Bicarbonato de Sodio | 1.17 kg  |

Durante los experimentos, se llevó a cabo un monitoreo diario de los parámetros de calidad de agua, para el caso del oxígeno disuelto y la temperatura del agua se realizaron dos registros, uno a las 6 AM y otro a las 6 PM. Los siguientes parámetros se determinaron una vez al día (12PM): la salinidad se determinó mediante el uso de un refractómetro, el pH con un potenciómetro marca Orion 720A, amonio, nitritos y nitratos con kits calorimétricos marca SERA, turbidez con la técnica de disco de secchi y el nivel de agua. Al final de los experimentos se evaluaron parámetros zootécnicos y pigmentación en los camarones (completos frescos) así como su composición proximal (análisis VEPINSA).

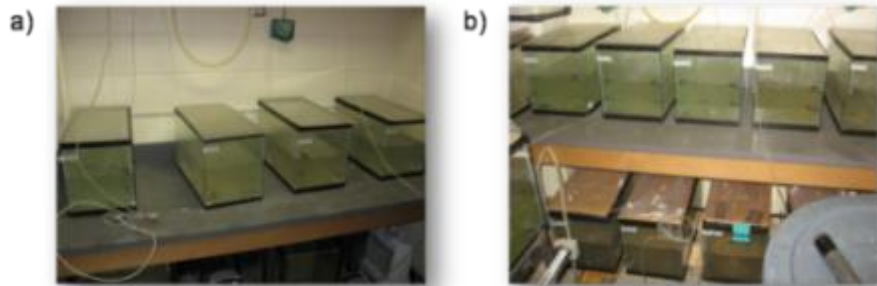


**Figura 7.** a) Tanques experimentales para cocultivo Ulva/camarón; b) Tanques con tapas de plástico durante la lluvia.

### 5.1.3 Laboratorio de bioensayos infecciosos de TVMDL (Texas A&M)

El laboratorio cuenta con 2 cuartos aislados para la realización de bioensayos infecciosos, un cuarto para albergar los organismos infectados (contaminado), y otro cuarto para los organismos control sin infectar (limpio). Ambos cuartos están equipados con acuarios de vidrio de 20 L de capacidad con tapa para evitar la pérdida de

organismos por salto, bombas de aireación, y calefacción para controlar la temperatura (Figura 8). Se utiliza agua marina sintética (Crystal Sea Marinemix™) a una salinidad de 30 ppt y una temperatura entre 26.5-30 °C.



**Figura 8.** a) Cuarto libre de WSSV (limpio); b) Cuarto para infección con WSSV (contaminado)

## 5.2 Material biológico

### 5.2.1 Origen y manejo de los camarones

Todos los camarones utilizados en los diferentes experimentos, fueron juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei* con distintos orígenes de acuerdo con la disponibilidad y el modelo experimental de cada objetivo particular dentro del proyecto de tesis. En cada uno de los experimentos, se realizó una biometría para conocer la variación de tallas en los lotes de camarón, para después realizar una distribución homogénea en las unidades experimentales (acuarios o tanques) dispuestas en bloques de tratamientos al azar.

Los camarones utilizados en los diferentes bioensayos realizados en el laboratorio de Maricultura de la UANL, fueron obtenidos de dos laboratorios comerciales de larvas para siembra en granja: uno de los laboratorios fue el de “Maricultura del Pacífico” (CMP) ubicado en Mazatlán Sinaloa, México; el segundo laboratorio fue el de “Langostinos y Camarones de Oriente” (LCO) ubicado en Veracruz, México. En ambos casos, los camarones fueron colocados en bolsas de plástico dentro de hieleras de poliestireno y enviados vía aérea al laboratorio de Maricultura de la UANL. Una vez en las instalaciones de la UANL, los camarones se aclimataron de acuerdo a la condiciones

de pH, salinidad y temperatura dentro de acuarios de fibra de vidrio de 500 L los cuales están interconectados a un sistema de recirculación de agua marina. Una vez aclimatados los organismos y justo antes de ser utilizados en los bioensayos, se alimentaron con dietas comerciales con presentación de acorde a la talla (por lo general con 35% proteína y 10% lípidos).

En el experimento llevado a cabo en la Universidad de Texas A&M se utilizaron camarones juveniles libres de patógenos específicos (SPF) de una línea de rápido crecimiento, obtenidos de la compañía “Shrimp Improvement Systems”, ubicada en Florida, EUA. Estos organismos fueron enviados vía aérea al laboratorio y aclimatados por 24 hrs previo a iniciar el experimento.

En el caso de los camarones utilizados para la experimentación en tanques piloto al aire libre en el laboratorio de Algalimentos, se emplearon organismos de dos orígenes distintos: en el primer caso fueron camarones muestreados de un estanque de engorda de camarón de una granja comercial (CGM), ubicada en Gusave, Sinaloa, México; en el segundo caso se emplearon camarones del laboratorio de “Maricultura del Pacifico”. En ambos casos los camarones fueron transportados vía terrestre en tanques de fibra de vidrio de 700 L (transportadores). Una vez en el laboratorio, los camarones se aclimataron a las condiciones del agua marina de los tanques experimentales (2000 L) distribuyéndolos homogéneamente y al azar.

### **5.2.2 Muestras de *Ulva clathrata* y sistemas de cultivo**

La cepa de *Ulva clathrata* utilizada en todo el proyecto de tesis, fue proporcionada por la empresa “Aonori Aquafarms Inc.”, ubicada en la ciudad de San Diego, California, EUA. La propagación y cultivo de la *U. clathrata* es a partir de un clon diploide vegetativo (esporofito), el cual puede reproducir esporas y producir una generación gametofítica; teniendo en cuenta que la tasa de producción de esporas era muy baja, se puede considerar que la biomasa producida consta de células diploides, con solo trazas de células haploides.

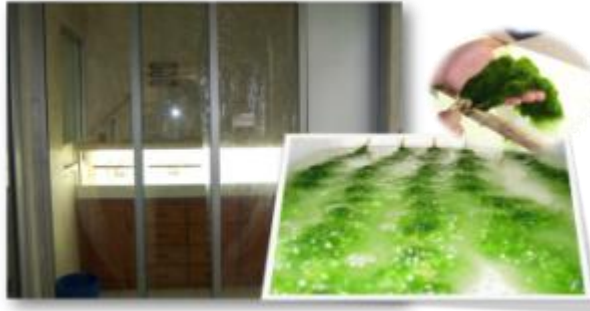
Para efecto de cumplir con los diferentes objetivos específicos, muestras del alga fueron proporcionadas directamente por la empresa y en otros casos el alga fue propagada dentro del laboratorio de Maricultura de la UANL (UPM) (Figura 9) donde la

*U. clathrata* se cultivo a una densidad de 10 g L<sup>-1</sup> en agua marina sintética a 35 ‰ de salinidad a una temperatura en el agua no mayor a 20°C, con una fertilización (28-7-7 relación NPK más micronutrientes) dos veces por semana a una razón de 0.125 mL L<sup>-1</sup>, recambiando totalmente el agua marina cada semana para evitar contaminación y déficit de nutrientes.

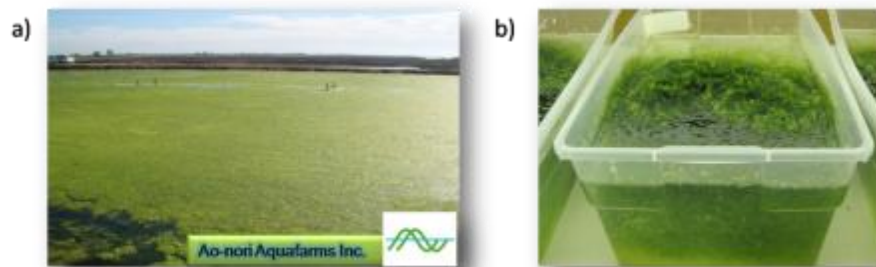
En el caso de las muestras proporcionadas por la empresa, se obtuvieron muestras de tres diferentes sistemas de cultivo del alga: LSS, que es un sistema de propagación a gran escala en donde el alga es cultivada en estanques comúnmente usados para el cultivo de camarón (Figura 10a); MSS, que es un sistema de cultivo de mediana escala donde el alga se cultiva en contenedores no mayores a 40 L (Figura 10b); CCp, que es un sistema piloto de de cocultivo con camarón en tanques de 2000L (Figura 11). En el caso de la *U. clathrata* enviada por Aonori aquafarms, muestras tanto secas como frescas de los sistemas de cultivo LSS y MSS fueron enviadas vía aérea al laboratorio y preservadas en bolsas de plástico perforadas en refrigeración entre 4 y 10°C, por no más de 15 días previos a su utilización en los experimentos.

### **5.2.3 Resumen de origen de las diferentes muestras de *U. clathrata* y camarones utilizados en los experimentos**

En la Tabla 3 se muestran los diferentes lotes de *U. clathrata* obtenido durante el proyecto de tesis, precisando los análisis realizados a cada muestra. En la Tabla 4 se muestra el lote de *U. clathrata* y el origen de los camarones utilizados en cada uno de los experimentos, señalando en donde y que análisis químicos se realizaron sobre el alimento y los camarones de cada experimento.



**Figura 9.** Propagación de *U. clathrata* en laboratorio del Programa Maricultura (UPM)



**Figura 10.** a) Sistema de cultivo a gran escala (LSS) de la empresa Aonori Aquafarms; b) Sistema de cultivo de mediana escala (MSS) de la empresa Aonori Aquafarms



**Figura 11.** Sistema piloto de cocultivo *Ulva*/camarón (CCp)

**Tabla 3.** Lotes de *U. clathrata* muestreados de diferentes sistemas de cultivo de alga

| Lote Ulva | Sistema de cultivo           | Año de producción | Ubicación de la producción | Análisis |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
|-----------|------------------------------|-------------------|----------------------------|----------|------|------|----|----|--------|----|----|----|----|---------|----|--------|
|           |                              |                   |                            | BR       | FD   | AZ   | AA | FA | MN     | CT |    |    |    |         |    |        |
| LSS1      | Gran escala (estanques)      | 2006              | Bahía soledad, B.C.        | UANL     |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| LSS2      | Gran escala (estanques)      | 2007              | Los Mochis, Sin.           | UANL     |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| LSS3      | Gran escala (estanques)      | 2007              | Los Mochis, Sin.           | UANL     |      |      |    |    | EVONIK |    |    |    |    |         |    |        |
| LSS4      | Gran escala (estanques)      | 2008              | Guasave, Sin.              | UANL     |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| LSS5      | Gran escala (estanques)      | 2008              | Guasave, Sin.              | UANL     |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| LSS6      | Gran escala (estanques)      | 2008              | Guasave, Sin.              | UANL     | UANL | UANL | UM | UM | UM     | UM | UM | UM | UM | UM      | UM | UM     |
| MSS1      | Mediana escala (laboratorio) | 2007              | Los Mochis, Sin.           | UANL     |      |      |    |    | EVONIK |    |    |    |    |         |    |        |
| MSS2      | Mediana escala (laboratorio) | 2009              | Los Mochis, Sin.           | UANL     | UANL | UANL | UM | UM | UM     | UM | UM | UM | UM | UM      | UM | UM     |
| MSS3      | Mediana escala (laboratorio) | 2009              | Los Mochis, Sin.           | UANL     | UANL | UANL | UM | UM | UM     | UM | UM | UM | UM | UM      | UM | UM     |
| MSS4      | Mediana escala (laboratorio) | 2009              | Los Mochis, Sin.           | UANL     | UANL | UANL | UM | UM | UM     | UM | UM | UM | UM | UM      | UM | UM     |
| CCp1      | Cocultivo piloto             | 2007              | Los Mochis, Sin.           | VEPinsa  |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| CCp2      | Cocultivo piloto             | 2007              | Los Mochis, Sin.           | VEPinsa  |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| CCp3      | Cocultivo piloto             | 2007              | Los Mochis, Sin.           | VEPinsa  |      |      |    |    |        |    |    |    |    | VEPinsa |    |        |
| CCp4      | Cocultivo piloto             | 2007              | Los Mochis, Sin.           | VEPinsa  |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| CCp5      | Cocultivo piloto             | 2007              | Los Mochis, Sin.           | VEPinsa  |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| CCp6      | Cocultivo piloto             | 2007              | Los Mochis, Sin.           | VEPinsa  |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| UPM1      | Programa Maricultura         | 2010              | Monterrey, N.L.            | UANL     |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| UPM2      | Programa Maricultura         | 2010              | Monterrey, N.L.            | UANL     |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    | CIBNOR |
| UPM3      | Programa Maricultura         | 2011              | Monterrey, N.L.            | UANL     |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |
| UPM4      | Programa Maricultura         | 2011              | Monterrey, N.L.            | UANL     |      |      |    |    |        |    |    |    |    |         |    |        |

Donde: BR = bromatológico; FD = fibra dietética; AZ = azúcares; AA = aminoácidos; FA = ácidos grasos; MN = minerales; CT = carotenoides totales.

**Tabla 4.** Lote de *U. clathrata* y origen de los camarones utilizados en cada experimento.

|                                  | Experimento |      |      |      |        |         |         |      |           |      |
|----------------------------------|-------------|------|------|------|--------|---------|---------|------|-----------|------|
|                                  | 1           | 2    | 3    | 4    | 5      | 6       | 7       | 8    | 9         | 10   |
| Lote de Ulva                     | LSS3        | MSS4 | LSS3 | MSS3 | UPM2   | CCp1-3  | CCp4-6  | UPM1 | LSS3      | MSS3 |
| Origen camarones                 | CMP         | LCO  | CMP  | CMP  | LCO    | CGM     | CMP     | LCO  | SPF (EUA) | CMP  |
| Peso promedio inicial (g)        | 1.13        | 0.52 | 4.6  | 1.2  | 1.25   | 3.5     | 0.65    | 0.19 | 5.5       | 2.7  |
| Acuarios o tanques               | 60L         | 60L  | 120L | 60L  | 120L   | 2000L   | 2000L   | 120L | 20L       | 60L  |
| Lugar de evaluación biológica    | UANL        | UANL | UANL | UANL | UANL   | AAqua   | AAqua   | UANL | TAMU      | UANL |
| <b>Análisis en las dietas</b>    |             |      |      |      |        |         |         |      |           |      |
| Bromatológico                    | UANL        | UANL | UANL | UANL | UANL   | UANL    | VEPinsa | UANL | UANL      | UANL |
| Estabilidad en el agua           | UANL        | UANL | UANL | UANL | UANL   |         |         | UANL | UANL      | UANL |
| Ácidos grasos                    |             |      | UM   |      | CIBNOR | VEPinsa |         |      |           |      |
| Esteroles                        |             |      |      |      | CIBNOR |         |         |      |           |      |
| Isotopos estables                |             |      |      |      |        |         |         | UC   |           |      |
| <b>Análisis en los camarones</b> |             |      |      |      |        |         |         |      |           |      |
| Bromatológico                    |             |      |      |      |        | VEPinsa | VEPinsa |      |           |      |
| Ácidos grasos                    |             |      | UM   |      | CIBNOR | VEPinsa | VEPinsa |      |           |      |
| Esteroles                        |             |      |      |      | CIBNOR |         |         |      |           |      |
| Carotenoides                     |             |      |      |      |        | VEPinsa | VEPinsa |      |           |      |
| Firmeza de musculo               |             |      |      |      |        | UNISON  |         |      |           |      |
| Isotopos estables                |             |      |      |      |        |         |         | UC   |           |      |
| Histología y PCR para WSSV       |             |      |      |      |        |         |         |      | TAMU      |      |
| Microarreglo                     |             |      |      |      |        |         |         |      |           | CIAD |

### 5.3 Alimentos experimentales

#### 5.3.1 Formulación y elaboración de alimentos experimentales

Los alimentos experimentales elaborados en el laboratorio del Programa Maricultura, se realizaron a partir de una fórmula de referencia la cual actuó como control (elaborada para cada experimento con la misma fuente de ingredientes) formulada con el programa Nutrion 5 (Tabla 5). Dependiendo el experimento, se sustituyó el ingrediente experimental (*U. clathrata* fresca, harina o extracto) por el mismo porcentaje en peso de harina de trigo dentro la fórmula.

**Tabla 5.** Fórmula base utilizada para la elaboración de las dietas experimentales

| Ingredientes (% proteína) | Origen                   | UANL control |
|---------------------------|--------------------------|--------------|
| Harina de pescado (67%)   | Omegan Protein           | 262.8        |
| Pasta de soya (47%)       | Proteínas Naturales S.A. | 67.3         |
| Harina de trigo (11.5%)   | Molinos San Joan         | 563.9        |
| Harina de camarón (42%)   | Hirinhsen (Chile)        | 40.0         |
| Aceite de pescado         | Tepual                   | 14.2         |
| Lecitina de soya          | Proteínas Naturales S.A. | 45.3         |
| Vitamina C                | Stay-C                   | 0.5          |
| Mezcla mineral            | CostaMar                 | 2.5          |
| Mezcla vitamínica         | CostaMar                 | 2.5          |
| Antifúngico               | CostaMar                 | 0.5          |
| Antioxidante              | CostaMar                 | 0.5          |
| Total g                   |                          | 1000.0       |

Para la elaboración de los alimentos, se molieron todos los ingredientes a un mismo tamaño de partícula (500  $\mu\text{m}$ ) en un molino Cyclotec modelo 1093, se pesaron todos los ingredientes por separado, posteriormente se pasaron los macronutrientes a la mezcladora marca Kitchen-Aid, donde se mezclaron durante 8 minutos (excepto el aceite de pescado y la lecitina de soya). Después se tomaron aproximadamente 150 g de la mezcla de los macronutrientes y se pre-mezclaron con los micronutrientes en un recipiente pequeño, se procedió a mezclar los micronutrientes con los macronutrientes durante 5 min. El aceite de pescado y la lecitina se agregaron a la mezcla anterior, mezclando por 8 minutos. En seguida se agregaron aproximadamente 350 mL de agua destilada caliente (cantidad de agua variable de acuerdo a los alimentos experimentales) mezclando por 5 min. Para la peletización se utilizó un molino para carne marca TOR-REY equipado con un dado con orificios de 1.6mm de diámetro. Después de peletizar cada dieta se seco en un horno de



convección a 100°C por 8 minutos o más, hasta obtener una humedad igual o menor a 10%, posteriormente se almacenaron en bolsas de plástico a 4°C.

En los experimentos donde no se incluyó *U. clathrata* en el alimento, se utilizó alimento comercial marca Costamar.

### 5.3.2 Determinación de estabilidad en el agua de alimentos experimentales

Se determinó la estabilidad en el agua de los alimentos experimentales en términos de porcentaje de pérdida de materia seca (PMS) y de proteína (PP); se realizaron pruebas de lixiviación de los alimentos, con 3 replicados, utilizando el método de Ricque-Marie *et al.*, (2006) con un mínimo de tres replicas por tratamiento, pesando 3 g de alimento por replica, colocandose en un tamiz constituido de un trozo de tubo PVC 1 ½” con malla de acero inox # 40 (apertura de malla 425µm). El tamiz se fija en la boca de un frasco de 250 mL con 200 mL de agua marina (salinidad entre 30 y 35 g L<sup>-1</sup>), de tal manera que los pellets sean inmersos en el agua. El frasco se coloca en un baño-maría regulado entre 27 y 28°C, con agitación a 30 rpm. Al cabo de una hora de agitación, los tamices se ponen a escurrir en posición inclinada en la boca del frasco, antes de secarlos a 130 °C por 6 h. Los cálculos se realizaron con las siguientes formulas (Cruz-Suárez *et al.*, 2001):

$\% \text{ PMS} = [(\text{Peso de alimento en base seca antes de lixiviar} - \text{Peso del alimento en base seca después de lixiviar}) / \text{Peso del alimento en base seca antes de lixiviar}] * 100$

$\% \text{ PP} = [(\% \text{ de proteína en el alimento} * 100) - (\% \text{ de proteína en el alimento lixiviado}) * (100 - \% \text{ pérdida de materia seca en el alimento})] / \% \text{ proteína en el alimento.}$

El porcentaje de absorción de agua (WA) de los alimentos experimentales fue determinado de la siguiente manera: se pesaron 5 g de alimento y se dejaron sumergidos por 1 hora en 50 ml de agua destilada. La muestra mojada se filtró en una malla 200 y se pesó. El porcentaje de absorción de agua se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$\% \text{ WA} = 100 * [(\text{peso de la muestra después de sumergirla en agua destilada} - \text{peso de la muestra antes de humedecer}) / \text{Peso de la muestra antes de humedecer}] * 100$

## 5.4 Análisis químicos cuantitativos y cualitativos de los alimentos y muestras de *U. clathrata* y camarón

En las Tablas 3 y 4 se especifica que análisis químico ó físico y en donde se llevó a cabo sobre las muestras de alimento, *U. clathrata* y camarón.

### 5.4.1 Análisis bromatológico, azúcares totales, monosacáridos y óxido de cromo (UANL)

Estos análisis se realizaron en el laboratorio de análisis químicos del Programa Maricultura de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). La composición bromatológica de los alimentos experimentales y muestras de *U. clathrata* se analizaron utilizando los siguientes métodos: Kjeldhal (Tecator, 1987) y Dumas (equipo LECO) para proteína, Soxhlet (Tecator, 1983) para lípidos, AOAC 942.05 (1990) para ceniza, AOAC 962.09 (1990) para fibra, y AOAC 920.36 (1990) para humedad. Para la determinación de fibra dietética total (FDT), fibra dietética soluble (FDS) y fibra dietética insoluble (FDI) (AOAC, Método oficial 985.29 and Método oficial 991.43, 2006) (SDF se calculó por diferencia, TDF-IDF). El extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó por diferencia. En el caso de la energía (Kcal g<sup>-1</sup>) se calculo multiplicando el contenido de nutrientes por los factores de 5.6 para proteína, 9.1 para lípidos y 4.5 para fibra cruda y ELN, después se sumaron las calorías y se dividieron por 100.

Para determinar el contenido de azúcares totales del extracto del alga, se utilizó el reactivo de antrona (Dubois, 1956), realizando una curva estándar con glucosa grado reactivo, tomando lectura en el espectrofotómetro a 625nm.

Para la determinación de concentración de óxido de cromo en las dietas y heces, se utilizó el método Bolin *et al.* (1952), digiriendo una muestra de 100 mg con 10 ml de mezcla oxidante (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – HClO<sub>4</sub>) con una digestión a 250°C durante 40 minutos.

El análisis de monosacáridos en el extracto de *U. clathrata* se realizó con una hidrólisis ácida (de Reviers y Leproux, 1993), se tomaron 50 mg del extracto y se disolvió en 20 mL de agua destilada, para después adicionar ácido sulfúrico hasta una concentración final de 1.0 M. Después la mezcla se calentó a 100°C por 3 h. Una vez digerida la muestra se analizó por HPLC con una columna Aminex, con fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, a temperatura del horno de 40°C con flujo de 0.6 mL/min, presión menor

a 1000 psi. A flujo y presión constante, la muestra es inyectada y analizada con detector UV a 195 nm e índice de refracción.

#### **5.4.2 Métodos análisis bromatológico, ácidos grasos, colesterol, carotenoides y pigmentación (VEPinsa)**

Estos análisis se llevaron a cabo en colaboración con el Ing. Gustavo Rodríguez Peña del laboratorio de control de calidad de la empresa Vegetales y Pigmentos Naturales S.A. (VEPinsa), ubicados en la ciudad de Los Mochis, Sinaloa. Para el análisis bromatológico de las diferentes muestras, se utilizaron métodos oficiales y recomendados por la AOCS (American Oil Chemists Society): para lípidos AOCS Bc 3-49 (1997) 1-1, proteína AOCS Ba 4a-38 (1997) 1-2, fibra cruda AOCS Ba 6-84 (1997) 1-4, ceniza AOCS Ca 11-55 (1997) 1-1 y humedad AOCS Ba 2-38 (1997) 1-1.

La determinación de ácidos grasos se llevó a cabo por cromatografía de gases (Varian Mod. 3800), donde la identificación de los ácidos grasos se realizó mediante una comparación de las señales obtenidas en la muestra, contra un patrón de estándares de ácidos grasos conocidos.

Para la determinación del contenido de colesterol, se llevó a cabo una saponificación del extracto con KOH etanólico al 12% y se realizó la extracción del colesterol con hexano, se cuantificó el contenido de colesterol por HPLC con columna uPorasil um, WATERS, 3.90 x 300 mm, usando metanol como fase móvil a un flujo de 2 ml/min. y 230 nm de longitud de onda (Bragagnolo y Rodríguez-Amaya, 1997).

La cuantificación de astaxantina y carotenoides totales fue mediante HPLC con arreglo de diodos, utilizando una columna YMC Carotenoid S-3 de 2.0 x 150 mm. Se determinó el grado de pigmentación de los camarones (frescos) con un colorímetro de reflectancia Minolta CR300, en este análisis los camarones fueron cocidos el mismo día de la cosecha en agua hirviendo durante 3min para posteriormente ser analizados.

#### **5.4.3 Métodos analíticos de ácidos grasos y esteroides (CIBNOR)**

Estos análisis se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Elena Palacios del laboratorio de Metabolismo de Lípidos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en la ciudad de La Paz, BCS. Para el análisis de ácidos grasos y

esteroles, se pesó 100 mg de músculo de camarón, se tomaron 3 muestras de cada réplica, para el alimento se pesó 80 mg por triplicado, y para la muestra de alga se tomaron 500 mg por triplicado, todas las muestras se pesaron en base húmeda. La extracción de lípidos y la trans-esterificación se realizó siguiendo la metodología reportada por Palacios *et al.* (2004). La separación de los ácidos grasos metil-esterificados y los esteroles se llevó a cabo por medio de cromatografía gas-líquido (CGL); los ácidos grasos metil esterificados y los esteroles se analizaron en un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N con detector de ionización de flama (FID); para los ácidos grasos se utilizó una columna capilar DB-23 (50% Cianopropil-50% metilpolisiloxano) de 30 m de longitud x 0.25 um de espesor de película x 0.25 mm de diámetro interno, utilizando helio como gas acarreador a un flujo de 0.8 mL/min, una rampa de temperatura de 110 – 220°C. En el caso de los esteroles se utilizó una columna capilar Rtx®-65 de Silica fundida (Crossbond« 65%-difenil-35% dimetil polisiloxano) de 15 m de longitud x 0.25 um de espesor de película x 0.25 mm de diámetro interno, marca Restek; utilizando hidrógeno como gas acarreador a presión constante de 50 psi y una rampa de temperatura de 50 – 260°C. La identificación de ácidos grasos y esteroles se realizó en base a estándares externos marca SIGMA, para después cuantificarlos en base a un estándar interno, C23:0 para ácidos grasos y 5- $\alpha$ -colestano para esteroles.

#### **5.4.4 Análisis de firmeza en el músculo de camarón (UNISON)**

Estos análisis se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Marina Ezquerria del Departamento de Investigación y Postgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora (UNISON), mediante la siguiente metodología: Se utilizó un penetrómetro digital (Chatillon 12-3b modelo DFI 50, Empire Scale Co., Santa Fe Springs, CA), con un punzón cilíndrico con punta “v” de 0.6 cm de diámetro. Esta medición se realizó en dos puntos del cuerpo del camarón (fresco), en el segundo y cuarto segmento del cuerpo, a temperatura ambiente. La textura se reporta como las libras (Lb-f) requeridas para romper el tejido (Rivas-Vega *et al.*, 2001)

#### **5.4.5 Métodos analíticos de lípidos, ácidos grasos, proteína, aminoácidos, carotenoides, ceniza, minerales y monosacáridos (AESCL, UM)**

En seguida se enlistan las metodologías empleadas para los diferentes análisis realizados por el laboratorio de “*Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories (AESCL)*” de la Universidad de Missouri (UM) a cargo del Dr. Thomas Mawhinney: nitrógeno total ó proteína cruda, por Kjeldahl, utilizando el factor de conversión de 6.25 para calcular el contenido de proteína (AOAC, Método oficial 984.13 (A-D), 2006); lípidos totales por hidrólisis acida (AOAC, Método oficial 954.02, 2006); ceniza (AOAC, Método oficial 942.05, 2006); humedad (AOAC, 2006); perfil de aminoácidos completo (AOAC, Método oficial 982.30 E (a,b,c), chp. 45.3.05, 2006); perfil de ácidos grasos, saturados, monosaturados y polinsaturados, siguiendo la metodología de la AOAC (2006); carotenoides totales (AOAC Método oficial 938.04); xantofilas, (AOAC Método oficial 970.64); metales y minerales por espectrofotometría de absorción atómica y/o por espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) siguiendo la metodología AOAC (2006).

La composición de carbohidratos fue analizada por cromatografía gas-líquido (GLC) y por cromatografía gas-líquido acoplado a masas (GLC-MS), basándose en el método de Oxley *et al.* (2004), donde las muestras fueron hidrolizadas con 500  $\mu$ L de ácido trifluoroacético (TFA) 2.5 M en tubos con tapa de teflón bajo atmósfera de argon durante 4 horas a 105°C. Después de enfriado, el TFA se removió en vacío y después se añadió 3-O-metil-glucitol como estándar interno. Se acetilaron los azúcares-amino mediante la adición de 1.0 mL de metanol, enfriado a 0°C, al cual se le añadió 25  $\mu$ L de acetato anhídrido con evaporación rápida. Después se removió el solvente con vacío, los carbohidratos fueron reducidos con sodio borodeuteruro 2 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  por 2.5 horas a temperatura ambiente. Las reacciones fueron acidificadas con 50  $\mu$ L ácido acético y después secadas. El ácido bórico fue removido con la adición de metanol el cual fue evaporado bajo inyección de nitrógeno. Los alcohol-azúcares resultantes fueron acetilados con la adición de 1.0 mL de piridina y 2.0 mL de acetato anhídrido e incubados por 1 hora a 100°C. Después se removió el solvente al vacío a 40°C, los azúcares alditol peracetilados se disolvieron en diclorometano (DCM) y lavados con 3 x 1.5 mL de agua. Las alícuotas de DCM fueron analizadas por GLC y por GLC-MS

(Oxley, 2004). El total de azúcares urónicos (ácido glucurónico e idurónico) fueron analizados colorimétricamente con el método de Bitter y Muir (1962) modificado por Kosakai y Zensaku (1979).

#### **5.4.6 Método de análisis de aminoácidos por el laboratorio de Evonik-Degussa**

La metodología de análisis de aminoácidos del laboratorio de Evonik-Degussa (Hanau, Germany) fue mediante el uso de HPLC, preparando las muestras por un método de hidrólisis acida para la mayoría de los amino ácidos, o por el métodos de oxidación acida mediante hidrólisis acida con metabisulfito de sodio para metionina y cistina (AOAC 1997, método 994.12, alternativas III y I, respectivamente; Llames y Fontaine ,1994; Fontaine, 2003).

### **5.5 Parámetros zootécnicos evaluados en los camarones**

Los parámetros zootécnicos evaluados en cada unos de los experimentos (cuando aplica) fueron registrados a los 14 y 28 días de bioensayo.

**Peso individual (W):** los camarones fueron pesados individualmente en una balanza digital con precisión de un miligramo, después de haber sido ligeramente secados en una toalla húmeda.

**Biomasa del acuario (BA):** es la suma de los pesos individuales de los camarones presentes en un acuario. Esta variable refleja los efectos en conjunto del crecimiento y de la sobrevivencia.

**Ganancia en peso individual (GP):** es el incremento en peso con respecto al peso individual promedio inicial expresado en gramos. Esta variable se calcula para cada acuario a partir del peso promedio inicial y del peso promedio final. Ganancia en peso individual = peso individual promedio final - peso individual promedio inicial.

**Tasa de sobrevivencia (%S):** el número final de camarones en cada acuario en porcentaje del número inicial. Tasa de sobrevivencia = (Número final / Número inicial) X 100.

**Consumo (CI):** el consumo individual se estimó cada día, a partir de la cantidad de alimento suministrado en cada acuario, del porcentaje de restos de alimento estimado al día siguiente y del número de camarones presentes ese día en el acuario. Para cada acuario el consumo reportado fue la suma del consumo individual diario estimado a lo largo de los x

días de bioensayo. Consumo individual =  $\Sigma_1^x$  (consumo en el acuario al día i / número de camarones al día i).

**Consumo de alga (CA):** se estima cuantificando el peso inicial del alga colocada dentro del acuario – el peso final del alga / número de camarones / número de días.

**Tasa de crecimiento (TC):** es el porcentaje de crecimiento por camarón con respecto al peso promedio inicial.  $TC = (\text{ganancia en peso (g)} / \text{peso inicial promedio}) \times 100$

**Tasa de crecimiento específico (TCE):** se define como el aumento de peso o masa con respecto a una unidad de tiempo.  $TCE = 100 (\text{In peso promedio final} - \text{In peso promedio inicial}) / \text{número de días}$ .

**Tasa de conversión alimenticia (TCA):** es el alimento artificial (base húmeda) consumido por unidad de peso ganado.  $TCA = \text{consumo individual estimado en un acuario} / \text{incremento en peso individual promedio en este mismo acuario}$ .

**Tasa de conversión alimenticia relativa al consumo de alimento artificial (pTCA):** Igual que la TCA, pero en este caso solo se considera el consumo de alimento artificial.  $pTCA = \text{consumo individual de alimento artificial estimado en un acuario} / \text{incremento en peso individual promedio en este mismo acuario}$ .

**Tasa de conversión alimenticia relativa al consumo de alimento artificial (tTCA):** Se considera el consumo de alimento artificial y el consumo de alga.  $tTCA = \text{consumo individual de alimento artificial estimado en un acuario} + \text{consumo individual de alga en base seca} / \text{incremento en peso individual promedio en este mismo acuario}$ .

**Tasa de eficiencia proteica (PER):** es el incremento en peso con respecto a la proteína consumida a partir del alimento artificial. Esta variable se calculó para cada acuario a partir del peso promedio inicial y del peso promedio final, así como del consumo individual estimado y de la concentración de proteína del alimento consumido.  $PER = \text{Incremento en peso} / \text{proteína consumida}$ .

## **5.6 Estrategia experimental de las evaluaciones *in vivo***

### **5.6.1 Efecto de la inclusión de harina de *U. clathrata* en el alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 1)**

Para determinar el efecto de la inclusión parcial con harina de *U. clathrata* en el alimento referencia sobre parámetros zootécnicos en el camarón, se llevó a cabo un bioensayo con duración de 28 días (UANL), se evaluaron cuatro alimentos experimentales: fabricados en el laboratorio del Programa Maricultura con 0, 2, 4, y 6% de inclusión de harina de *U. clathrata* (LSS3). Se empleó la misma formulación base (Tabla 5) en todos los alimentos y se agregó la harina del alga (en reemplazo de harina de trigo) junto con los macro-ingredientes al momento del mezclado de los alimentos.

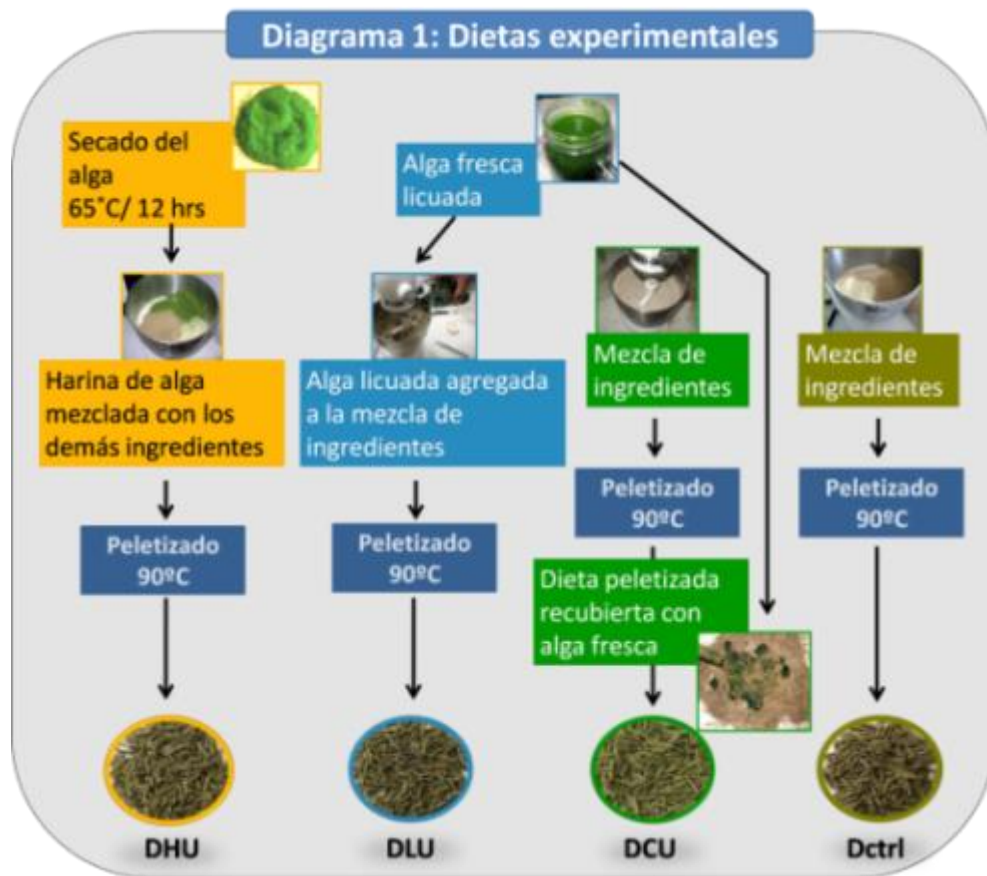
Se trabajó con 4 replicados (4 acuarios de 60L con doble fondo) por dieta; se distribuyeron 10 camarones juveniles *L. vannamei* (CMP) por acuario, alimentados a saciedad con 2 raciones diarias (09:00 y 16:00h). El peso inicial promedio de los camarones fue de 1.13 g para todos los acuarios. Los tratamientos se asignaron al azar en 4 bloques de 4 acuarios. Se evaluaron parámetros zootécnicos en los camarones, así como análisis bromatológico y de estabilidad de agua de los alimentos experimentales.

### **5.6.2 Efecto del procesado de *U. clathrata* y del alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 2)**

Para determinar el efecto del procesado del alga y del alimento sobre en el valor nutricional de *U. clathrata* se evaluaron parámetros zootécnicos del camarón en el siguiente experimento. A partir de la muestra de *U. clathrata* fresca (MSS4), se elaboraron cuatro alimentos experimentales (UANL), explorando tres diferentes condiciones de inclusión de *U. clathrata* en el alimento (2% de inclusión en base seca, reemplazando por harina de trigo), más un alimento control: una primera muestra de *U. clathrata* fue secada a 65°C/8 h para después ser molida y adicionada durante la mezcla de los macro-ingredientes de la dieta (DHU); una segunda muestra de *U. clathrata* fresca fue licuada y agregada a la mezcla de ingredientes previo a la peletización del alimento (DLU); una tercera muestra de *U. clathrata* fresca fue licuada y utilizada para recubrir los pellets secos de alimento terminado (DCU); una última dieta se preparó sin inclusión de alga para fungir como control (Dctrl) (Figura 12). Se realizó un bioensayo



de alimentación de 4 semanas, para determinar el efecto de las dietas sobre el rendimiento de camarones juveniles de *L. vannamei* (LCO). Se utilizaron 4 replicas (acuarios de 60 L con doble fondo) por tratamiento con una densidad de 10 camarones por acuario, con peso promedio inicial de  $0.52 \pm 0.01$  g, alimentados a saciedad con 2 raciones diarias de alimento (09:00 y 16:00h). Se evaluaron parámetros zootécnicos en los camarones, así como análisis bromatológico y de estabilidad de agua de los alimentos experimentales.



**Figura 12.** Estrategia general de elaboración de dietas con diferentes formas de incluir *U. clathrata* en el alimento

### 5.6.3 Efecto sobre la digestibilidad aparente del alimento con inclusión de *U. clathrata* (Experimento 3)

Para determinar si existe un efecto o cambio en la digestibilidad aparente de la materia seca y proteína de la dieta por la inclusión de harina de *U. clathrata* (LSS3), se evaluaron dos alimentos experimentales (UANL): un alimento con de 6% de inclusión de harina de *U. clathrata* (DEC) y otro alimento control sin *U. clathrata* (DCC), ambos con 1% de óxido de cromo como marcador inerte.

Se trabajó con 4 replicados por tratamiento con 16 camarones juveniles *L. vannamei* (CMP) por acuario (120 L sin doble fondo). Se seleccionaron camarones con un peso promedio inicial de 4.6g. Los tratamientos se asignaron al azar en 2 bloques de 4 acuarios. Se alimentó a los camarones a una ración fija de 6% de la biomasa dividida en tres raciones diarias durante 4 semanas. El protocolo de colecta de heces se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Protocolo de colecta de heces

| Hora  | Actividad   |
|-------|---|
| 08:00 | Sifonear tanques                                      |
| 08:10 | Pesar Alimento  |
| 08:30 | Alimentación de tanques con intervalos de 30 seg.     |
| 09:30 | Sifonear Restos de Alimento y Heces de los tanques    |
| 10:30 | Sifonear Heces de los tanques                         |
| 10:45 | Lavar y almacenar en congelación las heces colectadas |
| 12:30 | Alimentación de tanques con intervalos de 30 seg.     |
| 13:30 | Sifonear Restos de Alimento y Heces de los tanques    |
| 14:30 | Sifonear Heces de los tanques                         |
| 14:45 | Lavar y almacenar en congelación las heces colectadas |
| 16:30 | Alimentación de tanques con intervalos de 30 seg      |
| 17:30 | Sifonear Restos de Alimento y Heces de los tanques    |
| 18:30 | Sifonear Heces de los tanques                         |
| 18:45 | Lavar y almacenar en congelación las heces colectadas |

Se recolectaron heces hasta obtener un mínimo de 6g por tanque (peso húmedo) a tres diferentes tiempos: del día 1 al 4, del día 5 al 8 y del día 20 al 23 de bioensayo, con la finalidad de conocer el cambio de la digestibilidad de nutrientes de acuerdo a la dieta

y tiempo. Una vez colectados los 6g de heces por tanque, se liofilizaron para posteriormente ser analizados. Las heces colectadas se conservaron a -80°C en frascos de vidrio (por acuario) para evitar su degradación.

Cada uno de los análisis químicos de las heces se realizó por triplicado, tanto para óxido de cromo como para proteína. El óxido de cromo utilizado fue marca Impex Continental Lote: 52-03-05.

La digestibilidad aparente de la materia seca, proteína y energía se calculó con las ecuaciones siguientes (Maynard *et. al.*, 1981):

$$\% \text{ DAP} = [1 - (\% \text{ CrD} / \% \text{ PD}) \times (\% \text{ PH} / \% \text{ CrH})] \times 100$$

$$\% \text{ DAMS} = 100 - 100 (\% \text{ CrD} / \% \text{ CrH})$$

Donde:

CrD= % de cromo en dieta en base seca

CrH= % de cromo en heces en base seca

PD= % de proteína en dieta en base seca

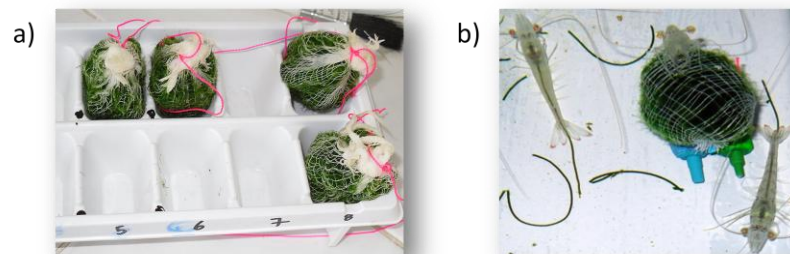
PH= % de proteína en heces en base seca

Una vez terminadas las 4 semanas de bioensayo, los camarones se sacrificaron en agua con hielo para posteriormente ser liofilizados para hacer análisis de perfil de ácidos grasos del carcas (análisis AESCL, UM).

#### **5.6.4 Efecto del consumo de *U. clathrata* fresca en condiciones controladas de laboratorio sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 4)**

En este experimento se exploró la utilización de *U. clathrata* fresca (MSS3) como alimento complementario o como sustituto parcial al alimento artificial en condiciones controladas de laboratorio sin producción natural. El alimento artificial utilizado fue de una marca comercial (Costamar) de 35% proteína. Se realizó un bioensayo de 28 días en el laboratorio (UANL), donde camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* (CMP), de peso promedio inicial de 1.2±0.1 g, fueron distribuidos en 4 bloques de 3 acuarios (60 L sin doble fondo) a una densidad de 8 camarones por acuario. Un primer grupo de camarones fue alimentado a saciedad con una dieta comercial (30% proteína cruda)

tomando esto como 100% ración (C100); el segundo y tercer grupo de camarones fueron alimentados con *U. clathrata* fresca a saciedad (siempre presente en los acuarios) más 75% (UC75) y 50% (UC50) de la ración de alimento artificial utilizado en el tratamiento C100. La cantidad de alimento comercial correspondiente a cada tratamiento, se dividió en 2 raciones diarias (09:00 y 16:00h). En el caso de la *U. clathrata*, se prepararon pacas de alga utilizando tela de gasa para poder cuantificar el consumo cada dos días (Figura 13). Para la cuantificación del consumo de alga, se tomó el peso inicial de la paca de *U. clathrata*, la cual se centrifugó a 1500 rpm por 5min en vasos de centrifuga equipados con un fondo de espuma de poliuretano para eliminar el exceso de agua, después de haber permanecido 2 días en los acuarios con los camarones, se repitió el procedimiento para sacar el peso final y por diferencia conocer el consumo de *U. clathrata*. Además se aplicó una corrección con una paca puesta en un acuario sin camarones durante el mismo periodo de exposición al agua marina. Se evaluaron parámetros zootécnicos en los camarones.



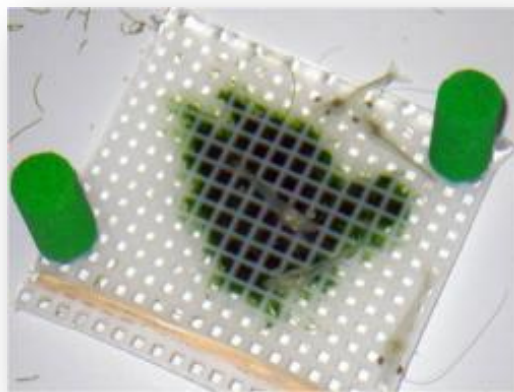
**Figura 13.** a) “Pacas” de *U. clathrata* envueltas con tela de gasa; b) Camarones consumiendo *U. clathrata*

### **5.6.5 Efecto del consumo de *U. clathrata* fresca sobre los ácidos grasos y esteroides en el músculo de camarón en condiciones controladas de laboratorio (Experimento 5)**

Para determinar el efecto del consumo de *U. clathrata* sobre los lípidos del camarón en un sistema de agua clara (sin producción natural), se realizó un bioensayo de 28 días de alimentación con camarones (LCO) de un peso promedio inicial de 1.25 g bajo los siguientes tratamientos: solo alimento artificial (DAA), alimento artificial más *U. clathrata* fresca (DAU) y solo *U. clathrata* fresca (DUU). Se evaluaron las siguientes

variables zootécnicas al término del bioensayo: sobrevivencia (%), ganancia en peso (% respecto al peso inicial), tasa de crecimiento específico (% día<sup>-1</sup>). La biomasa de *U. clathrata* fue obtenida a partir del sistema UPM de cultivo (UPM2). En el caso de los tratamientos DAA y DAU el alga estaba todo el tiempo a disposición de los camarones en los acuarios y solo se evaluó el consumo y tasa de conversión alimenticia relativa del alimento artificial sin evaluar el consumo de *U. clathrata*. Se otorgó la misma cantidad de alimento artificial a los tratamientos DAA y DAU (a saciedad fijado por el tratamiento DAA) con la finalidad de que el aporte de ácidos grasos y esteroides provenientes del alimento artificial fuera el mismo para los camarones de estos tratamientos. El alimento artificial utilizado fue de una marca comercial (Costamar) con contenido de 35% proteína. La *U. clathrata* se dispuso en un dispositivo tipo “sándwich” donde los camarones podían comer fácilmente el alga (Figura 15) y reemplazando y cuantificando el alga consumida (peso seco inicial – peso seco final) diariamente.

Se realizaron 4 replicados por tratamiento distribuidos en 3 bloques al azar. En cada replicado (acuarios de 120 L sin doble fondo) se colocaron 15 camarones. Una vez finalizado el bioensayo, los camarones se sacrificaron en agua marina con hielo y posteriormente almacenados a -80°C. Los camarones, la *U. clathrata* y el alimento artificial fueron analizados en su perfil de ácidos grasos y esteroides (análisis CIBNOR).



**Figura 14.** Camarones alimentados con *U. clathrata* fresca con dispositivos tipo “sándwich”

### **5.6.6 Cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto**

Para determinar el potencial del cocultivo *U. clathrata*/camarón, se llevaron a cabo dos experimentos en diferentes épocas del año, en el laboratorio de propagación de algas de la empresa “Aonori Aquafarms” en Los Mochis, Sinaloa. Se emplearon 12 tanques de lona de 2000 L. En el caso de los tanques experimentales correspondientes a los tratamientos con *U. clathrata*, se sembró a razón de 1.5 kg de biomasa centrifugada (para eliminar el exceso de agua) en un marco con cuerdas para mantener el alga a flote en el mismo día en que se sembraron los camarones correspondientes. La composición bromatológica (análisis VEPINSA) de la *U. clathrata* se analizó cada 15 días a partir de una muestra compuesta de todos los tanques experimentales. También se realizó el análisis bromatológico (UANL y VEPINSA) de los alimentos artificiales utilizados (comerciales, 35% proteína). El alimento artificial se suministro 3 veces al día en charolas de alimentación contabilizando los restos no consumidos.

#### **5.6.6.a Cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 28°C (primavera) (Experimento 6)**

Se realizó un bioensayo de 42 días de duración durante los meses de Marzo-Abril (2007) con una temperatura promedio en el agua de 27.5°C. Se evaluaron cuatro tratamientos con tres replicados usando 50 camarones (CGM) con 3.5 g peso promedio inicial en cada tanque, a una densidad de 22.2 camarones/m<sup>2</sup>. Los tratamientos fueron los siguientes: cocultivo sin alimento artificial (U100), cocultivo mas 55% de la ración de alimento artificial (UF55), cocultivo mas 90% de la ración de alimento artificial (UF90) y monocultivo de camarón con 100% de la ración de alimento siguiendo una tabla de racionamiento en granja (F100). Cada quince días, se analizó la producción primaria dentro de los tanques experimentales (análisis CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa)

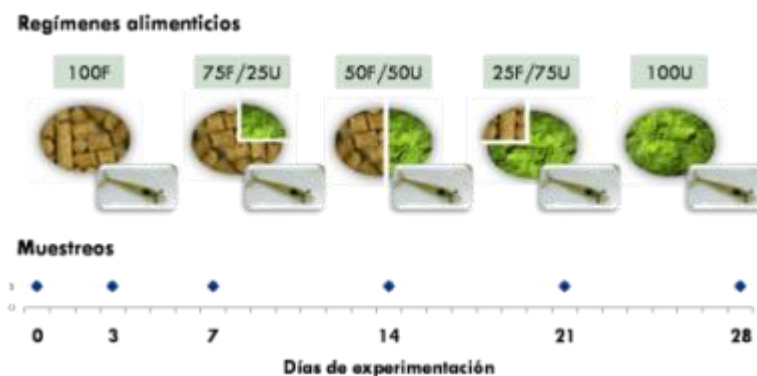
#### **5.6.6.b Cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 30°C (verano) (Experimento 7)**

Se realizó un bioensayo de 28 días de duración durante los meses de Agosto-Septiembre (2007) con una temperatura promedio en el agua de 31°C. El peso promedio inicial de los camarones (CMP) fue de 0.65 g, colocando 60 organismos por tanque. Los

tratamientos fueron los siguientes: cocultivo sin alimento artificial (E100), cocultivo mas 25% de la ración de alimento artificial (EA25), cocultivo mas 50% de la ración de alimento artificial (EA50) y monocultivo de camarón con 100% de la ración de alimento siguiendo una tabla de racionamiento en granja (A100). En este experimento no se evaluó la producción natural en los tanques.

### 5.6.7 Determinación de contribuciones nutricionales de carbono y nitrógeno en el camarón a partir de *U. clathrata* y alimento artificial, mediante el análisis de isotopos estables (Experimento 8)

Para conocer de forma más exacta la contribución nutricional de la *U. clathrata* en el camarón, se realizó un experimento utilizando como herramienta el análisis de isotopos estables de carbono y nitrógeno. En un bioensayo de 28 días, camarones (LCO) de un peso promedio inicial de 188 mg, fueron alimentados bajo cinco diferentes regímenes alimenticios (cada régimen con 2 acuarios de 120 L sin doble fondo con 20 camarones cada uno), diseñados para otorgar proporciones fijas, en base seca, de alimento artificial y *U. clathrata* fresca (UPM1). Los regímenes alimenticios fueron los siguientes: 100% alimento artificial (100F, control isotópico positivo), 100% *U. clathrata* fresca (100U, control isotópico negativo), además 3 regímenes de co-alimentación reemplazando el alimento artificial con biomasa de *U. clathrata* fresca (reemplazo calculado en base seca) con los niveles 25, 50 y 75% (75U/25F, 50U/50F y 25U/75F, respectivamente) (Figura 14). La cantidad de alimento artificial se ofreció en dos raciones diarias (08:00 y 16:00 h). La *U. clathrata* se dispuso en un dispositivo tipo “sándwich” de igual forma que en el experimento 5.



**Figura 15.** Regímenes alimenticios en los camarones y días de muestreo para análisis isotópico de C y N.

Las cantidades según las proporciones de alimento y *U. clathrata*, fueron ajustadas de acuerdo al consumo y al muestreo de organismos. Los camarones de cada acuario fueron muestreados al azar en los días 0, 3, 7, 14, 21 y 28 de experimentación, dejando estos en ayuno durante la noche para minimizar el contenido de alimento en el intestino de los organismos. Los camarones ayunados fueron sacrificados en agua semi-congelada, para después ser pesados y guardados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### **5.6.7.a Análisis de isótopos estables y estimación de contribuciones nutricionales**

Las muestras de *U. clathrata* fresca, alimento artificial y camarones completos fueron secados ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta llegar a peso constante) y molidos finamente (en un mortero). Comúnmente los lípidos están carentes de  $^{13}\text{C}$  en relación a los carbohidratos y proteína (De Niro y Epstein, 1978; Stenroth *et al.*, 2006); en base a esto, con la finalidad de reducir la variabilidad de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  en ambas fuentes alimenticias y camarones, se les extrajeron los lípidos (Beaudoin *et al.*, 2001), se suspendió el material molido en una solución 50:50 de cloroformo:metanol durante 2 h, repitiendo este paso 2 veces, secando ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta llegar a peso constante), se homogenizó y se guardó en el desecador. Adicionalmente se dejaron alícuotas de estas muestras además de tejido de músculo sin tratar, para la interpretar los valores de  $\delta^{15}\text{N}$ . Se pesaron las muestras entre 900 y 1100  $\mu\text{g}$ , dentro de cápsulas de estaño (D1008 Elemental Microanalysis Ltd., UK). El análisis elemental e isotópico se llevó a cabo según lo descrito por Gamboa-Delgado y Le Vay (2009) utilizando un analizador elemental *PDZ-Europa Scientific Roboprep* acoplado a un espectrómetro de masas para proporciones isotópicas *PDZ-Europa Hydra 20/20* del departamento de ciencias botánicas en la Universidad de California, Davis, CA, EUA. Los resultados isotópicos se expresan como notación delta ( $\delta$ ), que es la diferencia en el valor isotópico de un estándar y el de una muestra expresados en partes por mil (ppt). Los estándares utilizados fueron “Pee Dee belemnite” para carbono y nitrógeno atmosférico. Las proporciones relativas de contribución del carbono y nitrógeno dietario al crecimiento del camarón proveniente de tanto la *U. clathrata* fresca como el alimento artificial, fueron estimadas usando un modelo de mezclado de dos fuentes para un isótopo (Phillips y Gregg, 2001). La estimación de los factores de discriminación isotópica ( $\Delta$  consumidor-dieta) incrementa



la certeza del modelo de mezclado. Los valores control fueron tomados de las diferencias isotópicas entre los camarones alimentado solo con alimento artificial (control positivo) y los alimentados con *U. clathrata* (control negativo) después de alcanzar el equilibrio isotópico. La estimación de los valores de incorporación relativa de carbono y nitrógeno de ambas fuentes, están expresados como la media y sus intervalos de confianza de 95% (truncados a 0 y 100%).

Para obtener un estimado de la contribución relativa de materia seca (DM) al crecimiento de los camarones a partir de la *U. clathrata* fresca y el alimento artificial, la media de los valores duales de los isótopos estables para cada fuente dietaria y los de los camarones (de los tres regímenes de co-alimentación) fueron corregidos por los factores de discriminación para después ser graficados. Las distancias Euclidianas entre los valores duales de los isótopos de la *U. clathrata*, el alimento artificial y los camarones (S) fueron calculados con la formula  $Z = \sqrt{X^2 + Y^2}$  (donde X es  $\delta^{13}\text{C}$  y Y es  $\delta^{15}\text{N}$ ), y luego comparados. Las distancias entre la *U. clathrata* (A') y el alimento artificial (B') con el camarón son inversamente relacionados con la contribución relativa de la materia orgánica en peso seco de la *U. clathrata* y el alimento artificial con la dieta del camarón (entre más cercana la distancia, mayor la contribución). Debido a esta relación inversa, la contribución relativa de materia seca de cada fuente dietaria se calculó de la siguiente forma:

$$\% X \text{ en la dieta} = (SX^{r1} / SA^{r1} + SB^{r1}) * 100$$

Donde: X' es A' o B'

#### **5.6.7.b Estimación de tasa de recambio de carbón y nitrógeno**

Los cambios isotópicos en los camarones fueron monitoreados durante el periodo experimental, siguiendo el cambio dietario de una dieta basal a los diferentes regímenes alimenticios. Se generaron valores isotópicos esperados a partir de un modelo exponencial describiendo el cambio isotópico (Hesslein *et al.*, 1993), los cuales fueron ajustados a los valores observados con la finalidad de obtener un estimado de las tasas metabólicas de recambio de carbono y nitrógeno en el camarón completo. Los coeficientes de este modelo indican la magnitud de la tasa de recambio isotópico en relación al crecimiento (*k*) y el recambio metabólico (*m*), ambos coeficientes también

nos indican el tiempo necesario para que la mitad del tejido corporal se remplace después de consumir una nueva dieta (tiempo medio de residencia,  $t_{50}$ ):

$$t_{50} = \ln 2 / m + k$$

Donde:

$k = \log(\text{Peso final/peso inicial})/\text{tiempo (d)}$

$m =$  Estimado con una regresión no lineal usando el modelo de Hesslein *et al.* (1993)

### **5.6.8 Efecto antiviral de harina entera y extracto de *U. clathrata* en el alimento contra WSSV (Experimento 9)**

Con la finalidad de conocer si el consumo de harina o de un extracto acuoso de *U. clathrata* (LSS3) incluido en el alimento, tienen un efecto antiviral contra WSSV, se realizó en colaboración con el Dr. Kenneth Hasson, un bioensayo de desafío viral en el “Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory” de la Universidad de Texas A&M (TVMDL, TAMU). Se evaluaron las siguientes cuatro dietas: alimento artificial control (Dctrl), alimento con 6% de inclusión de harina de *U. clathrata* (DU-6%), alimento con 0.7% extracto acuoso de *U. clathrata* (DEx-0.7%, Ulvan no purificado ver Anexo A) y alimento con 0.4% fucoidán como control antiviral (DFu-0.4%). El porcentaje de inclusión de fucoidán (DFu-0.4%) se definió en base a las recomendaciones de Takahashi *et al.* (1998) para la ingesta diaria por peso de camarón ( $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), y de acuerdo con un análisis de azúcares totales en el extracto de *U. clathrata*, se llegó al porcentaje de inclusión del extracto (DEx-0.7%), es decir que teóricamente la dieta con extracto de *U. clathrata* contenía la misma cantidad de polisacáridos sulfatados que la dieta con fucoidán. Además el alimento DU-6% y DEx-0.7% son teóricamente bioequivalentes respecto a la sustancia activa (ulvan) de acuerdo con el análisis de pureza y recuperación del extracto, es decir que la dieta con harina de *U. clathrata* y la dieta con extracto de *U. clathrata* contenían la misma cantidad de sustancia activa.

Se utilizaron dieciséis acuarios de vidrio de 20 L de capacidad, de los cuales doce se colocaron en el cuarto para infección (contaminado) y cuatro en el cuarto sin infectar (limpio). En cada acuario se colocaron 8 camarones SPF de 5.5 g peso promedio. Los acuarios se sifonearon cada mañana para eliminar restos orgánicos, además se sustituyó

el 50% del agua cada día para mantener la calidad del agua. Se monitorearon las mudas, camarones muertos y moribundos durante todo el experimento.

Los camarones fueron alimentados con 6% de la biomasa de cada acuario dividido en tres raciones diarias durante 18 días. Cada mañana durante el cambio de agua y las alimentaciones, los acuarios fueron examinados para colectar y contabilizar mudas, muertos y moribundos durante todo el estudio. Los tratamientos asignados a cada acuario de presentan en la Tabla 7.

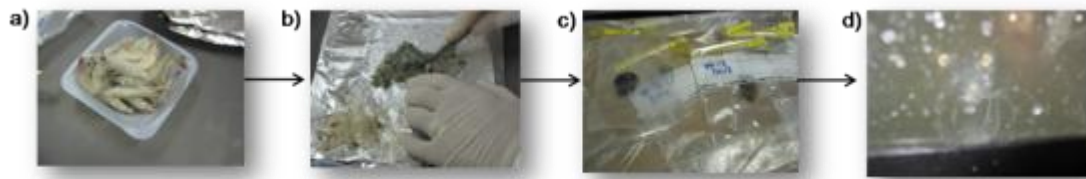
**Tabla 7.** Diseño experimental del desafío viral con WSSV

| Aquario          | Tratamiento                | No. camarones | Tratamiento     |
|------------------|----------------------------|---------------|-----------------|
| Cuarto limpio    |                            |               |                 |
| 1                | Dctrl, Control negativo    | 8             | Tejido SPF      |
| 2                | DU-6%, Control negativo    | 8             | Tejido SPF      |
| 3                | DEx-0.4%, Control negativo | 8             | Tejido SPF      |
| 4                | DFu-0.7%, Control negativo | 8             | Tejido SPF      |
| Cuarto infectado |                            |               |                 |
| 5                | Dctrl                      | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 6                | Dctrl                      | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 7                | Dctrl                      | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 8                | DU-6%                      | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 9                | DU-6%                      | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 10               | DU-6%                      | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 11               | DEx-0.4%                   | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 12               | DEx-0.4%                   | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 13               | DEx-0.4%                   | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 14               | DFu-0.7%                   | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 15               | DFu-0.7%                   | 8             | Tejido (+) WSSV |
| 16               | DFu-0.7%                   | 8             | Tejido (+) WSSV |

### 5.6.8.a Inóculo e infección con WSSV

El tejido infectado fue preparado un mes antes del bioensayo mediante la infección de camarones sanos SPF, inyectándolos vía intramuscular en el tercer segmento abdominal con un homogenizado de tejido filtrado de WSSV (obtenido de langostinos infectados de Luisiana, EUA). El inóculo se preparó a partir de camarones colectados muertos o moribundos después de la inyección con el virus. A los camarones de los acuarios del control negativo se les expuso a tejido SPF. En el día 11 se llevó a cabo una sola exposición *per os* (5% de la biomasa) con tejido infectado con WSSV (Figura 16). Después de la exposición y consumo del tejido infectado se continuó con el mismo

régimen alimenticio previo la exposición al virus, ajustando la ración de acuerdo al número de organismos.



**Figura 16.** a) Camarones previamente infectados con WSSV; b) Preparación del inóculo a partir de tejido infectado ó SPF; c) Ración de inóculo por acuario; d) Exposición *Per os* a WSSV.

#### 5.6.8.b Diagnostico histológico y por PCR

Se realizaron análisis histológicos de rutina, con tinción de hematoxilina y eosina utilizando métodos estándar sobre cinco camarones (recién llegado el lote al laboratorio) preservados en Davidson's, además de cinco camarones por tratamiento colectados en estado moribundo después de la exposición a WSSV y tres camarones sobrevivientes después de la exposición a WSSV al día 18 del estudio. Solo se utilizaron los cefalotórax para el análisis histológico y el abdomen se guardó en congelación (-80°C). Se realizó un análisis por PCR anidado para la detección de WSSV siguiendo el manual de "OIE Aquatic Disease Manual" sobre pleópodos de los distintos camarones (recién llegados, control negativo y de camarones moribundos expuestos a WSSV)

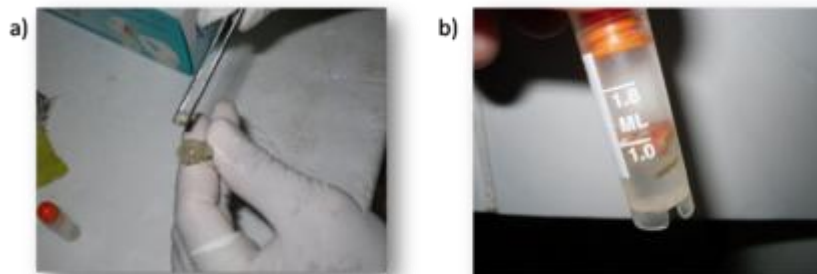
#### 5.6.9 Expresión diferencial de 292 genes en hepatopáncreas de camarón bajo consumo de *U. clathrata* y alimento artificial (Experimento 10)

Se realizó un bioensayo en colaboración con el "Laboratorio de Microarreglos CIAD-CIBNOR-CICESE" del Dr Francisco Vargas del CIAD de Hermosillo para determinar la expresión diferencial de genes entre camarones alimentados con alimento artificial y camarones alimentados con alimento artificial más *U. clathrata* fresca (MSS3). Camarones juveniles de *L. vannamei* (CMP) con peso promedio de 2.7 g, se alimentaron durante 4 semanas en acuarios (60 L sin doble fondo) con una densidad de 8 camarones por acuario (UANL). Dos tratamientos con 3 replicados fueron empleados: T1) 100% de ración de alimento artificial (a saciedad), T2) 100% de la ración de

alimento artificial (igual que T1) más *U. clathrata* fresca. El alimento artificial (comercial, 35% proteína) se ofreció en 2 raciones diarias (10:00 y 17:00 hrs) mientras que en el caso de la *U. clathrata* fresca, siempre estuvo disponible dentro de los acuarios en forma de “pacas” como en el experimento 4.

#### 5.6.9.a Toma de muestras para extracción de mRNA

De cada tratamiento se tomaron de 12 a 15 camarones en estadio C de muda, a los cuales se les extrajo el hepatopáncreas (una hora después de la alimentación matutina). El hepatopáncreas entero de cada camarón se colocó de forma individual en criotubos con solución RNA *later* (Figura 17) y posteriormente se refrigeró a 4°C. La solución RNA *later* se utilizó a razón de 5 volúmenes con respecto a la muestra. Después de una noche en refrigeración, se congelaron las muestras a -80°C y se almacenaron a esta temperatura durante una semana para después ser enviadas vía aérea en hielo seco al "Laboratorio de Microarreglos CIAD-CIBNOR-CICESE" del CIAD de Hermosillo para su posterior análisis.

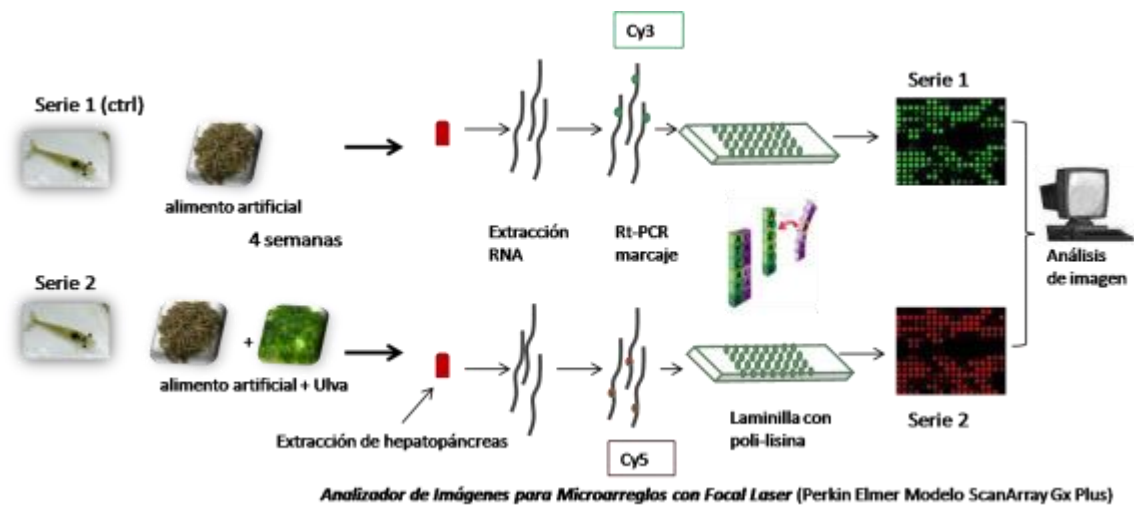


**Figura 17.** a) Extracción de hepatopáncreas de camarón; b) Hepatopáncreas en RNA *later* para preservar RNA de las muestras

#### 5.6.9.b Protocolo de microarreglos (CIAD, Hermosillo, Son.)

La expresión génica se evaluó utilizando microarreglos, con un número de 292 genes de camarón (Figura 18). El microarreglo se preparó por el laboratorio de Microarreglos del Dr. Francisco Vargas, el cual fue impreso en un equipo QArray2 (Genetix). Las sondas se prepararon a partir del mRNA purificado de hepatopáncreas de los camarones que consumieron los diferentes alimentos (alimento artificial y/o *U. clathrata* fresca) por medio de la técnica de Trizol (Invitrogen) siguiendo el

procedimiento recomendado. El marcaje con fluoróforos se realizó durante la síntesis del cDNA con transcriptasa reversa Superscript III RT (Invitrogen), utilizando el Kit AlexaFluor (Invitrogen). Se utilizó Cy3 para los camarones que solo consumieron alimento artificial (control) y Cy5 para los alimentados con alimento artificial y *U. clathrata* fresca. Los microarreglos se hibridaron en un SlideBooster SB401/800 (Advanlytix) y se leyeron en un scanner ScanArray Gx PLUS (PerkinElmer). El análisis se realizó con apoyo del software TM4 suite (Microarray Data Analysis System, TIGR Spotfinder, MultiExperiment Viewer, MicroArray DAta Manager).



**Figura 18.** Estrategia general de análisis de expresión génica de hepatopáncreas de camarón con microarreglos

### 5.7 Análisis estadísticos

En cada experimento, los parámetros zootécnicos evaluados para cada replicado (acuario) se sometieron a un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA); en los casos en que se presentaron diferencias significativas, se realizó una comparación múltiple de medias por el método de Duncan. En el caso del experimento 4, el consumo y tasa de conversión alimenticia relativa al alimento artificial (sin contar el consumo de *U.*

*clathrata*) para el tratamiento control (DAA) y el tratamiento adicionado con *U. clathrata* (DAU) fue sometido a un análisis de *t* de student.

En el caso de los análisis químicos de los diferentes tratamientos y tipos de muestras (alimentos, algas, camarones), los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA); cuando se presentaron diferencias significativas, las medias se compararon con un análisis de comparación múltiple de medias por el método de Tukey.

Para el caso de los análisis isotópicos, los contenidos de carbón y los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de la *U. clathrata* y alimento artificial fueron comparados por una análisis de t-Student's. Los valores isotópicos de los tejidos a diferentes tiempos, los pesos promedios y sobrevivencia de los camarones de los diferentes tratamientos fueron analizados por una prueba de varianza de una sola vía (ANOVA), y en el caso de ser necesario se aplicó un análisis de comparación múltiple de medias por el método de Tukey. Se aplicó un análisis de Chi-cuadrada de bondad de ajuste para determinar diferencias estadísticas de los valores esperados y observados de las proporciones de carbón y nitrógeno dietario incorporado en el cuerpo del camarón y en el tejido muscular.

Para el análisis de la sobrevivencia en el experimento de desafío viral, se aplicó un método no paramétrico basado en el tiempo de experimentación mediante el modelo de Kaplan-Meyer.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SPSS ver. 15.0 a un nivel de significancia de  $p < 0.05$  (SPSS. Inc., Chicago, IL, USA).

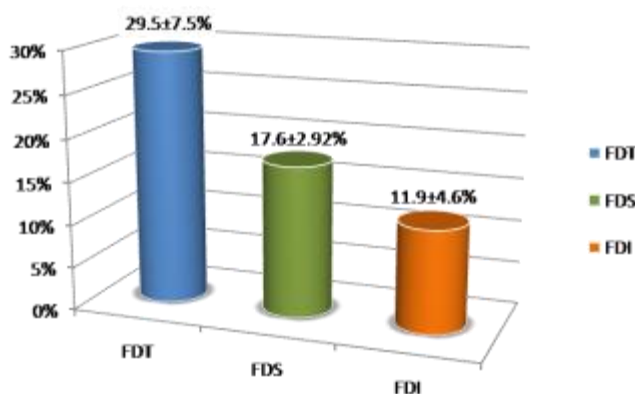
En el caso de los microarreglos, se tomo el *Log2* de la diferencia entre el tratamiento con *U. clathrata* y el control, los valores negativos indican supresión mientras que los positivos indican estimulación del gen, tomando los valores entre -1.2 y 1.2 como sin cambio de expresión (+/-20%).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Composición química de *Ulva clathrata*

En la Tabla 3 se enlistan todas las muestras y lotes de *U. clathrata* analizadas durante el proyecto de tesis, donde además se detallan los análisis realizados a cada una de las muestras y en donde fueron realizados dichos análisis. La composición proximal de *U. clathrata* de diferentes sistemas de cultivo se presenta en la Tabla 8. El promedio general de proteína y lípidos de las muestras fue de 20.6 y 0.98% respectivamente, sin presentarse diferencias significativas entre los diferentes sistemas de cultivo. En el caso de la fibra cruda, las muestras del sistema CCp presentaron un contenido significativamente mayor con 5.4%, mientras las de menor contenido fueron las del sistema UPM con 2.8% ( $P=0.004$ ). El contenido promedio de ceniza de todas las muestras fue de 37%, siendo significativamente mayor en la *U. clathrata* del sistema UPM (47.1%), sin embargo en el caso de las muestras de LSS, la *U. clathrata* tuvo un proceso de lavado con agua dulce, por lo que el contenido de ceniza se pudo ver reducido significativamente por efecto de este tratamiento ( $P<0.001$ ). Las muestras con mayor contenido de ELN fueron las muestras LSS con 45%, un 10% más que en el resto de las muestras de los otros sistemas ( $P<0.001$ ).

En el análisis de fibra dietética, se encontró un promedio de 29.5% de FDT en las muestras analizadas (Figura 19), donde la fracción soluble constituyó un 60% mientras que la fracción insoluble corresponde a un 40% del total de la fibra dietética.



**Figura 19.** Valores promedio de la cantidad de fibra dietética en muestras de *U. clathrata* ± desviación estándar (LSS n=1; MSS n=3; total n=4). Donde: FDT=fibra dietética total; FDS=fibra dietética soluble; FDI=fibra dietética insoluble

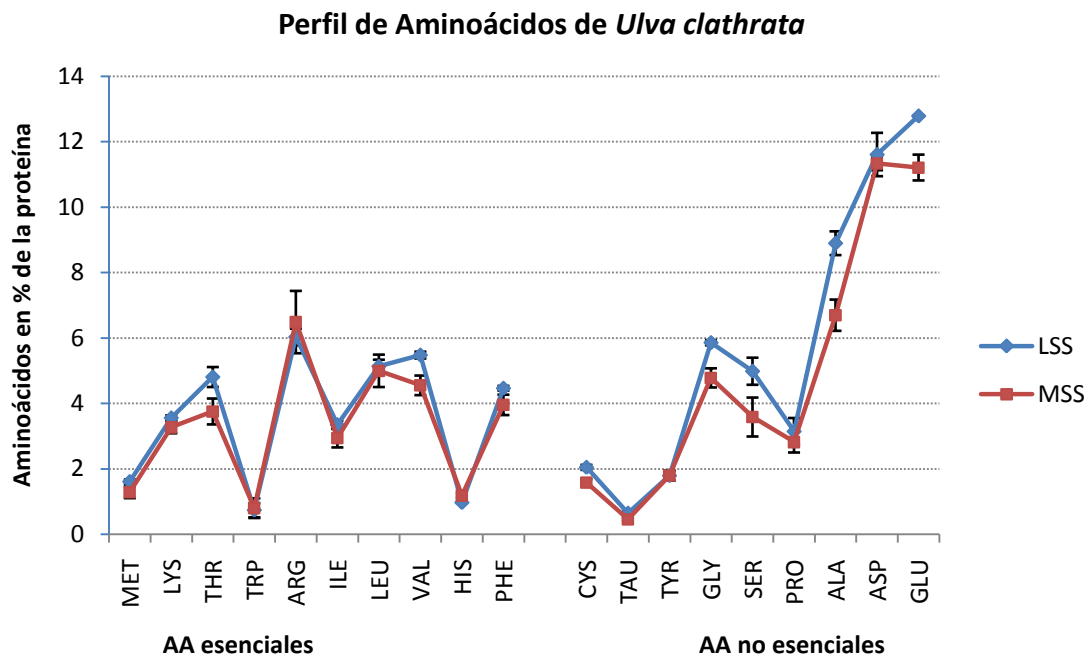


**Tabla 8.** Composición proximal en base seca (g 100g<sup>-1</sup>) de *Ulva clathrata* producida por diferentes sistemas de cultivo

|                 | Sistema de cultivo |      |      |        |      |      |        |      |      |       |      |      |        |      |      |                  |     |     |
|-----------------|--------------------|------|------|--------|------|------|--------|------|------|-------|------|------|--------|------|------|------------------|-----|-----|
|                 | LSS                |      |      | MSS    |      |      | CCp    |      |      | UPM   |      |      | ANOVA  |      |      | Promedio general |     |     |
|                 | Prom               | Min  | Max  | Prom   | Min  | Max  | Prom   | Min  | Max  | Prom  | Min  | Max  | Prom   | Min  | Max  | Prom             | Min | Max |
| <b>Proteína</b> | 19.6               | 14.9 | 27.3 | 22.3   | 20.3 | 25.9 | 20.2   | 15.7 | 25.8 | 21.2  | 17.8 | 24.6 | 0.329  | 20.6 | 14.9 | 27.3             |     |     |
| <b>Lípidos</b>  | 0.92               | 0.45 | 1.50 | 0.85   | 0.52 | 1.39 | 1.19   | 0.48 | 1.63 | 0.83  | 0.65 | 1.01 | 0.411  | 0.98 | 0.45 | 1.63             |     |     |
| <b>Fibra</b>    | 4.6bc              | 3.2  | 5.9  | 4.0b   | 3.2  | 5.6  | 5.4c   | 4.9  | 5.8  | 2.8a  | 2.5  | 3.1  | 0.004  | 4.5  | 2.5  | 5.9              |     |     |
| <b>Ceniza</b>   | 29.4a              | 18.6 | 35.9 | 43.9bc | 34.4 | 49.6 | 36.9ab | 30.3 | 47.2 | 47.1c | 44.8 | 48.9 | <0.001 | 37.3 | 18.6 | 48.9             |     |     |
| <b>ELN</b>      | 45.2c              | 41.0 | 48.5 | 31.9bc | 28.4 | 38.3 | 36.3b  | 30.6 | 42.3 | 30.2a | 28.6 | 31.1 | <0.001 | 37.2 | 28.4 | 48.5             |     |     |
| <b>Energía</b>  | 3.4c               | 3.1  | 4.0  | 2.9ab  | 2.7  | 3.2  | 3.1bc  | 2.6  | 3.4  | 2.6   | 2.5a | 2.7  | 0.009  | 3.1  | 2.5  | 4.0              |     |     |

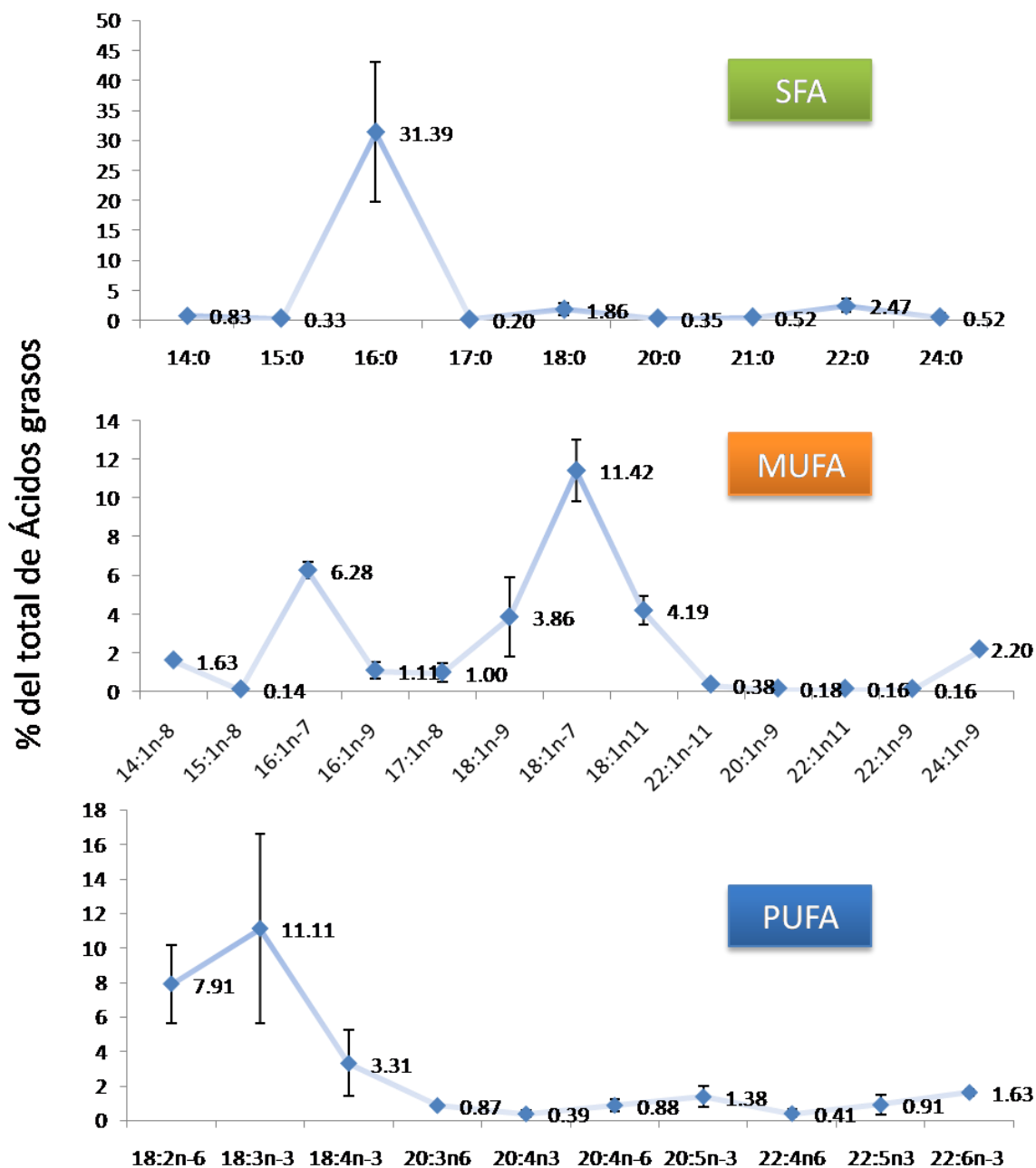
LSS sistema de cultivo a gran escala (n=6); MSS sistema de cultivo a mediana escala (n=4); CCp sistema de cultivo piloto (n=6); UPM sistema de propagación en laboratorio de la UANL (n=4). Prom = promedio; Min = mínimo; Max = máximo. Energía expresada como Kcal g. Los valores de lípidos en esta tabla, solo contemplan los valores obtenidos por método de análisis de soxhlet. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Duncan,  $\alpha=0.05$ )

En el perfil promedio de AA de *U. clathrata*, encontramos hasta un 35% de AAE y un 45% de AANE (resto no identificado) respecto a la proteína. De los AAE encontramos un alto contenido de arginina (6.3%), leucina (5.1%) y valina (5.0%), de los no esenciales los más abundantes son el ácido glutámico y el ácido aspártico con 11.5 y 12% respectivamente (Figura 20).

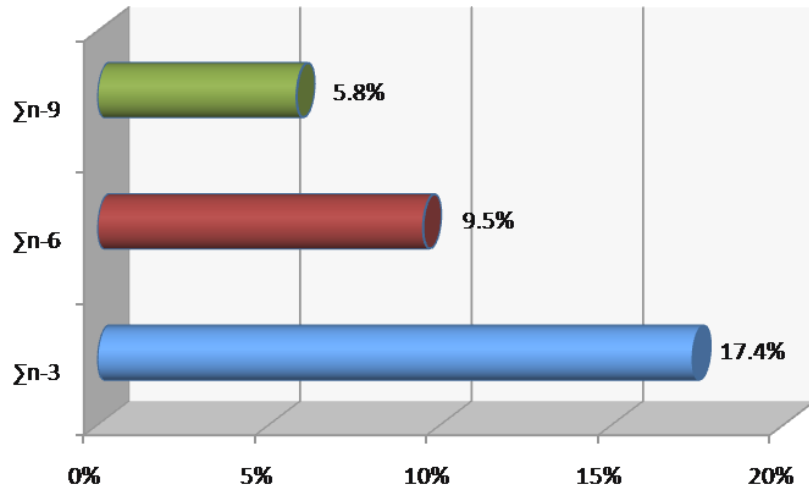


**Figura 20.** Perfil de aminoácidos de muestras de *U. clathrata* cultivadas en sistema LSS (n=2) y MSS (n=4).

El perfil promedio de FA de muestras de *U. clathrata* se presenta en la Figura 21. De los FA más abundantes encontramos ácido palmítico (16:0), palmitoleico (16:1n7), vaccénico (18:1n7), linoleico (LA, 18:2n6) y linolénico (LNA, 18:3n3). La suma promedio de SFAs (ácidos grasos saturados) es de 32.5%, de MUFAs (ácidos grasos monosaturados) 14.5% y de PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados) es de 29.5%. De los FA de las familias de los omega 3 se encontró un promedio de 17.4% mientras que de las omega 6 un 9.5% del total de FA (Figura 22).

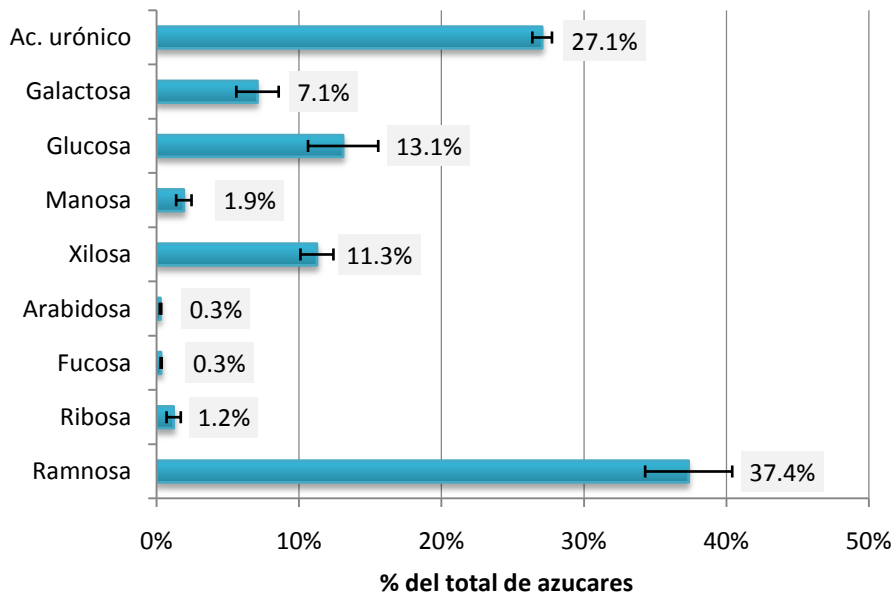


**Figura 21.** Perfil promedio de ácidos grasos de *U. clathrata*. Los valores son el promedio del análisis de muestras de todos los sistemas de cultivo  $\pm$  desviación estándar (LSS n=1; MSS n=3; CCp n=1; UPM n=1, total n=6). Donde: SFA = FA saturados; MUFA = FA monosaturados; PUFA = FA poliinsaturados.



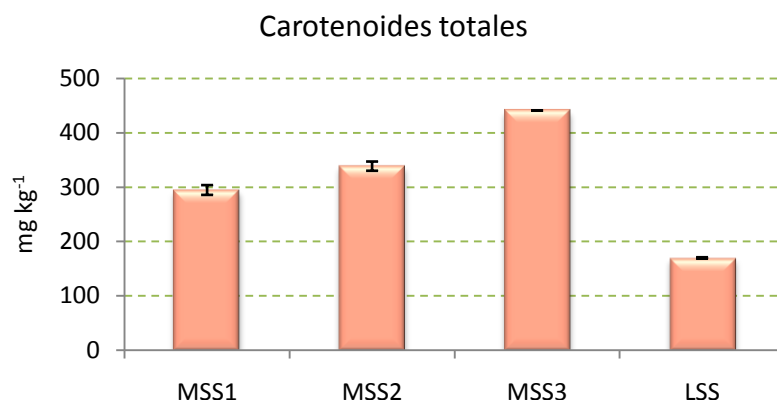
**Figura 22.** Promedio de ácidos grasos de las familias de omega 3, 6 y 9 en las muestras de *U. clathrata* analizadas (LSS n=1; MSS n=3; CCp n=1; UPM n=1, total n=6).

Los azúcares más abundantes en la *U. clathrata* fueron la ramnosa (37%), ácido urónico (27%), glucosa (13%) y la xilosa (11%) (Figura 23), los cuales a excepción de la glucosa, forman parte esencial del ulvan (polisacárido sulfatado) y de la fracción soluble de la fibra dietética.



**Figura 23.** Perfil de azúcares de *U. clathrata* (LSS n=1; MSS n=3, total n=4).

En la Figura 24 se muestra el contenido de carotenoides totales de cuatro diferentes muestras de *U. clathrata*, donde se puede apreciar la alta variabilidad con un promedio de 311 mg kg<sup>-1</sup> pero variando hasta +/- 112 mg kg<sup>-1</sup> en base seca de la muestra.



**Figura 24.** Contenido de carotenoides de diferentes muestras de *U. clathrata* (mg kg<sup>-1</sup> en base seca cada muestra analizada por triplicado).

El contenido promedio de minerales y metales en muestras de *U. clathrata* de los sistemas LSS y MSS se muestra en la Tabla 9. De los elementos analizados, el Ca fue el más abundante llegando hasta 18 g kg<sup>-1</sup> en una muestra del sistema LSS, también en esta muestra se encontró con una gran cantidad de Fe (4.17 g kg<sup>-1</sup>), sin embargo para esta misma muestra encontramos los niveles más bajos de Zn y Cu con 16.6 y 13.8 g kg<sup>-1</sup> respectivamente. En el caso del As y Pb los valores máximos encontrados fueron de 9.7 y 3.5 mg kg<sup>-1</sup>.

**Tabla 9.** Concentración de metales en muestras de *U. clathrata* (mg kg<sup>-1</sup> de peso seco)

|          | promedio | máximo | mínimo |
|----------|----------|--------|--------|
| Calcio   | 12023    | 18800  | 8850   |
| Hierro   | 1509     | 4172   | 340.1  |
| Zinc     | 74.0     | 188.91 | 16.66  |
| Cobre    | 36.7     | 54.17  | 13.8   |
| Nickel   | 3.84     | 5.72   | 2.37   |
| Arsénico | 3.87     | 9.73   | 1.63   |
| Plomo    | 2.38     | 3.49   | 1.09   |
| Cadmio   | 0.90     | 1.32   | 0.48   |
| Cromo    | 1.08     | 1.53   | 0.52   |

Valor promedio de cuatro muestras de *U. clathrata* (LSS n=1; MSS n=3, total n=4).

## 6.2 Efecto de la inclusión de harina de *U. clathrata* en el alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón (experimento 1)

La composición proximal de la *U. clathrata* utilizada en los alimentos experimentales se presenta en la Tabla 10. La composición proximal y la estabilidad en el agua de los alimentos experimentales se presentan en la Tabla 11. El contenido de humedad y proteína en las dietas experimentales fue de 8.2 a 9.2% y 30.5 a 31.5% respectivamente.

**Tabla 10.** Composición de la *U. clathrata* utilizada en alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de harina del alga del experimento 1 (g 100g<sup>-1</sup>).

| Análisis                              |          |
|---------------------------------------|----------|
| Humedad <i>U. clathrata</i> fresca    | 87.3±0.5 |
| Humedad harina de <i>U. clathrata</i> | 9.7±0.4  |
| Proteína                              | 21.3±0.9 |
| Lípidos                               | 0.8±0.2  |
| Ceniza                                | 43.2±1.2 |
| Fibra cruda                           | 3.5±0.2  |
| ELN                                   | 31.1±0.2 |
| Energía (Kcal/g)                      | 2.8      |

Valores expresados en base seca ± desviación estándar. ELN = extracto libre de nitrógeno

La PMS fue significativamente mayor ( $P<0.001$ ) en la dieta control (19.1%) comparado a las dietas con *U. clathrata* (15.7% a 16.5%). Un efecto similar se observa para la PP, donde las dietas con *U. clathrata* fueron significativamente más estables (menor pérdida de proteína) que la dieta control ( $P=0.003$ ). La WA de la dieta control (160%) se incrementó significativamente ( $P<0.001$ ) con la inclusión de la harina de *U. clathrata* (173 a 206%).

Los parámetros zootécnicos evaluados sobre los camarones alimentados con las cuatro dietas experimentales se muestran en la Tabla 12. Los resultados indican que la inclusión de harina de *U. clathrata* no afectó significativamente los parámetros de crecimiento evaluados. Todos los tratamientos terminaron con una sobrevivencia mayor al 90% sin presentar diferencias significativas.

**Tabla 11.** Composición proximal en base húmeda ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ), y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de harina del alga del experimento 1.

| Nutriente              | Dieta                 |                       |                       |                       |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                        | Ctrl                  | UM2                   | UM4                   | UM6                   |
| Humedad                | 8.4±0.2               | 8.2±0.3               | 9.1±0.1               | 9.2±0.3               |
| Proteína               | 31.5±0.2              | 31.1±0.3              | 30.5±0.4              | 30.6±0.2              |
| Lípidos                | 8.7±0.1               | 8.6±0.2               | 8.2±0.6               | 8.3±0.7               |
| Ceniza                 | 6.3±0.2               | 6.4±0.4               | 6.7±0.3               | 6.8±0.6               |
| Fibra cruda            | 1.89±0.2              | 1.87±0.3              | 1.91±0.1              | 1.93±0.1              |
| ELN                    | 43.2±0.3              | 43.8±0.4              | 43.6±0.3              | 43.2±0.2              |
| Energía (Kcal/g)       | 4.58                  | 4.58                  | 4.50                  | 4.50                  |
| Estabilidad en el agua |                       |                       |                       |                       |
| PMS (%)                | 19.1±1.4 <sup>b</sup> | 15.7±0.7 <sup>a</sup> | 16.5±1.3 <sup>a</sup> | 16.4±1.6 <sup>a</sup> |
| PP (%)                 | 25.1±1.3 <sup>b</sup> | 21.1±2.3 <sup>a</sup> | 21.2±1.3 <sup>a</sup> | 22.6±1.2 <sup>a</sup> |
| WA (%)                 | 160±5.1 <sup>a</sup>  | 175±7.2 <sup>b</sup>  | 173±4.1 <sup>b</sup>  | 206±9.6 <sup>c</sup>  |

Ctrl = dieta control; UM2 = 2% harina de *U. clathrata*; UM4 = 4% harina de *U. clathrata*; UM6 = 6% harina de *U. clathrata*. ELN = extracto libre de nitrógeno; PMS = pérdida de material seca; PP = pérdida de proteína; WA= absorción de agua. Los valores son el promedio de tres replicados  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Duncan,  $\alpha=0.05$ ).

**Tabla 12.** Parámetros zootécnicos de camarones alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de harina de *U. clathrata* en el experimento 1.

|           | Dieta     |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|           | Ctrl      | UM2       | UM4       | UM6       |
| Wf (g)    | 3.15±0.25 | 3.14±0.29 | 3.09±0.12 | 3.17±0.08 |
| BA (g)    | 31.5±2.55 | 29.3±3.19 | 28.8±0.68 | 30.6±2.45 |
| TC (%)    | 177±21.5  | 178±24.2  | 172±10.4  | 175±6.7   |
| CI (g)    | 3.16±0.17 | 3.2±0.14  | 3.1±0.1   | 3.21±0.08 |
| TCE (% d) | 3.64±0.28 | 3.64±0.3  | 3.57±0.14 | 3.61±0.09 |
| TCA       | 1.58±0.12 | 1.61±0.2  | 1.59±0.06 | 1.6±0.03  |
| PER       | 2.01±0.15 | 2.06±0.28 | 2.03±0.07 | 2.07±0.04 |
| C Kcal    | 4.58      | 4.58      | 4.50      | 4.50      |
| % S       | 100       | 93±6      | 93±6      | 97±6      |

Ctrl = dieta control; UM2 = 2% harina de *U. clathrata*; UM4 = 4% harina de *U. clathrata*; UM6 = 6% harina de *U. clathrata*. Wf = peso final; BA = biomasa del acuario; TC = tasa de crecimiento; CI = consumo individual; TCE = tasa de crecimiento específico; TCA = tasa de conversión alimenticia; PER = tasa de eficiencia proteica; C Kcal= consumo de kilocalorías; S = tasa de sobrevivencia. Los valores son el promedio de tres replicados  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Duncan,  $\alpha=0.05$ ).

### 6.3 Efecto del procesado de *U. clathrata* y del alimento sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 2)

La composición de la muestra de *U. clathrata* utilizada se presenta en la Tabla 13. La composición proximal y la estabilidad en el agua de los alimentos experimentales se presentan en la Tabla 14. La humedad, proteína y el contenido de fibra cruda, fueron similares en todas las dietas experimentales; sin embargo, el contenido de ceniza fue mayor en las dietas con *U. clathrata* (7.9 - 8.1%) que en la dieta control (7.3%).

**Tabla 13.** Composición de *U. clathrata* utilizada en alimentos elaborados bajo diferentes procesos de inclusión de *U. clathrata* en experimento 2 (g 100g<sup>-1</sup>).

| Análisis                              |          |
|---------------------------------------|----------|
| Humedad <i>U. clathrata</i> fresca    | 88.4±0.2 |
| Humedad harina de <i>U. clathrata</i> | 9.1±0.2  |
| Proteína                              | 21.7±0.3 |
| Lípidos                               | 0.7±0.1  |
| Ceniza                                | 46.0±0.3 |
| Fibra cruda                           | 3.2±0.2  |
| ELN                                   | 28.4±0.2 |
| Energía (Kcal/g)                      | 2.7      |

Valores expresados en base seca ± desviación estándar. ELN = extracto libre de nitrógeno

**Tabla 14.** Composición proximal (base húmeda), y estabilidad en el agua de dietas elaboradas bajo diferentes procesos de inclusión de *U. clathrata* en experimento 2

| Nutriente              | Dieta                 |                       |                       |                       |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                        | Dctrl                 | DHU                   | DLU                   | DCU                   |
| Humedad                | 9.5±0.2               | 9.2±0.1               | 9.3±0.2               | 9.3±0.1               |
| Proteína               | 31.1±0.3              | 31.0±0.4              | 30.9±0.3              | 31.0±0.5              |
| Lípidos                | 8.4±0.3               | 8.2±0.2               | 8.3±0.3               | 8.6±0.3               |
| Ceniza                 | 7.3±0.2               | 7.9±0.1               | 8.1±0.4               | 7.9±0.2               |
| Fibra cruda            | 1.95±0.2              | 1.95±0.2              | 1.94±0.2              | 1.96±0.3              |
| ELN                    | 41.8±0.3              | 41.8±0.3              | 41.5±0.3              | 41.2±0.4              |
| Energía (Kcal/g)       | 4.47                  | 4.45                  | 4.44                  | 4.46                  |
| Estabilidad en el agua |                       |                       |                       |                       |
| % PMS                  | 24.7±2.0 <sup>b</sup> | 14.5±3.9 <sup>a</sup> | 11.5±3.7 <sup>a</sup> | 24.6±1.8 <sup>b</sup> |
| % PP                   | 25.1±1.1 <sup>b</sup> | 16.5±2.1 <sup>a</sup> | 13.3±3.1 <sup>a</sup> | 25.5±2.1 <sup>b</sup> |
| % WA                   | 104±7.0 <sup>a</sup>  | 158±12.1 <sup>b</sup> | 162±10.2 <sup>b</sup> | 101±7.1 <sup>a</sup>  |

Dctrl = dieta control; DHU = 2% de harina de *U. clathrata*; DLU = 2% *U. clathrata* licuada; DCU = 2% *U. clathrata* recubierta. ELN = extracto libre de nitrógeno; PMS = pérdida de material seca; PP = pérdida de proteína; WA= absorción de agua. Los valores son el promedio de tres replicados ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Duncan,  $\alpha=0.05$ ).



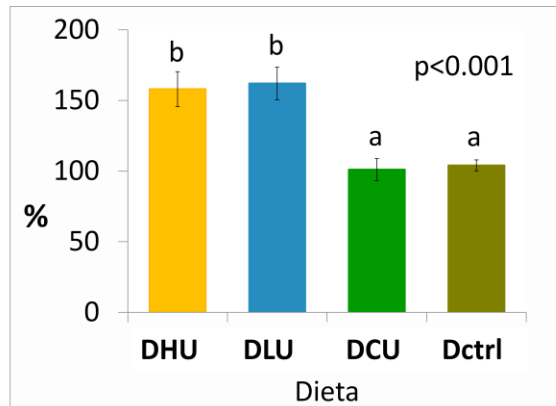
Cuando la *U. clathrata* se incluyó en el alimento antes del proceso de extrusión (DHU and DLU), la PMS y PP disminuyeron significativamente (mejor estabilidad) ( $P<0.001$ ). La WA en la dieta DHU (158%) y DLU (162%) se incrementó significativamente ( $P<0.001$ ) respecto al control (104%) y DCU (101%) (Figura 25).

Los resultados zootécnicos de los camarones al final del experimento se presentan en la Tabla 15. Los camarones alimentados con la dieta recubierta con *U. clathrata* (DCU) presentaron un crecimiento significativamente mayor en términos de peso final (1.84g,  $P<0.001$ ), TC (251%,  $P<0.001$ ) y TCE (4.65 % d<sup>-1</sup>,  $P=0.002$ ) comparado con los camarones alimentados con la dieta control y las otras dietas con *U. clathrata* (Figura 26). La TCA no presentan diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.05$ ). Los camarones alimentados con las dietas DHU y DCU presentaron mayor PER (2.21 y 2.22 respectivamente) que los alimentados con la dieta control (2.19) y DLU (2.09). El tratamiento DLU mostró la tasa de sobrevivencia mayor (97%) y el menor crecimiento por efecto de densidad entre los tratamientos, sin embargo no se presentaron diferencias significativas ( $P=0.13$ ).

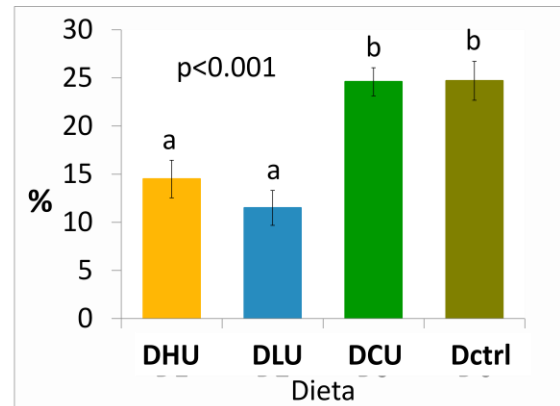
**Tabla 15** Parámetros zootécnicos de camarones alimentados con dietas elaboradas bajo diferentes procesos de inclusión de *U. clathrata* (experimento 2)

|           | Dieta                   |                        |                         |                        |
|-----------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
|           | Dctrl                   | DHU                    | DLU                     | DCU                    |
| Wf (g)    | 1.79±0.03 <sup>b</sup>  | 1.77±0.02 <sup>b</sup> | 1.71±0.01 <sup>a</sup>  | 1.84±0.03 <sup>c</sup> |
| BA (g)    | 13.7±1.9                | 13.6±2.6               | 15.9±1.0                | 16.6±0.3               |
| TC (%)    | 239±5.7 <sup>b</sup>    | 237±5.2 <sup>b</sup>   | 225±2.0 <sup>a</sup>    | 251±6.7 <sup>c</sup>   |
| CI (g)    | 1.89±0.01 <sup>bc</sup> | 1.84±0.04 <sup>a</sup> | 1.86±0.01 <sup>ab</sup> | 1.94±0.03 <sup>c</sup> |
| TCE (% d) | 4.53±0.06               | 4.50±0.06              | 4.37±0.02               | 4.65±0.07              |
| TCA       | 1.50±0.04               | 1.48±0.05              | 1.57±0.02               | 1.47±0.05              |
| PER       | 2.19±0.05 <sup>ab</sup> | 2.21±0.08 <sup>b</sup> | 2.09±0.02 <sup>a</sup>  | 2.22±0.07 <sup>b</sup> |
| C Kcal    | 1.89                    | 1.84                   | 1.86                    | 1.94                   |
| % S       | 80±12                   | 80±13                  | 97±6                    | 87±6                   |

Dctrl = dieta control; DHU = 2% de harina de *U. clathrata*; DLU = 2% *U. clathrata* licuada; DCU = 2% *U. clathrata* recubierta. Wf = peso final; BA = biomasa del acuario; TC = tasa de crecimiento; CI = consumo alimento; TCE = tasa de crecimiento específico; TCA = tasa de conversión alimenticia; PER = tasa de eficiencia proteica; C Kcal= consumo de kilocalorías; S = tasa de sobrevivencia. Los valores son el promedio de tres replicados. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Duncan,  $\alpha=0.05$ ).

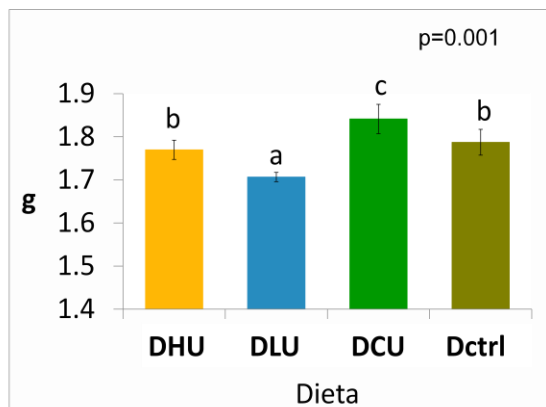


**a).** Absorción de agua de los pelets con *Ulva* bajo diferentes procesos (Duncan,  $\alpha=0.05$ ). n=5

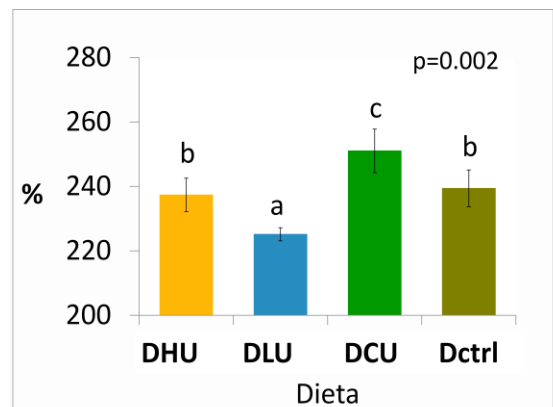


**b).** Pérdida de materia seca en los pelets con *Ulva* bajo diferentes procesos (Duncan,  $\alpha=0.05$ ). n=5

**Figura 25.** Características físicas de los alimentos experimentales bajo diferentes procesos de inclusión de *U. clathrata*, en términos de a) porcentaje de absorción de agua y b) pérdida de materia seca



**a).** Peso final (g) de los camarones alimentados con las dietas experimentales (Duncan,  $\alpha=0.05$ ). n=4



**b).** Tasa de crecimiento (%) de los camarones alimentados con las dietas experimentales (Duncan,  $\alpha=0.05$ ). n=4

**Figura 26.** Crecimiento de los camarones alimentados con las dietas experimentales bajo diferentes procesos de inclusión de *U. clathrata* en términos de a) peso final y b) tasa de crecimiento.

#### 6.4 Efecto sobre la digestibilidad aparente del alimento con inclusión de *U. clathrata* (Experimento 3)

La composición de la harina de *U. clathrata* utilizada en este experimento se presenta en el experimento 1. En la Tabla 16 se presentan la composición bromatológica y estabilidad en el agua de la dieta control y la dieta con 6% inclusión de *U. clathrata*. Se observa un incremento de casi 2% de ceniza en base seca en el alimento DEC debido al alto contenido de ceniza en la harina de *U. clathrata* (Tabla 10). Por otro lado, el alimento DEC resulto con una menor PP y una mayor WA ( $P<0.05$ ).

Los resultados de digestibilidad aparente de materia seca y de proteína de las dietas experimentales se presentan en las Figuras 27 y 28 respectivamente. Tanto en la DAMS como en la DAP se observa un incremento de la digestibilidad para ambas dietas conforme avanzan los días de bioensayo, sugiriendo un acondicionamiento enzimático a las dietas. En el caso de la DAMS, no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre las dos dietas para ningún tiempo de muestreo.

**Tabla 16.** Composición bromatológica y estabilidad en el agua de alimentos control (DCC) y con 6% inclusión harina de *U. clathrata* (DEC) del experimento 3.

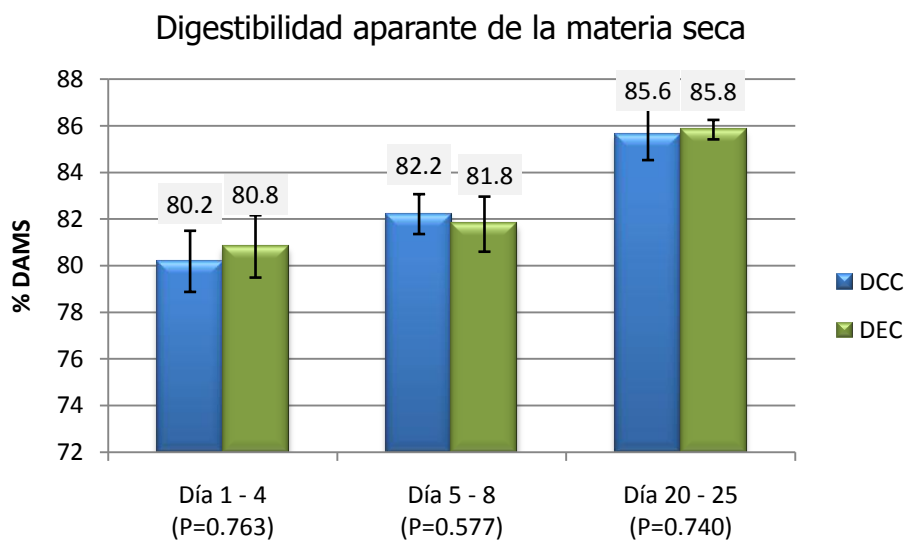
|                        | DCC       | DEC        |
|------------------------|-----------|------------|
| Análisis               |           |            |
| Humedad                | 7.5±0.2   | 7.9±0.2    |
| Proteína               | 33.0±0.1  | 32.9±0.2   |
| Lípidos                | 9.6±0.1   | 9.6±0.1    |
| Fibra cruda            | 0.9±0.1   | 1.2±0.1    |
| Ceniza                 | 9.0±0.2   | 10.8±0.1   |
| ELN                    | 47.5±0.1  | 45.6±0.1   |
| Energía (Kcal/g)       | 4.9       | 4.8        |
| Estabilidad en el agua |           |            |
| % PMS                  | 6.59±1.9  | 6.47±1.4   |
| % PP                   | 16.42±1.2 | 13.44±1.1* |
| % WA                   | 277±11    | 301±3.5*   |

DCC = dieta control; DEC = dieta con 6% de inclusión de harina de *U. clathrata* y 1% óxido de cromo. Valores de bromatológico reportados en g 100g<sup>-1</sup> de muestra en base seca. \* Indica diferencias significativas ( $P<0.05$ )

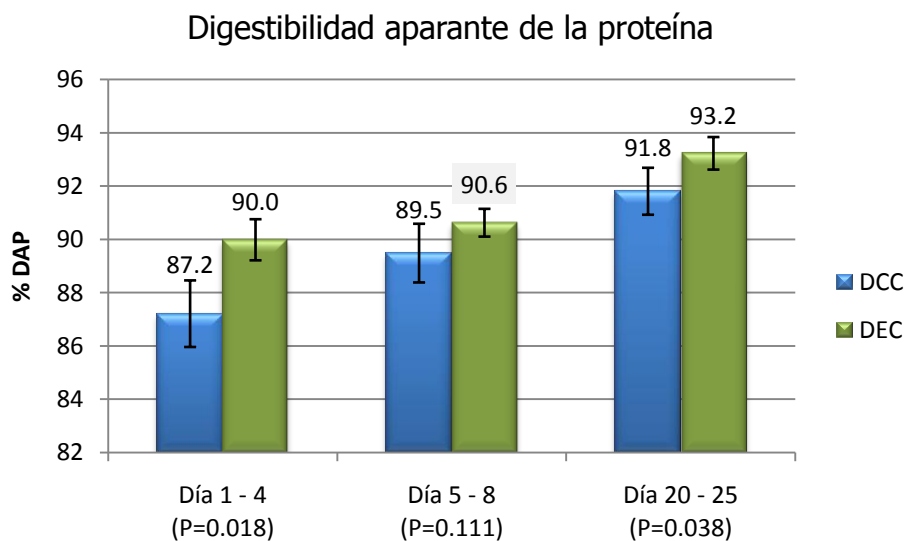
En los tiempo de muestreo del día 1-4 y del día 20-25, se observa una mayor DAP en la dieta con 6% de harina de *U. clathrata* donde desde el primer muestreo la

digestibilidad fue mayor al 90%, mientras que la DAP de la dieta control fue hasta después del segundo muestreo que presentó una DAP mayor al 90%.

En la Tabla 17 se presentan el perfil de FA de los camarones enteros después de las cuatro semanas de bioensayo, donde podemos notar que no se observan diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 27.** Digestibilidad aparente de la materia seca de las dietas experimentales con 0 y 6% de inclusión de *U. clathrata* a diferentes tiempos durante el experimento



**Figura 28.** Digestibilidad aparente de la proteína de las dietas experimentales con 0 y 6% de inclusión de *U. clathrata* a diferentes tiempos durante el experimento

**Tabla 17.** Composición de ácidos grasos (% del total de FA) de camarones completos alimentados con una dieta control (DCC) y una dieta con 6% de harina de *U. clathrata* (DEC) en experimento 3.

|         | Camarones    |              | t- student |
|---------|--------------|--------------|------------|
|         | DCC          | DEC          |            |
| 14:0    | 0.74 ± 0.03  | 0.70 ± 0.06  | 0.260      |
| 15:0    | 0.66 ± 0.76  | 0.68 ± 0.78  | 0.312      |
| 16:0    | 18.45 ± 0.51 | 17.82 ± 0.67 | 0.181      |
| 17:0    | 0.86 ± 0.05  | 0.85 ± 0.03  | 0.735      |
| 18:0    | 10.90 ± 0.33 | 10.84 ± 0.45 | 0.838      |
| 20:0    | 0.72 ± 0.04  | 0.72 ± 0.05  | 0.937      |
| 22:0    | 0.55 ± 0.64  | 0.90 ± 0.61  | 0.484      |
| ∑SFA    | 32.99 ± 2.15 | 32.50 ± 1.55 | 0.720      |
| 16:1n-7 | 1.33 ± 0.05  | 1.27 ± 0.12  | 0.374      |
| 18:1n-9 | 12.14 ± 0.26 | 11.60 ± 0.39 | 0.062      |
| 18:1n-7 | 2.86 ± 0.05  | 2.76 ± 0.11  | 0.137      |
| 20:1n-9 | 0.85 ± 0.03  | 0.83 ± 0.04  | 0.333      |
| 24:1n-9 | 0.49 ± 0.03  | 0.37 ± 0.25  | 0.889      |
| ∑MUFA   | 17.67 ± 0.35 | 16.82 ± 0.60 | 0.050      |
| 18:2n-6 | 16.44 ± 0.97 | 16.25 ± 0.66 | 0.759      |
| 18:3n-3 | 1.02 ± 0.09  | 1.01 ± 0.06  | 0.794      |
| 20:4n-6 | 2.73 ± 0.13  | 2.83 ± 0.19  | 0.430      |
| 20:5n-3 | 12.25 ± 0.27 | 12.44 ± 0.74 | 0.657      |
| 22:5n3  | 0.76 ± 0.03  | 0.75 ± 0.04  | 0.848      |
| 22:6n-3 | 8.28 ± 0.26  | 8.28 ± 0.22  | 0.977      |
| ∑PUFA   | 41.48 ± 1.45 | 41.54 ± 1.52 | 0.951      |
| ∑HUFA   | 24.02 ± 0.56 | 24.29 ± 1.00 | 0.655      |
| ∑n-3    | 22.31 ± 0.53 | 22.47 ± 0.87 | 0.765      |
| ∑n-6    | 19.17 ± 0.97 | 19.08 ± 0.71 | 0.882      |
| n-3/n-6 | 1.17 ± 0.04  | 1.18 ± 0.03  | 0.596      |

DCC = dieta control; DEC = dieta con 6% de inclusión de harina de *U. clathrata* y 1% óxido de cromo. ∑SFA = sumatoria de FA saturados; ∑MUFA = sumatoria de FA monosaturados; ∑PUFA = sumatoria de FA polinsaturados; ∑HUFA = sumatoria de FA altamente insaturados. Los valores son el promedio de tres replicados ± DE.

### 6.5 Efecto del consumo de *Ulva* fresca en condiciones controladas de laboratorio sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 4)

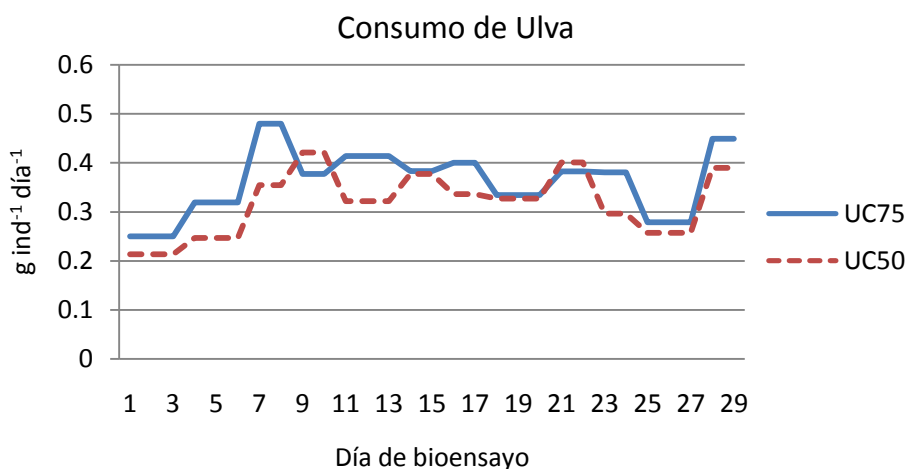
La composición bromatológica y estabilidad en el agua del alimento artificial (comercial) y la composición de la *U. clathrata* utilizada en el bioensayo se presenta en la Tabla 18. La estabilidad en el agua del alimento artificial se considera buena, con valores de pérdida de materia seca y proteína por debajo del 10% en ambos casos.

**Tabla 18.** Composición bromatológica y estabilidad en el agua del alimento artificial (comercial) y composición de la *U. clathrata* utilizados en experimento 4.

|                        | Alimento artificial | <i>U. clathrata</i> |
|------------------------|---------------------|---------------------|
| Análisis               |                     |                     |
| Humedad                | 10.5±0.2            | 89.2±0.1            |
| Proteína               | 36.8±0.2            | 21.8±0.1            |
| Lípidos                | 8.1±0.1             | 0.5±0.2             |
| Fibra cruda            | 1.5±0.1             | 3.8±0.1             |
| Ceniza                 | 7.2±0.1             | 44.0±0.2            |
| ELN                    | 46.4±0.1            | 29.8±0.1            |
| Energía (Kcal/g)       | 5.0                 | 2.8                 |
| Estabilidad en el agua |                     |                     |
| % PMS                  | 4.0±0.2             |                     |
| % PP                   | 9.6±0.4             |                     |
| % WA                   | 64.4±2.6            |                     |

Valores de bromatológico reportados en g 100g<sup>-1</sup> de muestra en base seca

En la Tabla 19 se presentan los resultados zootécnicos del bioensayo. El promedio de consumo de alga por día fue mayor en los camarones del tratamiento UC75, sin embargo no presentó diferencias significativas (P=0.251) con el tratamiento UC50. Durante la mayor parte del experimento, los camarones UC75 consumían más alga que los camarones UC50 (Figura 29).



**Figura 29.** Consumo de *U. clathrata* fresca de los diferentes regímenes alimenticios durante el experimento 4.

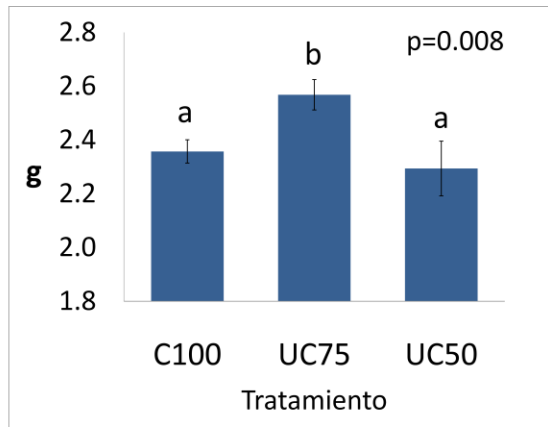
**Tabla 19.** Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con un alimento artificial (comercial) y *U. clathrata* fresca en diferentes regímenes alimenticios en condiciones controladas de laboratorio en el experimento 4.

|                         | Tratamiento            |                        |                        | ANOVA  |
|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------|
|                         | C100                   | UC75                   | UC50                   |        |
| Wf (g)                  | 2.36±0.04 <sup>a</sup> | 2.57±0.06 <sup>b</sup> | 2.29±0.10 <sup>a</sup> | 0.007  |
| TC (%)                  | 95.3±3.3 <sup>a</sup>  | 113.2±4.4 <sup>b</sup> | 90.1±8.5 <sup>a</sup>  | 0.007  |
| CA (g d <sup>-1</sup> ) | ---                    | 0.39±1.01              | 0.33±1.91              | 0.251  |
| CI (g)                  | 1.99±0.06 <sup>c</sup> | 1.64±0.03 <sup>b</sup> | 1.00±0.07 <sup>a</sup> | <0.001 |
| CI Kcal                 | 9.86                   | 8.12                   | 4.95                   |        |
| CA Kcal                 | --                     | 3.67                   | 3.11                   |        |
| Ct Kcal                 | 9.86                   | 11.80                  | 8.06                   |        |
| TCE (% d)               | 2.47±0.07 <sup>a</sup> | 2.80±0.10 <sup>b</sup> | 2.37±0.15 <sup>a</sup> | 0.008  |
| pTCA                    | 1.73±0.11 <sup>c</sup> | 1.21±0.03 <sup>b</sup> | 0.93±0.05 <sup>a</sup> | <0.001 |
| tTCA                    | 1.73±0.11              | 2.01±0.1               | 1.79±0.29              | 0.244  |
| % S                     | 82±6                   | 95±8                   | 86±0                   | 0.830  |

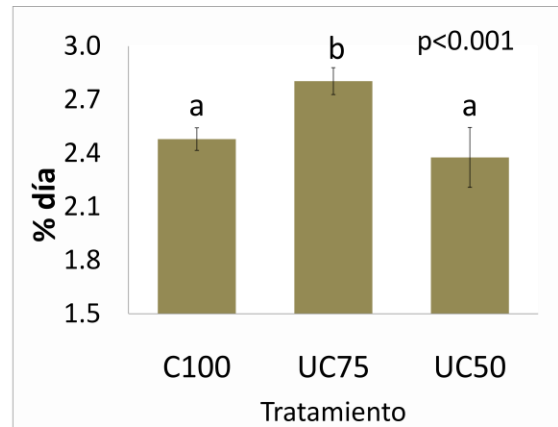
C100 = ración *ad libitum* de alimento artificial; UC75 = 75% de la ración del alimento artificial y *U. clathrata* fresca *ad libitum*; UC50 = 50% de la ración del alimento artificial y *U. clathrata* fresca *ad libitum*. Wf = peso final; TC = tasa de crecimiento; CA = consumo individual de alga fresca por día; CI= consumo de alimento artificial; CI Kcal= consumo de kilocalorías del alimento artificial; CA Kcal= consumo de kilocalorías de la *U. clathrata*; Ct Kcal= consumo total de kilocalorías; TCE = tasa de crecimiento específico; pTCA = tasa de conversión alimenticia relativa al alimento artificial; tTCA = tasa de conversión alimenticia considerando alimento y *U. clathrata*; S = tasa de sobrevivencia. Los valores son el promedio de cuatro replicados. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Duncan,  $\alpha=0.05$ ).

El peso final y la tasa de crecimiento específico (Figura 30a y b) de los camarones bajo el tratamiento UC75, fueron significativamente mayores ( $P=0.008$  y  $P<0.001$  respectivamente) comparado con los otros dos tratamientos.

El consumo total de alimento (incluyendo la *U. clathrata* en base seca) fue significativamente mayor en el tratamiento UC75 (Figura 31a). Si consideramos el alimento artificial como la única fuente de nutrientes, la tasa de conversión alimenticia (pTCA) fue mejorada significativamente ( $p=0.006$ ) en los tratamientos con 75 y 50% de ración de alimento artificial. Considerando la suma del consumo de alimento artificial y el alga en base seca, la tasa total de conversión alimenticia (tTCA) no presentó diferencias significativas ( $P=0.244$ ) entre tratamientos (Figura 31b). Todos los tratamientos finalizaron con una tasa de sobrevivencia mayor al 80% sin presentar diferencias significativas entre ellos.

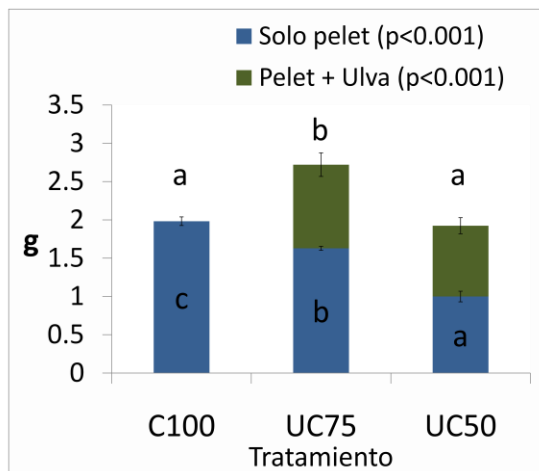


**a).** Peso final (g) de los camarones alimentados con alimento artificial y *Ulva* (Duncan,  $\alpha=0.05$ ). n=4

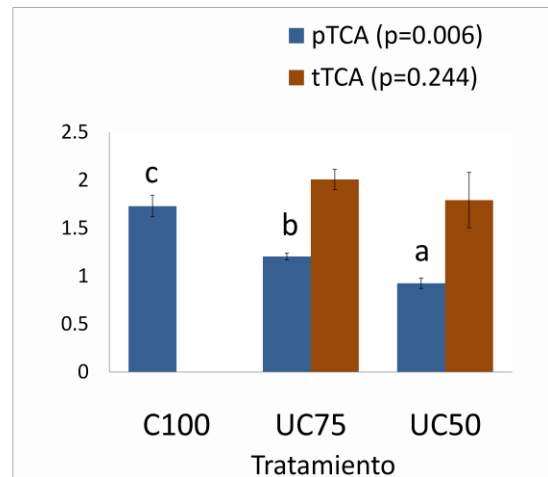


**b).** Tasa de crecimiento específico (% día) en camarones alimentados con alimento artificial y *Ulva* (Duncan,  $\alpha=0.05$ ). n=4

**Figura 30.** Crecimiento de los camarones alimentados con los diferentes regímenes alimenticios en experimento 4, en términos de a) peso final y b) tasa de crecimiento específico.



**a).** Consumo de alimento artificial y *Ulva* (base seca) en camarones bajo diferentes tratamientos. (Duncan,  $\alpha=0.05$ ). n=4



**b).** Tasa de conversión alimenticia del alimento artificial (pTCA) y tasa total de conversión alimenticia (tTCA) en camarones bajo diferentes tratamientos. (Duncan,  $\alpha=0.05$ ). n=4

**Figura 31.** Consumo y tasa de conversión alimenticia en experimento 4. a) Consumo de alimento artificial y *U. clathrata*; b) tasa de conversión alimenticia total y tomando en cuenta solo el consumo de alimento artificial.



## 6.6 Efecto del consumo de *U. clathrata* fresca sobre los ácidos grasos y esteroides en el músculo de camarón en condiciones controladas de laboratorio (Experimento 5)

El contenido de proteína cruda y lípidos en el alimento artificial fue de 37.5 y 7.5% mientras que en la *U. clathrata* fue de 20.4 y 1.4% respectivamente (Tabla 20). Los resultados de los parámetros zootécnicos evaluados en el bioensayo se muestran en la Tabla 21. Al término de los 28 días de bioensayo los camarones bajo el tratamiento DUU tuvieron una mortalidad elevada (40%) y un pobre crecimiento. Los camarones del tratamiento DAU presentaron un crecimiento significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que los otros tratamientos. Se observa un mejor aprovechamiento del alimento artificial en presencia de *U. clathrata*, en términos de la tasa de conversión alimenticia relativa al alimento artificial (pTCA) ( $P = 0.014$ ).

**Tabla 20.** Composición del alimento artificial y *U. clathrata* utilizados en experimento 5 (g 100g<sup>-1</sup> de materia seca)

|                  | Alimento artificial | <i>U. clathrata</i> |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Humedad          | 8.81                | 89.2                |
| Proteína cruda   | 37.53               | 20.4                |
| Lípidos          | 7.55                | 1.4                 |
| Ceniza           | 6.91                | 34.4                |
| Fibra cruda      | 1.92                | 5.6                 |
| ELN              | 46.1                | 38.2                |
| Energía (Kcal/g) | 4.9                 | 3.2                 |

ELN = extracto libre de nitrógeno

**Tabla 21.** Resultados zootécnicos sobre los camarones alimentados bajo diferentes regímenes con alimento artificial y *U. clathrata* en el experimento 5.

|           | Tratamiento          |                      |                      | Anova  |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|
|           | DAA                  | DAU                  | DUU                  |        |
| TC (%)    | 142±4 <sup>b</sup>   | 167±18 <sup>c</sup>  | 32±2 <sup>a</sup>    | <0.001 |
| TCE (% d) | 3.2±0.1 <sup>b</sup> | 3.5±0.2 <sup>c</sup> | 1.0±0.1 <sup>a</sup> | <0.001 |
| CI (g)    | 2.38±0.02            | 2.36±0.03            | ND                   | 0.208  |
| CI Kcal   | 11.78                | 11.68                | ND                   |        |
| pTCA      | 1.32±0.04            | 1.12±0.10            | ND                   | 0.014  |
| % S       | 90±7 <sup>b</sup>    | 96±8 <sup>b</sup>    | 60±10 <sup>a</sup>   | 0.005  |

DAA = solo alimento artificial; DAU = alimento artificial y *U. clathrata* fresca; DUU = solo *U. clathrata* fresca. TC = tasa de crecimiento; CI = consumo alimento artificial; CI Kcal = consumo de kilocalorías del alimento artificial; TCE = tasa de crecimiento específico; pTCA = tasa de conversión relativa al alimento artificial; S = tasa de sobrevivencia ND, no determinado. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

En el perfil de FA del alimento artificial se tiene que el 47.3% corresponden a PUFAs mientras que en la *U. clathrata* representaron solo 13.6% (Tabla 22). Del total de FA presentes en *U. clathrata*, 9.8% corresponden a ácidos grasos esenciales (EFA) para el camarón, siendo el 18:3n3 (LNA) el más abundante con 4.12%, seguido del 18:2n6 (LA) con 3.64% y en menor proporción, 20:5n3 (ácido eicosapentanoico; EPA) y 22:6n3 (ácido docosahexanoico; DHA) con 1.82% y 0.32% respectivamente. Los MUFAs más predominantes en la *U. clathrata* fueron el ácido palmitoleico (16:1n7) y el vaccénico (18:1n7) (6.6 y 12.5% respectivamente). Los esteroides analizados en el alimento y *U. clathrata* se presentan en la Tabla 23. El principal esteroide que se presenta en el alimento artificial es el colesterol (61.4%) mientras que en la *U. clathrata* es el isofucosterol (87.7%). Del total de esteroides en la *U. clathrata* y en el alimento artificial se encontraron entre 7.0 y 8.1% de esteroides no identificados.

Las diferencias en la composición de FA de los camarones alimentados bajo los diferentes tratamientos se presentan en la Tabla 24. Globalmente se observa una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) en el total de FA en los camarones DUU con respecto a los otros tratamientos. Los camarones de los tratamientos con *U. clathrata* (DAU y DUU) presentaron un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la proporción y cantidad de ácido linoléico (18:3n3) y una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en la cantidad de ácido oleico (18:1n9) y EPA, esto con respecto a los camarones control (DAA). Se observa un aumento en la proporción de MUFAs y altamente insaturados (HUFA) en los camarones DUU, sin embargo en cantidad de estos mismos, se observa una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) respecto a los camarones DAA. En los tratamientos DAU y DUU se presentó un incremento general en los esteroides analizados encontrando acumulamientos significativos en brassicasterol, isofucosterol y otros esteroides no identificados (Tabla 25). Se observó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el contenido de colesterol en los camarones DUU.

**Tabla 22.** Composición de ácidos grasos (mg 100g<sup>-1</sup> peso húmedo y % del total de FA) del alimento artificial y la *U. clathrata* utilizados en el experimento 5.

| Ácido graso | mg 100g <sup>-1</sup> peso húmedo |                       | % del total de ácidos grasos |                     |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------|
|             | Alimento artificial               | <i>U. clathrata</i>   | Alimento artificial          | <i>U. clathrata</i> |
| 14:00       | 124.80 ± 5.83                     | 1.26 ± 0.04           | 4.46 ± 0.09                  | 1.15 ± 0.08         |
| 15:00       | 0.00 ± 0.00                       | 0.59 ± 0.02           | 0.00 ± 0.00                  | 0.54 ± 0.04         |
| 16:00       | 653.93 ± 13.43                    | 58.04 ± 6.44          | 23.40 ± 0.18                 | 52.00 ± 1.12        |
| 17:00       | 0.00 ± 0.00                       | 0.10 ± 0.00           | 0.00 ± 0.00                  | 0.09 ± 0.01         |
| 18:00       | 139.46 ± 2.67                     | 0.48 ± 0.02           | 4.99 ± 0.05                  | 0.44 ± 0.03         |
| 20:00       | 0.58 ± 0.04                       | 0.28 ± 0.15           | 0.02 ± 0.00                  | 0.26 ± 0.15         |
| 21:00       | 0.00 ± 0.00                       | 0.60 ± 0.06           | 0.00 ± 0.00                  | 0.55 ± 0.05         |
| 22:00       | 1.28 ± 0.34                       | 3.50 ± 0.32           | 0.05 ± 0.01                  | 3.15 ± 0.04         |
| 24:00       | 0.08 ± 0.08                       | 1.54 ± 0.20           | 0.00 ± 0.00                  | 1.37 ± 0.06         |
| ∑SFA        | <b>920.13 ± 22.14</b>             | <b>66.40 ± 7.02</b>   | <b>32.93 ± 0.18</b>          | <b>59.55 ± 0.97</b> |
| 14:1n-8     | 0.00 ± 0.00                       | 0.03 ± 0.03           | 0.00 ± 0.00                  | 0.03 ± 0.03         |
| 15:1n-8     | 0.00 ± 0.00                       | 0.15 ± 0.02           | 0.00 ± 0.00                  | 0.14 ± 0.03         |
| 16:1n-9     | 8.20 ± 0.38                       | 1.73 ± 0.42           | 0.29 ± 0.01                  | 1.55 ± 0.33         |
| 16:1n-7     | 130.15 ± 5.81                     | 7.25 ± 0.39           | 4.65 ± 0.08                  | 6.57 ± 0.30         |
| 16:1n-5     | 4.95 ± 0.24                       | 0.04 ± 0.02           | 0.18 ± 0.00                  | 0.03 ± 0.01         |
| 17:1n-8     | 0.61 ± 0.03                       | 1.99 ± 0.25           | 0.02 ± 0.00                  | 1.85 ± 0.39         |
| 18:1n-9     | 382.46 ± 11.88                    | 1.05 ± 0.14           | 13.68 ± 0.07                 | 0.93 ± 0.04         |
| 18:1n-7     | 1.40 ± 0.01                       | 13.95 ± 1.29          | 0.05 ± 0.00                  | 12.54 ± 0.05        |
| 20:1n-11    | 2.66 ± 1.34                       | 0.45 ± 0.08           | 0.09 ± 0.05                  | 0.39 ± 0.04         |
| 20:1n-9     | 0.44 ± 0.22                       | 0.16 ± 0.05           | 0.02 ± 0.01                  | 0.16 ± 0.06         |
| 22:1n-11    | 11.40 ± 0.79                      | 0.20 ± 0.06           | 0.41 ± 0.02                  | 0.17 ± 0.04         |
| 22:1n-9     | 2.23 ± 0.34                       | 0.18 ± 0.00           | 0.08 ± 0.01                  | 0.17 ± 0.01         |
| 24:1n-9     | 7.56 ± 0.30                       | 2.50 ± 0.11           | 0.27 ± 0.02                  | 2.30 ± 0.29         |
| ∑MUFA       | <b>552.06 ± 19.06</b>             | <b>29.49 ± 1.88</b>   | <b>14.60 ± 0.06</b>          | <b>16.67 ± 0.34</b> |
| 18:2n-6     | 834.60 ± 12.19                    | 4.09 ± 0.59           | 29.88 ± 0.36                 | 3.64 ± 0.20         |
| 18:3n-6     |                                   |                       | 0.09 ± 0.03                  | 0.87 ± 0.07         |
| 18:3n-3     | 2.06 ± 0.12                       | 4.62 ± 0.68           | 0.07 ± 0.00                  | 4.12 ± 0.29         |
| 18:4n-3     | 3.97 ± 0.23                       | 1.80 ± 0.33           | 0.14 ± 0.00                  | 1.59 ± 0.16         |
| 20:2n-6     | 0.81 ± 0.03                       | 0.14 ± 0.05           | 0.03 ± 0.00                  | 0.13 ± 0.04         |
| 20:3n-3     | 0.05 ± 0.05                       | 0.05 ± 0.03           | 0.00 ± 0.00                  | 0.04 ± 0.02         |
| 20:4n-6     | 0.65 ± 0.02                       | 1.17 ± 0.05           | 0.02 ± 0.00                  | 1.07 ± 0.07         |
| 20:5n-3     | 268.72 ± 14.99                    | 2.00 ± 0.14           | 9.60 ± 0.28                  | 1.82 ± 0.11         |
| 22:6n-3     | 209.49 ± 7.00                     | 0.35 ± 0.13           | 7.49 ± 0.07                  | 0.32 ± 0.11         |
| ∑PUFA       | <b>1,320.35 ± 34.45</b>           | <b>14.22 ± 1.91</b>   | <b>47.33 ± 0.16</b>          | <b>13.59 ± 0.80</b> |
| ∑HUFA       | 478.86 ± 21.99                    | 3.53 ± 0.30           | 17.12 ± 0.34                 | 3.20 ± 0.26         |
| ∑(n-6)      | 836.06 ± 12.22                    | 5.40 ± 0.65           | 29.93 ± 0.36                 | 4.83 ± 0.19         |
| ∑(n-3)      | 484.29 ± 22.28                    | 8.82 ± 1.27           | 17.31 ± 0.35                 | 7.89 ± 0.35         |
| (n-3)/(n-6) |                                   |                       | 0.58 ± 0.02                  | 1.63 ± 0.06         |
| Total (FA)  | <b>2,792.54 ± 74.94</b>           | <b>110.28 ± 10.51</b> |                              |                     |

∑SFA = sumatoria de FA saturados; ∑MUFA = sumatoria de FA monosaturados; ∑PUFA = sumatoria de FA polisaturados; ∑HUFA = sumatoria de FA altamente insaturados. Los valores son el promedio ± desviación estándar (n=3).

**Tabla 23.** Composición de esteroides (mg 100g<sup>-1</sup> peso húmedo y % del total de esteroides) del alimento artificial y la *U. clathrata* utilizados en el experimento 5.

| Esteroides                | mg 100g <sup>-1</sup> peso húmedo |                     | % del total de esteroides |                     |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
|                           | Alimento artificial               | <i>U. clathrata</i> | Alimento artificial       | <i>U. clathrata</i> |
| s12.38                    | 1.01 ± 0.18                       | 0.00 ± 0.00         | 0.56 ± 0.12               | 0.00 ± 0.00         |
| s12.62                    | 1.81 ± 0.10                       | 0.05 ± 0.01         | 0.98 ± 0.06               | 1.31 ± 0.05         |
| s14.03                    | 4.43 ± 0.19                       | 0.04 ± 0.01         | 2.42 ± 0.17               | 0.91 ± 0.12         |
| s14.2                     | 0.63 ± 0.08                       | 0.00 ± 0.00         | 0.34 ± 0.03               | 0.00 ± 0.00         |
| s14.46                    | 4.40 ± 0.43                       | 0.00 ± 0.00         | 2.38 ± 0.13               | 0.00 ± 0.00         |
| s15.3                     | 0.63 ± 0.17                       | 0.16 ± 0.01         | 0.33 ± 0.08               | 4.81 ± 1.65         |
| s16.1                     | 0.94 ± 1.09                       | 0.00 ± 0.00         | 0.50 ± 0.59               | 0.00 ± 0.00         |
| s17.6                     | 1.09 ± 0.09                       | 0.00 ± 0.00         | 0.59 ± 0.01               | 0.00 ± 0.00         |
| dehidrosterol             | 3.92 ± 0.40                       | 0.00 ± 0.00         | 2.11 ± 0.06               | 0.00 ± 0.00         |
| Colesterol                | 113.79 ± 8.49                     | 0.06 ± 0.01         | 61.45 ± 0.09              | 1.66 ± 0.44         |
| s20.81                    | 1.57 ± 0.11                       | 0.00 ± 0.00         | 0.85 ± 0.07               | 0.00 ± 0.00         |
| Brassicasterol            | 2.34 ± 0.23                       | 0.00 ± 0.00         | 1.27 ± 0.10               | 0.00 ± 0.00         |
| Desmosterol               | 1.51 ± 0.05                       | 0.00 ± 0.00         | 0.82 ± 0.06               | 0.00 ± 0.00         |
| Campesterol               | 9.56 ± 0.84                       | 0.00 ± 0.00         | 5.15 ± 0.08               | 0.00 ± 0.00         |
| Dehidroergosterol         | 3.66 ± 0.17                       | 0.00 ± 0.00         | 2.59 ± 0.06               | 0.00 ± 0.00         |
| Estigmasterol             | 4.81 ± 0.47                       | 0.00 ± 0.00         | 1.99 ± 0.06               | 0.00 ± 0.00         |
| s23.14                    | 2.21 ± 0.14                       | 0.00 ± 0.00         | 1.20 ± 0.03               | 0.00 ± 0.00         |
| β-Sitosterol              | 23.90 ± 1.99                      | 0.10 ± 0.00         | 12.89 ± 0.14              | 2.75 ± 0.83         |
| 7-Dehidroporiferasterol   | 0.26 ± 0.26                       | 0.00 ± 0.00         | 0.15 ± 0.15               | 0.00 ± 0.00         |
| Fucosterol                | 1.08 ± 0.06                       | 0.03 ± 0.00         | 0.60 ± 0.07               | 0.82 ± 0.27         |
| Isofucosterol             | 0.93 ± 0.47                       | 3.70 ± 1.03         | 0.48 ± 0.24               | 87.74 ± 3.33        |
| <b>Total (esteroides)</b> | <b>185.14 ± 13.56</b>             | <b>4.13 ± 1.05</b>  |                           |                     |

Los valores son el promedio ± desviación estándar (n=3).

**Tabla 24.** Composición de ácidos grasos (mg 100g<sup>-1</sup> peso húmedo y % del total de FA) en el musculo de camarones alimentados con alimento artificial y/o *U. clathrata* en experimento 5.

| FA                | mg 100g <sup>-1</sup> peso húmedo |                       |                       | % del total de ácidos grasos |                     |                     |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
|                   | DAA                               | DAU                   | DUU                   | DAA                          | DAU                 | DUU                 |
| 14:00             | 1.9 ± 0.1                         | 1.9 ± 0.1             | 1.5 ± 0.1             | 0.3 ± 0.02                   | 0.3 ± 0.01          | 0.4 ± 0.02          |
| 15:00             | 1.4 ± 0.1 a                       | 1.9 ± 0.1 b           | 1.6 ± 0.1 ab          | 0.2 ± 0.01 a                 | 0.3 ± 0.01 b        | 0.4 ± 0.02 c        |
| 16:00             | 121.9 ± 7.4 b                     | 106.7 ± 6.3 b         | 72.8 ± 1.8 a          | 19.2 ± 0.3 b                 | 19.0 ± 0.2 b        | 17.4 ± 0.3 a        |
| 17:00             | 6.2 ± 0.3                         | 6.0 ± 0.4             | 5.5 ± 0.3             | 1.0 ± 0.02 a                 | 1.1 ± 0.01 b        | 1.3 ± 0.03 c        |
| 18:00             | 73.2 ± 3.9 b                      | 64.1 ± 3.2 ab         | 54.0 ± 3.0 a          | 11.6 ± 0.2 a                 | 11.5 ± 0.2 a        | 12.8 ± 0.4 b        |
| 20:00             | 1.3 ± 0.2                         | 1.2 ± 0.2             | 1.2 ± 0.4             | 0.2 ± 0.03 a                 | 0.2 ± 0.01 a        | 0.3 ± 0.1 b         |
| 21:00             | 0.5 ± 0.1 a                       | 0.8 ± 0.1 b           | 0.6 ± 0.1 ab          | 0.1 ± 0.01 a                 | 0.1 ± 0.01 b        | 0.2 ± 0.01 b        |
| 22:00             | 1.5 ± 0.1 b                       | 1.3 ± 0.1 a           | 1.9 ± 0.3 ab          | 0.3 ± 0.02 a                 | 0.2 ± 0.01 a        | 0.4 ± 0.1 b         |
| 24:00             | 7.2 ± 0.6                         | 7.3 ± 0.6             | 5.0 ± 0.3             | 1.1 ± 0.1                    | 1.3 ± 0.1           | 1.2 ± 0.1           |
| <b>∑SFA</b>       | <b>215.0 ± 12.2 b</b>             | <b>191.0 ± 10.6 b</b> | <b>144.1 ± 5.5 a</b>  | <b>33.9 ± 0.2</b>            | <b>34.0 ± 0.2</b>   | <b>34.3 ± 0.5</b>   |
| 14:1n-8           | 1.0 ± 0.1                         | 1.0 ± 0.03            | 1.0 ± 0.03            | 0.2 ± 0.01 a                 | 0.2 ± 0.01 a        | 0.2 ± 0.01 b        |
| 15:1n-8           | 12.4 ± 0.5 b                      | 11.4 ± 0.3 b          | 8.5 ± 1.7 a           | 2.0 ± 0.1                    | 2.1 ± 0.1           | 2.02 ± 0.4          |
| 16:1n-9           | 9.5 ± 0.4                         | 9.0 ± 0.3             | 8.5 ± 0.3             | 1.5 ± 0.1 a                  | 1.6 ± 0.1 a         | 2.03 ± 0.03 b       |
| 16:1n-7           | 5.4 ± 0.4 b                       | 5.2 ± 0.6 ab          | 3.4 ± 0.3 a           | 0.8 ± 0.04                   | 0.9 ± 0.1           | 0.8 ± 0.1           |
| 16:1n-5           | 2.0 ± 0.2 b                       | 1.7 ± 0.2 b           | 0.9 ± 0.2 a           | 0.3 ± 0.02 b                 | 0.3 ± 0.02 ab       | 0.2 ± 0.04 a        |
| 17:1n-8           | 0.0                               | 0.4 ± 0.1 b           | 0.4 ± 0.1 a           | 0.0                          | 0.1 ± 0.02 b        | 0.1 ± 0.03 b        |
| 18:1n-9           | 63.6 ± 4.5 b                      | 49.7 ± 3.5 a          | 37.6 ± 4.1 a          | 9.9 ± 0.2 b                  | 8.8 ± 0.2 a         | 8.8 ± 0.6 ab        |
| 18:1n-7           | 18.1 ± 1.6 b                      | 16.7 ± 1.5 b          | 10.2 ± 0.6 a          | 2.8 ± 0.1                    | 2.9 ± 0.1           | 2.4 ± 0.1           |
| 20:1n-11          | 3.9 ± 0.3 b                       | 3.3 ± 0.2 b           | 2.1 ± 0.1 a           | 0.6 ± 0.02 b                 | 0.6 ± 0.02 b        | 0.5 ± 0.02 a        |
| 20:1n-9           | 0.6 ± 0.04                        | 0.6 ± 0.1             | 0.5 ± 0.04            | 0.1 ± 0.0                    | 0.1 ± 0.0           | 0.1 ± 0.01          |
| 22:1n-9           | 0.3 ± 0.03                        | 0.4 ± 0.04            | 0.4 ± 0.1             | 0.1 ± 0.01                   | 0.1 ± 0.01          | 0.1 ± 0.02          |
| 24:1n-9           | 10.7 ± 0.5 a                      | 13.4 ± 0.7 b          | 22.6 ± 1.5 c          | 1.8 ± 0.2 a                  | 2.5 ± 0.2 b         | 5.4 ± 0.3 c         |
| <b>∑MUFA</b>      | <b>114.2 ± 7.04 b</b>             | <b>100.2 ± 5.9 b</b>  | <b>86.5 ± 6.3 a</b>   | <b>15.3 ± 0.2 a</b>          | <b>15.0 ± 0.2 a</b> | <b>17.4 ± 0.8 b</b> |
| 18:2n-6           | 80.9 ± 6.1 b                      | 68.8 ± 4.8 b          | 31.1 ± 0.8 a          | 12.6 ± 0.4 b                 | 12.2 ± 0.2 b        | 7.4 ± 0.2 a         |
| 18:3n-6           |                                   |                       |                       | 0.2 ± 0.0 a                  | 0.2 ± 0.01 a        | 0.2 ± 0.01 b        |
| 18:3n-3           | 3.9 ± 0.4 a                       | 6.4 ± 0.7 b           | 5.0 ± 0.8 ab          | 0.6 ± 0.03 a                 | 1.1 ± 0.1 b         | 1.2 ± 0.2 b         |
| 18:4n-3           | 0.5 ± 0.02 ab                     | 0.7 ± 0.1 b           | 0.3 ± 0.1 a           | 0.1 ± 0.0 a                  | 0.1 ± 0.01 b        | 0.1 ± 0.03 ab       |
| 20:2n-6           | 9.5 ± 0.8 b                       | 7.4 ± 0.6 b           | 3.9 ± 0.4 a           | 1.5 ± 0.1 b                  | 1.3 ± 0.04 b        | 0.9 ± 0.1 a         |
| 20:3n-3           | 0.7 ± 0.1 ab                      | 1.1 ± 0.1 b           | 0.5 ± 0.04 a          | 0.1 ± 0.0 a                  | 0.2 ± 0.01 b        | 0.1 ± 0.01 a        |
| 20:4n-6           | 15.1 ± 0.3 a                      | 15.5 ± 0.5 a          | 20.8 ± 1.0 b          | 2.5 ± 0.1 a                  | 2.8 ± 0.1 a         | 4.9 ± 0.2 b         |
| 20:5n-3           | 106.7 ± 4.6 b                     | 93.3 ± 3.3 a          | 85.3 ± 2.7 a          | 17.04 ± 0.5 a                | 16.8 ± 0.4 a        | 20.4 ± 0.8 b        |
| 22:6n-3           | 72.8 ± 4.8 b                      | 62.9 ± 4.0 b          | 32.6 ± 1.3 a          | 11.4 ± 0.2 b                 | 11.2 ± 0.2 b        | 7.8 ± 0.2 a         |
| <b>∑PUFA</b>      | <b>290.2 ± 16.4 b</b>             | <b>256.1 ± 13.4 b</b> | <b>179.5 ± 4.2 a</b>  | <b>46.0 ± 0.3 b</b>          | <b>45.9 ± 0.2 b</b> | <b>43.0 ± 1.1 a</b> |
| <b>∑HUFA</b>      | <b>194.6 ± 9.4 b</b>              | <b>171.7 ± 7.5 ab</b> | <b>138.7 ± 3.8 a</b>  | <b>30.93 ± 0.52 a</b>        | <b>30.8 ± 0.4 a</b> | <b>33.1 ± 0.9 b</b> |
| <b>∑(n-6)</b>     | <b>105.5 ± 7.0 b</b>              | <b>91.7 ± 5.7 b</b>   | <b>55.7 ± 1.8 a</b>   | <b>16.54 ± 0.31 b</b>        | <b>16.3 ± 0.2 b</b> | <b>13.3 ± 0.1 a</b> |
| <b>∑(n-3)</b>     | <b>184.7 ± 9.7 b</b>              | <b>164.4 ± 7.8 b</b>  | <b>123.8 ± 3.6a</b>   | <b>29.26 ± 0.42</b>          | <b>29.4 ± 0.3</b>   | <b>29.6 ± 1.1</b>   |
| (n-3)/(n-6)       |                                   |                       |                       | 1.78 ± 0.06 a                | 1.8 ± 0.03 a        | 2.2 ± 0.1 b         |
| <b>Total (FA)</b> | <b>632.8 ± 35.5 b</b>             | <b>559.7 ± 30.1 b</b> | <b>419.5 ± 14.2 a</b> |                              |                     |                     |

DAA = solo alimento artificial; DAU = alimento artificial y *U. clathrata* fresca; DUU = solo *U. clathrata* fresca. ∑SFA = sumatoria de FA saturados; ∑MUFA = sumatoria de FA monosaturados; ∑PUFA = sumatoria de FA polinsaturados; ∑HUFA = sumatoria de FA altamente insaturados. Los valores son el promedio ± desviación estándar (n=12). Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey, α=0.05).

**Tabla 25.** Composición de esteroides (mg 100g<sup>-1</sup> peso húmedo y % del total de FA) en el músculo de camarones alimentados con alimento artificial y/o *U. clathrata* en experimento 5.

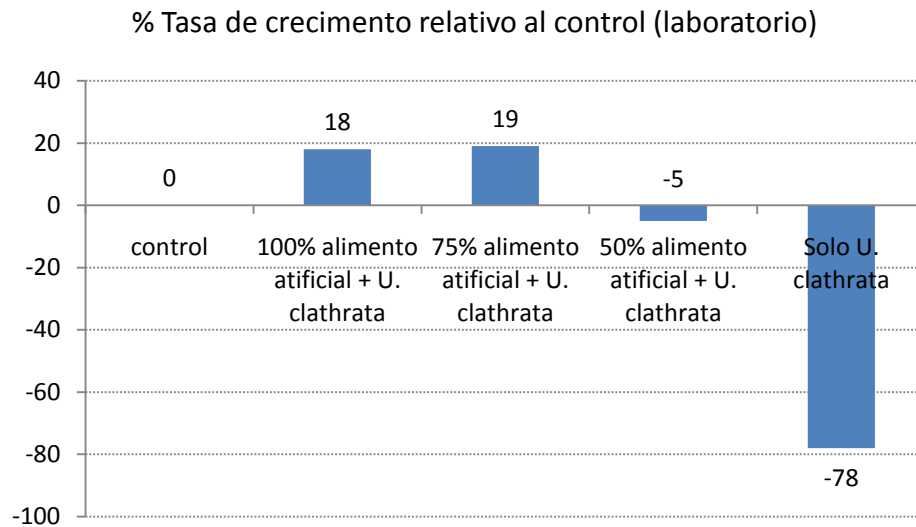
|                       | mg 100g <sup>-1</sup> peso húmedo |                    |                     | % del total de esteroides |              |              |
|-----------------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|--------------|--------------|
|                       | DAA                               | DAU                | DUU                 | DAA                       | DAU          | DUU          |
| s12.38                | 0.7±0.03 a                        | 1.1±0.1 b          | 1.10±0.11 b         | 0.47±0.02 a               | 0.65±0.05 b  | 0.53±0.02 ab |
| s12.62                | 0.5±0.02 a                        | 0.7±0.04 b         | 0.73±0.07 b         | 0.32±0.01 a               | 0.42±0.02 b  | 0.35±0.02 ab |
| s14.03                | 0.2±0.01 a                        | 0.5±0.03 b         | 0.56±0.08 b         | 0.16±0.01 a               | 0.30±0.02 b  | 0.27±0.03 b  |
| s14.46                | 0.2±0.1                           | 0.2±0.02           | 0.25±0.08           | 0.16±0.03                 | 0.09±0.02    | 0.12±0.03    |
| dehidrosterol         | 4.2±0.3                           | 4.0±0.4            | 4.13±0.38           | 2.98±0.57 b               | 2.49±0.90 ab | 2.01±0.30 a  |
| Colesterol            | 125.1±0.2 a                       | 140.6±0.7 a        | 186.2±0.57 b        | 87.9±0.45 a               | 87.0±0.37 a  | 89.6±0.45 b  |
| s20.81                | 0.2±0.03 a                        | 0.7±0.1 b          | 0.57±0.07 b         | 0.14±0.84 a               | 0.41±1.24 c  | 0.27±1.18 b  |
| Brassicasterol        | 1.2±0.1 a                         | 2.03±0.2 b         | 2.43±0.18 b         | 0.84±0.04 a               | 1.24±0.09 b  | 1.18±0.03 b  |
| Campesterol           | 4.7±0.4                           | 5.03±0.2           | 4.08±0.51           | 3.25±0.21 b               | 3.13±0.14 b  | 2.00±0.24 a  |
| Estigmasterol         | 0.3±0.1                           | 0.2±0.1            | 0.32±0.05           | 0.21±0.05                 | 0.12±0.04    | 0.15±0.02    |
| s23.14                | 0.7±0.02 a                        | 1.2±0.1 b          | 1.31±0.10 b         | 0.48±0.02 a               | 0.73±0.04 b  | 0.64±0.02 b  |
| β-Sitosterol          | 4.0±0.4                           | 4.4±0.4            | 4.47±0.52           | 2.77±0.27                 | 2.72±0.21    | 2.17±0.18    |
| Isofucosterol         | 0.04±0.0 a                        | 0.4±0.1 b          | 0.59±0.16 b         | 0.03±0.00 a               | 0.22±0.05 b  | 0.29±0.08 b  |
| total<br>(esteroides) | <b>142.4±3.4 a</b>                | <b>161.5±5.1 a</b> | <b>207.5±18.1 b</b> |                           |              |              |

DAA = solo alimento artificial; DAU = alimento artificial y *U. clathrata* fresca; DUU = solo *U. clathrata* fresca. Los valores son el promedio ± desviación estándar (n=12). Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

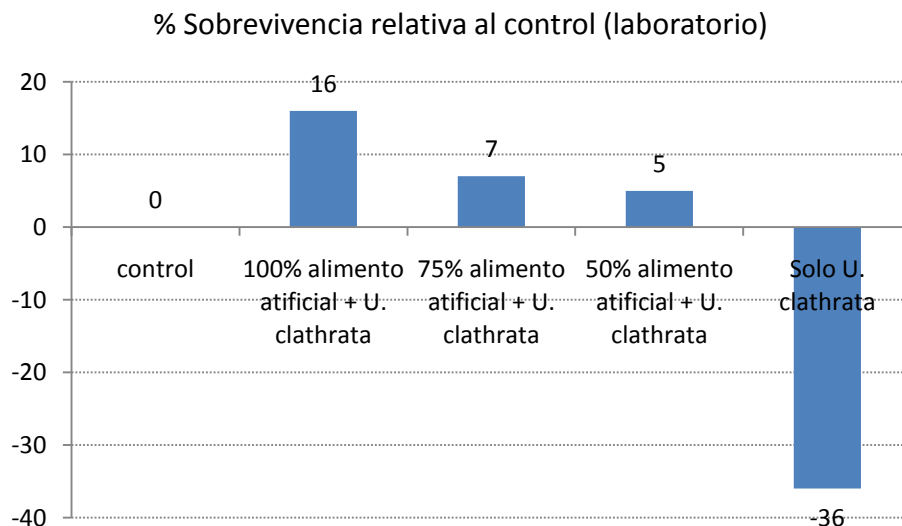
### 6.6.1 Integración de resultados de crecimiento de ensayos con *U. clathrata* fresca en condiciones controladas de laboratorio (Experimentos 4 y 5)

En la Figura 32 se integran los valores de tasa de crecimiento relativo de los tratamientos en los experimentos 4 y 5, donde se considera el crecimiento de los camarones control (100% de ración de alimento artificial) como 100% y a partir de ahí la ganancia o pérdida de crecimiento de los demás tratamientos respecto a este control; se observa que el consumo de *U. clathrata* fresca más la utilización de entre 75 y 100% de la ración de alimento artificial (control) ocasiona una ganancia en el crecimiento de hasta 19% por encima del tratamiento control, sin embargo, cuando se consume *U. clathrata* fresca más una ración de alimento artificial de 50% o menos, el crecimiento no se ve mejorado respecto al control. En el caso de los camarones alimentados solo con *U. clathrata* fresca, el crecimiento es muy inferior (hasta -78%) respecto al control de solo alimento artificial. En el caso de la sobrevivencia relativa al control (tomada como

100%), se observa un efecto positivo en una mayor sobrevivencia de los camarones cuando se combina alimento artificial y *U. clathrata* fresca, sin embargo los camarones alimentados solo con *U. clathrata* fresca tienen un aumento en la mortalidad respecto a los camarones alimentados solo con el alimento artificial (Figura 33).



**Figura 32.** Tasa de crecimiento relativo al tratamiento control (línea base) de los diferentes tratamientos experimentales con *U. clathrata* fresca, obtenidos en los experimentos en condiciones controladas de laboratorio.



**Figura 33.** Tasa de sobrevivencia relativa al tratamiento control (línea base) de los diferentes tratamientos experimentales con *U. clathrata* fresca, obtenidos en los experimentos en condiciones controladas de laboratorio.

## 6.7 Evaluación del cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto

### 6.7.1 Cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 28°C (primavera) (Experimento 6)

Los parámetros de calidad de agua monitoreados durante el experimento se presentan en la Tabla 26. La temperatura dentro de los tanques experimentales se mantuvo en un rango de entre 24 y 28 °C, con una pH alcalino alrededor de 9. Durante las tardes, se presentó un aumento en la cantidad de oxígeno disuelto en el agua de hasta 3 mg L<sup>-1</sup>, por encima de la medición matutina. El total de concentración de NH<sub>3</sub>, varió entre 0.1 y 0.25 mg L<sup>-1</sup>, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos (P=0.54). Los niveles de nitratos estuvieron por debajo del límite de sensibilidad del kit empleado para su evaluación.

**Tabla 26.** Parámetros de calidad de agua durante el experimento de cocultivo en época de primavera (experimento 6).

| Parámetro                              | Promedio general |
|--|------------------|
| T°C am                                 | 24.5±0.11        |
| T°C pm                                 | 27.5±0.14        |
| pH                                     | 9.1±0.10         |
| Salinidad (ppt)                        | 34.4±0.29        |
| Oxígeno disuelto (mg L <sup>-1</sup> ) |                  |
| sin <i>Ulva</i> AM                     | 3.9±2.1          |
| sin <i>Ulva</i> PM                     | 7.9±1.6          |
| con <i>Ulva</i> AM                     | 4.2±0.13         |
| con <i>Ulva</i> PM                     | 6.2±0.36         |

Los resultados de producción natural dentro los tanques experimentales se presentan en las tablas 27 y 28, donde se promediaron los resultados por tratamiento y en el tiempo, de ahí las grandes desviaciones estándar, sin embargo aunque no se aprecien diferencias significativas en ninguna de las fracciones del análisis, podemos observar que en el tratamiento F100 (sin *U. clathrata*) predominaba una mayor producción primaria, reflejado de forma simplificada en la turbidez del agua (Figura 34). Casi el 90% del total de células de plancton producidas en los tanques fueron dinoflagelados y diatomeas, solo el 5% eran ciliados.



La composición proximal del alimento artificial y la *U. clathrata* se presentan en la Tabla 29, donde los valores del alga están constituidos por un promedio de tres muestreos durante el bioensayo, siendo el contenido de ceniza y proteína los parámetros más variables en la *U. clathrata*.

El perfil de ácidos grasos del alimento artificial y de la *U. clathrata* utilizados en el experimento se muestra en la Tabla 30. El FA más abundante y en similar proporción tanto para el alimento y la *U. clathrata* fue el ácido palmítico (>23%). Proporcionalmente al contenido de grasa, el total SFA en el alimento artificial fue 7% mayor que en la *U. clathrata*. La *U. clathrata* presenta un alto porcentaje de PUFAs (34%), principalmente LNA (18:3n-3) y LA (18:2n6) con 14.5 y 9.6% respectivamente.

**Tabla 27.** Análisis de producción natural en los tanques experimentales de acuerdo a una clasificación por tipo de célula en experimento de cocultivo en primavera (experimento 6).

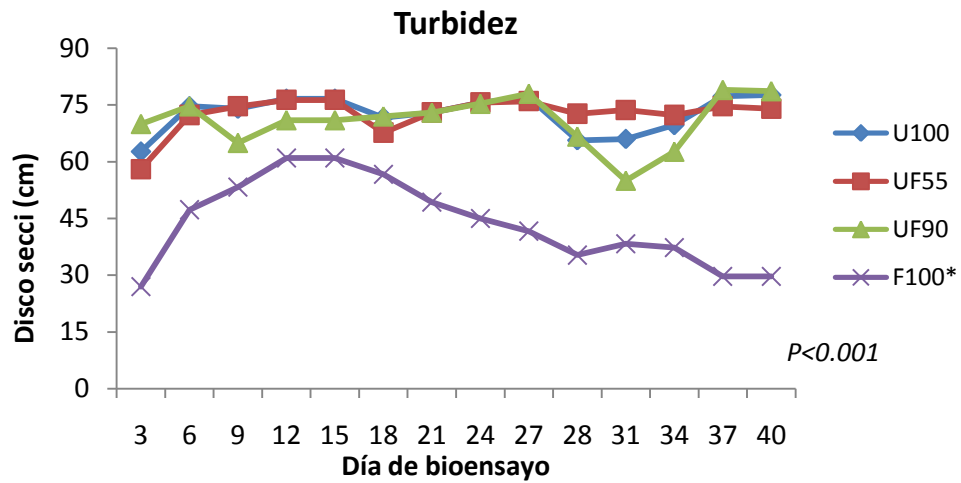
|       | Diatomeas (cel/mL) | Dinoflagelados (cel/mL) | Cianofitas (cel/mL) |
|-------|--------------------|-------------------------|---------------------|
| U100  | 1327 ± 616         | 798 ± 1181              | 38 ± 60             |
| UF55  | 703 ± 728          | 703 ± 477               | 10 ± 13             |
| UF90  | 1159 ± 869         | 500 ± 428               | 12 ± 22             |
| F100  | 25511 ± 43319      | 3113 ± 5171             | 18 ± 19             |
| Anova | 0.459              | 0.613                   | 0.729               |

U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. Valores promedio de tres replicas en tres tiempos ± desviación estándar durante el experimento.

**Tabla 28.** Análisis de producción natural en los tanques experimentales de acuerdo al tamaño de las células en experimento de cocultivo en primavera (experimento 6).

|       | Microfitoplancton (cel/mL) | Nanoplacton (cel/mL) | Total (cel/mL) |
|-------|----------------------------|----------------------|----------------|
| U100  | 2166 ± 1194                | 41955 ± 36756        | 44121 ± 36383  |
| UF55  | 1416 ± 291                 | 26492 ± 27709        | 27908 ± 27993  |
| UF90  | 1671 ± 534                 | 18291 ± 19640        | 19962 ± 19972  |
| F100  | 28641 ± 48508              | 42220 ± 29764        | 70861 ± 73627  |
| Anova | 0.473                      | 0.694                | 0.545          |

Microfitoplancton (>20 µm), está constituido por protozoos y microalgas; Nanoplacton (< 20µm), incluye dinoflagelados en un porcentaje importante. Valores promedio de tres replicas en tres tiempos durante el experimento. Valores promedio de tres replicas en tres tiempos ± desviación estándar durante el experimento.



**Figura 34.** Análisis de turbidez en los estanques experimentales de cocultivo en época de primavera (experimento 6). U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial.

**Tabla 29.** Composición proximal del alimento artificial y la *U. clathrata*, utilizados en el bioensayo de cocultivo en época de primavera (experimento 6).

|                  | Alimento artificial | <i>U. clathrata</i> |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Humedad          | 9.5±0.2             | 89.2±0.5            |
| Proteína         | 33.3±0.1            | 20.7±3.1            |
| Lípidos          | 8.9±0.2             | 1.5±0.3             |
| Fibra cruda      | 1.3±0.1             | 5.6±0.5             |
| Ceniza           | 8.6±0.1             | 38.4±5.5            |
| ELN              | 47.9±0.1            | 33.3±3.5            |
| Energía (Kcal/g) | 4.9                 | 3.1                 |

U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. ELN = extracto libre de nitrógeno. Valores promedio de tres replicas ± desviación estándar. En el caso de la *U. clathrata*, el valor promedio es a partir de 3 muestras colectadas y analizadas por triplicado (n=3x3).

**Tabla 30.** Perfil de ácidos grasos (% relativo al total de FA) del alimento artificial y la *U. clathrata* del cocultivo en época de primavera (experimento 6).

| Ácido graso   | Alimento artificial | <i>U. clathrata</i> |
|---------------|---------------------|---------------------|
| 14:0          | 3.27                | ND                  |
| 14:1 $n$ -3   | ND                  | 1.57                |
| 16:0          | 23.07               | 23.5                |
| 16:1 $n$ -7   | 3.20                | 0.62                |
| 18:0          | 3.10                | ND                  |
| 18:1 $n$ -9   | 28.5                | 6.99                |
| 18:2 $n$ -6   | 19.3                | 9.61                |
| 18:3 $n$ -3   | 3.03                | 14.5                |
| 18:4 $n$ -3   | 0.20                | 5.7                 |
| 20:0          | 3.25                | 0.27                |
| 20:1 $n$ -9   | 0.70                | ND                  |
| 20:5 $n$ -3   | 5.51                | 2.04                |
| 22:1 $n$ -9   | ND                  | ND                  |
| 22:5 $n$ -3   | 0.93                | 0.74                |
| 22:6 $n$ -3   | 5.56                | 1.76                |
| 24:1 $n$ -9   | 0.04                | ND                  |
| $\Sigma$ SFA  | 32.7                | 25.3                |
| $\Sigma$ MUFA | 32.4                | 9.18                |
| $\Sigma$ PUFA | 34.6                | 34.1                |

U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. ND = no detectado.  $\Sigma$ SFA = sumatoria de FA saturados;  $\Sigma$ MUFA = sumatoria de FA monosaturados;  $\Sigma$ PUFA = sumatoria de FA polinsaturados.

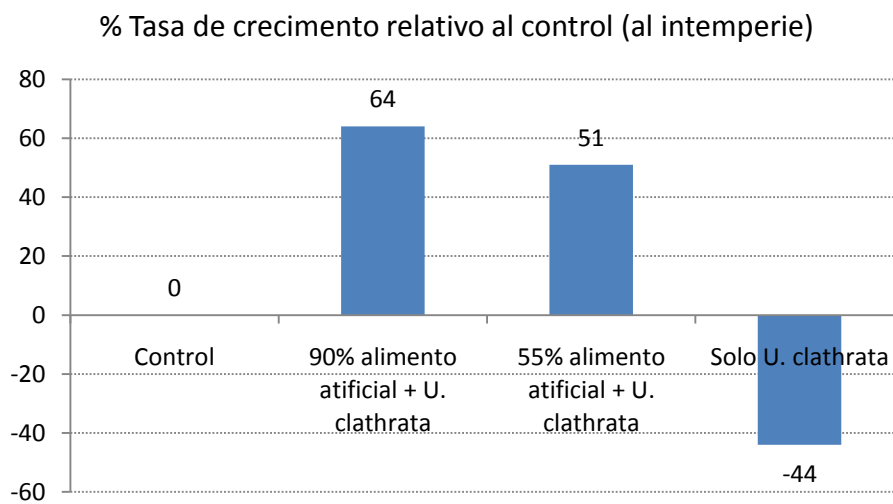
Los resultados zootécnicos de los camarones en el experimento bajo los diferentes tratamientos, se presentan en la Tabla 31. La tasa de sobrevivencia entre los tratamientos (80-90%) no presentó diferencias significativas ( $P=0.61$ ). Después de las seis semanas de bioensayo, los camarones de los tratamientos UF55 y UF90 mostraron una clara mejora en el crecimiento respecto al control de monocultivo (F100) y el cocultivo sin alimento artificial (U100), observándose diferencias altamente significativas en términos de TC y TCE ( $P<0.001$  y  $P=0.001$  respectivamente). La pTCA se mejoró significativamente en los tratamientos de cocultivo ( $P=0.004$ ). En la figura 35 se observa la tasa de crecimiento relativo, donde se considera el crecimiento de los camarones control (F100) como 100% y a partir de ahí la ganancia o pérdida de crecimiento de los demás tratamientos respecto a este control; se hace evidente una ganancia de entre 51 y 64% en crecimiento en los camarones en cocultivo con suplementación de alimento artificial, mientras que en los camarones en cocultivo sin alimento artificial tienen una

pérdida de crecimiento de 44% respecto al control. El consumo de *U. clathrata* se confirmó mediante la observación de las heces, donde las heces de color verde correspondían a la *U. clathrata* (referencia tratamiento U100) y las heces café oscuro al alimento artificial (referencia tratamiento F100), en el caso de los tratamientos de cocultivo suplementados con alimento artificial se observaron heces bicolor con bandas longitudinales verde / café (Figura 36), sugiriendo un consumo alternado pero con una segregación estomacal con un tránsito intestinal simultáneo de las fuentes alimentarias.

**Tabla 31.** Parámetros zootécnicos de los camarones en cocultivo (primavera) con *U. clathrata* y monocultivo en diferentes regímenes alimenticios del experimento 6.

|         | Tratamiento           |                       |                       |                       | Anova  |
|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|
|         | U100                  | UF55                  | UF90                  | F100                  |        |
| Wf (g)  | 5.6±0.4 <sup>a</sup>  | 9.4±0.9 <sup>c</sup>  | 9.5±0.6 <sup>c</sup>  | 7.3±0.1 <sup>b</sup>  | 0.008  |
| TC (%)  | 61±13 <sup>a</sup>    | 165±25 <sup>c</sup>   | 179±18 <sup>c</sup>   | 109±4 <sup>b</sup>    | <0.001 |
| CI (g)  | --                    | 7.1±0.4 <sup>a</sup>  | 11.0±0.5 <sup>b</sup> | 12.9±0.7 <sup>c</sup> | 0.001  |
| CI Kcal | --                    | 34.8                  | 54.0                  | 63.2                  |        |
| TCE     | 1.13±0.2 <sup>a</sup> | 2.32±0.2 <sup>b</sup> | 2.44±0.1 <sup>b</sup> | 1.30±0.4 <sup>a</sup> | 0.001  |
| pTCA    | --                    | 1.24±0.2 <sup>a</sup> | 1.62±0.4 <sup>a</sup> | 2.61±0.8 <sup>b</sup> | 0.004  |
| % S     | 92±11                 | 80±10                 | 95±4                  | 89±10                 | 0.610  |

U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. Wf = peso final; CI = consumo alimento artificial; CI Kcal= consumo de kilocalorías del alimento artificial; TC = tasa de crecimiento; TCE = tasa de crecimiento específico; pTCA = tasa de conversión alimenticia relativa al alimento artificial; S = tasa de sobrevivencia. Los valores son el promedio de tres replicados ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).



**Figura 35.** Tasa de crecimiento relativo al tratamiento control (línea base) de los diferentes tratamientos experimentales con *U. clathrata* en cocultivo.



**Figura 36.** Foto de heces de camarón alimentados con alimento artificial y *U. clathrata* en cocultivo de primavera (experimento 6). Heces verdes corresponden al consumo de *U. clathrata*, heces cafés corresponden al consumo de alimento artificial.

La composición proximal del cuerpo entero de los camarones de los diferentes tratamientos después de las 6 semanas de bioensayo se presenta en la Tabla 32. Los camarones del tratamiento UF90 presentaron un menor contenido de humedad (73.4%) y la mayor cantidad de proteína (18.7%) comparado con los demás tratamientos. El contenido de grasa en los camarones se correlacionó ( $R^2=0.997$ , siguiendo un modelo cuadrático) con la relación de alimento artificial ofrecido a los camarones (Figura 37). En el caso de los camarones U100 (sin alimento artificial) se observó un incremento significativo ( $P=0.025$ ) en el contenido de ceniza (3.6%) respecto a los tratamientos en cocultivo con adición de alimento artificial (2.5-2.8%).

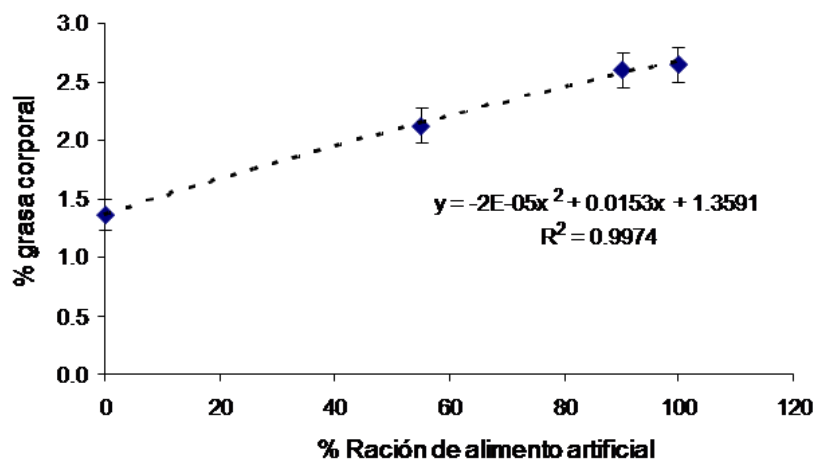
El perfil de FA de los camarones completos de los diferentes tratamientos al final del experimento se presenta en la Tabla 33. El FA predominante en todos los camarones es el ácido palmítico (16:0), siendo los camarones del tratamiento en monocultivo (F100) los que presentaron una mayor proporción de este FA pero sin obtener diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.079$ ). Los niveles de EPA (20:5n3) y DHA (22:6n3) en los camarones U100 fueron hasta en 3 y 4% mayores en proporción al total de FA, comparado con el resto de los tratamientos ( $P<0.05$ ). El porcentaje de MUFAs en los camarones F100 fue menor pero no significativo respecto a los

tratamientos en cocultivo ( $P=0.05$ ). Los camarones del tratamiento U100 presentaron una disminución significativa de la proporción de LA (18:2n6) y un aumento significativo de la proporción de LNA (18:3n3) comparado con los demás tratamientos ( $P=0.001$  y  $P=0.004$  respectivamente).

**Tabla 32.** Composición proximal de los camarones enteros ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$  en base húmeda) de cocultivo (primavera) con *U. clathrata* y en monocultivo con diferentes raciones de alimento artificial, después de seis semanas de experimentación.

|             | Tratamiento             |                        |                         |                        | Anova  |
|-------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|--------|
|             | U100                    | UF55                   | UF90                    | F100                   |        |
| Humedad     | 76.3±0.2 <sup>b</sup>   | 76.3±1.2 <sup>b</sup>  | 73.4±1.4 <sup>a</sup>   | 74.4±1.0 <sup>ab</sup> | 0.028  |
| Lípidos     | 1.4±0.1 <sup>a</sup>    | 2.1±0.1 <sup>b</sup>   | 2.6±0.1 <sup>c</sup>    | 2.6±0.1 <sup>c</sup>   | <0.001 |
| Proteína    | 17.0±0.3 <sup>a</sup>   | 16.9±0.7 <sup>a</sup>  | 18.7±0.3 <sup>b</sup>   | 17.8±0.8 <sup>ab</sup> | 0.035  |
| Ceniza      | 3.6±0.4 <sup>b</sup>    | 2.5±0.3 <sup>a</sup>   | 2.8±0.5 <sup>a</sup>    | 3.1±0.1 <sup>ab</sup>  | 0.025  |
| Fibra Cruda | 1.53±0.03 <sup>ab</sup> | 1.40±0.11 <sup>a</sup> | 1.48±0.12 <sup>ab</sup> | 1.63±0.03 <sup>b</sup> | 0.043  |

U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. Los valores son el promedio de tres replicados  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).



**Figura 37.** Correlación entre el contenido de grasa en el camarón completo y la cantidad de alimento artificial suministrado en cocultivo de primavera (experimento 6).

**Tabla 33.** Perfil de FA (% relativo al total de FA) de camarones completos de cocultivo (primavera) con *U. clathrata* y en monocultivo con diferentes raciones de alimento artificial (experimento 6).

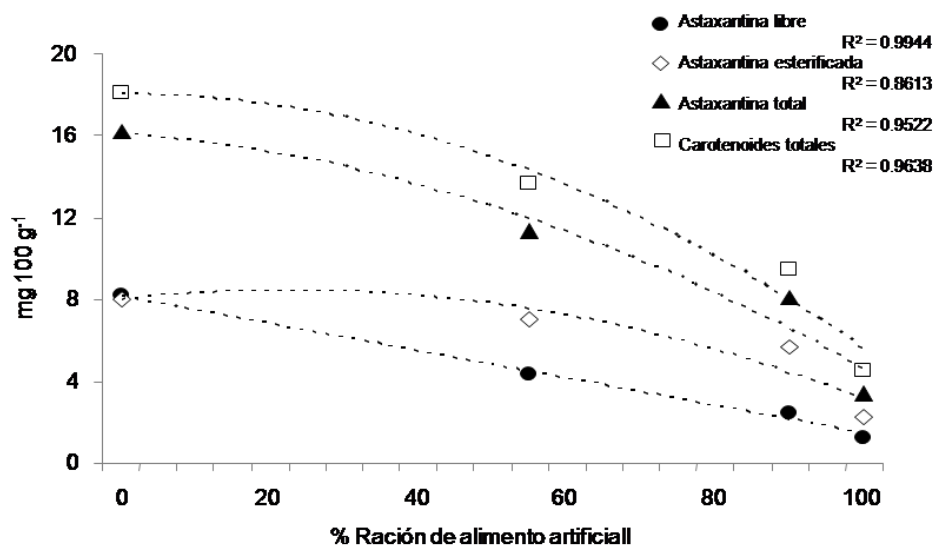
| Ácido graso         | U100                    | UF55                   | UF90                    | F100                   | Anova |
|---------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------|
| 14:0                | 0.69±0.2 <sup>a</sup>   | 1.13±0.1 <sup>b</sup>  | 1.08±0.2 <sup>b</sup>   | 1.30±0.1 <sup>b</sup>  | 0.009 |
| 16:0                | 20.91±1.6               | 20.70±0.6              | 21.05±0.9               | 24.51±2.9              | 0.079 |
| 16:1 <sub>n-7</sub> | 1.34±0.8                | 0.70±0.1               | 0.47±0.1                | 0.54±0.2               | 0.108 |
| 18:0                | 11.65±4.4               | 8.80±2.1               | 7.12±0.5                | 6.20±0.7               | 0.119 |
| 18:1 <sub>n-9</sub> | 16.03±2.4 <sup>ab</sup> | 20.92±2.5 <sup>b</sup> | 17.94±5.4 <sup>ab</sup> | 12.20±0.7 <sup>a</sup> | 0.056 |
| 18:2 <sub>n-6</sub> | 6.19±1.5 <sup>a</sup>   | 15.51±0.6 <sup>b</sup> | 16.02±0.9 <sup>b</sup>  | 15.61±3.0 <sup>b</sup> | 0.001 |
| 18:3 <sub>n-3</sub> | 2.20±0.4 <sup>c</sup>   | 1.81±0.3 <sup>bc</sup> | 1.47±0.1 <sup>ab</sup>  | 1.02±0.1 <sup>a</sup>  | 0.004 |
| 18:4 <sub>n-3</sub> | 0.63±0.4                | 1.20±0.4               | 1.23±0.2                | 0.98±0.2               | 0.157 |
| 20:1 <sub>n-9</sub> | 0.84±0.1                | 1.28±0.4               | 1.45±0.2                | 1.42±0.6               | 0.282 |
| 20:5 <sub>n-3</sub> | 13.95±1.3 <sup>b</sup>  | 10.43±0.5 <sup>a</sup> | 10.79±0.9 <sup>a</sup>  | 10.32±0.9 <sup>a</sup> | 0.003 |
| 22:1 <sub>n-9</sub> | ND                      | 0.16±0.5               | 0.13±0.0                | 0.12±0.1               | 0.967 |
| 22:5 <sub>n-3</sub> | 1.18±0.1 <sup>b</sup>   | 0.71±0.5 <sup>ab</sup> | 0.42±0.1 <sup>a</sup>   | 0.51±0.2 <sup>a</sup>  | 0.005 |
| 22:6 <sub>n-3</sub> | 8.07±2.0 <sup>b</sup>   | 3.74±0.4 <sup>a</sup>  | 3.78±0.8 <sup>a</sup>   | 3.59±0.6 <sup>a</sup>  | 0.032 |
| 24:1 <sub>n-9</sub> | 0.24±0.0                | 0.51±0.2               | 0.48±0.1                | 0.35±0.3               | 0.266 |
| ∑SFA                | 33.2±5.8                | 30.6±2.7               | 29.2±1.1                | 32.0±3.5               | 0.605 |
| ∑MUFA               | 18.5±3.2                | 23.5±1.8               | 20.4±5.1                | 14.6±0.6               | 0.050 |
| ∑PUFA               | 32.2±1.5                | 33.4±0.4               | 33.7±1.1                | 32.0±3.1               | 0.061 |
| ∑HUFA               | 23.2±2.8 <sup>b</sup>   | 14.9±1.7 <sup>a</sup>  | 15.0±2.0 <sup>a</sup>   | 14.4±0.8 <sup>a</sup>  | 0.003 |

U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. ND = no detectado. ∑SFA = sumatoria de FA saturados; ∑MUFA = sumatoria de FA monosaturados; ∑PUFA = sumatoria de FA polinsaturados; ∑HUFA = sumatoria de FA altamente insaturados). Los valores son el promedio de tres replicados ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

El análisis cuantitativo de carotenoides en los camarones completos muestran que el consumo de *U. clathrata* incrementa significativamente ( $P=0.02$ ) el contenido total de carotenoides, siendo el tratamiento U100 con la mayor pigmentación en los camarones (Figura 38). La astaxantina fue el carotenoide más abundante en los camarones (76 a 89% del total de carotenoides). La astaxantina libre y esterificada vario de entre 12.5 y 22.1, y entre 80.3 y 81.9 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente. El contenido de carotenoides en los camarones se correlacionó negativamente con el consumo de alimento artificial (Figura 39).



**Figura 38.** Camarones cosechados y cocidos provenientes de cocultivo con *U. clathrata* (primavera). U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial.



**Figura 39.** Correlación negativa entre el contenido de carotenoides en los camarones y el alimento artificial consumido en cocultivo de primavera (experimento 6).



También se realizó el análisis de pigmentación del primer segmento abdominal de los camarones por reflectancia (cromómetro), donde se observó una coloración roja significativamente mayor ( $P=0.001$ ) en los camarones de los tratamientos U100 y UF55 (Tabla 34). Los camarones del tratamiento U100 resultaron en una coloración amarilla mayor ( $P<0.001$ ) con la menor claridad ( $P=0.02$ ) (siendo mayor en la ausencia de color).

**Tabla 34.** Análisis de pigmentación del músculo de los camarones por reflectancia (cocultivo en primavera).

|       | Coloración            |                        |                       |
|-------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|       | Roja                  | Amarilla               | Claridad              |
| U100  | 16.8±3.9 <sup>b</sup> | 34.0±4.3 <sup>c</sup>  | 65.2±2.3 <sup>a</sup> |
| UF55  | 16.2±4.5 <sup>b</sup> | 30.7±6.1 <sup>b</sup>  | 69.1±3.2 <sup>b</sup> |
| UF90  | 11.5±2.9 <sup>a</sup> | 26.3±2.8 <sup>a</sup>  | 73.7±2.5 <sup>c</sup> |
| F100  | 12.1±4.0 <sup>a</sup> | 29.1±4.3 <sup>ab</sup> | 71.6±4.0 <sup>d</sup> |
| Anova | 0.001                 | <0.001                 | 0.020                 |

U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. Analizados después de haber sido cocidos por 3 min. Los valores son el promedio de tres replicados ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

La textura (firmeza) del músculo de los camarones es un importante parámetro de calidad con el que un producto puede ser aceptado o no por el consumidor. En la tabla 35, se presentan los resultados de firmeza de los camarones de los diferentes tratamientos, donde los camarones del tratamiento UF55 presentaron mayor resistencia al corte, sin embargo no se presentaron diferencias significativas.

**Tabla 35.** Análisis de textura de los camarones del cocultivo en primavera.

|       | Peso promedio de segmentos (g) | Firmeza (lb-f)*        |
|-------|--------------------------------|------------------------|
| U100  | 5.5±0.86 <sup>a</sup>          | 1.6±0.31 <sup>a</sup>  |
| UF55  | 9.6±0.75 <sup>b</sup>          | 2.1±0.59 <sup>b</sup>  |
| UF90  | 9.7±0.70 <sup>b</sup>          | 1.8±0.19 <sup>ab</sup> |
| F100  | 7.0±1.14 <sup>c</sup>          | 1.9±0.20 <sup>ab</sup> |
| Anova | 0.001                          | 0.070                  |

U100 = cocultivo sin alimento artificial; UF55 = cocultivo con 55% de la ración del alimento artificial; UF90 = cocultivo con 90% de la ración del alimento artificial; F100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. \*La textura se reporta como las libras (lb-f) requeridas para romper el tejido. Las letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas, (Duncan,  $\alpha= 0.05$ )

### 6.7.2 Cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto a temperatura promedio de 30°C (verano) (Experimento 7)

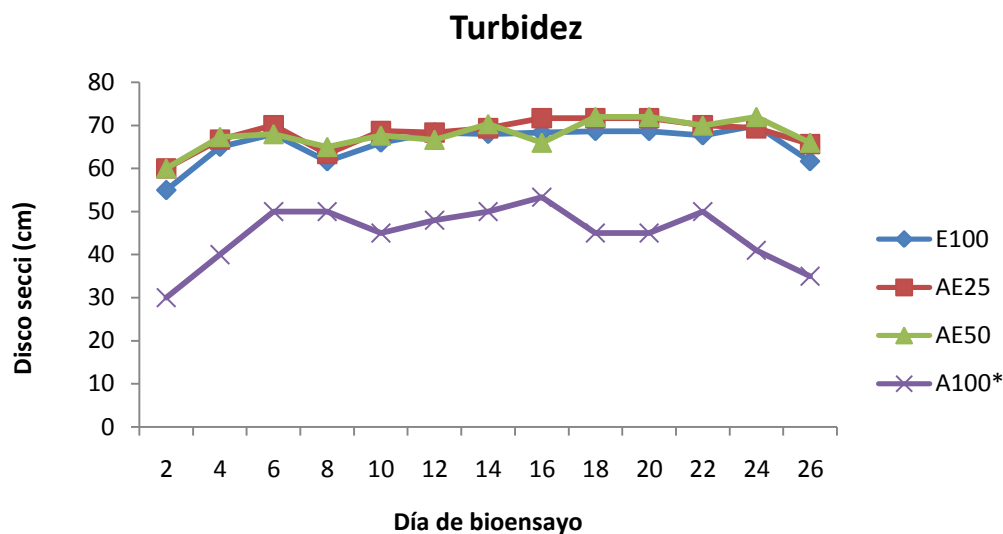
Los promedios de calidad de agua durante el experimento se presentan en la Tabla 36. La temperatura dentro de los tanques experimentales se mantuvo en un rango de entre 29 y 31 °C, con una pH alcalino alrededor de 9. En todos los tanques experimentales se presentó un aumento de oxígeno disuelto de 1 mg L<sup>-1</sup> por las tardes respecto a la mañana. Los niveles de NH<sub>3</sub> estuvieron por debajo de 0.5 mg L<sup>-1</sup>, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos (P>0.05). El contenido de nitratos no fue posible cuantificarse por que la concentración era muy baja.

**Tabla 36.** Parámetros de calidad de agua durante el experimento de cocultivo en época de verano (experimento 7)

| Parámetro                              | Promedio general |
|--|------------------|
| T°C am                                 | 29.0±0.5         |
| T°C pm                                 | 30.4±0.6         |
| pH                                     | 9.2±0.3          |
| Salinidad (ppt)                        | 37.4±1.0         |
| Oxígeno disuelto (mg L <sup>-1</sup> ) |                  |
| sin <i>Ulva</i> AM                     | 3.3±0.4          |
| sin <i>Ulva</i> PM                     | 4.3±0.9          |
| con <i>Ulva</i> AM                     | 3.3±0.4          |
| con <i>Ulva</i> PM                     | 4.5±0.6          |

Para el caso de este experimento, no fue posible cuantificar la producción natural de plancton dentro de los tanques experimentales, sin embargo, de forma indirecta en el análisis de turbidez del agua se observa una diferencia significativa (P<0.05) en los tanques del tratamiento de monocultivo (A100) con respecto a los demás tratamientos en cocultivo con *U. clathrata* (Figura 40), obteniendo un efecto similar que en experimento en época de primavera.

La composición proximal del alimento artificial y la *U. clathrata* se presentan en la Tabla 37, donde los valores del alga están constituidos por un promedio de tres muestreos durante el bioensayo, siendo en este caso el contenido de proteína y fibra cruda los más variables para la *U. clathrata*.



**Figura 40.** Análisis de turbidez en los estanques experimentales de cocultivo en época de verano (experimento 7).

**Tabla 37.** Composición proximal del alimento artificial y la *U. clathrata* del bioensayo de cocultivo en época de verano (experimento 7)

|                  | Alimento artificial | <i>U. clathrata</i> |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Humedad          | 7.6±0.2             | 88.3±1.2            |
| Proteína         | 32.0±0.1            | 20.0±3.6            |
| Lípidos          | 11.8±0.2            | 2.9±1.7             |
| Fibra cruda      | 1.2±0.1             | 7.0±3.0             |
| Ceniza           | 8.6±0.2             | 28.1±1.4            |
| ELN              | 46.5±0.3            | 40.2±2.3            |
| Energía (Kcal/g) | 5.0                 | 3.6                 |

ELN = extracto libre de nitrógeno. Valores promedio de tres replicas ± desviación estándar. En el caso de la *U. clathrata*, el valor promedio es a partir de 3 muestras colectadas y analizadas por triplicado (n=3x3).

Los resultados zootécnicos de los camarones en el experimento se presentan en la Tabla 38. Después de las cuatro semanas de bioensayo, la tasa de sobrevivencia entre los tratamientos fue mayor al 95% para todos los tratamientos. A diferencia del experimento llevado a cabo en época de primavera, el tratamiento de monocultivo (A100) presentó un crecimiento significativamente mejor que los camarones en cocultivo ( $P<0.001$ ). La pTCA de los tratamientos con alimento artificial fue menor a 1, donde los tratamientos AE25 y AE50 resultaron con valores para este parámetro de 0.4 y 0.6 ( $P<0.001$ ). Se hizo

evidente el consumo de *U. clathrata* en las heces siguiendo la observación del experimento en época de primavera.

La composición proximal del cuerpo entero de los camarones de los diferentes tratamientos después de las cuatro semanas de bioensayo se presenta en la Tabla 39. Se presentaron diferencias significativas en el contenido de lípidos ( $P=0.007$ ) y ceniza ( $P=0.001$ ), siendo en los camarones A100 los de mayor contenido de lípidos (2.3%) y menor contenido de ceniza (2.2%). Se evidencia, al igual que en el experimento de primavera, el efecto del consumo de *U. clathrata* sobre la disminución de lípidos totales en el camarón.

**Tabla 38** Parámetros zootécnicos de los camarones en cocultivo (verano) con *U. clathrata* y monocultivo en diferentes regímenes alimenticios (experimento 7)

|         | Tratamiento          |                        |                        |                        | Anova  |
|---------|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------|
|         | E100                 | AE25                   | AE50                   | A100                   |        |
| Wf (g)  | 1.5±0.2 <sup>a</sup> | 2.3±0.2 <sup>b</sup>   | 3.1±0.2 <sup>c</sup>   | 4.0±0.2 <sup>d</sup>   | <0.001 |
| TC      | 131±26 <sup>a</sup>  | 252±26 <sup>b</sup>    | 360±29 <sup>c</sup>    | 501±17 <sup>d</sup>    | <0.001 |
| CI (g)  |                      | 0.70±0.01 <sup>a</sup> | 1.40±0.01 <sup>b</sup> | 2.73±0.01 <sup>c</sup> | <0.001 |
| CI Kcal | --                   | 3.5                    | 7.0                    | 13.7                   |        |
| pTCA    |                      | 0.43±0.01 <sup>a</sup> | 0.57±0.01 <sup>b</sup> | 0.80±0.01 <sup>c</sup> | <0.001 |
| % S     | 100                  | 97±2                   | 96±2                   | 98±2                   | 0.264  |

E100 = cocultivo sin alimento artificial; AE25 = cocultivo con 25% de la ración del alimento artificial; AE50 = cocultivo con 50% de la ración del alimento artificial; A100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. Wf = peso final; TC = tasa de crecimiento; CI = consumo de alimento artificial; CI Kcal= consumo de kilocalorías del alimento artificial; pTCA = tasa de conversión alimenticia relativa al alimento artificial; S = tasa de sobrevivencia. Los valores son el promedio de tres replicados ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**Tabla 39.** Composición proximal de los camarones completos (g 100g<sup>-1</sup> en base húmeda) de cocultivo (verano) con *U. clathrata* y en monocultivo con diferentes raciones de alimento artificial (experimento 7).

|             | Tratamiento          |                       |                       |                      | Anova |
|-------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-------|
|             | E100                 | AE25                  | AE50                  | A100                 |       |
| Humedad     | 75.5±0.5             | 76.3±2.2              | 75.2±1.3              | 74.9±1.2             | 0.055 |
| Lípidos     | 1.6±0.1 <sup>a</sup> | 1.8±0.1 <sup>ab</sup> | 2.1±0.1 <sup>bc</sup> | 2.3±0.1 <sup>c</sup> | 0.007 |
| Proteína    | 12.7±0.3             | 12.8±0.4              | 13.2±1.0              | 13.1±0.4             | 0.249 |
| Ceniza      | 3.0±0.2 <sup>c</sup> | 2.7±0.2 <sup>bc</sup> | 2.6±0.2 <sup>b</sup>  | 2.2±0.1 <sup>a</sup> | 0.001 |
| Fibra Cruda | 1.1±0.1              | 1.0±0.1               | 1.0±0.1               | 1.0±0.1              | 0.471 |

E100 = cocultivo sin alimento artificial; AE25 = cocultivo con 25% de la ración del alimento artificial; AE50 = cocultivo con 50% de la ración del alimento artificial; A100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. Los valores son el promedio de tres replicados ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

El perfil de FA de los camarones completos de los diferentes tratamientos al final del experimento se presenta en la Tabla 40. En este experimento los FA más abundantes en los camarones fueron el 16:0 y 18:0, obteniendo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.001$ ), donde los camarones del tratamiento E100 resultaron con la mayor proporción de 16:0 pero a su vez con la menor proporción de 18:0. En los tratamientos con alimento artificial, los camarones resultaron con un acumulación significativamente mayor ( $P<0.05$ ) en el total de SFAs y MUFAs respecto a los camarones E100 (33% contra >42% y 29% contra >32% respectivamente). De igual forma que en el experimento en época de primavera, los camarones en cocultivo sin adición de alimento artificial, presentaron un acumulación significativamente mayor de 18:3n3, sin embargo en el caso del 18:2n6 este efecto no se repitió.

**Tabla 40.** Perfil de FA (% relativo al total de FA) de camarones completos de cocultivo (verano) con *U. clathrata* y en monocultivo con diferentes raciones de alimento artificial (experimento 7).

| Ácido graso | E100        | AE25        | AE50        | A100        | Anova  |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|
| 14:0        | 0.3±0.2 a   | 0.3±0.1 a   | 0.3±0.2 a   | 0.9±0.0 b   | <0.001 |
| 16:0        | 26.4±2.5 d  | 19.5±1.4 ab | 19.0±1.8 a  | 22.7±0.4 c  | 0.002  |
| 16:1n-7     | ND          | 3.6±2.2     | 4.6±3.6     | 0.7±0.2     | 0.111  |
| 18:0        | 6.2±0.4 a   | 22.6±10.0 b | 25.8±10.3 b | 21.3±1.3 b  | <0.001 |
| 18:1n-9     | 10.6±2.4 a  | 10.6±2.4 a  | 17.6±1.8 b  | 18.6±2.1 b  | 0.039  |
| 18:2n-6     | 17.4±0.7 ab | 17.6±1.8 ab | 16.9±5.3 a  | 18.1±0.5 b  | 0.001  |
| 18:3n-3     | 6.2±0.3 c   | 1.9±0.3 b   | 1.3±0.3 ab  | 0.9±0.0 a   | <0.001 |
| 18:4n-3     | 0.6±0.1 a   | 1.0±0.1 a   | 1.0±0.3 a   | 1.5±0.0 b   | 0.039  |
| 20:5n-3     | 1.4±0.1 a   | 5.0±1.1 c   | 3.1±0.9 b   | 2.4±0.1 ab  | 0.001  |
| 22:1n-9     | 12.7±0.2    | 10.4±2.0    | 10.7±2.2    | 12.4±0.2    | 0.203  |
| 22:5n-3     | 0.6±0.1     | 1.1±0.6     | 0.7±0.6     | 0.3±0.1     | 0.051  |
| 22:6n-3     | 11.6±0.8 c  | 8.5±1.7 a   | 9.9±2.1 bc  | 13.2±0.3 d  | 0.001  |
| 24:1n-9     | 5.9±1.1 ab  | 7.1±1.5 b   | 5.7±1.0 ab  | 4.4±0.4 a   | 0.029  |
| ∑SFA        | 33.0±2.1 a  | 42.4±2.5 b  | 45.0±2.6 b  | 44.9±0.63 b | <0.001 |
| ∑MUFA       | 29.1±2.6 a  | 32.0±2.1 b  | 38.7±1.3 b  | 36.2±1.2 b  | 0.007  |
| ∑PUFA       | 37.9±0.7 b  | 35.2±1.8 ab | 33.0±2.3a   | 36.3±0.4 ab | 0.021  |
| ∑HUFA       | 13.7±1.2 a  | 14.7±0.8 ab | 13.7±1.5 a  | 15.8±1.3 b  | 0.021  |

E100 = cocultivo sin alimento artificial; AE25 = cocultivo con 25% de la ración del alimento artificial; AE50 = cocultivo con 50% de la ración del alimento artificial; A100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. ND = no detectado. ∑SFA = sumatoria de FA saturados; ∑MUFA = sumatoria de FA monosaturados; ∑PUFA = sumatoria de FA polinsaturados; ∑HUFA = sumatoria de FA altamente insaturados). Los valores son el promedio de tres replicados ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

El análisis cuantitativo de carotenoides en los camarones muestra un comportamiento similar de acumulación de carotenoides totales en los camarones en cocultivo a excepción del tratamiento AE25 el cual no presentó diferencias significativas respecto al control de monocultivo (A100) (Tabla 41). En los camarones bajo cocultivo se detectó la presencia de luteína libre, la cual es el carotenoide principal de la *U. clathrata*.

**Tabla 41.** Composición de carotenoides (mg 100 g<sup>-1</sup>) en camarones completos del experimento de cocultivo en época de verano (experimento 7).

|                          | E100      | AE25     | AE50      | A100     | Anova  |
|--------------------------|-----------|----------|-----------|----------|--------|
| Astaxantina libre        | 2.6±0.2c  | 0.8±0.1a | 3.3±0.4d  | 1.5±0.5b | <0.001 |
| Astaxantina esterificada | 4.6±0.5b  | 2.1±0.1a | 4.2±0.5b  | 2.6±0.3a | <0.001 |
| Astaxantina total        | 7.2±0.6c  | 2.9±0.2a | 7.5±0.9c  | 4.0±0.7b | <0.001 |
| Carotenoides totales     | 14.3±1.0b | 4.2±0.4a | 12.8±1.9b | 4.5±0.6a | <0.001 |
| Luteína libre            | 3.9±0.8b  | 3.9±0.8b | 0.1±0.3a  | ND       | <0.001 |
| β-caroteno               | 0.1±0.0a  | ND       | 0.3±0.1b  | ND       | <0.001 |

E100 = cocultivo sin alimento artificial; AE25 = cocultivo con 25% de la ración del alimento artificial; AE50 = cocultivo con 50% de la ración del alimento artificial; A100 = monocultivo con 100% de la ración del alimento artificial. ND = no detectado. Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

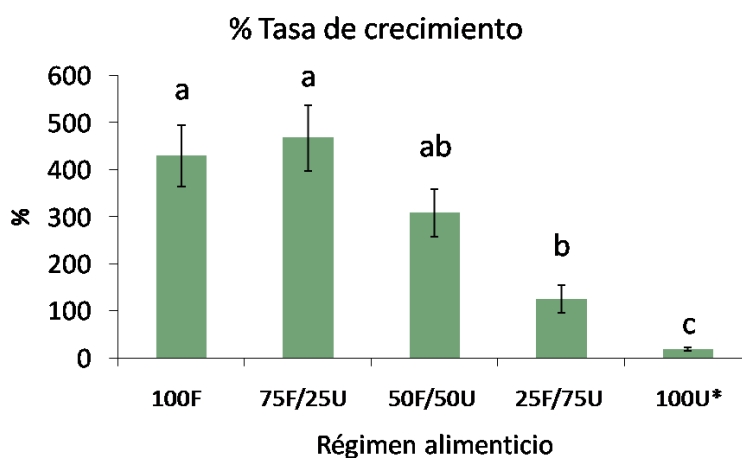
### 6.8 Determinación de contribuciones nutricionales de carbono y nitrógeno en el camarón a partir de *U. clathrata* y alimento artificial, mediante el análisis de isótopos estables (Experimento 8)

Se presentó una gran variabilidad en el crecimiento de los camarones bajo los distintos regímenes alimenticios (Tabla 42), sin embargo, se observa una clara tendencia de incremento en la tasa de crecimiento de los camarones del tratamiento 75F/25U (467%), seguidos por los camarones del tratamiento 100F (429%) (Figura 41). Los camarones alimentados solo con *U. clathrata* (100U) mostraron muy pobre crecimiento (18%) donde solo el 23% de los organismos sobrevivieron al día 21 (tomados para análisis isotópico). Las tasas de sobrevivencia más altas al final del experimento (93-95%), corresponden a los regímenes alimenticios de 100F y 75F/25U, mientras que los tratamientos 50F/50U y 25F/75U presentaron sobrevivencias de 78 y 65% respectivamente.

**Tabla 42.** Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con diferentes regímenes alimenticios de *U. clathrata* y alimento artificial (experimento 8).

|         | Tratamiento |             |             |            |           |
|---------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------|
|         | 100F        | 75F/25U     | 50F/50U     | 25F/75U    | 100U*     |
| Wf (mg) | 995 ± 289a  | 1067 ± 364a | 768 ± 273ab | 424 ± 207b | 221 ± 49c |
| TC %    | 429 ± 154a  | 467 ± 193a  | 308 ± 145ab | 125 ± 110b | 18 ± 126c |
| CI (g)  | 0.94        | 0.81        | 0.43        | 0.14       | -         |
| CA (g)  | -           | 0.4         | 0.44        | 0.65       | 1.32      |
| CI Kcal | 4.8         | 4.1         | 2.2         | 0.7        |           |
| % S     | 95 ± 13a    | 93 ± 11a    | 78 ± 11ab   | 60 ± 21b   | 23 ± 4c   |

100F = alimento artificial *ad libitum*; 75F/25U = 75% de alimento artificial y 25% *U. clathrata* fresca; 50F/50U = 50% de alimento artificial y 50% *U. clathrata* fresca; 25F/75U = 25% de alimento artificial y 75% *U. clathrata* fresca; 100U = *U. clathrata* fresca *ad libitum*. Wf = peso final; TC = tasa de crecimiento; CI = consumo de alimento artificial en base seca; CA = consumo de alga en base seca; CI Kcal= consumo de kilocalorías del alimento artificial; S = tasa de sobrevivencia. \* Valores calculados al día 21 de bioensayo. Los valores esta expresados como promedios ± desviación estándar (n=8-20). Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias significativas (Duncan,  $\alpha=0.05$ ).



**Figura 41.** Tasa de crecimiento de camarones alimentados durante 28 días con diferentes regímenes alimenticios con *U. clathrata* fresca y alimento artificial. \* Valor estimado a los 21 días de bioensayo. 100F = alimento artificial *ad libitum*; 75F/25U = 75% de alimento artificial y 25% *U. clathrata* fresca; 50F/50U = 50% de alimento artificial y 50% *U. clathrata* fresca; 25F/75U = 25% de alimento artificial y 75% *U. clathrata* fresca; 100U = *U. clathrata* fresca *ad libitum*.

### Cambio isotópico y factores de discriminación

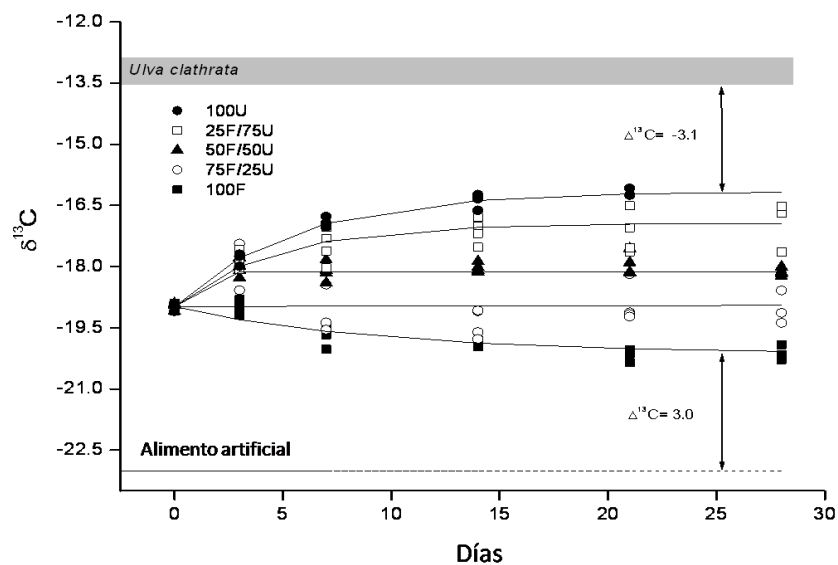
El alimento artificial y la *U. clathrata* presentaron valores contrastantes de  $\delta^{13}\text{C}$  ( $-23.0 \pm 0.1$  y  $-13.1 \pm 0.6$  ‰, respectivamente) y  $\delta^{15}\text{N}$  ( $9.7 \pm 0.2$  y  $-3.5 \pm 0.4$  ‰, respectivamente). Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en la *U. clathrata* variaron ligeramente

durante el experimento, debido al tiempo de cultivo del alga y su almacenaje en refrigeración, sin embargo, esta variabilidad fue considerada dentro de los modelos de mezclado para estimar las contribuciones relativas dietarias. Ambas fuentes dietarias tuvieron una influencia en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los camarones en todos los tratamientos. Al final del experimento, los valores isotópicos del tejido de los camarones en los tratamientos con co-alimentación, presentaron una tendencia fuerte hacia los valores isotópicos de la *U. clathrata*.

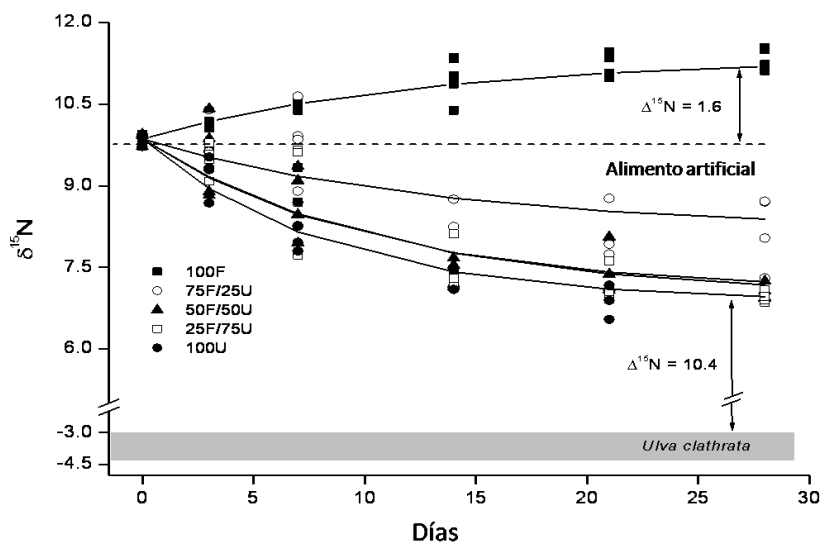
Al día 3 de experimentación, hubo un incremento de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  en el tejido de todo el cuerpo en los camarones de los tratamientos 50F/50U y 25F/75U (Figura 42), atribuido posiblemente al periodo de adaptación de los nutrientes. Los cambios isotópicos fueron más pronunciados para los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  que para los valores de  $\delta^{13}\text{C}$ . El promedio de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  entre los tratamientos varió entre 3.9 y 4.5 ‰, respectivamente. Los camarones en todos los tratamientos alcanzaron el equilibrio isotópico respecto a su dietas, a los 14 días, excepto los camarones alimentados solo con *U. clathrata* (100U), los cuales presentaron un crecimiento mínimo y una alta mortalidad. Como los camarones sobrevivientes en este tratamiento fueron muestreados antes del término del experimento (al día 21), el equilibrio isotópico no fue alcanzado (Figuras 42 y 43), por lo que se estimó este valor para el día 28 a partir del modelo de Hesslein. El valor promedio predicho para  $\delta^{13}\text{C}$  fue -16.17 ‰, el cual es muy similar al promedio de los valores observados en los camarones en el día 21 (-16.30 ‰). El valor promedio predicho para  $\delta^{15}\text{N}$  fue de 6.60 ‰ para el día 28, de igual forma cercano al valor promedio del día 21 (6.86 ‰). Los valores isotópicos predichos para este tratamiento fueron usados como valores isotópicos control negativos para corregir los factores de discriminación entre los camarones y la *U. clathrata*.

Los factores de discriminación entre los camarones y las dietas fueron de igual forma contrastantes. El valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  entre los camarones y el alimento artificial después de alcanzar el equilibrio isotópico fue 3.0 ‰, mientras que los camarones alimentados solo con *U. clathrata* presentaron un inusual valor negativo de -3.1‰ (Figura 42). Por otro lado, el valor promedio de  $\Delta^{15}\text{N}$  entre los camarones y las dietas fue de 1.6 ‰ para los alimentados solo con alimento artificial y 10.4 ‰ para los alimentados solo con *U. clathrata* fresca (Figura 43).





**Figura 42** Cambios en los valores isotópicos de carbono (‰) en el cuerpo completo de los camarones alimentados con regímenes alimenticios consistentes en diferentes proporciones de alimento artificial y *U. clathrata* fresca. Las líneas representan los valores predichos generados por el modelo de Hesslein *et al.* (1993) mostrando el mejor ajuste a los datos observados. Las flechas representan los factores de discriminación entre ambas fuentes dietarias y los camarones alimentados con el alimento artificial y la *U. clathrata* fresca.



**Figura 43.** Cambios en los valores isotópicos de nitrógeno (‰) en el cuerpo completo de los camarones alimentados con regímenes alimenticios consistentes en diferentes proporciones de alimento artificial y *U. clathrata* fresca. Las líneas representan los valores predichos generados por el modelo de Hesslein *et al.* (1993) mostrando el mejor ajuste a los datos observados. Las flechas representan los factores de discriminación entre ambas fuentes dietarias y los camarones alimentados con el alimento artificial y la *U. clathrata* fresca.

En la Tabla 43 se muestra la tasa de recambio y tiempo medio en el tejido estimada para carbono y nitrógeno. Las tasas de recambio metabólico variaron entre 0.049 a 0.191 d<sup>-1</sup> para carbono y de 0.013 a 0.100 d<sup>-1</sup> para nitrógeno. Como las tasas de recambio de nitrógeno fueron más lentas que las de carbono, tomo más tiempo para que los valores de δ<sup>15</sup>N alcanzaran un estado estable (Figura 43). Las tasas de recambio siguieron una tendencia a incrementarse en función al consumo de *U. clathrata*, siendo más notorio para el nitrógeno dietético. Los valores de *t*<sub>50</sub> en el tejido completo del camarón descendieron de forma constante a lo largo de los diferentes tratamientos desde 9.5 d (100F) hasta 6.4 d (100U). No fue posible estimar la tasa de recambio de carbono en los camarones de los tratamientos 75F/25U y 50F/50U ya que los valores isotópicos provocados por los regímenes alimenticios durante el experimento, no presentaron una tendencia exponencial en relación a los valores establecidos por la dieta basal (Figura 42), evitando así el uso del modelo Hesslein, que se basa en los cambios isotópicos exponenciales.

**Tabla 43.** Tasa de crecimiento (*k*), tasa metabólica estimada (*m*) y tiempo medio (*t*<sub>50</sub>) de carbono y nitrógeno en los camarones completos alimentados con regímenes alimenticios a diferentes proporciones de alimento artificial y *U. clathrata* fresca.

| Tratamiento | Carbono                     |                              |                            | Nitrógeno             |                             |                            |                       |
|-------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|
|             | <i>k</i> (d <sup>-1</sup> ) | <i>m</i> (d <sup>-1</sup> )* | <i>t</i> <sub>50</sub> (d) | Δ <sup>13</sup> C (‰) | <i>m</i> (d <sup>-1</sup> ) | <i>t</i> <sub>50</sub> (d) | Δ <sup>15</sup> N (‰) |
| 100F        | 0.060 ± 0.011 <sup>a</sup>  | 0.049 ± 0.014 <sup>a</sup>   | 6.4 ± 1.0 <sup>b</sup>     | 3.0                   | 0.013 ± 0.009 <sup>a</sup>  | 9.5 ± 1.9 <sup>a</sup>     | 1.6                   |
| 75F/25U     | 0.062 ± 0.011 <sup>a</sup>  | nd                           | nd                         | -                     | 0.013 ± 0.015 <sup>a</sup>  | 9.2 ± 2.4 <sup>a</sup>     | -                     |
| 50F/50U     | 0.050 ± 0.015 <sup>a</sup>  | nd                           | nd                         | -                     | 0.048 ± 0.015 <sup>a</sup>  | 7.1 ± 1.5 <sup>ab</sup>    | -                     |
| 25F/75U     | 0.029 ± 0.015 <sup>ab</sup> | 0.191 ± 0.042 <sup>b</sup>   | 3.2 ± 0.7 <sup>a</sup>     | -                     | 0.062 ± 0.012 <sup>ab</sup> | 7.6 ± 1.9 <sup>ab</sup>    | -                     |
| 100U        | 0.008 ± 0.019 <sup>b</sup>  | 0.176 ± 0.008 <sup>c</sup>   | 6.4 ± 0.6 <sup>b</sup>     | -3.1                  | 0.100 ± 0.013 <sup>b</sup>  | 6.4 ± 0.9 <sup>b</sup>     | 10.4                  |

100F = alimento artificial *ad libitum*; 75F/25U = 75% de alimento artificial y 25% *U. clathrata* fresca; 50F/50U = 50% de alimento artificial y 50% *U. clathrata* fresca; 25F/75U = 25% de alimento artificial y 75% *U. clathrata* fresca; 100U = *U. clathrata* fresca *ad libitum*. nd = no determinado. \*Los valores de *m* fueron estimados de valores esperados ajustados sobre los valores observados, R<sup>2</sup>=0.63 a 0.98. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas a *P*<0.05.

Los resultados del modelo isotópico de mezclado indicaron que los camarones de los tres regímenes de co-alimentación, incorporaron de forma significativa, una mayor cantidad de carbono y nitrógeno dietario de la *U. clathrata* fresca que del alimento artificial (Tabla 44). Al final del experimento, los camarones del tratamiento 75F/25U

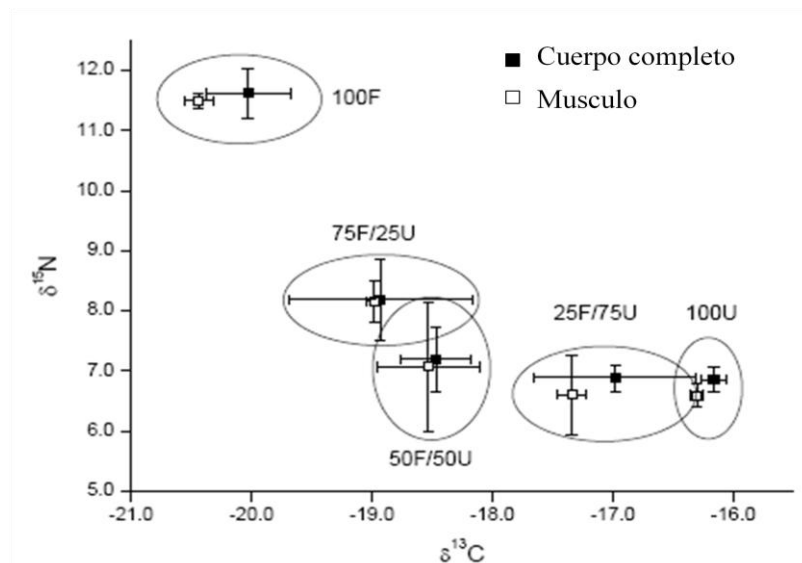
incorporaron 52% del carbono proveniente del alimento artificial y 48% de la *U. clathrata*. Los camarones de los tratamientos 50F/50U y 25F/75U, incorporaron de forma significativa, mayor cantidad de carbono dietario proveniente de la *U. clathrata* comparado con el valor esperado de la proporción de carbono ofrecida en los regímenes de co-alimentación. Los camarones en co-alimentación 25F/75U y 50F/50U, incorporaron la mayoría de su nitrógeno dietario a partir de la *U. clathrata*. Las contribuciones dietarias estimadas para el músculo del camarón, siguieron un patrón similar a las contribuciones nutricionales incorporadas en el organismo completo. El carbono incorporado en el tejido muscular a partir del alimento artificial fue 5-10% mayor que la proporción estimada para todo el cuerpo (con extracción de lípidos), mientras que el nitrógeno depositado fue 4-8 % mayor en el músculo, comparado con las muestras de camarón completo sin tratar (sin extracción) (Tabla 44), siendo estas diferencias no significativas.

En la Figura 44 se combina los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los camarones completos y del tejido muscular, donde se puede observar gráficamente la contribución en materia orgánica a partir del alimento artificial y la *U. clathrata*. Aunque las distancia euclidianas indican que los camarones de los tratamientos 75F/25U y 50F/50U incorporan cantidades similares (~50%) de materia seca de ambas fuentes, los valores de contribución corregidos por la concentración elemental (Tabla 44) en estos tratamiento muestran una mayor incorporación de materia seca a partir de la *U. clathrata* (70-80%). Debido a su menor contenido de carbono y nitrógeno, la *U. clathrata* tenía que ser consumida e incorporada en mayor cantidad con la finalidad de abastecer la contribución elemental observada en los camarones completos y en el tejido muscular.

**Tabla 44.** Estimación relativa de proporciones del total de material seca, carbono y nitrógeno suministrado a partir del alimento artificial y la *U. clathrata* fresca, y contribución al crecimiento de los camarones indicada por un modelo de mezclado para dos fuentes y un isótopo.

| Tratamiento       | Esperado          | Observado         |                         |      |         |                         |      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|------|---------|-------------------------|------|
|                   |                   | Todo el organismo |                         |      | Musculo |                         |      |
|                   |                   | min.              | prom                    | max. | min.    | prom                    | max. |
| <b>Carbono</b>    |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| 75A/25U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 79.9 <sup>a</sup> | 43.7              | <b>52.1<sup>b</sup></b> | 60.6 | 54.6    | <b>57.9<sup>b</sup></b> | 61.2 |
| U. clathrata      | 20.1              | 39.4              | <b>47.9</b>             | 56.3 | 38.8    | <b>42.1</b>             | 45.4 |
| 50A/50U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 66.5 <sup>a</sup> | 27.9              | <b>34.5<sup>b</sup></b> | 41.0 | 38.9    | <b>43.5<sup>b</sup></b> | 48.1 |
| U. clathrata      | 33.5              | 59.0              | <b>65.5</b>             | 72.1 | 51.9    | <b>56.5</b>             | 61.1 |
| 25A/75U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 30.5 <sup>a</sup> | 0                 | <b>11.3<sup>b</sup></b> | 22.7 | 9.2     | <b>18.2<sup>b</sup></b> | 27.3 |
| U. clathrata      | 69.5              | 77.3              | <b>88.7</b>             | 100  | 72.7    | <b>81.8</b>             | 90.8 |
| <b>Nitrógeno</b>  |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| 75A/25U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 79.6 <sup>a</sup> | 2.3               | <b>15.9<sup>b</sup></b> | 29.4 | 9.4     | <b>20.5<sup>b</sup></b> | 31.6 |
| U. clathrata      | 20.4              | 70.6              | <b>84.1</b>             | 97.7 | 68.4    | <b>79.5</b>             | 90.6 |
| 50A/50U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 66.1 <sup>a</sup> | 0                 | <b>2.2<sup>b</sup></b>  | 19.1 | 0       | <b>6.9<sup>b</sup></b>  | 14.1 |
| U. clathrata      | 33.9              | 93.5              | <b>97.8</b>             | 100  | 76.2    | <b>93.1</b>             | 100  |
| 25A/75U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 30.1 <sup>a</sup> | 0                 | <b>1.0<sup>b</sup></b>  | 15.8 | 0       | <b>3.2<sup>b</sup></b>  | 8.6  |
| U. clathrata      | 69.9              | 96.9              | <b>99.0</b>             | 100  | 82.0    | <b>96.8</b>             | 100  |
| <b>Total MS**</b> |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| 75F/25U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 66.9 <sup>a</sup> | 19.3              | <b>30.3<sup>b</sup></b> | 41.3 | 23.1    | <b>30.3<sup>b</sup></b> | 37.5 |
| U. clathrata      | 33.1              | 58.7              | <b>69.7</b>             | 80.7 | 62.5    | <b>69.7</b>             | 76.9 |
| 50F/50U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 49.4 <sup>a</sup> | 8.5               | <b>20.2<sup>b</sup></b> | 32.0 | 8.7     | <b>19.4<sup>b</sup></b> | 30.2 |
| U. clathrata      | 50.6              | 68.0              | <b>79.8</b>             | 91.5 | 69.8    | <b>80.6</b>             | 91.3 |
| 25F/75U           |                   |                   |                         |      |         |                         |      |
| Alimento art      | 17.7 <sup>a</sup> | 0                 | <b>6.9<sup>b</sup></b>  | 20.0 | 0       | <b>8.4<sup>b</sup></b>  | 20.3 |
| U. clathrata      | 82.3              | 80.0              | <b>93.1</b>             | 100  | 79.7    | <b>91.6</b>             | 100  |

100F = alimento artificial *ad libitum*; 75F/25U = 75% de alimento artificial y 25% *U. clathrata* fresca; 50F/50U = 50% de alimento artificial y 50% *U. clathrata* fresca; 25F/75U = 25% de alimento artificial y 75% *U. clathrata* fresca; 100U = *U. clathrata* fresca *ad libitum*. \*Las letras indican diferencias significativas entre los valores esperados y el promedio observado de las contribuciones dietarias. \*\*Las contribuciones totales de materia seca fueron estimadas después de corregir por la concentración de carbono y nitrógeno en ambas fuentes dietarias usando la ecuación propuesta por Fry (2006).



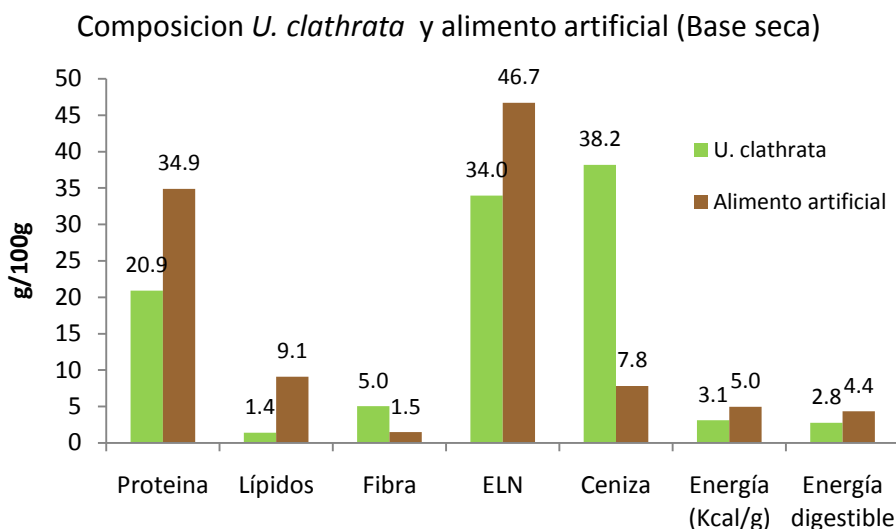
**Figura 44.** Análisis dual de isotopos de carbono y nitrógeno (‰) de cuerpo completo y de tejido muscular de camarón alimentados con regímenes alimenticios, consistentes en diferentes proporciones de alimento artificial (100F) y *U. clathrata* fresca (100U). Valores promedio ± desviación estándar (n= 2-4).

### 6.9 Valores promedio de composición química de los lotes de *U. clathrata* y de los alimentos experimentales utilizados en los experimentos.

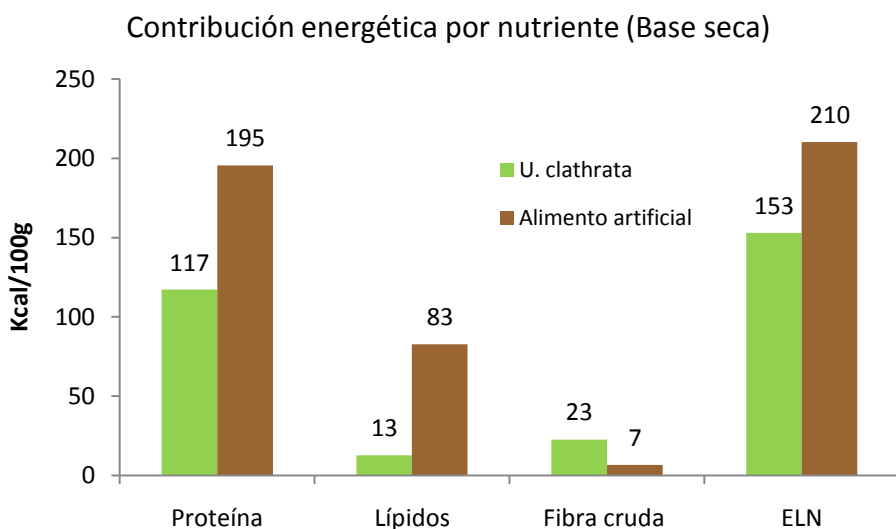
En la Figura 45 se presenta la composición bromatológica, contenido de energía, además de la energía digestible promedio tanto de los lotes de *U. clathrata* como de los alimentos experimentales utilizados en los diferentes experimentos del trabajo de tesis. El cálculo de la energía digestible se realizó utilizando un factor de digestibilidad de energía de 89% para el alimento artificial y de 88% para la *U. clathrata*, dichos factores son los obtenidos por Villarreal-Cavazos en su tesis de Doctorado (2011). Se observa una diferencia evidente entre la composición de nutrientes en base seca entre el alimento y el alga, siendo el contenido de proteína, lípidos, y extracto libre de nitrógeno menor en *U. clathrata* que en el alimento experimental, lo que se ve reflejado en una menor disponibilidad de energía en el alga que en el equivalente en peso seco del alimento artificial (Figura 46).

En el perfil promedio de ácidos grasos (del total de lípidos) se observa una menor proporción de LA, EPA y DHA, y una mayor proporción de LNA en *U. clathrata* que en los alimentos experimentales, en el caso de la proporción de ARA y total de omegas-3, el alga y el alimento son similares (Figura 47). En el perfil promedio de aminoácidos

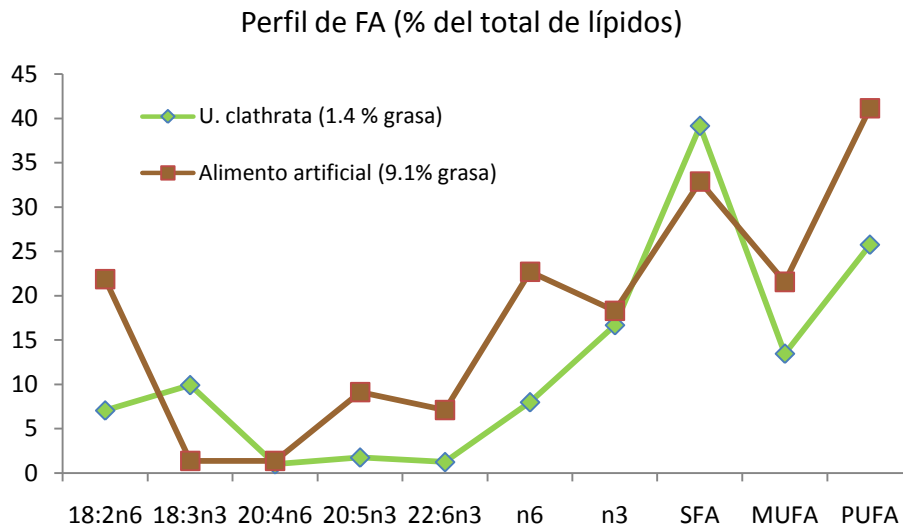
(del total de proteína) no presenta grandes diferencias entre la *U. clathrata* y el alimento experimental, sin embargo de los AAE, Lys, His, Leu y Ile resultan en menor proporción en el alga que en el alimento artificial (Figura 48).



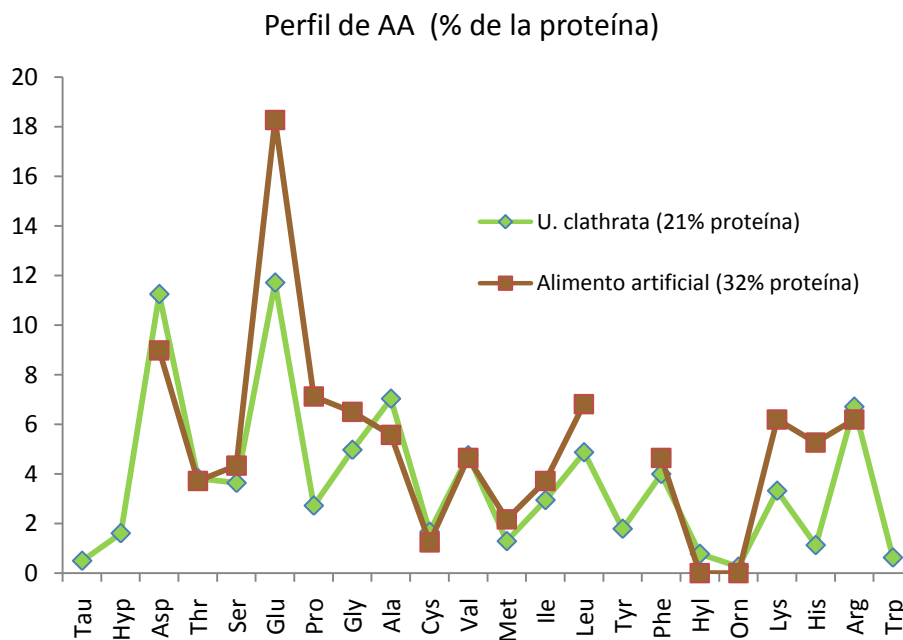
**Figura 45.** Composición química promedio de los lotes de *U. clathrata* y los alimentos experimentales utilizados en los diferentes ensayos biológicos. La energía digestible se calcula en base a coeficientes de digestibilidad obtenidos por Cavazos-Villarreal en su tesis de doctorado (2011).



**Figura 46.** Contribución energética promedio por nutriente de los lotes de *U. clathrata* y los alimentos experimentales utilizados en los diferentes ensayos biológicos.



**Figura 47.** Perfil de ácidos grasos promedio de los lotes de *U. clathrata* y los alimentos experimentales utilizados en los diferentes ensayos biológicos.



**Figura 48.** Perfil de aminoácidos promedio de los lotes de *U. clathrata* y los alimentos experimentales utilizados en los diferentes ensayos biológicos.

### 6.10 Efecto antiviral de harina entera y extracto de *U. clathrata* en el alimento contra WSSV (Experimento 9)

El lote de camarones SPF utilizados en el bioensayo fue analizado (5 camarones) previo a iniciar el experimento, resultando negativos para WSSV por PCR e histología, además de no presentar signos clínicos aparentes de alguna patología. El peso promedio de los camarones fue determinado al inicio y al final del experimento sobre los camarones control negativo, observándose un incremento de casi 2 g al final de los 18 días de estudio.

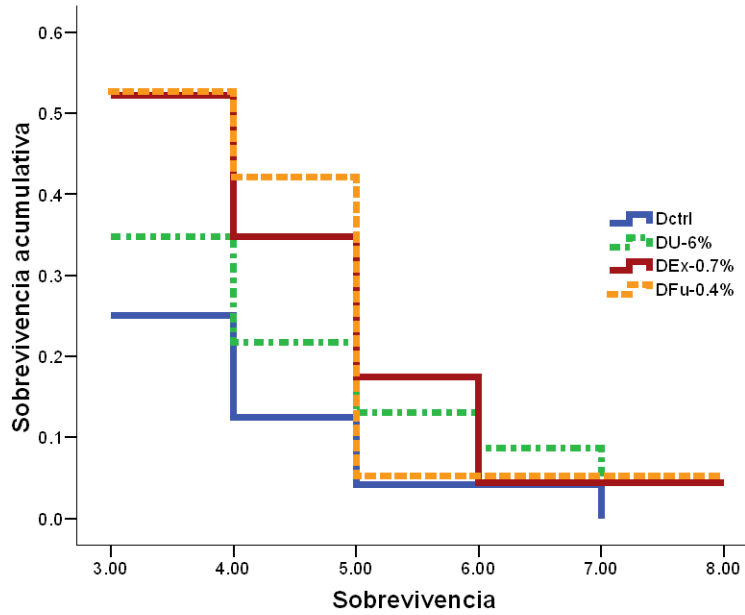
Previo a la exposición con WSSV, 2 camarones de los acuarios control negativo se encontraron muertos, presumiblemente resultado del canibalismo por muda reciente. La mortalidad de los acuarios expuestos a WSSV se presentó a las primeras 48 h post-exposición (Figura 49). A la terminación del estudio al día 18 solo 3 acuarios de los 12 originalmente expuestos a WSSV mantuvieron una población de un camarón. En contraste, la población remanente entre los acuarios control negativo varió entre 88 y 100% hasta la terminación al día 18. El análisis de Kaplan-Meier no indica una diferencia estadística entre las diferentes dietas, sin embargo se observa el doble de sobrevivencia para las dietas DEx-0.7% y DFu-0.4% respecto a la dieta control Dctrl a las 72 h post-exposición. Al día 4 post-exposición, se observa una mayor sobrevivencia en los tratamientos con dietas con alga o extracto respecto al control (Dctrl). Al día 5 el tratamiento DEx-0.7% presenta una mayor sobrevivencia (17%) que el resto de los tratamientos ( $\leq 13\%$ ) (Tabla 45).

**Tabla 45** Porcentaje de sobrevivencia de los camarones de los diferentes tratamientos después de la exposición a WSSV.

| Tratamiento | Día post-infección |      |      |
|-------------|--------------------|------|------|
|             | 3                  | 4    | 5    |
| Dctrl       | 25                 | 12.5 | 4.2  |
| DU-6%       | 34.8               | 21.7 | 13   |
| DEx-0.7%    | 52.2               | 34.8 | 17.4 |
| DFu-0.4%    | 52.6               | 42.1 | 5.3  |

Dctrl = dieta control; DU-6% = dieta con 6% harina de *U. clathrata*; DEx-0.7% = dieta con 0.7% extracto de *U. clathrata*; DFu-0.4% = dieta con 0.4% fucoidan.





**Figura 49.** Sobrevivencia de los camarones post-exposición a WSSV alimentados con cuatro dietas experimentales. Dctrl = dieta control; DU-6% = dieta con 6% harina de *U. clathrata*; DEx-0.7% = dieta con 0.7% extracto de *U. clathrata*; DFu-0.4% = dieta con 0.4% fucoidan.

Después de la exposición a WSSV, los camarones presentaron signos clínicos característicos de la infección, incluyendo enrojecimiento de urópodos y antenas junto con coloración oscura debido a la expansión de cromatóforos (Figura 50).



**Figura 50.** Camarón moribundo después al día 2 post-exposición *per os* a WSSV

Una observación interesante sobre las mudas de cefalotórax de los camarones, tanto de los control negativo así como de los camarones expuestos a WSSV, fue la aparición de depósitos de minerales de “manchas blancas” (Figura 51) similares a las características de la infección viral en *P. monodon* (no reportadas en *L. vannamei*). Examinando los camarones congelados desde su llegada al laboratorio, se determinó que estas manchas venían desde el envío de la granja, quedando desconocida la causa original de este fenómeno.

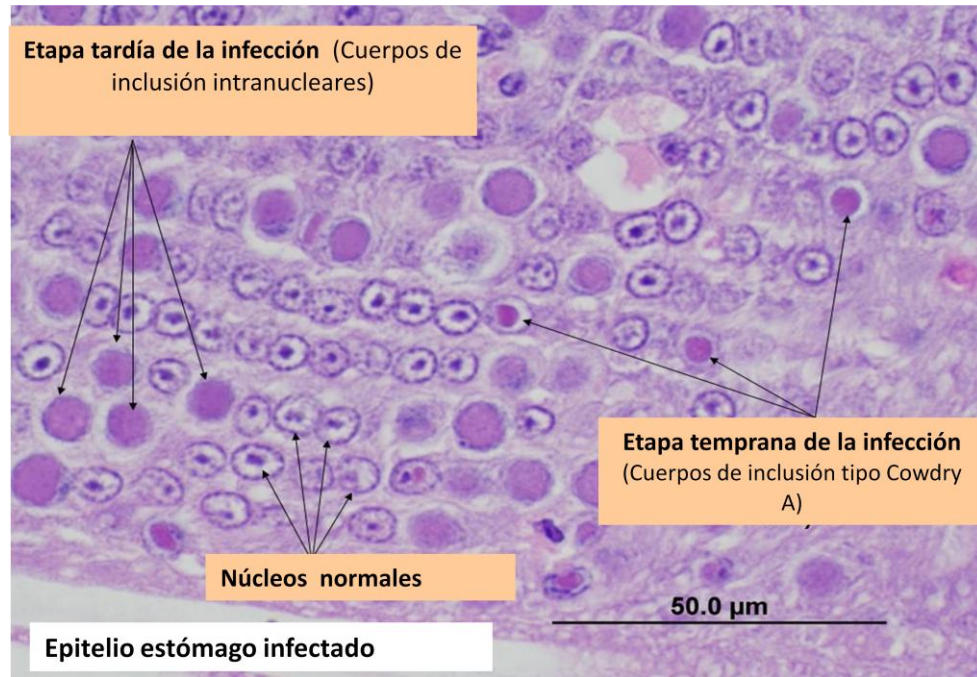


**Figura 51.** Mudras de cefalotórax de camarón con “manchas blancas”

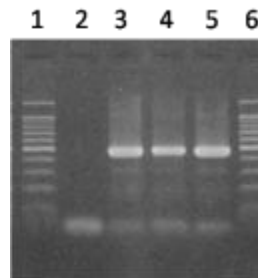
### **Análisis Histológico y por PCR**

En los camarones analizados a la llegada de los camarones al laboratorio, se detectó una anomalía debido a la presencia de esferoides en el órgano linfóide medio. En los camarones muertos colectados de los acuarios control negativos previo a la exposición viral, no se les detectó alguna enfermedad infecciosa, por lo que presumiblemente fueron resultado del canibalismo por muda. El análisis histológico de 20 camarones moribundos (5 por tratamiento) colectados dos días post-exposición al virus (d 13), mostró una infección severa de WSSV en todas las muestras. Las lesiones virales provocadas por WSSV presentaron cuerpos de inclusión intranucleares (Figura 52) en varios tejidos diferentes, incluyendo epitelio cuticular de las branquias, tejido conectivo, epitelio de la glándula antenal, tejido hematopoyético y órgano linfóide, además de inflamación hemocítica de las branquias, escasos esferoides en órgano linfóide y adenitis hemocítica en glándula antenal (ver fotos de laminilla Anexo B). El

análisis por PCR a partir de pleópodos de estos camarones dieron positivo para WSSV (Figura 53), confirmando el análisis histológico. Al término de los 18 días de ensayo, los camarones sobrevivientes de los acuarios con exposición a WSSV, no presentaron lesiones histológicas típicas de la infección.



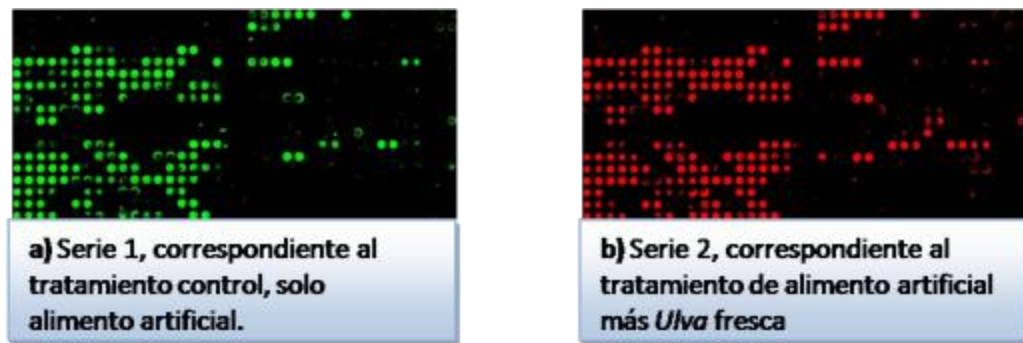
**Figura 52.** Corte histológico de epitelio de estómago de una camarón 48 h después de haber sido expuesto a WSSV.



**Figura 53.** PCR positivo para camarones a dos días de ser expuestos a WSSV. 1= marcador de peso molecular; 2 = control endógeno actina, camarón no infectado; 3-5 = camarones positivos a WSSV.

### 6.11 Expresión diferencial de 292 genes en hepatopáncreas de camarón bajo consumo de *U. clathrata* y alimento artificial (Experimento 10)

En la Figura 54 se presentan las imágenes de las laminillas tipo microarreglo obtenidas de las muestras de hepatopáncreas del experimento. La información general de los elementos expresados diferencialmente en los camarones alimentados con alimento artificial y *U. clathrata* fresca respecto al control de solo alimento artificial se presenta en la Tabla 46.

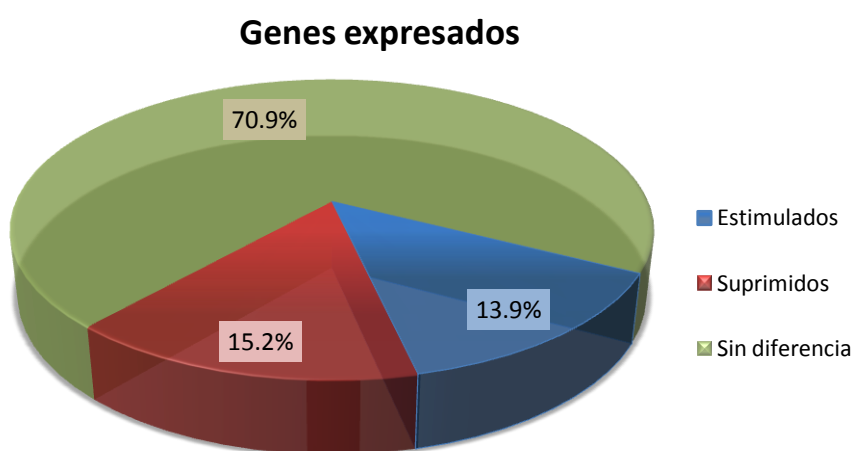


**Figura 54.** Fotos de laminillas tipo microarreglo a) correspondientes a hepatopáncreas de camarones que solo consumieron alimento artificial (control) y b) de hepatopáncreas de camarones que consumieron alimento artificial y *U. clathrata* fresca

De un total de 292 genes que contenía la laminilla, 155 fueron detectados (expresados), de los cuales 46 presentaron una expresión diferencial entre los tratamientos. De los elementos determinados con una expresión diferencial, 22 fueron sobre estimulados mientras que 24 fueron reprimidos en los camarones alimentados con alimento artificial y *U. clathrata* fresca (Tabla 46 y Figura 55). 50% de los genes suprimidos corresponden a proteínas involucradas en respuesta inmune, mientras que el 27% de los genes sobre-expresados corresponden a genes de proteínas ribosomales (Figura 56).

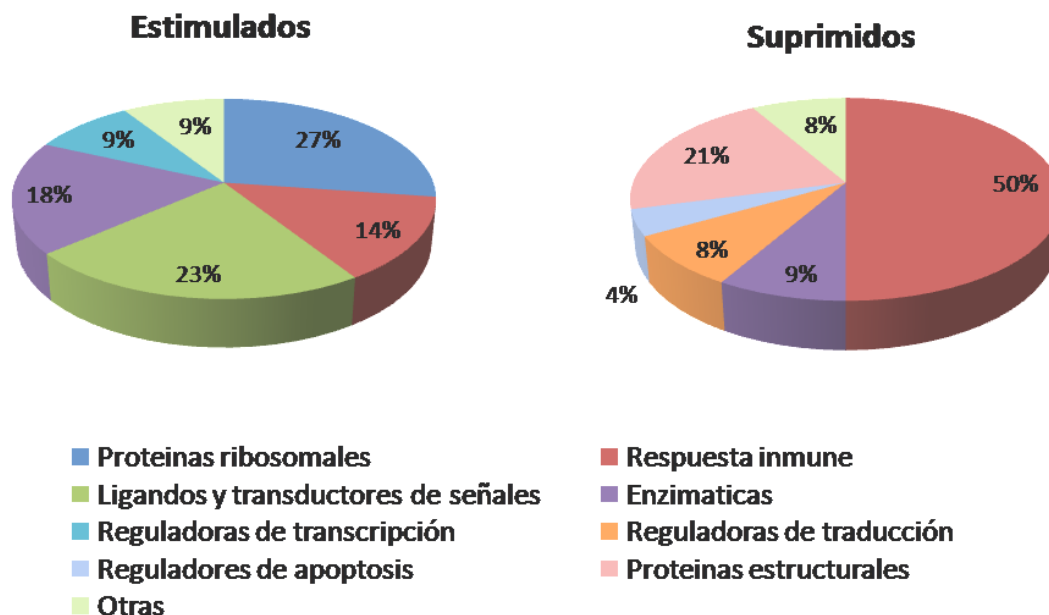
**Tabla 46.** Resultados generales del análisis del microarreglo

|                                 | No. de clones | % del total de clones |
|---------------------------------|---------------|-----------------------|
| No detectados                   | 137           | 46.4                  |
| Total de genes expresados       | 155           | 53.6                  |
| Genes sobre-estimulados         | 22            | 7.5                   |
| Genes reprimidos                | 24            | 8.2                   |
| Genes expresados sin diferencia | 109           | 38.4                  |
| Total de genes                  | 292           | 100.0                 |



**Figura 55.** Porcentaje de genes estimulados, reprimidos o sin diferencia en los camarones alimentado con alimento artificial y *U. clathrata* fresca.

Los elementos sobre-expresados y reprimidos en los camarones alimentados con alimento artificial y *U. clathrata* se enlistan en la Tabla 47. Los genes de las proteínas de “ATPase sub 6”, “Cytochrome P450” y “Acyl-CoA-Binding Protein” fueron los genes significativamente más sobre-expresados, mientras que los diferentes clones de las proteínas “Crustin” y la “Diphenol Oxidase A2” resultaron en los más significativamente reprimidos.



**Figura 56.** Porcentaje de genes expresados diferencialmente en camarones alimentados con alimento artificial y *Ulva clathrata*, divididos de acuerdo a su función biológica.

**Tabla 47.** Expresión diferencial de genes de hepatopáncreas de camarón alimentados con alimento artificial y *U. clathrata* fresca respecto a camarones alimentados solo con alimento artificial

| Estimulados                         |                                    |                   |
|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| ID Gen                              | Definición                         | Relación Cy5/Cy3* |
| Enzimáticas                         |                                    |                   |
| SM1_016                             | ATPase sub 6                       | 4.0087            |
| SMX-0196                            | Cytochrome P450                    | 3.9933            |
| SM1_006                             | Cytochrome oxidase                 | 2.1106            |
| gi_047                              | fumarate hydrolase                 | 1.3799            |
| Ligandos y transductores de señales |                                    |                   |
| SMX-0093                            | Acyl-CoA-Binding Protein           | 3.1407            |
| SM1_029                             | Acyl-CoA Binding protein           | 2.8482            |
| SMX-0269                            | Fatty Acid-Binding Protein 10      | 2.4128            |
| SMX-0306                            | Guanine Nucleotide-Binding Protein | 2.3536            |
| SMX-0114                            | Apolipoprotein D                   | 2.0589            |
| Proteínas ribosomales               |                                    |                   |
| gi_333                              | 60S ribosomal L5                   | 2.4695            |
| gi_453                              | 40S ribosomal S26                  | 2.1592            |
| gi_050                              | 60S ribosomal L13                  | 1.8667            |

|                              |   |        |
|------------------------------|---|--------|
| gi_007                       | 40S ribosomal S8                              | 1.8578 |
| gi_233                       | 60S ribosomal L31                             | 1.2851 |
| gi_421                       | 60S ribosomal L18                             | 1.2073 |
| Respuesta inmune             |   |        |
| SM1_040                      | Hemocyanin                                    | 2.2911 |
| SMX-0257                     | Interferon gamma-inducible Prot 30            | 1.9915 |
| SM1_028                      | destabilase I EST y nucleotide                | 1.5254 |
| Reguladoras de transcripción |   |        |
| SM1_035                      | Elongation factor                             | 1.8301 |
| gi_115                       | Transcription initiation Factor TFIID subunit | 1.6937 |
| Otras                        |   |        |
| gi_117                       | Hypotetical                                   | 2.0882 |
| gi_171                       | Salivary Cys-Rich Secreted Prot               | 1.2266 |

---

### Reprimidos

---

| ID Gen                  | Definición                               | Relación Cy5/Cy3* |
|-------------------------|--|-------------------|
| Enzimáticas             |  |                   |
| gi_057                  | Mak3p                                    | -1.7475           |
| gi_020                  | Thioredoxin peroxidase                   | -2.7461           |
| Respuesta inmune        |  |                   |
| gi_448                  | Proteinase inhibitor Kazal II            | -1.3475           |
| SM1_068                 | Lectin                                   | -2.0890           |
| SM1_004                 | Cathepsin L                              | -2.5679           |
| SMX-0110                | Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor | -2.6456           |
| gi_096                  | Proteinase inhibitor Kazal I             | -2.7442           |
| gi_004                  | SLPI                                     | -2.8022           |
| SMX-0103                | Toll protein                             | -2.9184           |
| SMX-0219                | Diphenol Oxidase A2                      | -3.4919           |
| SMX-0173                | Crustin                                  | -3.6459           |
| SM1_021                 | Crustin                                  | -3.7060           |
| SM1_077                 | Crustin                                  | -3.3143           |
| gi_582                  | Crustin                                  | -3.4695           |
| Proteínas estructurales |  |                   |
| gi_253                  | Actin-related protein2/3                 | -1.2943           |
| SMX-0158                | Centromere/microtubule protein binding   | -1.7433           |
| gi_014                  | Thymosin                                 | -1.9194           |
| SMX-0126                | Mouse Nidogen                            | -1.9318           |
| SMX-0317                | Histone H3 NP_511095                     | -2.9355           |

|                           |   |         |
|---------------------------|---|---------|
| Reguladoras de traducción |   |         |
| SM1_080                   | Translation initiation factor 3 subunit           | -1.6135 |
| SMX-0254                  | Eukaryotic Translation Initiation Factor<br>EIF1A | -2.3626 |
| Reguladores de apoptosis  |   |         |
| gi_313                    | Programmed cell death 10                          | -1.3357 |
| Otras                     |   |         |
| SMX-0088                  | WD repeat protein 18                              | -2.9460 |
| gi_144                    | NNN 144   | -1.2055 |

---

\*Log2 de la diferencias de la señal (expresión) dada en las muestras de hepatopáncreas de camarón con alimento artificial y U. clathrata fresca entre los hepatopáncreas de los camarones control (solo alimento artificial) tomando los valores entre -1.2 y 1.2 como sin cambio de expresión (+/-20%)



## 7 DISCUSIÓN

### 7.1 Composición química de la macroalga *Ulva clathrata*

Los contenidos de proteína, carbohidratos (ELN) y ceniza, fueron los componentes más abundantes en las muestras analizadas de *U. clathrata* producida en los diferentes sistemas de cultivo. En el caso de las muestras del sistema LSS, el contenido de ceniza fue significativamente menor, presumiblemente porque para estas muestras se llevó un proceso de lavado con agua dulce, lo que elimina un excedente de sales en el alga de hasta 15% del peso seco de la muestra. Las muestras LSS no presentaron diferencias significativas en el contenido de proteína respecto a los demás sistemas, aun cuando las muestras de fueron lavadas bajando el contenido de ceniza y concentrando los otros componentes incluyendo la proteína, esto pudo ser ocasionado por que en este sistema (gran escala) el control de la fertilización es más complicado. De acuerdo con Lahaye *et al.* (1995), Gómez-Pinchetti *et al.* (1998), y Msuya y Neori (2008) una menor fertilización de nitrógeno puede explicar estas diferencias en composición.

Niveles similares de proteína y ceniza de *U. clathrata* reportados en el presente estudio (14.9-27.3 y 18.6-48.9 en base seca, respectivamente) han sido reportados para *Ulva lactuca* cultivada en España (Ventura y Castañón, 1998), *Ulva rigida* de la costa en Portugal producida como subproducto de un efluente de granja de pescado (Valente *et al.*, 2006), *Ulva lactuca* de la costa norte de Chile (Ortiz *et al.*, 2006), de Holbeck, en Reino Unido (Marshall *et al.*, 2007) y para *Enteromorpha prolifera*, *E. linza*, y *U. fasciata* cultivada y colectada en India (13.4-22.6 y 6.6-35.6% en base seca, respectivamente) (Naidu *et al.*, 1993). Sin embargo, valores de baja proteína y alta ceniza (5.9-17 % y 17.5-55 % BS, respectivamente) han sido también reportados para las siguientes muestras colectadas de bancos naturales: *U. fasciata* y *U. intestinalis* (McDermid y Stuercke, 2003), *U. lactuca* (Wong y Cheung, 2000) y para *Enteromorpha intestinalis* y *Enteromorpha sp* colectada de playas de la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México (Aguilera-Morales., *et al.*, 2005). En general, los valores de proteína y ceniza reportadas para *Ulva* silvestres están inversamente correlacionados, y el rango de variación es mayor que el de las algas cultivadas, las cuales parecieran relacionadas al grado de variación de las condiciones ambientales. La alta concentración

de materia inorgánica en las algas es muy común y es debido a su extraordinaria capacidad para acumular elementos presentes en el agua donde se encuentran (Chapman y Chapman, 1980). El contenido de proteína encontrado en la *Ulva clathrata* cultivada, es comparable con plantas terrestres ricas en proteína como la soya.

El contenido de fibra dietética presentó una gran variación entre las muestras de *Ulva* analizadas, donde la muestra de LSS fue la de mayor contenido de FDT (40.6% BS) comparado con muestras del sistema MSS (24.8-26.3%), esto concuerda con Lahaye *et al.* (1995) quienes reportan que el contenido de nitrógeno en el medio afecta la biosíntesis de la pared celular del alga como la proteína y pigmentos. Gómez-Pinchetti *et al.* (1998) reportó para *Ulva rigida*, que cuando el nitrógeno es limitante para el crecimiento, la síntesis de carbohidratos predomina y en condiciones de enriquecimiento de nitrógeno, se observa un decremento en el contenido de fibra dietética. El contenido promedio de FDT de las muestras de *Ulva* analizadas (29.7% BS), fue menor que lo reportado por Wong y Cheung, (2000), Lahaye (1991) y Ortiz *et al.* (2006) para *U. lactuca* silvestre (55.4, 38.1 y 60.5% BS), y lo reportado por Gómez-Pinchetti *et al.* (1998) para *U. rigida* (54.4% BS), sin embargo, son semejantes a los valores reportados para *Ulva sp.* (33.4% BS) y *U. rigida* (36.9% BS) (Lahaye y Jegou, 1993; Lahaye 1991). El contenido de FDS en las muestras de *Ulva* analizadas (16-22% BS) representa la fracción principal del total de la fibra dietética (>50% de FDT), siendo mayor la cantidad de FDS en la muestra LSS, donde la relación FDS y FDI (S/I) fue menor (1.2) para la muestra LSS que para las muestras MSS (1.7). En un estudio de Lahaye *et al.* (1995), observaron que las condiciones de cultivo afectaron la relación S/I, encontrando una proporción mayor de polisacáridos solubles en *U. rigida* enriquecida con nitrógeno (S/I = 1.23) comparada con el alga de medio silvestre (S/I = 0.93), lo cual estaba relacionado con la tasa de crecimiento. La división rápida del alga produce nuevas paredes celulares que contienen más polisacáridos con menor capacidad de gelificación. Gómez-Pinchetti *et al.* (1998) también analizaron *U. rigida* cultivada en tanques y observó una relación S/I mayor (2.5 a 4.8) que la obtenida en éste trabajo con *Ulva clathrata* (1.47 general).

En el caso de los AA, el ácido aspártico y el ácido glutámico fueron los más abundantes, representando más del 23 % del total de AA en la *Ulva clathrata* del presente estudio, coincidiendo con lo reportado por otros autores para otras especies de *Ulva* y *Enteromorpha* (Ortiz *et al.*, 2006; Taboada *et al.*, 2009; Wong y Cheung, 2000). De acuerdo con Mabeau y Fleurence (1993), los altos niveles de ácido aspártico y ácido glutámico son los responsables del sabor característico del alga. En el caso de los AAE, encontramos altos niveles de arginina siendo poco común para las *Ulva*les, coincidiendo con análisis reportados para *U. pertusa* (Fujiwara-Arasaki *et al.*, 1984), *U. lactuca* (Wong y Cheung, 2000) y *U. rigida* (Taboada *et al.*, 2009). El promedio general de AAE en las muestras de *Ulva* fue de 35% del total de AA analizados, lo cual concuerda con lo obtenido en otros estudios en *U. lactuca* y *Enteromorpha sp.* (Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Wong & Cheung, 2000). La relación AAE/AANE fue de 0.8 promedio de las muestra analizadas, lo cual es menor que la relación de 1.0 reportada por Taboada *et al.* (2009).

Los lípidos totales (por soxhlet) en las diferentes muestras de *Ulva* analizadas en este trabajo (<1.7) caen dentro del rango reportado para diferentes especies de *Ulva* (0.2-5.6%) (Ventura y Castañón, 1998; Wong y Cheung, 2000; McDermid y Stuercke, 2003; Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2006; Marsham *et al.*, 2007; Taboada *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2010). La proporción de SFAs, MUFAs y PUFAs son similares a los presentados por otros autores en otras especies de *Ulva* (Kumar *et al.*, 2010; Rohani-Ghadikolaei *et al.*, 2011). La suma promedio de SFA en las muestras de *Ulva* (32.5%) fue mucho menor que lo reportado por Kumari *et al.* (2010) para otras *Ulva*les (51-64%), sin embargo en el caso de las suma promedio de MUFAs y PUFAs (14.5 y 29.5% respectivamente) fueron similares a los reportados por el mismo autor para otras especies de *Ulva* (15-26 y 15-29% respectivamente). En general, el perfil de FA analizado en las diferentes muestras, presenta un perfil característico de *Ulva*les, con alto contenido de PUFAs de 18 carbonos (Kumari *et al.*, 2010). La proporción promedio de LA (18:2n6) encontrada en las diferentes muestras (7.91%) fue similar a la reportada por Kumari *et al.* (2010) para siete especies de *Ulva* (7.6-11.7%), en contraste, la proporción promedio de ácido linolénico (18:3n3) encontrada en este estudio, fue hasta diez veces mayor (11.1%) que

los valores reportados por el mismo autor (0.95-2.25%). La proporción promedio de FA de la familia de los omega 3 y 6 (17.4% y 9.5% respectivamente) en las muestras analizadas, es congruente con lo reportado para otras especies de *Ulvaceas* (Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2006). El alto contenido de PUFAs de la familia de los omega 3 es una importante cualidad de la *Ulva*, la cual se ha utilizado para mejorar la calidad de huevos enriqueciéndolos en omega 3 mediante la alimentación de las gallinas ponedoras con dietas suplementadas con aceite de sardina y alga (Carrillo *et al.*, 2008).

La caracterización y perfil de los azúcares presentes en diferentes especies de *Ulva sp.* y *Enteromorpha sp.* (Lahaye, 1991; Lahaye *et al.*, 1995; Ray, 2006; Lahaye y Robic, 2007), y recientemente en *U. clathrata* (Hernández-Garibay *et al.*, 2011). La composición de monosacáridos en las muestras de *U. clathrata* en el presente trabajo coincide con lo reportado para *Enteromorpha intestinalis* (Dodson y Aronson, 1978), *Ulva lactuca* (Lahaye y Jegou, 1993), *Ulva rigida* (Lahaye *et al.*, 1995), y para *Enteromorpha compressa* (Lahaye y Jegou, 1993; Ray, 2006). En el presente trabajo se reporta un valor promedio de ácido urónico, donde se incluye al ácido glucurónico e idurónico que forman parte del *Ulvan* (Lahaye, 2001; Lahaye y Robic, 2007). En los análisis de monosacáridos en las muestras, se encontró ribosa, presumiblemente proveniente de los nucleótidos de las células del alga. Ray (2006) indica que el rendimiento y la composición de azúcares de las diferentes fracciones obtenidas de *Ulvaceas* de diferentes lugares pueden ser muy diferentes cuando se comparan en base molar. Sin embargo, es bien sabido que la época del año y los cambios de los parámetros químicos y físicos del lugar de colecta o también las condiciones de cultivo del alga, son responsables de la variación de su composición (Lahaye, 1991; Lahaye *et al.*, 1995; Ray, 2006).

En el contenido de carotenoides totales en las muestras de *Ulva* analizadas, se observó una gran variabilidad (169 a 441 mg Kg<sup>-1</sup>) siendo la intensidad de luz, el foto periodo, condiciones de secado y almacenaje los principales factores para esta variación, sin embargo, este rango es comparable a lo presentado en zanahorias o frutas como papaya y mango (Yahia *et al.*, 2009). La luteína, el carotenoide más abundante en la *Ulva*, es conocido por ser promotor de piel y vista saludables (Lewis, 2008), y en el caso

de camarón, es una buena fuente de pigmentos que metaboliza hasta astaxantina (Cruz-Suárez *et al.*, 2009).

De los minerales y metales analizados en las muestras de *Ulva*, el Ca fue el más abundante con hasta 18g kg<sup>-1</sup> en base seca, sin embargo este valor fue inferior a lo reportado para *E. intestinalis* (25 a 122g Ca kg<sup>-1</sup>) colectada de la bahía de La Paz y una laguna Baja California México (Rodríguez-Castañeda *et al.*, 2006) y también más bajo que los valores reportados por Kumar *et al.* (2010) para otras *Ulvaceas* (26 a 47g Ca kg<sup>-1</sup>). Los valores de Fe encontrados en las muestras de *Ulva* (0.3 a 4.2 g kg<sup>-1</sup> BS) son muy similares a los reportados para *Enteromorpha sp.* y otras *Ulvaceas* (0.12 a 4 g kg<sup>-1</sup> BS) colectadas de la costa del pacífico de México (Paez-Osuna *et al.*, 2000) y para *E. intestinalis*, *E. linza* y *U. lactuca* colectadas en la bahía de El-Mex, Egipto (Mohamed y Khaled, 2005) más bajo respecto a los reportado para *E. intestinalis* (7 a 14 g Fe kg<sup>-1</sup>) colectada en la bahía de La Paz, B.C.S, por Rodríguez-Castañeda *et al.* (2006). El valor promedio de Cu en las muestras de *Ulva* (36.7 mg kg<sup>-1</sup> BS) fue similar al reportado por Orduña-Rojas y Longoria-Espinoza (2006) para *U. lactuca* colectada en la bahía de Navachiste, México. En general el contenido de Cu y Zn en las muestras de *Ulva* analizadas coincide con lo reportado para otras *Ulvaceas* (Kumar *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2005; Paez-Osuna *et al.*, 2000). En el presente estudio, el promedio de As (3.9 mg kg<sup>-1</sup> BS) encontrado en las muestras de *Ulva*, está dentro del rango reportada para otras especies de *Ulva* (1.1 a 16 mg kg<sup>-1</sup> BS) donde se reporto que no era tóxico para consumo humano (Pérez *et al.*, 2010; Rodríguez-Castañeda, *et al.*, 2006; Besada *et al.*, 2009). La concentración de Pb varió entre 1.1 y 3.5 mg kg<sup>-1</sup> en base seca, siendo estos valores inferiores a los reportados en otras *Ulvaceas* (Mohamed *et al.*, 2005; Orduña-Rojas y Longoria-Espinoza, 2006). Todas las muestras presentaron concentraciones bajas de Cd (0.48 a 1.25 mg kg<sup>-1</sup> BS) y Cr (0.52 a 1.53 mg kg<sup>-1</sup> BS); donde para Cd, los valores fueron similares a lo reportado por Orduña-Rojas y Longoria-Espinoza (2006) y Paez-Osuna *et al.* (2000), mientras que para Cr, los valores fueron menores comparado con los reportados en otras *Ulvaceas* (Paez-Osuna *et al.*, 2000; Rodríguez-Castañeda *et al.*, 2006). Los valores de Ni entre las muestras (2.37 a 5.72 mg kg<sup>-1</sup> BS) son consistentes con lo reportado por Kumar *et al.* (2010) y Paez-Osuna *et al.* (2000). Es poco la legislación en el uso de algas marinas para consumo humano; Francia fue el primer país

en establecer regulaciones sobre el uso de algas marinas para consumo humano como alimentos no tradicionales (Besada *et al.*, 2009). Los límites franceses para algas marinas comestibles son: Pb<5mg kg<sup>-1</sup>; Cd<0.5mg kg<sup>-1</sup>; Hg<0.1mg kg<sup>-1</sup>; y As inorgánico <3 mg kg<sup>-1</sup>, todos en base seca, siendo estos límites excedidos para algunas muestras del presente estudio para algunos elementos. Como las algas pueden concentrar varias veces los niveles de metales encontrados en el agua en un corto plazo, los niveles traza de los elementos detectados en el agua, fertilizantes y suelo en el sistema de cultivo, debe ser controlado antes de iniciar la producción de alga, con la finalidad de ser no tóxica para consumo animal y/ humano.

## **7.2 Efecto de diferentes niveles y procesos de inclusión de *U. clathrata* en el alimento para camarón**

En el presente estudio se observó esta mejoría en la estabilidad en el agua y absorción de agua en los alimentos experimentales cuando la harina de *Ulva* o *Ulva* fresca fue incorporada en niveles de inclusión de 2,4 y 6% en la mezcla de ingredientes de la dieta antes de ser peletizada, mientras que cuando el alga se añadió después de la peletización del alimento, este efecto se perdió. En general la inclusión de harinas de algas marinas en alimentos para organismos acuáticos resulta en un mejoramiento de la absorción de agua y la estabilidad del alimento en agua la cual es modulada por el tipo de polisacáridos presentes en las algas (Paradossi 1999; Percival 1986; Ray y Lahaye 1995; Wong y Cheung 2001). Peñaflorida y Golez (1996) no encontraron diferencias significativas en PMS cuando se añadió a la dieta harinas de *Kappaphycus alvarezii* y *Gracilaria heteroclada* a niveles entre 0 y 10%, mientras que cuando la inclusión fue de 15% de cualquiera de estas harinas algas, se incrementó significativamente la PMS respecto al alimento control (0% alga). Briggs y Funge-Smith (1996) incluyeron alga roja *Gracilaria sp.* en el alimento, encontrando que las dietas conteniendo hasta 10% de la harina del alga no mostraban diferencias significativas en la estabilidad en el agua (después de 12 h) comparado con la dieta control (0% alga). Cruz-Suarez *et al.* (2000) formularon dietas con niveles de inclusión de 2 a 8% de harina de *Macrocystis pyrifera* de diferentes orígenes, resultando una correlación positiva de la WA conforme se

incrementaba el nivel de inclusión y valores entre 2 y 23.3% de PMS después de una hora de inmersión en agua marina, encontrando diferencias entre los orígenes de las algas, pero con la misma tendencia de mejorar la PMS a partir de un nivel de inclusión de 4%, mientras que en el presente trabajo se mejoró la PMS a partir de 2% de inclusión de *U. clathrata* en el alimento. En otro estudio, la inclusión de 3.3% de harina de *U. clathrata* en el alimento, resultó en una menor PMS y mayor WA comparado con alimentos con el mismo nivel de inclusión de harina de *Ascophyllum sp.* y *Macrocystis sp.* (Cruz-Suarez *et al.* 2009).

Tanto en el experimento de diferentes niveles de inclusión de harina de *U. clathrata* (2,4 y 6%) como en el de efecto de procesado en el alimento con *U. clathrata* (2%), no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los camarones respecto al control 0% *U. clathrata*, a excepción de cuando la *U. clathrata* fresca licuada (2% de inclusión en BS) se utilizó para recubrir el alimento, resultando un incremento significativo en el crecimiento de los camarones comparado con el control. Como no se observaron diferencias significativas en el consumo de alimento entre la dieta recubierta con alga fresca, los otros alimentos con inclusión de *U. clathrata* y el control, asumimos que el mejoramiento del crecimiento del camarón no es causado por un efecto de atractabilidad pero si por un efecto nutricional agregado por la contribución del alga, sugiriendo que la manipulación tecnológica para deshidratar el alga, además del proceso de manufactura del alimento, puede reducir los efectos promotores de crecimiento en el camarón. Peñaflores y Golez (1996) reportan que la inclusión de 5% de harina *K. alvarezii* y 10% de harina de *G. heteroclada* (10%) (secadas a 60°C y molidas a <425 µm) en el alimento para camarón *P. monodon*, mejoró la tasa de crecimiento específico comparado con una dieta control con 5% de almidón de maíz y 5% harina de trigo sin inclusión de algas. Marinho-Soriano *et al.* (2007) probaron una dieta para camarón hecha con 50% *Gracilaria cerviconis* (secada a 50°C/24 h) y 50% de una dieta comercial, donde no encontraron diferencias significativas en parámetros de crecimiento cuando lo compararon con una dieta 100% comercial, demostrando la efectividad de esta alga para reemplazar parcialmente la proteína en la dieta para camarón. Wong y Cheung (2001) analizaron los efectos del secado en estufa y el liofilizado en tres especies de *Sargassum*, encontrando que la cantidad de aminoácidos y la capacidad de retención de

agua y aceite era significativamente mayor en las muestras liofilizadas ( $p < 0.05$ ). Da Silva y Barbosa (2009) probaron una mezcla hecha de *Hypnea cervicornis* y *Cryptonemia crenulata* (secadas a 55°C/36 h) como fuente de proteína en alimento para camarón a niveles de inclusión de 13, 26 y 39%, observando un incremento en la tasa de conversión alimenticia cuando los niveles de inclusión de alga en el alimento se incrementaban, lo cual no coincide con los resultados del presente estudio, donde no se obtuvieron diferencias significativas en la TCA con los diferentes niveles de inclusión utilizados. En un estudio de Cruz-Suárez *et al.* (2009), evaluaron harina de *Ascophillum nodosum* secada al sol y harinas de *Macrocystis pyrifera* y *U. clathrata* secadas en estufa a 55°C, incluidas a 3.3% en el alimento para camarón, donde las tasas de crecimiento (170 a 203%) fueron similares a los presentados en este estudio en alimentos con inclusión de *Ulva* de entre 2 y 6% (172 a 251%).

Aun y cuando la digestibilidad aparente de materia seca y proteína de la harina de *U. clathrata* es mayor a 90%, según lo reportado por Cavazos-Villarreal (2011), aparentemente la *U. clathrata* no contiene suficiente energía metabolizable para suplir por completo el alimento artificial del camarón (Ventura *et al.*, 1994), sin embargo en combinación con un alimento artificial, puede aumentar la digestibilidad de los nutrientes provenientes de los otros ingredientes de la dieta (Nandeeshia *et al.* 2001). En el presente estudio, aun nivel de inclusión de 6% de harina de *U. clathrata*, la digestibilidad a aparente de la proteína de la dieta se vió mejorada respecto al control, lo cual significa que esta dieta seria menos contaminante. En el caso de la digestibilidad aparente de materia seca no se observan diferencias respecto al control, pudiera ser debido a que el aporte de ceniza (casi 2%) de la *U. clathrata* a la dieta no sea digestible.

### **7.3 Efecto del consumo de *U. clathrata* fresca en el camarón en condiciones controladas de laboratorio**

La combinación de alimento artificial y *U. clathrata* en condiciones controladas tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de los camarones, sin embargo este efecto se potencia cuando la *U. clathrata* se encuentra en un sistema abierto con producción natural. En un primer experimento, se obtuvo un incremento significativo en la tasa de



crecimiento en camarones alimentados con *U. clathrata* fresca en combinación con 25% menos alimento artificial que los camarones control (sin *U. clathrata*), mientras que en el caso del tratamiento con *U. clathrata* fresca y 50% menos alimento artificial, no se presentaron diferencias significativas respecto al control, es decir que en condiciones controladas de laboratorio (sin producción primaria) podemos ahorrar hasta un 50% de alimento balanceado. Porchas-Cornejo *et al.* (1999) reportan que la presencia de *Caulerpa sertularioides* mejoró el crecimiento y sobrevivencia de camarones café *Penaeus californiensis* bajo condiciones de laboratorio.

En un segundo experimento se puso como objetivo principal conocer los cambios en sobre el perfil de FA en los camarones alimentados con *U. clathrata* fresca y alimento artificial. El perfil de FA del alimento artificial utilizado para esta parte del estudio, fue característico de dietas prácticas para camarón (Ju *et al.*, 2009; Patnaik *et al.*, 2006; Gonzalez-Felix *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2007). En el caso de la *U. clathrata*, la proporción de SFAs, MUFAs y PUFAs fueron similares a los presentados por otros autores en otras especies de *Ulva* (Kumar *et al.*, 2010; Rohani-Ghadikolaei *et al.*, 2011). Los FA más abundantes encontrados en la *U. clathrata* fueron el ácido palmítico (16:0) y el vaccénico (18:1n7) cuyos valores concuerdan con lo reportado por Gomez-Pinchetti *et al.* (1998) para *U. rigida* analizada después de un periodo de ayuno de nitrógeno, lo cual pudiera ser una posible causa del perfil de FA presentado en este trabajo. La alta proporción de ácido palmítico (>50% del total de FA) en la *U. clathrata* en este estudio, aunque es poco común, se ha reportado para otras especies del mismo género (Shanmugam y Palpandi, 2008; Gómez-Pinchetti *et al.*, 1998; Rohani-Ghadikolaei *et al.*, 2011). El alimento balanceado presentó cantidades considerables de esteroides característicos de plantas terrestres como el  $\beta$ -Sitosterol y campesterol los cuales son esteroides predominantes en el frijol de soya (Meijer *et al.*, 2003) comúnmente utilizado en los alimentos para camarón. El principal esteroide encontrado en la *U. clathrata* fue el isofucosterol, lo que concuerda con lo reportado para otras Ulvales (Siddhanta *et al.*, 2002; Fattorusso *et al.*, 1980), sin embargo en algunos casos, el esteroide predominante puede ser el fucosterol según las características del lugar y la época del año en que se cosecha (Popov *et al.*, 1985).

Uno de los efectos más evidentes del consumo de *U. clathrata* en los camarones, es la disminución en el contenido de FA con respecto a los camarones alimentados solo con la dieta artificial (de 0.6 a 0.4 g 100g<sup>-1</sup> en peso humedo), haciendo evidente que en el camarón, la *U. clathrata* tiene un efecto sobre el metabolismo de lípidos como el reportado en diversas especies de peces y animales terrestres (Carrillo *et al.*, 2008; Ergun *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 1987; Nakagawa, 1997a,b; Pengzhan *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 1999). En los camarones alimentados con solo *U. clathrata* fresca (DUU), hay un decremento en el porcentaje de 16:0, 18:1n9, 18:2n6, y un incremento en 18:0, 18:3n3, 20:5n3 con respecto a los DAA. Aún cuando la proporción de DHA es significativamente menor en camarones alimentados solo con *U. clathrata*, estos compensan incrementando la proporción de EPA, por lo que a final de cuenta, los HUFA y la relación n-3/n-6 son incluso mayores que en los otro dos tratamientos. La acumulación de ácido nervónico (24:1n9) y la disminución de FA de la familia de los Omega-6 en los camarones DUU puede ser indicativo de que el alga por sí sola no cubre los requerimientos de PUFAs en el camarón, este efecto se ha reportado en ratas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos además de una dieta libre de grasa (Egwim y Kummerow, 1972; Walker, 1968). Otro FA acumulado significativamente en los camarones DUU es el ARA (ácido araquidónico; 20:4n6), que al ser el precursor de eicosanoides inmunoestimulantes, podría estar afectando la respuesta ante un estrés, es decir que a nivel de cultivo, deberían de ser más tolerantes ante un posible patógeno.

En el caso de los esteroides en el músculo de los camarones, el colesterol fue el más predominante, aún si la dieta consistió solamente de *U. clathrata*, la cual tiene muy poco colesterol lo que indica; 1) que el camarón retiene preferencialmente el colesterol, y más aún si este hace falta en la dieta, por lo que la regulación es muy estrecha; 2) el camarón es capaz de sintetizar colesterol a partir de ciertos precursores (fitoesteroides). Contrario la acumulación de colesterol observada en el presente trabajo, Casas-Valdez *et al.* (2006), demostraron que una dieta con 4% de inclusión del alga *Sargassum* disminuía significativamente el contenido de colesterol en músculo de camarón café *Farfantepenaeus californiensis*.

En un estudio descrito por Morris *et al.* (*In press*), camarones alimentados con una dieta basal con 0.08% de colesterol y otra con 0.1% fitoesteroides, encontraron un

crecimiento similar después de 12 semanas de alimentación. El aumento en la cantidad de colesterol en los camarones que consumieron *Ulva*, es opuesto a lo reportado en ratas y huevos de gallinas ponedoras (Carrillo *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 1999).

#### **7.4 Evaluación del cocultivo de *U. clathrata* y camarón en tanques piloto**

En el presente trabajo se realizaron dos experimentos de cocultivo en tanques piloto al exterior en diferentes épocas del año, donde aparentemente la temperatura en el agua juega un papel primordial en el rendimiento del cocultivo. A temperaturas en el agua por igual o por encima de los 30°C (verano), el cocultivo no presentó los rendimientos positivos sobre el crecimiento de los camarones observados a temperaturas por igual o por debajo de los 28°C (primavera).

Los parámetros de calidad en el agua de ambos experimentos fueron similares, exhibiéndose una menor producción primaria en los tanques bajo cocultivo respecto a los de monocultivo. En los estanques de camarón, se considera como deseables para la contribución nutricional organismos unicelulares como diatomeas y dinoflagelados (Bula-Meyer, 1985; Laurén-Matta *et al.*, 1995). En diversos estudios se ha demostrado que el alimento natural (por lo general producción primaria) en combinación con alimento artificial tienen mejores resultados de productividad que solo alguno de los dos tipos de alimentación (Jory, 1995; Martínez-Córdova, *et al.*, 2005). Dependiendo la densidad de cultivo, el aporte nutricional de la producción primaria puede cubrir hasta más de un 70% de los requerimientos nutricionales del camarón (Jory, 1995; Martínez-Córdova *et al.*, 1998, 2002), para el caso del presente trabajo, se puede asumir que la macroalga contribuyó cerca del 50% en el crecimiento del camarón (en el caso del experimento llevado en primavera). Clifford (1992) menciona que se debe contar con un mínimo deseado de 80,000 cel/ml de fitoplancton en estanques de cultivo semi-intensivo, sin embargo en ninguno de los experimentos de cocultivo del presente trabajo se llegó a tal cifra. La baja producción de plancton en los tanques de cocultivo puede ser debido a varios factores: la reducción de intensidad de luz debido a la que la superficie del tanque está cubierta con *U. clathrata* y/o debido a que la *U. clathrata* trabaja como biofiltro utilizando el nitrógeno como fuente de nutriente (Hamano *et al.*, 2007;

Copertino *et al.*, 2009) y teniendo competencia directa con las microalgas por estos compuestos, evitando su proliferación.

La combinación del cocultivo y el alimento artificial mejora significativamente la utilización del alimento y en el caso del experimento a temperatura menor a 28°C se mejoró significativamente el crecimiento del camarón con una reducción de hasta 45% del alimento artificial. En el caso del experimento en primavera (<28°C), la TCA relativa a solo el alimento artificial, se mejoró hasta poco más del doble respecto al control (2.6 contra 1.2) obteniendo crecimientos incluso superiores al control. Para el caso del experimento en verano (>29°C) la TCA relativa al alimento artificial pasó de 0.8 del tratamiento control (monocultivo) a 0.4 en camarones alimentados en cocultivo con 25% de la ración de alimento, sin embargo, para este último caso el crecimiento de los camarones fue 50% menor al de los camarones en monocultivo, sugiriendo que para este caso fue deficiente la cantidad de alimento artificial. Se sugiere pues, que en condiciones óptimas incluyendo temperatura ( $\leq 29^\circ\text{C}$ ) la *U. clathrata* puede actuar como suplemento nutricional y/o mejorar la utilización de nutrientes de la dieta artificial. A pesar de la baja concentración de nutrientes en la *U. clathrata*, esta contiene una alta proporción de agua (~85%) la cual puede contribuir a una mayor digestibilidad del alga (Conceição *et al.*, 2010). Porchas-Cornejo *et al.* (1999) reporta un efecto similar cuando camarones *Farfantepenaeus californiensis* incrementaron su tasa de crecimiento tres veces en presencia del alga *Caulerpa sertularioides*, para este caso no se menciona el rol nutricional del consumo del alga como posible causa del mejoramiento en el crecimiento. En contraste, Lombardi *et al.* (2006) llevaron a cabo un experimento de cocultivo de *L. vannamei* y el alga filipina *Kappaphycus alvarezii* en jaulas flotantes; pero después de 103 días, el crecimiento, sobrevivencia y TCA no fue significativamente diferente entre el sistema de cocultivo y los de monocultivo. Van Tri y Thanh Ha (2004) reportaron que larvas de camarones *L. vannamei* alimentados con algas marinas frescas junto con un alimento balanceado, obtuvieron mayores tasas de crecimiento y mayor sobrevivencia (48–53%), que aquellos alimentados con algas deshidratadas solas o en combinación de alimento artificial.

La composición bromatológica se vió modificada en los camarones de ambos experimentos bajo cocultivo, lo más significativo, es la disminución del contenido de

lípidos totales conforme la ración de alimento artificial fue disminuyendo, además las raciones mayores al 55% no afectaron el crecimiento de los camarones respecto a los camarones en monocultivo (100% ración de alimento artificial). En el caso de la ceniza, los camarones en cocultivo aparentan incrementar su contenido de ceniza respecto a los de monocultivo, probablemente debido al alto contenido de minerales en la *U. clathrata*, los cuales podrían estar siendo acumulados en el camarón (Alliot y Frenet-Piron, 1990; Ulrik-Riisgard y Famme, 1986). El perfil de FA se vio claramente modificado en los tratamientos en cocultivo sin alimento artificial, presentándose una mayor proporción de LNA (18:3n3) en los camarones de ambos experimentos, además de aumento en la proporción de ácido oleico (19:1n9), EPA (20:5n3) y DHA (22:6n3) y disminución de LA (18:2n6) en el experimento en primavera, todo esto comparado con el control (camarones en monocultivo). Esto puede ser debido a la composición y concentración de FA de las fuentes lipídicas consumidas (Gonzalez-Felix *et al.*, 2002a,b, 2003; Cheng y Hardy, 2004; Zhou *et al.*, 2007). Pareciera que en el camarón se produjera algunos PUFAs como el DHA, a partir de la elongación de ácido linolénico (abundante en la *U. clathrata*). Aun y cuando *U. clathrata* puede ser buena fuente de precursores de PUFAs esenciales en el camarón (Kanazawa *et al.*, 1979), se observa que la macroalga por sí sola, no es capaz de soportar el máximo crecimiento del camarón probablemente debido a una falta de energía metabolizable como lo concluyen Ventura *et al.* (1994) en un estudio con pollos. Patnaik *et al.* (2006) observaron que el remplazo de aceite de pescado menhaden con harinas de algas marinas ricas en HUFAs en dietas, no tenían un efecto significativo en el crecimiento de camarones *L. vannamei*, por lo que se puede considerar que los FA provenientes del alga son de alta calidad nutricional para el camarón.

Otro efecto significativo y de alta relevancia es el incrementó en la pigmentación de los camarones en cocultivo, se confirma que la luteína de la *U. clathrata* es asimilada, metabolizada y depositada en el camarón (Cruz-Suárez *et al.*, 2009). Vernon-Carter *et al.* (1996) y Arredondo-Figueroa *et al.* (1999), encontraron que extractos de *Tagetes erecta* ricos en luteína incluidos en la dieta de camarones, era posiblemente metabolizada a astaxantina y depositada en el cuerpo del camarón blanco del pacífico. Adicionalmente, se llevo a cabo un análisis de colorimetría en los camarones del

experimento de primavera, el análisis de reflectancia mostró diferencias significativas similares a los análisis por HPLC en los mismos camarones, sin embargo, no se encontraron referencias del uso de este método de análisis colorimétrico en camarones, por lo que se sugiere realizar un estudio completo para estandarizar estos valores relacionándolos con las necesidades del mercado, tomando en cuenta la tendencia de que al incrementar el uso de alimento artificial, el efecto de la pigmentación por el consumo de *U. clathrata* se diluye.

La textura y firmeza en el músculo de los camarones es muy importante desde el punto de vista del consumidor. Algunos autores reportan una aparente relación entre el contenido de grasa y la textura del camarón, a mayor contenido de grasa menor firmeza en el músculo (Ezquerro *et al.* 2003, 2004; Rivas-Vega *et al.* 2001), sin embargo esta relación no se puede apreciar claramente en los camarones analizados del experimento de época de primavera, esto debido a la diferencia significativa de los pesos entre los tratamientos, siendo el peso del segmento muy importante al momento de realizar el análisis.

### **7.5 Determinación de contribuciones nutricionales de carbono y nitrógeno en el camarón mediante el análisis de isotopos estables**

El peso final y la tasa de sobrevivencia se incrementaron conforme aumento la cantidad de alimento artificial administrado. Los camarones bajo el régimen de co-alimentación de 75% alimento artificial y 25% *Ulva* (75F/25U), resultaron en el mayor crecimiento respecto a los otros tratamientos, por lo que en este caso la proporción de *U. clathrata* (25%) puede ser nutricionalmente equivalente o incluso mejor que el alimento artificial en base seca. Las mejores tasas de crecimiento en camarón se han asociado a la presencia e ingestión de diferentes elementos de la producción natural dentro del estanque de cultivo (Hunter *et al.*, 1987; Nunes *et al.*, 1997; Gamboa-Delgado *et al.*, 2003). Nutrientes específicos como ácidos grasos y aminoácidos esenciales son frecuentemente escasos en alimento vivo y generalmente son suplementados con alimento artificial, como es el caso de los camarones en el tratamiento de solamente *U. clathrata* (U100) los cuales tuvieron pobre crecimiento y baja sobrevivencia. El efecto

positivo de co-alimentación de alimento vivo y alimento artificial ha sido reportados para larvas y juveniles de algunos crustáceos (Teshima *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2002; Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009b) y peces (Kolkovski *et al.*, 1993; Rosenlund *et al.*, 1997, Curnow *et al.*, 2006).

El valor de  $\delta^{13}\text{C}$  del alimento artificial ( $-23.0\pm 0.2\text{‰}$ ) refleja valores de la mezcla de ingredientes utilizados en la formula (principalmente haría de pescado, harina de soya y harina de trigo). El valor isotópico  $\delta^{13}\text{C}$  en la *Ulva* ( $-13.1\pm 0.6\text{‰}$ ) indica un relativo enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$ , el cual es consistente con lo reportado por Mercado *et al.* (2009) para *U. clathrata* colectada del ambiente natural ( $-14.4\pm 1.0\text{‰}$ ). El valor de  $\delta^{13}\text{C}$  en el alga está fuertemente vinculado con las vías metabólicas asociadas con la fotosíntesis y la toma de carbono inorgánico disuelto ( $\text{CO}_2$  o  $\text{HCO}_3^-$ ) y/o el  $\text{CO}_2$  atmosférico, el cual presenta una firma isotópica diferente para las diferentes clases y especies de algas marinas (Fry, 2006; Mercado *et al.*, 2009). En contraste, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en la *U. clathrata* están sujetos a muchas variaciones de acuerdo con la fuente de nitrógeno. En condiciones de laboratorio, la manipulación de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en la algas mediante el uso de diferentes fertilizantes en el medio de cultivo, ha sido reportado por algunos autores (Cohen y Fong, 2004; Teichberg *et al.*, 2008, Le Vay y Gamboa-Delgado, 2010), de la misma forma que se hizo en este estudio.

La mayoría de los camarones llegaron al equilibrio isotópico respecto a sus dietas en 2 semanas, esto es similar a lo reportado por Fry y Arnold (1982) y Gamboa-Delgado y Le Vay (2009a) en experimentos con camarones peneidos. El bajo crecimiento observado en los camarones U100, indica que alcanzaron el equilibrio isotópico a través del catabolismo y recambio metabólico y no por acreción de la *U. clathrata*.

La discriminación negativa del carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) observada entre los camarones y la *Ulva* indica una disminución de isotopos pesados  $^{13}\text{C}$ , siendo que en general, los organismos tienden a enriquecerse en su isotopo pesado debido a la incorporación preferencial de  $^{13}\text{C}$  y excreción de  $^{12}\text{CO}_2$  (De Niro y Epstein, 1978). Este efecto de enriquecimiento negativo, ya ha sido reportado por otros autores donde se considera el fraccionamiento isotópico y las fuentes nutricionales (Martínez del Río y Wolf, 2005), siendo el carbono respirado relativamente alto en contenido de  $^{13}\text{C}$  comparado con la dieta cuando es resultado de metabolismo de azúcares (enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$ ),

mientras que en el caso opuesto el metabolismo de lípidos tiende a disminuir su  $^{13}\text{C}$  (Breteler *et al.*, 2002).

En el presente estudio, los valores de  $\Delta^{15}\text{N}$  observados entre los camarones y el alimento artificial ( $\Delta^{15}\text{N}= 1.6 \text{ ‰}$ ) fue 6 veces mayor que el valor observado en los camarones alimentados con *U. clathrata* ( $\Delta^{15}\text{N}= 10.4 \text{ ‰}$ ). Este último valor es 3 veces mayor a los valores de enriquecimiento frecuentemente reportado en estudios de contribuciones nutricionales. Los resultados del presente estudio indican que el contenido de nitrógeno y la tasa de ingestión/excreción pudieran jugar un rol en el grado de  $\Delta^{15}\text{N}$  entre los camarones y sus dietas. El contenido de proteína en el alimento artificial fue mayor (35.2%) que el contenido de proteína en la *U. clathrata* (18.6 %). Valores altos de  $\Delta^{13}\text{C}$  y  $\Delta^{15}\text{N}$  provocados por condiciones nutricionales limitantes han sido reportadas donde se hipotetiza que los altos factores de discriminación ocurren como resultado de altas tasa metabólicas de recambio en animales que están acoplándose fisiológicamente a la escases de nutrientes (Martínez del Río y Wolf, 2005).

Los valores predichos generados por el modelo de Hesslein *et al.* (1993) se ajusta razonablemente bien a los valores observados ( $R^2=0.63-0.98$ ). Las tasas metabólicas de recambio ( $m$ ) y los valores de equilibrio isotópico fueron estimados a partir de esta ecuación. Las tasas de recambio de carbono y nitrógeno sugieren un reciclaje mayor de nutrientes en camarones alimentados en regímenes de co-alimentación.

En los organismos con bajo y lento crecimiento, los cambios isotópicos fueron causados por el cambio metabólico, esto se ha reportado en animales alimentados con dietas nutricionalmente deficientes, donde los organismos incrementan su tasa metabólica como estrategia para incorporar nutrientes escasos como los algunos aminoácidos (Fantle *et al.*, 1999). Las tasas de recambio de nitrógeno indican el balance entre la síntesis y catabolismo de la proteína. En el presente trabajo, la tasa de recambio de nitrógeno en los camarones alimentados con solo alimento artificial fueron significativamente menores ( $0.013 \text{ d}^{-1}$ ) que lo observado en los camarones alimentados solo con *U. clathrata* ( $0.100 \text{ d}^{-1}$ ). Estas altas tasas de recambio metabólico de nitrógeno en camarón *L. vannamei* ya han sido reportadas por otros autores (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009a). Los valores de tiempo medio ( $t_{50}$ ) integran los parámetros de  $k$  (crecimiento) y  $m$  (tasa de recambio metabólico), es por eso que los valores de  $t_{50}$  para



nitrógeno en el presente estudio, se incrementaron en función del crecimiento promovido por la suplementación del alimento artificial. El bajo valor de  $t_{50}$  para nitrógeno (6.4 d) observado en los camarones alimentados solo con *U. clathrata* sugiere que la proteína tuvo un corto tiempo de residencia en el tejido de estos camarones con bajo crecimiento.

Los camarones de los tratamientos con mayor proporción de alimento artificial presentaron los mayores crecimientos, lo cual explica la alta incorporación de carbono y nitrógeno (y sus isótopos) reflejado en la acreción de biomasa con bajas tasas catabólicas. Cuando los organismos son alimentados con dietas nutricionalmente buenas, la eficiencia de retención y síntesis de proteína reflejada en el crecimiento puede llegar hasta un 94% (Mente *et al.*, 2002). Los diferentes nutrientes en la dieta no se homogenizan completamente en el animal antes de la síntesis de nuevo tejido, este efecto se le conoce como fraccionamiento isotópico (Schwarcz, 1991; Martínez del Río y Wolf, 2005; Wolf *et al.*, 2009) y representa la suma de las rutas metabólicas las cuales movilizan nutrientes específicos a grupos específicos, por ejemplo, en el caso de cultivo de camarones, una alta proporción de nitrógeno en la dieta se dirige principalmente a tejido muscular, mientras que el carbono dietario de los ácidos grasos es principalmente enviado al hepatopáncreas y gónadas. En el presente experimento, este efecto puede observarse por las diferentes contribuciones de carbono y nitrógeno, comparando los valores duales isotópicos de todo el organismo y el tejido muscular, que son ligeramente superpuestos (sin presentar diferencias significativas entre ambos análisis). En el presente estudio, las diferencias isotópicas entre las fuentes dietarias son grandes ( $\delta^{13}\text{C}$  diferencia de 9.9 ‰ y  $\delta^{15}\text{N}$  diferencia de 13.3 ‰) lo que facilita determinar correctamente las contribuciones dietarias al crecimiento mediante el modelo de mezclado isotópico.

Las contribuciones de carbono y nitrógeno más altas de lo esperado en los camarones enteros que en el tejido muscular, podrían estar relacionadas con la alta digestibilidad de *U. clathrata* (Villarreal-Cavazos, 2011) y su disponibilidad continua para los camarones, en cambio, sólo dos raciones diarias de alimento artificial fueron suministradas a los camarones en los regímenes co-alimentación. Experimentos similares de co-alimentación realizados en larvas de camarón y peces, han demostrado

que la disponibilidad de alimento vivo (zooplankton, biofilm) frecuentemente contribuye en mayor proporción al crecimiento de los consumidores que el alimento artificial suministrado (Abreu *et al.*, 2007; Jomori *et al.*, 2008; Gamboa-Delgado *et al.*, 2008). Las contribuciones del nitrógeno dietario de *U. clathrata* fueron muy altas y representaron más del 95% del nitrógeno incorporado en los regímenes de co-alimentación 50F/50U y 25F/75U, donde se suministró proporciones de nitrógeno de 66:34 y 30:70 de alimentación artificial y *U. clathrata* respectivamente. Tal desproporción en la incorporación relativa de nitrógeno dietario de la macroalga, podría ser debido a una mayor digestibilidad y asimilación de aminoácidos, además de la disponibilidad continua de *U. clathrata* para camarones. Estos resultados indican que el carbono y nitrógeno dietario de ambas fuentes fueron metabolizados de diferente manera.

#### **7.6 Efecto del consumo de harina de *U. clathrata* y un extracto acuoso de *U. clathrata* en el alimento contra la infección WSSV**

Con la finalidad de tener un tratamiento de referencia contra la infección de WSSV, se utilizó un alimento con fucoidán como control antiviral ya que se tenía reportes de que este tiene un efecto positivo en contra de la infección de mancha blanca (Takahashi *et al.*, 1998; Chotigeat *et al.*, 2004; Cruz-Suarez *et al.*, 2006). Aparentemente el modelo de infección utilizado (*per os*) no fue el adecuado, ya que todos los camarones presentaron un grado de infección severamente alto reflejado en el análisis histológico de los órganos blanco, debido a que posiblemente el inóculo presentaba una dosis infectiva inusualmente alta para un sistema natural. Aunque que no se presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia entre los tratamientos, el efecto de la inclusión del extracto de *U. clathrata* y el de fucoidán en el alimento sobre la sobrevivencia fue similar durante los primeros cuatro días post-infección, con una sobrevivencia de más del doble de la población respecto al control sin alga, es decir: hay un retardo en la mortalidad aunque al final no existe una protección completa contra el virus. Los camarones alimentados con la dieta con inclusión de harina entera de *U. clathrata* también presentaron una mejor sobrevivencia que el control, sin embargo

tuvieron una mayor mortalidad que el tratamiento con extracto de *U. clathrata*, aun y cuando la inclusión en el alimento con harina de *U. clathrata* se hizo en base al porcentaje de recuperación del extracto, para que de esta forma teórica tuvieran la misma cantidad de sustancia activa (*Ulvan*). Aun y cuando se tienen reportes de trabajos donde se describen extractos de algunas especies de *Ulva* como antibacteriano e inmunoestimulante en camarón (Selvin *et al.*, 2004; Immanuel *et al.*, 2004), no hay reportes del efecto antiviral contra WSSV. Se sugiere que para próximos estudios de desafío viral, es necesario titular la carga viral con la que se va infectar (DL50) para evitar una infección extremadamente severa y con esto poder evidenciar o no el efecto antiviral de los compuestos experimentales.

### **7.7 Expresión diferencial de 292 genes de hepatopáncreas en camarones alimentados con *U. clathrata* y alimento artificial**

Del total de clones en el microarreglo, solo el 53.6% fue detectado a partir de las muestras de hepatopáncreas de los camarones, esto debido a que ciertos genes son expresado a muy bajo nivel o incluso no son expresados de acuerdo al tejido muestreado (Fagutao *et al.*, 2008, 2009). El uso de polisacáridos sulfatados extraídos de algas del genero *Ulva sp.* se han reportado como inmunoestimulantes en peces y mamíferos (Castro *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 1994), por lo que en este estudio utilizado *U. clathrata* fresca se esperaba observar algo congruente con estos antecedentes, sin embargo de los 15 genes involucrados en respuesta inmune expresados diferencialmente, solo 3 se sobre-expresaron y 12 se reprimieron (estos últimos 4 corresponden a crustinas), sin embargo sería preferible realizar estas observaciones sobre los hemocitos (tejido preferencial para estudios de respuesta inmune en camarón). De los genes sobre-expresados en los hepatopáncreas de camarón alimentados con *U. clathrata* se encuentran la “subunidad 6 ATPasa”, “proteína de unión a Acil-CoA”, “Hemocianina”, “Factor de elongación” y una “proteína hipotética”, las cuales se han reportado como sobre-expresadas en camarones *L. vannamei* resistentes a mancha blanca (Zhao *et al.*, 2007), pudiendo ser estas proteínas participes de la resistencia aparente observada en el experimento de desafío viral con WSSV realizado en el presente estudio. Algunos genes

sobre-estimulados como la “proteína 10 de unión a ácidos grasos” y la “apolipoproteína D” están relacionados al metabolismo de lípidos, por lo que podrían estar involucrados en la movilización y utilización de las fuentes lipídicas en el camarón como lo presentado en este trabajo. Otro gen sobre-expresado es el “citocromo P450” mayormente encargado de la eliminación de compuestos xénobioticos como pesticidas (Snyder y Mulder, 2001) pero también está involucrado la metabolización de sustratos variados como ácidos grasos, eicosanoides, etc. (Snyder, 2000), por lo que pudiera indicar la presencia de compuestos poco comunes en la *U. clathrata* de los cuales el camarón podría estar intentando metabolizar. Para conocer más ampliamente los efectos del consumo de *U. clathrata* en el camarón a nivel de genes, es necesario realizar más experimentos y en lo posible análisis sobre mas genes de todas las rutas metabólicas del camarón.

## 8 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se cumplió con los objetivos trazados para conocer de manera general, el uso potencial de *Ulva clathrata* en la engorda de camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*, mediante análisis químicos, ensayos *in vivo* y pruebas de biología molecular:

1. Se describe la composición química de *Ulva clathrata* cultivada en diferentes sistemas de cultivo.
  - El contenido de proteína y lípidos en *U. clathrata* es similar entre los diferentes sistemas de cultivo, sin embargo pueden variar entre 15 y 27% y entre 0.5 y 1.6% respectivamente. Las proporciones de fibra cruda, ceniza y carbohidratos en la macroalga, presentaron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo, siendo en el sistema de cocultivo con mayor contenido de fibra cruda, el sistema de propagación del laboratorio de UANL el de mayor contenido en ceniza, y el sistema en estanque de camarón con mayor contenido de carbohidratos. El contenido de ceniza tiende a ser alto (>40%) cuando la macroalga no tiene un proceso de lavado con agua dulce antes de ser secada.
  - La macroalga *U. clathrata* puede ser considerada como buena fuente de fibra dietética (30% en base seca), siendo la fracción soluble la más predominante.
  - El 35% de los aminoácidos en la proteína de *U. clathrata* son de los considerados esenciales para el camarón, siendo la arginina, leucina y valina los más abundantes.
  - Cerca del 30% de ácidos grasos en las muestras de *U. clathrata* son poliinsaturados, 17% de la familia de los omega-3 (principalmente 18:3n3), mientras que 9.5% de la familia de los omega-6 (principalmente 18:2n6).
  - Los monosacáridos más abundantes en *U. clathrata* fueron la ramnosa, ácido urónico, glucosa y xilosa.
  - La macroalga *U. clathrata* debe considerarse buena fuente de carotenoides por su alto contenido el cual puede llegar hasta 440 mg kg<sup>-1</sup> en base seca.

- En el caso de minerales, *U. clathrata* puede considerarse como fuente de macroelementos esenciales en el caso de Ca y otros micro-elementos esenciales como Fe, Zn y Cu. De acuerdo a la variación encontrada de abundancia de los elementos analizados, es evidente que la concentración estará ligada a la disponibilidad de estos elementos en el medio de cultivo.
2. Se evaluaron diferentes niveles y formas de inclusión de *U. clathrata* en el alimento para camarón, determinando la estabilidad en el agua de las dietas así como su valor nutricional en términos de crecimiento, tasa de conversión alimenticia, sobrevivencia y digestibilidad aparente de materia seca y proteína.
- La inclusión entre el 2 y 6% de *U. clathrata* previo a la peletización del alimento, mejora significativamente la estabilidad en el agua del alimento en términos de pérdida de materia seca y proteína, además de aumentar su capacidad de absorción de agua.
  - En términos de crecimiento, la inclusión hasta de 6% de harina de *U. clathrata* en el alimento, no mejora el crecimiento de los camarones.
  - Cuando *U. clathrata* es utilizada fresca (licuada) para recubrir el alimento terminado (2% inclusión base seca) los camarones mejoran su tasa de crecimiento respecto al control en un 5%, sugiriendo que los procesos térmicos sobre *U. clathrata* pueden afectar el valor nutricional de la macroalga sobre el camarón.
  - La inclusión de 6% de harina de *U. clathrata* mejora significativamente la digestibilidad aparente de la proteína en la dieta, no así para la digestibilidad de la materia seca en la dieta. Con este nivel de inclusión, no se presentaron diferencias significativas respecto a un control 0% *U. clathrata* sobre el perfil de ácidos grasos en los camarones alimentados con estas dietas.
3. Se determinó la capacidad de remplazo de alimento artificial con *U. clathrata* fresca y su efecto en el perfil de ácidos grasos en el camarón, bajo condiciones controladas de laboratorio (sin producción primaria).

- La *U. clathrata* fresca puede llegar a sustituir hasta el 50% de la ración normal de alimento artificial (balanceado) sin tener efectos negativos en el crecimiento. Con la reducción de hasta 25% de la ración normal de alimento artificial y en presencia de *U. clathrata* fresca, se presenta un crecimiento significativamente mayor en los camarones que en aquellos alimentados con una ración de 100% alimento artificial sin presencia de *Ulva*.
  - En el caso de los camarones alimentados con 50% de la ración de alimento artificial, la cantidad de *U. clathrata* consumida se puede considerar como nutricionalmente equivalente de acuerdo a la tasa de conversión alimenticia total, considerando el consumo de *Ulva* y alimento artificial en base seca.
  - El consumo de *U. clathrata* fresca disminuye el contenido de ácidos grasos totales en el músculo de camarón, aumentando la proporción de ácido linolénico.
  - Los camarones que solo consumen *U. clathrata* presentan una acumulación de colesterol en el músculo.
4. Se realizaron pruebas para determinar la viabilidad y rendimiento del cocultivo de *L. vannamei* y *U. clathrata*, evaluando parámetros zootécnicos en los camarones y realizando análisis químicos específicos (bromatológicos, pigmentos, ácidos grasos).
- En los tanques bajo cocultivo se vió modificada la calidad de agua, disminuyendo la turbidez y la cuenta total de células de plancton.
  - La eficiencia de utilización de alimento artificial se ve mejorada en términos de tasa de conversión alimenticia relativa a la dieta artificial.
  - Los camarones en cocultivo disminuyen el contenido de lípidos totales corporales, aumentando la proporción de ácido linolénico.
  - El consumo de *U. clathrata* incrementa de forma significativa el contenido de carotenoides totales en el camarón, disminuyéndose este efecto conforme se administra mas alimento artificial.
  - Los camarones bajo cocultivo sin suplementación de alimento artificial no pueden alcanzar su potencial máximo de crecimiento pero presentan buena sobrevivencia.

- Para óptimos resultados, el modelo de cocultivo con la presente cepa de *U. clathrata* debe de realizarse a temperaturas no mayores a 28° C en el agua de cultivo, donde se puede ahorrar hasta un 45% de alimento artificial.
5. Se determinó la contribución nutricional de *U. clathrata* en el camarón *L. vannamei* en condiciones controladas de laboratorio, mediante el análisis de isotopos estables de carbono y nitrógeno.
- Todos los camarones alcanzaron el equilibrio isotópico a las 3 semanas de experimentación. Al término del ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre los valores isotópicos de los camarones completos y sus respectivos tejidos musculares.
  - El carbono suministrado por el alimento artificial fue incorporado en los camarones en mayor proporción que el nitrógeno disponible en esta misma fuente.
  - Los camarones alimentados solo con *U. clathrata* presentaron una tasa de recambio metabólico de carbono y nitrógeno muy elevado con un crecimiento muy pobre y baja sobrevivencia.
  - El tiempo medio ( $t_{50}$ ) de residencia del nitrógeno dietario fue mayor conforme la proporción de alimento artificial se incremento, lo cual está relacionado con la síntesis de tejido en el camarón (mayor crecimiento)
  - Los resultados indican que la contribución de materia seca de *U. clathrata* fue superior a la contribución del alimentación artificial en camarones co-alimentados con *Ulva* y alimento artificial.
6. Se determinó el potencial de la harina de *Ulva clathrata* y de un extracto de la misma (Ulvan) contra la infección de WSSV en camarón *L. vannamei*.
- Tanto la harina entera de *U. clathrata* como el extracto (Ulvan) en el alimento de camarón, presentaron una mayor sobrevivencia que los camarones controles alimentados con una dieta sin alga, sin llegar a ser significativa.
  - El extracto de *Ulva* tuvo un efecto similar al fucoidan (ya probando contra WSSV) sobre la sobrevivencia de los camarones infectados con WSSV, por lo



que el extracto utilizado, constituido principalmente de ulvan, pudiera considerarse como posible agente antiviral contra WSSV.

- Debido a que el modelo de infección utilizado en el presente estudio fue inusualmente severo, es necesario realizar nuevos estudios de infección con un virus titulado, para determinar con mayor certeza la efectividad de *U. clathrata* como antiviral contra WSSV.

7. Se determinó la expresión diferencial en hepatopáncreas de camarones alimentados con una dieta artificial y *U. clathrata* respecto a camarones alimentados solo con la dieta artificial, esto por medio del análisis de microarreglos con 292 genes de camarón.

- De los 292 elementos en el microarreglo, solo 46 se consideraron con una expresión diferencial.
- Cerca del 30% de los genes sobre-expresados corresponden a proteínas ribosomales, mientras que el 50% de los genes reprimidos corresponden a proteínas de respuesta inmune.
- Algunos de los genes sobre-expresados en los camarones alimentados con *Ulva* pudieran estar involucrados en la resistencia a la infección de WSSV.
- Es necesario llevar a cabo más estudios de biología molecular para correlacionar y comprender mejor los efectos ocasionados por el consumo de *U. clathrata* y/o sus compuestos específicos en el camarón blanco *L. vannamei*.

## 9 ANEXOS

### **ANEXO A.- Protocolo para extracción de polisacáridos sulfatados de *Ulva clathrata* para ensayo de desafío con WSSV**

#### Material y métodos

La extracción del ulvan se llevó a cabo con HCl 0.05 M con el cual se puede romper la pared celular del alga para tener una mejor extracción de ulvan. La extracción se realizó a temperatura ambiente durante 3 h en agitación constante, repitiendo este proceso 4 veces. Posteriormente se recuperó el ulvan por precipitación con etanol. Propuesta por Percivall y McDowell (1967) con algunas modificaciones desarrolladas por Tako *et al.* (2000).

El porcentaje de recuperación se calculó a partir del peso seco al término del proceso. Una vez teniendo el extracto se realizó un análisis de cuantificación de monosacáridos, realizando una hidrólisis de 50 mg de c/extracto en 20 mL de ácido sulfúrico 1.0 M a ebullición con reflujo por 3h (método Tako *et al.* 2000). Después se afora a 25 mL, se filtra una alícuota y se inyecta en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) para la separación y cuantificación de monosacáridos.

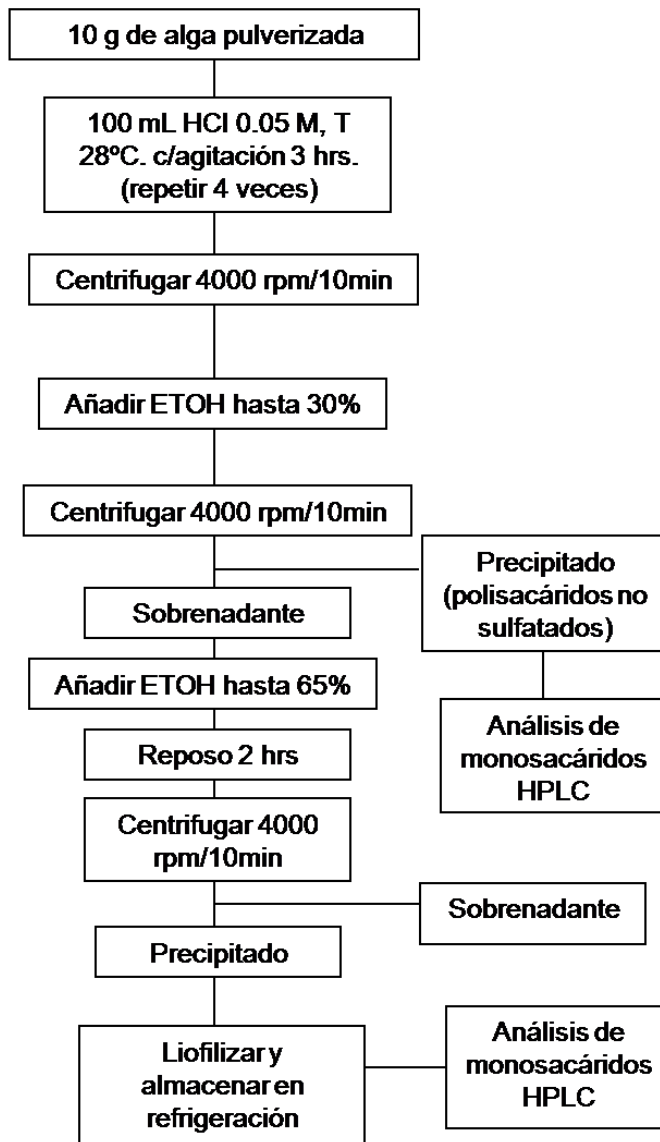
#### Material y equipo de laboratorio

- Cristalería
  - o Vasos de precipitado
  - o Pipetas
  - o Matraz de aforación
- Agitadores magnéticos
- Plancha magnética
- Balanza analítica
- HPLC
- Columna Aminex

#### Reactivos

- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico
- Etanol 96°
- Oxalato de amonio
- Hidróxido de sodio
- Agua destilada
- Filtros HPLC 45um grandes
- Filtros HPLC 45um pequeños

Diagrama del protocolo de extracción de polisacáridos de *Ulva clathrata*

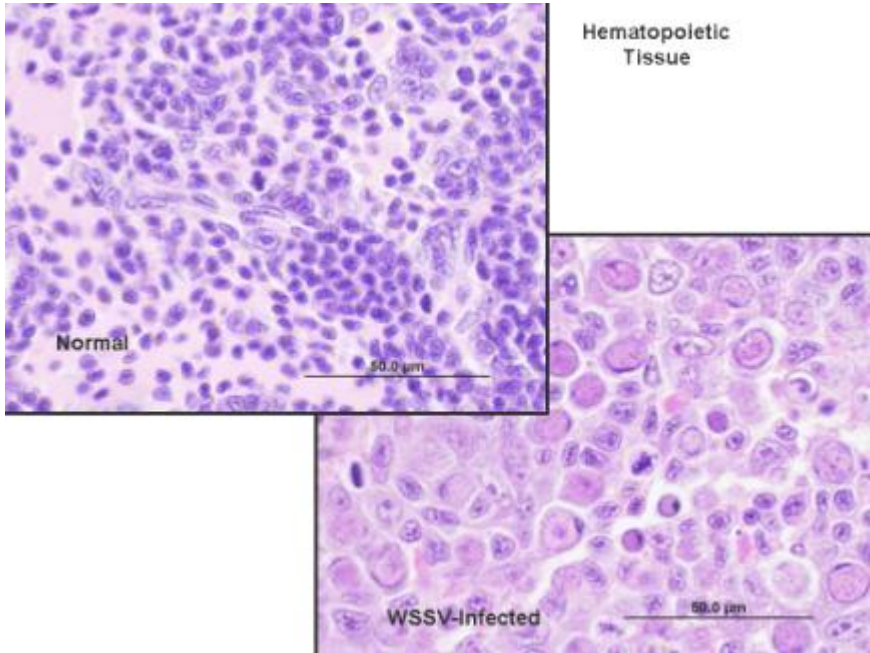


## Resultados

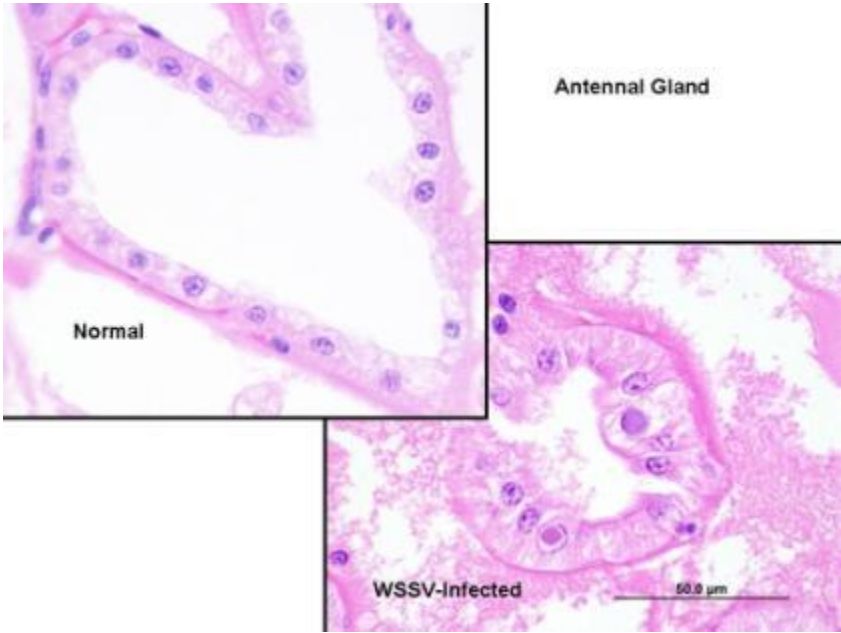
El porcentaje de recuperación del extracto fue del 11%, con una pureza de 48%

**ANEXO B.- Laminillas de cortes histológicos en camarones sanos e infectados con WSSV**

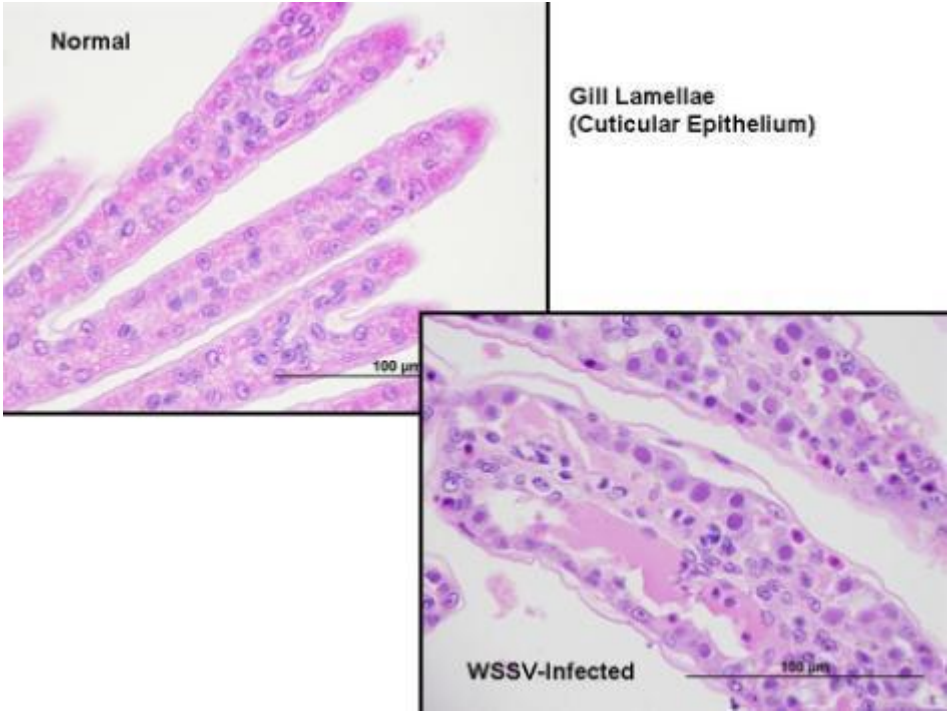
**Tejido hematopoyético**



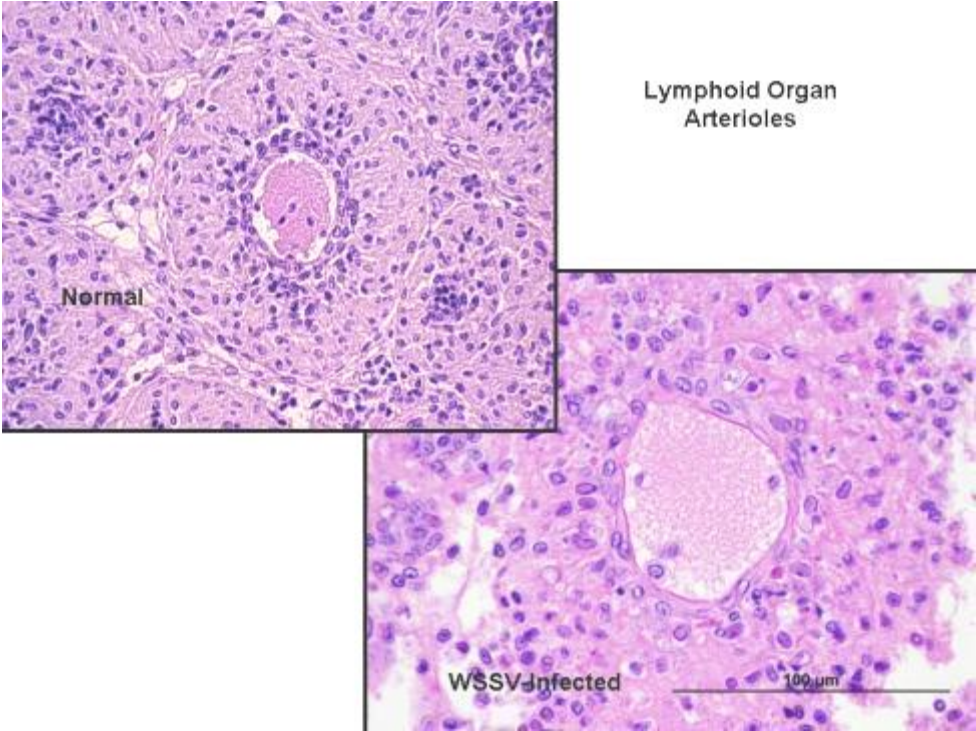
**Glándula antenal**



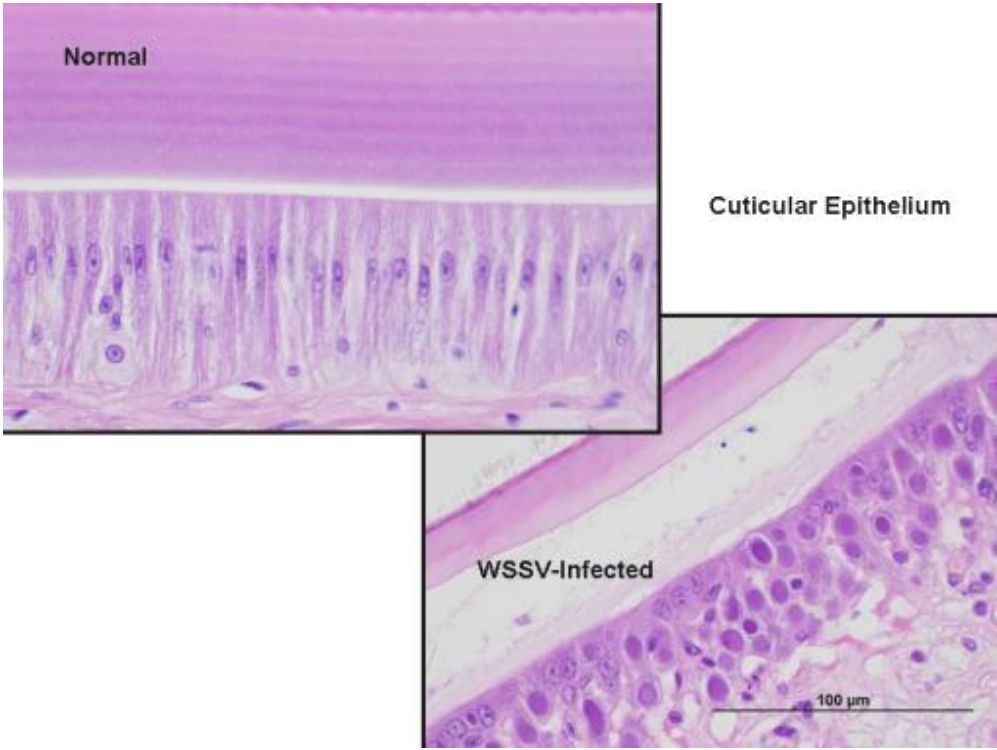
**Branquias**



**Órgano linfoide**



**Epitelio cuticular**



## 10 LITERATURA CITADA

Abreu PC, Ballester ELC, Odebrecht C, Wasielesky W Jr, Cavalli RO, Graneéli W, Anesio AM. 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 347, 88–96.

Aguilera-Morales M, Casas-Valdez M, Carrillo-Dominguez B, Gonzalez-Acosta B, Perez-Gil F. 2005. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha spp.* as a potential food source. Journal of Food Composition and Analysis 18:79-88.

Akiyama D, Dominy W, Lawrence AL. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: Revisited, Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop American Soybean Association, pp 80-98.

Alliot A, Frenet-Piron M. 1990. Relationship between metals in sea-water and metal accumulation in shrimps. Marine Pollution Bulletin 21:30-33.

Anderle P, Farmer P, Berger A, Roberts MA. 2004. Nutrigenomic approach to understanding the mechanisms by which dietary long-chain fatty acids induce gene signals and control mechanisms involved in carcinogenesis. Nutrition 20:103-108.

AOAC. 1990. Official Methods of analysis, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.

AOCS. 1997. Official and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, 5th ed., AOCS Press, Champaign IL, USA.

Arasaki A, Arasaki T. 1983. Low calories, high nutrition. Vegetables from sea to help you look and feel better. Japan publications, pp. 39-42.

Arredondo-Figueroa JL, Ponce-Palafox JT, Vernon-Carter EJ. 1999. Dose response to unesterified pigments of Aztec marigold, *Tagetes erecta*, in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed with various dietary concentrations of carotenoids. Crustacean Issues 12, 481-487.

Balasubramanian G, Sarathi M, Kumar SR, Hameed ASS. 2007. Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. Aquaculture 263:15-19.

Barsanti L, Gualtieri P. 2006. Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology. Taylor and Francis. Florida US, pp. 251-289.

Beaudoin CP, Prepas EE, Tonn WM, Wassenaar LI, Kotak BG. 2001. A stable carbon and nitrogen isotope study of lake food webs in Canada's Boreal Plain. *Freshwater Biol.* 46, 465–477.

Besada V, Andrade JM, Schultze F, Gonzalez JJ. 2009. Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption. *Journal of Marine Systems* 75:305-313.

Bitter T, Muir HM. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry* 4(4), 330-334.

Bodvin T, Indergarad M, Norgaard E, Jensen A, Skaar A. 1996. Clean technology without waste products. *Hydrobiologia.* 326/327:83-86.

Bonneau M, Laarveld B. 1999. Biotechnology in animal nutrition, physiology and health. *Livestock Production Science* 59:223-241.

Boonyaratpalin M, Thongrod S, Supamattaya K, Britton G, Schlipalius LE. 2001. Effects of  $\beta$ -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 32(1):182-190.

Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. 2001. Total Lipid, Cholesterol, and Fatty Acids of Farmed Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Wild Marine Shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). *Journal of Food Composition and Analysis* 14:359-369.

Breteler WCMK, Grice K, Schouten S, Kloosterhuis HT, Damste JSS, 2002. Stable carbon isotope fractionation in the marine copepod *Temora longicornus*: unexpectedly low  $\delta_{13}\text{C}$  value of fecal pellets. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 240, 195–204.

Briggs MRP, Funge-Smith SL. 1996. The potential of *Gracilaria* spp. meal for supplementation of diets for juvenile *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquacult. Fish. Manage* 27(5):345-354.

Bula-Meyer, G., 1985. Florecimientos nocivos de algas verde-azules en dos lagunas del Departamento del Magdalena. *Rev. Ing. Pesq.* 5(1-2), 89-99.

Burtin P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2(4):498-503.

Cabrera T, Cabrera G, Rosas J, Velasquez A, Silva M. 2005. Variation of the lipids and fatty acids in marine shrimps consumed in Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55:194-200.

Carefoot TH. 1973. Feeding, food preference, and the uptake of food energy by the supralittoral isopod *Ligia pallasii*. *Marine Biology* 18:228–236.



Carrillo-Domínguez S, Casas-Valdez M, Ramos-Ramos F, Pérez-Gil F, Sanchez-Rodríguez I. 2002. Algas marinas de Baja California Sur, México: Valor nutrimental: ALAN, dic. 2002, vol.52, no.4.

Carrillo S, Lopez E, Casas M, Avila E, Castillo R, Carranco M, Calvo C, Perez-Gil F. 2008. Potential use of seaweeds in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs. *Journal of Applied Phycology* 20:721-728.

Casas-Valdez M, Portillo-Clark G, Aguila-Ramírez N, Rodríguez-Astudillo S, Sánchez-Rodríguez I, Carrillo-Domínguez S. 2006. Efecto del alga marina *Sargassum spp.* sobre las variables productivas y la concentración de colesterol en el camarón café, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900). *Revista de biología marina y oceanografía* 41:97-105.

Castro R, Piazzon MC, Zarra I, Leiro J, Noya M, Lamas J. 2006. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture* 254:9-20.

Cerecer-Cota EE, Ricque-Marie D, Mendoza-Cano F, Nieto-Lopez M, Cruz-Suárez LE. 2005. Pellet stability and hardness influence feed consumption of Pacific White Shrimp. *Global Aquaculture Advocate* 8(3):84-86.

Chapman VJ, Chapman OJ. 1980. Seaweeds and their uses. Chapman and Hall, third edition, London, pp 334.

Chávez-Calvillo G, Perez-Rueda E, Lizama G, Zúñiga Aguilar JJ, Gaxiola G, Cuzon G, Arena-Ortiz L. 2010. Differential gene expression in *Litopenaeus vannamei* shrimp in response to diet changes. *Aquaculture* 300:137-141.

Cheng ZJ, Hardy RW. 2004. Protein and lipid sources affect cholesterol concentrations of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Journal of Animal Science* 82:1136-1145.

Chopin T, Sharp G, Belyea E, Semple R, Jones D. 1999a. Open-water aquaculture of the red alga *Chondrus crispus* in Prince Edward Island, Canada. *J. Hydrobiologia* 398/399:417-25.

Chopin T, Yarish C, Wilkes R, Belyea E, Lu S, Mathieson A. 1999b. Developing Porphyra/salmon integrated aquaculture for bioremediation and diversification of the aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology* 11:463-472.

Chopin T, Buschmann AH, Halling C, Troell M, Kautsky N, Neori A, Kraemer GP, Zertuche-González JA, Yarish C, Neefus C. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *J. Phycol.* 37:975–986.

Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 233:23-30.

Chou HY, Huang CY, Wang CH, Chiang HC, Lo CF. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Disease of Aquatic Organisms* 23:165-173.

Clifford III HC. 1992. Marine shrimp pond management: a review. In: Wyban, J. (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, U.S.A, pp. 110-137.

Cohen RA, Fong P. 2004. Nitrogen uptake and assimilation in *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link (Chlorophyta): using <sup>15</sup>N to determine preference during simultaneous pulses of nitrate and ammonium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309, 67–77.

Collins JF. 2006. Gene chip analyses reveal differential genetic response to iron deficiency in rat duodenum and jejunum. *Biol. Res.* 39, 25-27.

CONAPESCA. 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México - © - 2010 <http://www.siap.gob.mx/>

Conceição LEC, Yúfera M, Makridis P, Morais S, Dinis MT. 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquac. Res.* 41, 613-640.

Copertino MD, Tormena T, Seeliger U. 2009. Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Chlorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. *Journal of Applied Phycology* 21:31-45.

Corthesy-Theulaz I, den Dunnen JT, Ferre P, Geurts JMW, Muller M, van Belzen N, van Ommen B. 2005. Nutrigenomics: The impact of biomics technology on nutrition research. *Ann. Nutr. Metab.* 49, 355-365.

Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Guajardo-Barbosa C. 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Cerecedo-Olvera R (eds). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del Quinto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* pp. 227-266. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México., Noviembre 19-22.

Cruz-Suárez LE, Hernández J, Porchas-Conrnejo M, Coronado-Molina DE, Linné-Unzueta-Bustamante ML, Nieto-López M, Tapia-Salazar M, Ricque-Marie D. 2006. Estudio del efecto antiviral del fucoidan del alga café *Cladosiphon okamuranus* contra la infección por WSSV en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Puello-Cruz AP, García-Ortega A (eds). *Book proceedings of the VIII simposio internacional de Nutrición acuícola*, pp. 78. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. Noviembre 15-17.

Cruz-Suarez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-Lopez MG, Guajardo-Barbosa C, Ricque-Marie D. 2009. Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis*

*pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition* 15:421-430.

Curnow J, King J, Partridge G, Kolkovski S. 2006. Effects of two commercial microdiets on growth and survival of barramundi (*Lates calcarifer* Bloch) larvae within various early weaning protocols. *Aquacult. Nutr.* 12, 247- 255.

Cuzon G, Guillaume J, Cahu C. 1994. Composition, preparation and utilization of feeds for Crustacea. *Aquaculture* 124:253-267.

Da Silva RL, Barbosa JM. 2009. Seaweed meal as a protein source for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Phycology* 21:193-197.

Dalmo RA, Seljelid R. 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminarian b(1,3)-Dglucan) on Atlantic salmon, *Salmon salar* L., macrophages *in vitro*. *Journal of Fish Diseases* 18:175-185.

Darcy-Vrillon B. 1993. Nutritional aspect of the developing use of marine macroalgae for the human foods industry. *International Journal of Food Science and Nutrition* 44:23–35.

de la Vega E, Hall MR, Wilson KJ, Reverter A, Woods RG, Degnan BM. 2007. Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Physiol. Genomics* 31:126-138.

De Niro MJ, Epstein S. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 42:495–506.

de Reviere B, Leproux A. 1993. Characterization of polysaccharides from *Enteromorpha intestinalis* (L.) link, chlorophyta. *Carbohydrate Polymers* 22:253-259.

Dhar AK, Dettori A, Roux MM, Klimpel KR, Read B. 2003. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cDNA microarrays. *Arch. Virol.* 148:2381–2396.

Dodson JR, Aroson JM. 1978. Cell wall composition of *Enteromorpha intestinalis*. *Botanica Marina* 21:241–246.

Du HH, Xu ZR, Wu XF, Li WF, Dai W. 2006. Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus. *Aquaculture* 260:39-43.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JR, Roberts PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–354.

Durand S, Lightner D, Nunan L, Redman R, Mari J, Bonami J. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:59-66.

Egwim PO, Kummerow FA. 1972. Influence of dietary fat on the concentration of long-chain unsaturated fatty acid families in rat tissues. *Journal of Lipid Research* 13:500-510.

Emerson WD. 1980. Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Marine Ecology Progress Service* 2:121-131.

Emerson WD, Hayes DP, Ngonyame M. 1983. Growth and maturation of *Penaeus indicus* under blue and green light. *South African Journal of Zoology* 18:71-75.

Espinosa G, Rodríguez T, Marrero J, Ramos L, Borrell Y, Bécquer U, Nodas F, Hernández N. 2002. Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. pp. 765-777.  
<http://www.revistaaquatic.com/civa2002/coms/completo.asp?cod=90>

Ergün S, Soyutürk M, Güroy B, Güroy D, Merrifield D. 2009. Influence of *Ulva* meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. *Aquaculture International* 17:355-361.

Escobedo-Bonilla, C.M., V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgelos, M.B. Pensaert, H.J. Nauwynck. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases* 31:1-18.

Ezquerria-Brauer JM, Parra-Vergara NV, Carrillo-Pérez C. 2003. Efecto de la concentración de proteína en la dieta sobre la calidad química, microbiológica y textura del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado. *Biocencia* 5:25-33

Ezquerria-Brauer JM, Bringas-Alvarado L, Burgos-Hernández A, Rouzaud-Sandéz O. 2004. Control de la composición química y atributos de calidad de camarones cultivados. In: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Nieto-López MG, Villarreal D, Scholz U, González M. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Fagutao FF, Yasuike M, Caipang CM, Kondo H, Hirono I, Takahashi Y, Aoki T. 2008. Gene Expression Profile of Hemocytes of Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Following Peptidoglycan Stimulation. *Marine Biotechnology* 10:731-740.

Fagutao FF, Yasuike M, Santos MD, Ruangpan L, Sangrunggruang K, Tassanakajon A, Takahashi Y, Ueno R, Kondo H, Hirono I, Aoki T. 2009. Differential

gene expression in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following administration of oxytetracycline and oxolinic acid. *Developmental and Comparative Immunology* 33:1088-1092.

Fantle, M.S., Dittel, A.I., Schwalm, S., Epifanio, C.E., Fogel, M.L., 1999. A food-web analysis of the juvenile crab *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia* 120, 416-426.

FAO. 1988. Manual para la cría de camarones peneidos. FAO. Roma. 1988.

FAO. 2004. FAO. The state of the world fisheries and aquaculture (*SOFIA*), FAO, Rome 2004. Accessible at [http://www.fao.org/sof/sofia/index\\_en.htm](http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm).

FAO. © 2006-2011. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [online]. Rome. Updated 7 April 2006. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es)

FAO. 2010. Agricultura “climáticamente inteligente”; Políticas, prácticas y financiación para la seguridad alimentaria, adaptación y mitigación Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 2010, Roma, Italia, pp12

Fattorusso E, Magno S, Mayol L. 1980. Sterols of mediterranean chlorophyceae. *Cellular and Molecular Life Sciences* 36:1137-1138.

Ferguson LR, Shelling AN, Lauren D, Heyes JA, McNabb WC. 2007. Nutrigenomics and gut health. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 622:1-6.

Fleurence J. 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology* 10:25-28.

Fleury N, Lahaye M. 1991. Chemical and physico-chemical characterisation of fibres from *Laminaria digitata* (kombu breton): A physiological approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 55(3):389-400.

Fontaine J. 2003. Amino acid analysis of feeds, In: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Amino Acids in Animal Nutrition*, 2nd edition. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 15–40.

Foster GG, Hodgson AN. 1998. Consumption and apparent dry matter digestibility of six intertidal macroalgae by *Turbo sarmaticus* (Mollusca: Vetigastropoda: Turbinidae). *Aquaculture* 167:211–227.

Fry B, Arnold C. 1982. Rapid <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia* 54:200–204.

Fry B. 2006. *Stable Isotope Ecology*. Springer Science. NY, USA. 390 pp.

Fujiwara-Arasaki T, Mino T, Kuroda M. 1984. The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia* 116/117:513–516

Gamboa-Delgado J, Molina-Poveda C, Cahu C. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research* 34:1403-1411.

Gamboa-Delgado J, Cañavate JP, Zerolo R, Le Vay L. 2008. Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 280:190-197.

Gamboa-Delgado J, Le Vay L. 2009a. Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture* 291:115-123.

Gamboa-Delgado J, Le Vay L. 2009b. Artemia replacement in co-feeding regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon stable isotopes. *Aquaculture* 297:128-135.

Gomez-Pinchetti J, del Campo-Fernandez E, Moreno-Diez P, Reina G. 1998. Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 10:383-389.

Gonzalez-Felix ML, Gatlin DM, Lawrence AL, Perez-Velazquez M. 2002a. Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 207:151-167.

González-Félix ML, Lawrence AL, Gatlin DM, Perez-Velazquez M. 2002b. Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. *Aquaculture* 205:325-343.

Gonzalez-Felix ML, Gatlin DM, Lawrence AL, Perez-Velazquez M. 2003. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: II. Effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated and highly unsaturated fatty acids on juvenile shrimp growth, survival, and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition* 9:115-122.

González-Félix ML, da Silva FSD, Davis DA, Samocha TM, Morris TC, Wilkenfeld JS, Perez-Velazquez M. 2010. Replacement of fish oil in plant based diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 309:152-158.

Hamano K, Aue-Umuoy D, Srisapoom P, Tsutsui I. 2007. Profitable environmental remediation with seaweeds in an intensive marine shrimp culture. XIXth International Seaweed Symposium. March 26-31, Kobe, Japan.

Hashim R, Saat MAM. 1992. The utilization of seaweed meals as binding agents in pelleted feeds for snakehead (*Channa striatus*) fry and their effects on growth. *Aquaculture* 108:299-308.

Hayden HS, Blomster J, Maggs CA, Silva PC, Stanhope MJ, Waaland JR. 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *European Journal of Phycology* 38:277-294.

He NH, Qin QW, Xu X. 2005. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research* 66:39-45.

Hernández-Garibay E, Zertuche-González JA, Pacheco-Ruiz I. 2011. Isolation and chemicals characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Journal of Applied Phycology*. doi:585 10.1007/s10811-010-9629-0.

Hesslein RH, Hallard KA, Ramlal P. 1993. Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by <sup>34</sup>S, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50:2071–2076.

Hilton JW, Cho CY, Slinger SJ. 1981. Effect of extrusion processing and steam pelleting diets on pellet durability, pellet water absorption and the physiological response of rainbow trout. *Aquaculture* 25:185-194.

Hirata H, Kohirata E. 1993. Culture of the sterile *Ulva sp.* in a marine fish farm *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh* 45(4):164-168.

Hirata H, Yamasaki S, Maenosono H, Nakazono T, Yamauchi T, Matsuda M. 1994. Relative budgets of p O<sub>2</sub> and p CO<sub>2</sub> in cage polycultured Red Sea bream, *Pagrus major* and sterile *Ulva sp.* *Suisan Zoshoku* 42: 377–381.

Hou WY, Chen JC. 2005. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 19:127-138.

Houa X, Chai C, Qian Q, Yanb X, Fanb X. 1997. Determination of chemical species of iodine in some seaweeds (I). *The Science of the Total Environment* pp 215-221.

Hunter B, Pruder G, Wyban J. 1987. Biochemical composition of pond biota, shrimp ingesta, and relative growth of *Penaeus vannamei* in earthen ponds. *J. World Aquac. Soc.* 18:162-174.

Immanuel G, Vincybai VC, Sivaram V, Palavesam A, Marian MP. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and

pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture* 236:53-65.

Indergaard M, Minsaas J. 1991. Animal and human nutrition. In Guiry MD, Blunden G (eds.), *Seaweed resources in Europe: Uses and potential*, pp. 21–64.

Ito K, Hori K. 1989. Seaweed; chemical composition and potential food uses. *Food Review International* 5:101–144.

Ivanova E, Toshkova R, Ivanova V, Rouseva R, Kolarova M. 1994. Stimulating effect of *Ulva lactuca* heteropolysaccharide on the immune response in mice. *Comptes-rendus de l'Académie Bulgare des Sciences* 47:109–112.

Jha RK, Xu ZR, Shen J, Bai SJ, Sun JY, Li WF. 2006. The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Immunology Letters* 105:68-76.

Jiménez del Río M, Ramazanov Z, García-Reina G. 1996. *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. *J of hydrobiologia* 326/327:61-66.

Jimenez-Escrig A, Sanchez-Muniz FJ. 2000. Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research* 20:585-598.

Jomori RK, Ducatti C, Carneiro DJ, Portella MC. 2008. Stable carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquac. Res.* 39:370–381.

Jordal AE, Torstensen BE, Tsoi S, Tocher DR, Lall SP, Douglas SE. 2005. Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Nutr.* 135:2355–2361.

Jory DE. 1995. Management of natural productivity in marine shrimp semi-intensive ponds. *Aquaculture Magazine* 21:90-100.

Ju ZY, Forster IP, Dominy WG. 2009. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 292:237-243.

Kanazawa A, Teshima S, Tokiwa S. 1979. Biosynthesis of fatty acids from palmitic acid in the prawn *Penaeus japonicus*, using microencapsulated diets. *Marine Biology* 54: 261.

Kaput J, Noble J, Hatipoglu B, Kohrs K, Dawson K, Bartholomew A. 2007. Application of nutrigenomic concepts to Type 2 diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 17:89-103.



Kolkovski S, Tandler A, Kissil GW, Gertler A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12:203-209.

Kosakai M, Yosizawa Z. 1979. A partial modification of the carbazole method of Bitter and Muir for quantitation of hexuronic acids. *Analytical Biochemistry* 93:295-298.

Kumar M, Kumari P, Trivedi N, Shukla M, Gupta V, Reddy C, Jha B. 2010. Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *Journal of Applied Phycology*:1-14.

Kumari P, Kumar M, Gupta V, Reddy CRK, Jha B. 2010. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chemistry* 120(3):749-757.

Lahaye M. 1991. Marine algae as sources of fibers: Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some 'sea vegetables'. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54: 587–594.

Lahaye M, Jegou D. 1993. Chemical and physical-chemical characteristics of dietary fibres from *Ulva lactuca* (L.) Thuret and *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. *Journal of Applied Phycology* 5:195-200.

Lahaye M, Gómez-Pinchetti JL, Jimenez del Rio M, Garcia-Reina G. 1995. Natural decoloration, composition and increase in dietary fibre content of an edible marine algae, *Ulva rigida* (Chlorophyta), grown under different nitrogen conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68:99-104.

Lahaye M. 2001. Chemistry and physico-chemistry of phycocolloids. *Cahiers de Biologie Marine* 42:137-157.

Lahaye M, Robic A. 2007. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8:1765-1774.

Lamare MD, Wing SR. 2001. Calorific content of New Zealand marine macrophytes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 35(2):335–341.

Latscha T. 1991. Carotenoids in aquatic animal nutrition. In: Akiyama DM, Tan RKH, (eds.). *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop*. pp. 68-79.

Laurén-Matta CJ, Hietala M, Reinikainen M, Wall M. 1995. Do *Microcystis aeruginosa* toxin accumulate in the food web: a laboratory study. *Hydrobiologia* 304:23-27.

Le Vay L, Gamboa-Delgado J. 2010. Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture*. DOI:10.1016/j.aquaculture.2010.03.033.

Leaver M, Villeneuve L, Obach A, Jensen L, Bron J, Tocher D, Taggart J. 2008. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9:299.

Leu JH, Chang CC, Wu JL, Hsu CW, Hirono I, Aoki T, Juan HF, Lo CF, Kou GH, Huang HC. 2007. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics* 8:120.

Lewis B. 2008. Promoting eye and skin health through intake of the natural carotenoid lutein. in De Meester F, Watson RR (Eds), *Wild-type food in health promotion and disease prevention*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. pp.331-342.

Lightner DV, Hasson KW, White BL, Redman RM. 1998. Experimental Infection of Western Hemisphere Penaeid Shrimp with Asian White Spot Syndrome Virus and Asian Yellow Head Virus. *Journal of Aquatic Animal Health* 10:271-281.

Liu JN, Yoshida Y, Wang MQ, Okai Y, Yamashita U. 1997. B cell stimulating activity of seaweed extracts. *International Journal Immunopharmacol* 19(3):135-142

Llames C, Fontaine J. 1994. Determination of amino acids in feeds: collaborative study. *J.AOAC International*. 77:1362-1402.

Lombardi JV, Marques HLD, Pereira RTL, Barreto OJS, de Paula EJ. 2006. Cage polyculture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the Philippines seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Aquaculture* 258:412-415.

Lu YN, Liu JJ, Jin LJ, Li XY, Zhen YH, Xue HY, You JS, Xu YP. 2008. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. *Fish & Shellfish Immunology* 25:604-610.

Mabeau S, Fleurence J. 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology* 4:103-107.

Mai H, Fotedar R, Fewtrell J. 2010. Evaluation of *Sargassum sp.* as a nutrient-sink in an integrated seaweed-prawn (ISP) culture system. *Aquaculture* 310:91-98.

Mai K, Mercer JP, Donlon J. 1994. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino: II. Amino acid composition of abalone and six species of macroalgae with an assessment of their nutritional value. *Aquaculture* 128:115-130.

Mamatha BS, Namitha KK, Senthil A, Smitha J, Ravishankar GA. 2007. Studies on use of *Enteromorpha* in snack food. Food Chemistry 101:1707-1713.

Marais MF, Joseleau JP. 2001. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. Carbohydrate Research 336:155-159.

Marinho-Soriano E, Morales C, Moreira WSC. 2002. Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) in shrimp pond effluents in Brazil. Aquaculture Research 33:1081-1086.

Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MAA, Moreira WSC. 2006. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. Bioresource Technology 97:2402-2406.

Marinho-Soriano E, Camara MR, Cabral TD, Carneiro MAD. 2007. Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. Aquacult Res 38:182-187.

Marsham S, Scott GW, Tobin ML. 2007. Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. Food Chemistry 100:1331-1336.

Martínez-Córdova L, Porchas-Cornejo M, Villareal-Colmenares H, Calderón-Pérez J, Naranjo-Parmao J. 1998. Evaluation of three feeding strategies on the culture of white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931 in low water exchange ponds. Aquacultural Engineering 17:21-28.

Martínez-Córdova L, Campaña-Torres A, Porchas-Cornejo M. 2002. Promotion and contribution of biota in low water exchange ponds farming blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). Aquaculture Research 33:27-32.

Martinez-Cordova LR, Peña-Messina E. 2005. Biotic communities and feeding habits of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson 1974) in monoculture and polyculture semi-intensive ponds. Aquaculture Research 36:1075-1084.

Martínez del Rio C, Wolf BO. 2005. Mass-balance models for animal isotopic ecology. In: Starck, J. M., Wang, T. (Eds.). Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates. Science Publishers, Enfield, NH, pp. 141-174.

Maynard A, Loosli JK, Hintz HF, Warner RG. 1983. Nutrición Animal, 4 edición, Mc Graw Hill. pp 22-47

McDermid KJ, Stuercke B. 2003. Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. Journal of Applied Phycology 15:513-524.

McHugh DJ. 2003. A guide to the seaweed industry. Fisheries Technical Paper. No. 441. FAO, Rome.

Meijer G, Bressers M, Arjan de Groot W, Rudrum M. 2003. Effect of structure and form on the ability of plant sterols to inhibit cholesterol absorption in hamsters. *Lipids* 38:713-721.

Mente E, Coutteau P, Houlihan D, Davidson I, Sorgeloos P. 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology* 205:3107-3122.

Mercado JM, de los Santos CB, Pérez-Lloréns JL, Vergara JJ. 2009. Carbon isotopic fractionation in macroalgae from Cádiz Bay (Southern Spain): Comparison with other bio-geographic regions. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 85:449–458.

Mohamed LA, Khaled A. 2005. Comparative study of heavy metal distribution in some coastal seaweeds of Alexandria, Egypt. *Chemistry and Ecology* 21:181-189.

Moll B, Deikman J. 1995. *Enteromorpha clathrata*: A potential seawater-irrigated crop. *Bioresource Technology* 52:255-260.

Moll B. 2004. Aquatic surface barriers and methods for culturing seaweed. World Intellectual Property Organization WO 2004/093525.

Morales de León J, Babinsky V, Bourges RH, Camacho PM. 2000. Tablas de composición de alimentos mexicanos. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubairán. México, D.F.

Morris TC, Samocha TM, Davis DA, Fox JM. 2011. Cholesterol supplements for *Litopenaeus vannamei* reared on plant based diets in the presence of natural productivity. *Aquaculture In Press, Corrected Proof*.

Msuya F, Neori A. 2008. Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *Journal of Applied Phycology* 20:1021-1031.

Muangkeow B, Ikejima K, Powtongsook S, Yi Y. 2007. Effects of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., stocking density on growth, nutrient conversion rate and economic return in integrated closed recirculation system. *Aquaculture* 269:363-376.

Murray HM, Lall SP, Rajaselvam R, Boutilier LA, Blanchard B, Flight RM, Colombo S, Mohindra V, Douglas SE. 2010. A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L. *Aquaculture* 298:282-293.

Naidu KA, Tewari A, Joshi HV, Viswanath S, Ramesh HP, Rao SV. 1993. Evaluation of nutritional quality and food safety of seaweeds of India. *Journal of Food Safety*, 13(2):77 – 90.

Nakagawa H, Kasahara S, Sugiyama T. 1987. Effect of *Ulva* meal supplementation on lipid metabolism of black sea bream, *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker). *Aquaculture* 62:109-121.

Nakagawa H. 1997a. Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. *Biomed & Pharmacother* 51: 345-348.

Nakagawa H, Umino T, Tasaka Y. 1997b. Usefulness of *Ascophyllum* meal as a feed additive for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 151: 275-281.

Nandeesh MC, Gangadhara B, Manissery JK, Venkataraman LV. 2001. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. *Bioresource Technol.* 80(2):117-1720.

Neori A, Cohen I, Gordin H. 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents. 2. Growth rate, yield and C:N ratio. *Botanica Marina*. Vol. 34, no. 6, pp. 483-489. Nunes, A.J.P., Gesteira, T.C.V., Goddard, S., 1997. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149:121-136.

Neori A, Ragg NLC, Shpigel M. 1998. The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within an abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. *Aquacultural Engineering* 17:215–239.

Neori A, Shpigel M. 1999. Using algae to treat effluents and feed invertebrates in sustainable integrated mariculture. *World Aquaculture* 30:46–49.

Neori A, Shpigel M, Ben-Ezra D. 2000. Sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture* 186:279–291.

Neori A. 2008. Essential role of seaweed cultivation in integrated multi-trophic aquaculture farms for global expansion of mariculture: an analysis. *Journal of Applied Phycology* 20:567-570.

Ning JF, Zhu W, Xu JP, Zheng CY, Meng XL. 2009. Oral delivery of DNA vaccine encoding VP28 against white spot syndrome virus in crayfish by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine* 27:1127-1135.

Nisizawa K, Noda H, Kikuchi R, Watanabe T. 1987. The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia* 151/152:5-29.

Nunes AJP, Gesteira TCV, Goddard S. 1997. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149:121-136.

Obluchinskaia ED, Voskoboinikov GM, Galynkin VA. 2002. Content of alginic acid and fucoidan in fucus algae of the Barents sea. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 38(2):213-216.

Orduña-Rojas J, Longoria-Espinoza RM. 2006. Metal Content in *Ulva lactuca* (Linnaeus) from Navachiste Bay (Southeast Gulf of California) Sinaloa, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 77:574–580.

Ortiz J, Romero N, Robert P, Araya J, Lopez-Hernandez J, Bozzo C, Navarrete E, Osorio A, Rios A. 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry* 99:98-104.

Oxley D, Currie G, Bacic A. 2004. Analysis of Carbohydrate from Glycoproteins in Purifying Proteins for Proteomics: A Laboratory Manual (ed. Simpson, R.J.). (Chapter 25). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Paez-Osuna F, Ochoa-Izaguirre MJ, Bojorquez-Leyva H, Michel-Reynoso IL. 2000. Macroalgae as biomonitors of heavy metal availability in coastal lagoons from the subtropical Pacific of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 64:846-851.

Paine RT, Vadas RL. 1969. Calorific values of benthic marine algae and their postulated relation to invertebrate food preference. *Marine Biology* 4:79–86.

Palacios E, Racotta IS, Heras H, Marty Y, Moal J, Samain JF. 2002. Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture International* 9:531-543.

Palacios E, Bonilla A, Pérez A, Racotta IS, Civera R. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 299:201-215.

Pan D, He NH, Yang ZY, Liu HP, Xu X. 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 29:103-112.

Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, Esquerré D, Geurden I, Médale F, Kaushik S, Corraze G. 2009. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294:123-131.

Paoloni-Giacobino A, Grimble R, Pichard C. 2003. Genetics and nutrition. *Clinical Nutrition* 22:429-435.

Paradossi G, Cavalieri F, Pizzoferrato L, Liquori AM. 1999. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *International Journal Biol Macromol.* 25(4):309-315.

Paradossi G, Cavalieri F, Chiessi E. 2002. A conformational study on the algal polysaccharide ulvan. *Macromolecules* 35:6404-6411.

Parker JC, Conte FS, MacGrath WS, Miller BW. 1974. An intensive culture system for penaeid shrimp. *Proceedings of the annual meeting - World Mariculture Society* 5:65-79.

Patnaik S, Samocha TM, Davis DA, Bullis RA, Browdy CL. 2006. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 12:395-401.

Paul NA, de Nys R. 2008. Promise and pitfalls of locally abundant seaweeds as biofilters for integrated aquaculture. *Aquaculture* 281: 49-55.

Pengzhan Y, Ning L, Xiguang L, Gefei Z, Quanbin Z, Pengcheng L. 2003. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacological Research* 48:543-549.

Peñaflorida VD, Golez NV. 1996. Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. 143:393-401.

Percival E. 1968. Glucuronoxylifucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research* 7(3):272-283.

Pérez AA, Pérez LB, Strobl AM, Camarda S, Farías SS, López CM, Fajardo MA. 2010. Variación estacional de arsénico total en algas comestibles recolectadas en el Golfo San Jorge (Chubut, Argentina). *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 1(1):16-30.

Petrell RJ, Mazhari Tabrizi K, Harrison PJ, Druehl LD. 1993. Mathematical model of *Laminaria* production near a British Columbian salmon sea cage farm. *J. Appl. Phycol.* 5:1-14.

Petrell RJ, Alie SY. 1996. Integrated cultivation of salmonids and seaweeds in open systems. *Journal of Hydrobiology* 326/327, 67-73.

Pomeranz Y. 1991. *Functional properties of food components*, 2nd. Edition. Academic Press. Inc. pp. 569.

Ponce MA, Pujol C, Damonte E, Flores M, Stortz C. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research* 338:153-165.

Pongsomboon S, Tang S, Boonda S, Aoki T, Hirono I, Yasuike M, Tassanakajon A. 2008. Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *BMB reports* 41:670-677.

Porchas-Cornejo MA, Martínez-Córdova LR, Magallón-Barajas F, Naranjo-Páramo J, Portillo-Clark G. 1999. Efecto de la macroalga *Caulerpa sertularoides* en el desarrollo del camarón *Farfantepenaeus californiensis* (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Tropical* 47(3):437-442.

Popov SS, Marekov NL, Konaklieva MI, Panayotova MI, Dimitrova-Konaklieva S. 1985. Sterols from some black sea ulvaceae. *Phytochemistry* 24:1987-1990.

Purcell SW, Patrois J, Fraisse N. 2006. Experimental evaluation of co-culture of juvenile sea cucumbers, *Holothuria scabra* (Jaeger), with juvenile blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). *Aquaculture Research* 37:515-522.

Raa J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science* 4(3):229-288.

Rameshthangam P, Ramasamy P. 2007. Antiviral activity of bis(2-methylheptyl) phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against white spot syndrome virus of *Penaeus monodon fabricius*. *Virus Research* 126:38-44.

Ray B, Lahaye M. 1995. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (ulvales, chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydrate Research* 274:251-261.

Ray B. 2006. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. *Carbohydrate Polymers* 66:408-416.

Ricque-Marie D, Peña-Rodríguez A, Tapia-Salazar M, Nieto Lopez MG, Villarreal-Cavazos D, Guajardo-Barbosa C, Cruz Suarez LE, Locateli ML. 2006. Effect of pré-prandial nutrient leaching in seawater and different binders on apparent amino acid digestibility coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *International Aquafeed* 9(5):32-33.

Rivas-Vega ME, Rouzaud-Sández O, Martinez-Córdova LR, Ezquerra-Brauer JM. 2001. Dietary protein level in farmed blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). Effect on digestive activity, textura, and thermal denaturation of muscle protein during freeze storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 10(4):25-38.

Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent HF, Chen YA, Peck MET, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW, Gross PS. 2007. Insights into the immune



transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiological Genomics* 29:44-56.

Rodriguez-Castaneda AP, Sanchez-Rodriguez I, Shumilin EN, Sapozhnikov D. 2006. Element concentrations in some species of seaweeds from La Paz Bay and La Paz Lagoon, south-western Baja California, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 18:399-408.

Rodríguez-Montesinos YF, Hernández-Carmona G. 1991. Variación estacional y geográfica de la composición química de *Macrocystis pyrifera* en la costa occidental de Baja California. *Ciencias Marinas* 17/3:91-107.

Rohani-Ghadikolaei K, Abdulalian E, Ng WK. 2011. Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources. *Journal of Food Science and Technology In Press, Corrected Proof*.

Rosenlund G, Stoss J, Talbot C. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155:183–191.

Sahul Hameed AS, Yoganandhan K, Sathish S, Rasheed M, Murugan V, Jayaraman K. 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture* 201:179-186.

Sakata K, Ina K. 1985. Digalactosyldiacylglycerols and phosphatidylcholines isolated from a brown alga as effective phagostimulants for a young abalone. *Bull. Journal Society Science Fish* 51:659–665.

Sakata K, Kato K, Iwase Y, Okada H, Ina K, Machiguchi Y. 1991. Feeding-stimulant activity of algal glycerolipids for marine herbivorous gastropods. *Journal of Chemical Ecology*, 17(1):185-193.

Schwarcz HP. 1991. Some theoretical aspects of isotope paleodiet studies. *J. Archaeol. Sci.* 18, 261–275.

Selvin J, Huxley AJ, Lipton AP. 2004. Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. *Aquaculture* 230: 241-248.

Shan BE, Yoshida Y, Kuroda E, Yamashita U. 1999. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes in vitro. *International Journal Immunopharmacol* 21(1):59-70.

Shanmugan A, Palpandi C. 2008. Biochemical composition and fatty acid profile of the green alga *Ulva reticulata*. *Asian Journal of Biochemistry* 3:26-31.

Sharp G. 1987. *Ascophyllum nodosum* and its harvesting in Eastern Canada. In: Case studies of seven commercial seaweed resources, Doty MS, Caddy JF, Santelices B (eds.). FAO Fisheries Technical. pp. 281.

Siddhanta AK, Goswami AM, Shanmugam M, Mody KH, Ramavat BK. 2002. Sterols from marine green algae of Indian waters. *J. Indian Chem Soc.*, 79:294-297.

Snyder MJ. 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology* 48:529-547.

Snyder MJ, Mulder EP. 2001. Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquatic Toxicology* 55:177-190.

Stenroth P, Holmqvist N, Nyström P, Berglund O, Larsson P, Granéli W. 2006. Stable isotopes as an indicator of diet in omnivorous crayfish (*Pacifastacus leniusculus*): the influence of tissue, sample treatment and season. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 63:821-831.

Storebakken T. 1985. Binders in fish feeds : I. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture* 47:11-26.

Storebakken T, Austreng E. 1987. Binders in fish feeds: II. Effect of different alginates on the digestibility of macronutrients in rainbow trout. *Aquaculture* 60:121-131.

Storebakken T, No HK. 1992. Pigmentation in rainbow trout. *Aquaculture* 100:209-229.

Suárez-García HA. 2006. Efecto de la inclusión de alginato y harina de algas *Sargassum sp* y *Macrocistys pyrifera* sobre la estabilidad en agua, digestibilidad del alimento y sobre el crecimiento del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Sung H, Kou G, Song L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29(1):11-17. Troell M, Rönnbäck P, Halling C, Kautsky N, Buschmann A. 1999. Ecological engineering in aquaculture: use of seaweeds for removing nutrients from intensive mariculture. *Journal of Applied Phycology* 11:89-97.

Taboada C, Millán R, Míguez I. 2009. Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:445-449.

Takahashi Y, Uehra K, Watanabe R, Okumura T, Yamashita T, Omura H, Kawano T, Kanemitsu A, Narasaka H, Susuki N, Itami T. 1998. Efficacy of oral

administration of fucoidan, a sulphated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. In *Advances in shrimp biotechnology*, Flegel TW (ed.). National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. Noviembre 11-14.

Teichberg M, Fox SE, Aguila C, Olsen YS, Valiela I. 2008. Macroalgal responses to experimental nutrient enrichment in shallow coastal waters: growth, internal nutrient pools, and isotopic signatures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 368:117-126.

Teshima S, Ishikawa M, Koshio S. 2000. Nutritional assessment and feed intake of microparticulate diets in crustaceans and fish. *Aquac. Res.* 31:691-702.

Thompson FL, Abreu PC, Wasielesky Jr W. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203:263-278.

Torrissen OJ, Hardy RW, Shearer KD. 1989. Pigmentation of salmonids-Carotenoid deposition and metabolism. *CRC Crit. Rev. Aquat. Science* 1:209- 225.

Troell M, Rönnbäck P, Halling C, Kautsky N, Buschmann A. 1999. Ecological engineering in aquaculture: use of seaweeds for removing nutrients from intensive mariculture. *Journal of Applied Phycology* 11: 89-97.

Ulrik Riisgård H, Famme P. 1986. Accumulation of inorganic and organic mercury in shrimp, *Crangon crangon*. *Marine Pollution Bulletin* 17:255-257.

Valente LMP, Gouveia A, Rema P, Matos J, Gomes EF, Pinto IS. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 252:85-91.

Van Tri D, Thanh Ha NT. 2004. Impacts of feed on the growth of white leg shrimp larvae *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Research Institute for Aquaculture No. 3, Fisheries review No. 9/2004. Fisheries Informatics Centre Internet Web Page license number: 81/GP-BC , issued on 28 june 2005 <http://www.fistenet.gov.vn>

Vandendriessche S, Messiaen M, O'Flynn S, Vincx M, Degraer S. 2007. Hiding and feeding in floating seaweed: Floating seaweed clumps as possible refuges or feeding grounds for fishes. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 71:691-703.

Ventura MR, Castañón JIR, McNab JM. 1994. Nutritional value of seaweed (*Ulva rigida*) for poultry. *Animal Feed Science and Technology* 49:87-92.

Ventura MR, Castañón JIR. 1998. The nutritive value of seaweed (*Ulva lactuca*) for goats. *Small Ruminant Research* 29:325-327.

Vernon-Carter EJ, Ponce-Palafox JT, Pedroza-Islas R. 1996. Pigmentation of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) using Aztec marigold (*Tagetes erecta*) extracts as the carotenoid source. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 46(3):243-6.

Villarreal-Cavazos DA. 2011 Determinación de la digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes utilizados en alimentos comerciales para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en México. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Wahbeh MI. 1997. Amino acid and fatty acid profiles of four species of macroalgae from Aqaba and their suitability for use in fish diets. *Aquaculture* 159:101-109.

Wang B, Li FH, Dong B, Zhang XJ, Zhang CS, Xiang JH. 2006. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology* 8:491-500.

Walker BL. 1968. Recovery of rat tissue lipids from essential fatty acid deficiency: brain, heart and testes. *J. Nutr.* 94:469-474.

Westenberg M, Heinhuis B, Zuidema D, Vlak JA. 2005. SiRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Research* 114:133-139.

Whitt S. 1994. Cell surface structure of bacteria. In: Abigail A, Salyers and Dixic D, Whitt (eds) *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. ASM Press Washinton,DC. pp. 339-342.

Wolf N, Carleton A, Martínez del Rio C. 2009. Ten years of experimental animal isotopic ecology *Funct. Ecol.* 23:17-26.

Wong KH, Sam SW, Cheung PCK, Ang PO. 1999. Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutrition Research* 19:1519-1527.

Wong KH, Cheung PCK. 2000. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds: Part I - proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. *Food Chemistry* 71:475-482.

Wong KH, Cheung PCK. 2001. Influence of drying treatment on three *Sargassum* species 2. Protein extractability, *in vitro* protein digestibility and amino acid profile of protein concentrates. *Journal of Applied Phycology* 13:51-58.

Wurmann CG, Madrid RM, Brugger AM. 2004. Shrimp farming in Latin America: Current status, opportunities, challenges and strategies for sustainable development. *Aquaculture Economics & Management* 8:117-141.

Xu JY, Han F, Zhang XB. 2007. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research* 73:126-131.

Yahia EM, Ramírez-Padilla GK, Carrillo-López A. 2009. Carotenoid content of five fruits and vegetables and their bioconversion to vitamin A measured by retinol accumulation in rat livers. *Acta Hort. (ISHS)* 841, 619-624, [http://www.actahort.org/books/841/841\\_97.htm](http://www.actahort.org/books/841/841_97.htm)

Yuan D, Yi Y, Yakupitiyage A, Fitzimmons K, Diana JS. 2010. Effects of addition of red tilapia (*Oreochromis spp.*) at different densities and sizes on production, water quality and nutrient recovery of intensive culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in cement tanks. *Aquaculture* 298:226-238.

Zhao ZY, Yin ZX, Weng SP, Guan HJ, Li SD, Xing K, Chan SM, He JG. 2007. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. *Fish & Shellfish Immunology* 22:520-534.

Zhou QC, Li CC, Liu CW, Chi SY, Yang QH. 2007. Effects of dietary lipid sources on growth and fatty acid composition of juvenile shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 13:222-229.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

**Alberto Peña Rodríguez**

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Tesis: **USO POTENCIAL DE LA MACROALGA VERDE *Ulva clathrata* EN EL CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei***

**Campo de Estudio:** Biotecnología animal y vegetal

**Datos personales:** Nacido en Durango, Dgo., el 13 de marzo de 1982

**Educación:** Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Obteniendo el grado de: Químico Bacteriólogo Parasitólogo 2000-2004 (cédula 4847861)

**Experiencia profesional:** Realización de tesis Doctoral: Uso potencial de la macroalga verde *Ulva clathrata* en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Agosto 2006 – Junio 2011)

### **Presentaciones en congresos:**

- **Peña-Rodríguez, A.,** León, A., Ricque-Marie, D., Moll, B. and Cruz-Suárez, L.E. Macroalga *Ulva clathrata* como alimento complementario para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. **Segundo Congreso SOLABIAA.** Cancún, Quintana Roo, Diciembre 5 – 9 2010.
- **Peña-Rodríguez, A.,** León, A., Ricque-Marie, D., Moll, B. and Cruz-Suárez, L.E. Exploración de la forma de inclusión de la macroalga *Ulva clathrata* en alimento para camarón. **Segundo Congreso SOLABIAA.** Cancún, Quintana Roo, Diciembre 5 – 9 2010.
- **Peña-Rodríguez, A.,** León, A., Moll, B., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Ricque-Marie, D. and Cruz-Suárez, L.E. Use of *Ulva clathrata* for White shrimp nutrition: a review. Libro de Programa y Resúmenes del **X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.** San Nicolás de los Garza Nuevo León, México. Del 8 al 10 de Noviembre de 2010
- León, A., Moll, B., **Peña-Rodríguez, A.** Business model: production of Aonori for shrimp feeding (managed co-cultures of organisms having prophylactic and health promoting effects). Libro de Programa y Resúmenes del **X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.** San Nicolás de los Garza Nuevo León, México. Del 8 al 10 de Noviembre de 2010
- **Peña-Rodríguez, A.,** León, A., Ricque-Marie, D., Moll, B. and Cruz-Suárez, L.E. Effects of process on *Ulva clathrata* included in shrimp feeds. **X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.** San Nicolás de los Garza Nuevo León, Noviembre 8-10 2010.
- **Peña-Rodríguez, A.,** León, A., Ricque-Marie, D., Moll, B. and Cruz-Suárez, L.E. Fresh *Ulva clathrata* as complementary food for White shrimp *Litopenaeus vannamei*. **X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.** San Nicolás de los Garza Nuevo León, Noviembre 8-10 2010.

- **Peña-Rodríguez, A.,** León, A., Ricque-Marie, D., Moll, B. and Cruz-Suárez, L.E. Three different inclusion forms of green seaweed *Ulva clathrata* in shrimp feed. **Aquaculture 2009.** Veracruz, Mexico, September 25-29 2009.
- **Peña-Rodríguez, A.,** León, A., Ricque-Marie, D., Moll, B. and Cruz-Suárez, L.E. Nutritional effect of fresh *Ulva clathrata* on shrimp growth in a controlled system. **Aquaculture 2009.** Veracruz, Mexico, September 25-29 2009.
- Ricque-Marie, D.\*, **Peña-Rodríguez, A.,** Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., Cruz-Suárez, L.E. and Lemme, A. Amino acid digestibility of six rendered animal products in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture 2009.** Veracruz, Mexico, September 25-29 2009.
- Ricque-Marie, D., **Peña-Rodríguez, A.,** Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., Cruz-Suárez, L.E. and Lemme, A., Apparent dry matter, protein and amino acid digestibility of six rendered animal products in *Litopenaeus Vannamei* juveniles. **XIII International symposium of fish nutrition and feeding.** Florianapolis, Brazil, Junio 1-5, 2008.
- Cruz-Suárez, L.E., Leon, A., **Peña-Rodríguez, A.,** Rodríguez-Peña, G., Moll, B. y Ricque-Marie, D. Co-cultivo de camarón y *Ulva clathrata* para optimizar la utilización del alimento comercial. **II Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal.** Xalapa Ver. México, 5 al 10 de Octubre de 2008.
- Cruz-Suárez L.E.\*, León A.A., **Peña-Rodríguez A.,** Rodríguez-Peña G., Moll B., Ricque-Marie D. 2008a. Shrimp and green algae co-culture to optimize commercial feed utilization. **ISFNF XIII International symposium of fish nutrition and feeding.** Florianapolis, Brazil, Junio 1-5, 2008.
- Cruz-Suárez, L.E., Leon, A., **Peña-Rodríguez, A.,** Rodríguez-Peña, G., Moll, B. y Ricque-Marie, D. Valor nutricional del alga *Ulva clathrata* en co-cultivo con camarón *Litopenaeus vannamei*. Libro de Programa y Resúmenes del **IX Simposio Internacional de Nutrición Acuicola.** Del 24 al 27 de Noviembre de 2008, Ensenada, B.C.N., México.
- **Peña-Rodríguez, A.,** Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., Ricque-Marie, D. and Cruz-Suárez, L.E. Digestible Protein/Energy Ratio and Feed Efficiency Show That Commercial Shrimp Feeds Used in Mexico are Over-Formulated. **Aquaculture 2007.** San Antonio Texas, U.S.A Febrero 26-Marzo 2 2007.
- Ricque-Marie, D., **Peña-Rodríguez, A.,** Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo-Barbosa, C., Locatelli, M.L. and Cruz-Suárez, L.E. Effect of Pre-Prandial Nutrient Leaching in Sea Water and Different Binders on Apparent Amino Acid Digestibility Coefficients of a Practical Diet in *Litopenaeus vannamei* Shrimp Juveniles. **Aquaculture 2007.** San Antonio Texas, U.S.A Febrero 26-Marzo 2 2007.
- Cruz-Suárez, L.E., **Peña-Rodríguez, A.,** Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C. y Ricque-Marie, D. Apparent Amino Acids, Protein, Dry Matter and Energy Digestibility Coefficients of Six Rendered Animal Products by White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture 2007.** San Antonio Texas, U.S.A Febrero 26-Marzo 2 2007.
- Cruz-Suárez, L.E., **Peña-Rodríguez, A.,** Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C. y Ricque-Marie, D. Apparent amino acids, protein and dry matter digestibility coefficients of six rendered animal products by the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Caribbean & Latin American Aquaculture 2007.** San Juan Puerto Rico. Noviembre 6-9, 2007.
- Cruz-Suárez, L.E.\*, **Peña-Rodríguez, A.,** Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C. y Ricque-Marie, D. 2006. Coeficientes de Digestibilidad Aparente de Proteína, Material Seca y Energía de 6 Productos de Reciclamiento Animal en Camarón *Litopenaeus vannamei*. Libro de Programa y Resúmenes del **VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuicola.** 15 al 17 de Noviembre de 2006. Mazatlán, Sinaloa.

- Ricque-Marie, D., **Peña-Rodríguez, A.**, Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo-Barbosa, C., Locatelli, M.L. and Cruz-Suárez, L.E. 2006. Efecto de la lixiviación preprandial del alimento en el agua sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de aminoácidos en camarón en presencia de diferentes aglutinantes. Libro de Programa y Resúmenes del **VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola**. 15 al 17 de Noviembre de 2006. Mazatlán, Sinaloa.
- **Peña-Rodríguez, A.**, Nieto-Lopez, M.N., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. 2006. Los Valores de la Relación Proteína/Energía Digestible y la Eficiencia Alimenticia Demuestran que los Alimentos Comerciales Para Camarón Usados en México están Sobre-formulados. Libro de Programa y Resúmenes del **VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola**. 15 al 17 de Noviembre de 2006. Mazatlán, Sinaloa.

#### **Artículos en extenso en congresos**

- **Peña-Rodríguez, A.**, León, A., Moll, B., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Ricque-Marie, D. and Cruz-Suárez, L.E. Use of *Ulva clathrata* for White shrimp nutrition: a review. Libro de memorias del **X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola**. Del 8 al 10 de Noviembre de 2010, San Nicolás de los Garza Nuevo León, México. ISBN 978-607-433-546-0
- León, A., Moll, B., **Peña-Rodríguez, A.** Business model: production of Aonori for shrimp feeding (managed co-cultures of organisms having prophylactic and health promoting effects). Libro de memorias del **X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola**. Del 8 al 10 de Noviembre de 2010, San Nicolás de los Garza Nuevo León, México. ISBN 978-607-433-546-0

#### **Artículos en revistas de difusión**

- Ricque-Marie, D., **Peña-Rodríguez, A.**, Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo-Barbosa, C., Cruz-Suárez, L.E. and Locatelli, M.L. 2006. Effect of pre-prandial nutrient leaching in sea water and different binders on apparent amino acid digestibility coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei* shrimp juveniles. *International Aquafeed*. September-October, 2006. 32-33 pp. Vol 5/6.
- Elizondo-González, R., Cruz-Suárez, E., Ricque-Marie, D., **Peña-Rodríguez, A.**, Rodríguez-Padilla, C., Trejo-Avila, L.M. Recursos algales como fuente de nuevos y mejores antivirales. *ALGAS Boletín Informativo de la Sociedad Española de Ficología*. Aceptado publicación para Agosto 2011

#### **Artículos publicados o aceptados para su publicación:**

- Cruz-Suárez, L. E., León, A., **Peña-Rodríguez, A.**, Rodríguez-Peña, G., Moll, B., Ricque-Marie, D. (2010). Shrimp/*Ulva* co-culture: a sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301 (1-4), 64-68.
- **Peña-Rodríguez, A.**, Mawhinney, T., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E. (2010). Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chemistry* Article accepted for publication: 28-APR-2011