

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



**EFFECTO DE LA SALINIDAD Y DIETAS SIN HARINA DE PESCADO  
SOBRE LA FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y CRECIMIENTO EN EL  
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)  
CULTIVADOS EN BIOFLOC**

M. EN C. ALVARO FABRICIO BARRETO ALTAMIRANO

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:  
Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Pesqueras

Xalisco, Nayarit, Julio 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

Xalisco, Nayarit; 20 de agosto de 2020  
CBAP/097/2020

**M.C. GLORIA MACHAIN IBARRA**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**NIVEL SUPERIOR Y POSGRADO**

Con base al oficio de fecha 15 de julio de 2020, enviado por los **CC. Dr. Jesús T. Ponce Palafox, Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortes, Dr. Milton Spanopoulos Hernández y Dr. Sergio Gustavo Castillo Vargasmachuca**, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza al **M.C. Álvaro Fabricio Barreto Altamirano**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado del Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Pesqueras.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"Por lo nuestro a la Universidad"



Dr. J. Diego García Paredes  
Coordinador del Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias

Unidad Académica de Agricultura. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63780. Xalisco, Nayarit.  
Tels. (311)2-11-01-28 y 2-11-11-63 Posgrado (CBAP) 2-11-24 78.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE NAYARIT

Xalisco, Nayarit., 15 de julio de 2020

**DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN**  
**CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**P R E S E N T E**

Los suscritos integrantes del Cuerpo Tutorial para asesorar la Tesis titulada: “Efecto de la salinidad y dietas sin harina de pescado sobre la fisiología digestiva y crecimiento en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)”, que presenta el M.C. **Álvaro Fabricio Barreto Altamirano** para obtener el Grado de Doctor en Ciencias con opción terminal en Ciencias Pesqueras, damos nuestra aprobación para que continúe con los trámites correspondientes para la obtención de su grado.

Sin otro asunto que tratar, reciba un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

**Dr. Jesús T. Ponce Palafox**  
**Director**

**Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortes**  
**Co-directora**

**Dr. Milton Spanopoulos Hernández**  
**Asesor**

**Dr. Sergio G. Castillo Vargasmachuca**  
**Asesor**

---

# Dedicatoria

*Dedicado a  
mi familia*

*Dedicado a  
mis amigos*

---

# Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias (UMDI Sisal, UNAM), lugar donde lleve a cabo mis experimentos con la dirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Dr. Jesús Trinidad Ponce Palafox, muchas gracias por todo su apoyo.

Al apoyo de CONACYT.

Le agradezco todos mis amigos por apoyarme: Sergio, Marín, Yessica, Yazmín, Gisela, Mariana, Pame, Elsa, Analuisa, Alheli, Patricio, Kenia, Heber y Ana Parra Flores.

---

# Índice general

Oficio de aprobación	ii
Oficio de conformidad del Comité Tutorial	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice general	vi
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
<b>1 INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
1.1 Fuentes de proteína . . . . .	2
1.2 Tecnología de biofloc . . . . .	4
1.3 Cultivo en baja salinidad . . . . .	5
1.4 Enzimas digestivas . . . . .	6
1.4.1 Hipótesis . . . . .	7
1.4.2 Objetivo general . . . . .	7
Referencias . . . . .	8
<b>2 Digestibilidad <i>in vitro</i></b>	<b>14</b>
2.1 Introducción . . . . .	15
2.2 Material y Métodos . . . . .	16
2.2.1 Obtención de organismos . . . . .	16
2.2.2 Determinación de digestibilidad . . . . .	16
2.2.3 Análisis proximal de los ingredientes. . . . .	17
2.2.4 Análisis estadístico . . . . .	18
2.3 Resultados . . . . .	18
2.4 Discusión . . . . .	21
2.5 Conclusión . . . . .	23
Referencias . . . . .	24
<b>3 Digestibilidad <i>in vivo</i></b>	<b>27</b>
3.1 Introducción . . . . .	28
3.2 Material y Métodos . . . . .	29

3.2.1	Diseño experimental. . . . .	29
3.2.2	Elaboración de dietas. . . . .	29
3.2.3	Composición de las dietas. . . . .	30
3.2.4	Alimentación y colecta de heces . . . . .	30
3.2.5	Método de análisis de la digestibilidad <i>in vivo</i> . . . . .	31
3.2.6	Análisis estadísticos . . . . .	31
3.3	Resultados . . . . .	32
3.4	Discusión . . . . .	33
3.5	Conclusión . . . . .	35
	Referencias . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Evaluación de Crecimiento</b>	<b>38</b>
4.1	Introducción . . . . .	39
4.2	Material y Métodos . . . . .	40
4.2.1	Diseño experimental. . . . .	40
4.2.2	Análisis de calidad de agua. . . . .	42
4.2.3	Dietas experimentales. . . . .	42
4.2.4	Análisis proximal de las dietas . . . . .	44
4.2.5	Índices de evaluación de rendimiento productivo. . . . .	44
4.2.6	Enzimas digestivas. . . . .	44
4.2.7	Análisis estadístico . . . . .	45
4.3	Resultados . . . . .	46
4.4	Discusión . . . . .	53
4.5	Conclusión . . . . .	61
	Referencias . . . . .	61
<b>A</b>	<b>pH-Stat</b>	<b>70</b>
A.0.1	Principios del método de pH-stat en las reacciones de hidrólisis proteica. . . . .	70
A.0.2	Descripción del modelo utilizado para la evaluación del <i>DH</i> proteica del <i>Litopenaeus vannamei</i> . . . . .	71
A.0.3	Evaluación de residuales del modelo 2.3. . . . .	72
<b>B</b>	<b>Análisis digestibilidad <i>in vivo</i></b>	<b>73</b>
B.0.1	Evaluación de residuales de modelo 3.1 de digestibilidad <i>in vivo</i> . . . . .	73
<b>C</b>	<b>Modelos Lineales Mixtos</b>	<b>77</b>

---

# Índice de tablas

2.1	Valores de $h_{tot}$ para diferentes fuentes de proteína (Adler-Nissen et al., 1986). . . . .	17
2.2	Análisis proximal de ingredientes en experimento <i>in vitro</i> . . . . .	19
2.3	Parámetros estimados del modelo de regresión en el $DH$ . . . . .	20
2.4	Porcentajes de digestibilidad <i>in vitro</i> . . . . .	22
3.1	Composición de ingredientes de las dietas de referencia y prueba. . . . .	30
3.2	Composición proximal de las dietas de prueba para la digestibilidad <i>in vivo</i> . . . . .	32
3.3	Digestibilidad aparente de materia seca de los ingredientes . . . . .	33
3.4	Digestibilidad aparente de proteína de los ingredientes . . . . .	34
4.1	Proceso de aclimatación de juveniles de camarón blanco para tratamiento de baja salinidad . . . . .	41
4.2	Formulación y composición de las dietas experimentales. . . . .	43
4.3	Valores de calidad de agua del cultivo . . . . .	46
4.4	Valores de rendimiento productivo en el experimento de biofloc. . . . .	49
4.5	Efectos principales en actividad enzimática digestiva del experimento de biofloc . . . . .	52



---

# Índice de figuras

2.1	<i>DH</i> en función del tiempo de las fuentes de proteína evaluadas. . . . .	21
4.1	Diagrama del diseño experimental. . . . .	41
4.2	Comportamiento de las concentraciones de amonio y nitrito en el cultivo de biofloc en diferentes salinidades. . . . .	47
4.3	Efectos fijos del modelo de crecimiento. . . . .	48
4.4	Valores de índice hepatosomático . . . . .	50
4.5	Crecimiento de <i>L. vannamei</i> a través del tiempo, supervivencia y biomasa final en experimento de biofloc . . . . .	51
4.6	Actividad enzimática de tripsina, quimotripsina y lipasa en experimento de biofloc . . . . .	54
4.7	Proporción T/Q y T/L en el cultivo de biofloc. . . . .	55
4.8	Actividad de la tripsina en función de la pendiente de crecimiento en el experimento de biofloc . . . . .	56
4.9	PCA de los parámetros medidos del experimento de biofloc. . . . .	58
A.1	Modelo de regresión asintótica donde se muestran los parámetros $\phi_1$ , $\phi_2$ cuando la respuesta en $x = 0$ y $t_{0,5}$ , como el tiempo de respuesta medio. . . . .	71
A.2	Evaluación de residuales para confirmar los supuestos de normalidad y homogeneidad del modelo 2.3 . . . . .	72
B.1	Digestibilidad aparente de proteína de ingredientes para el camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> . Valores presentados en la tabla 3.4. . . . .	73
B.2	Evaluación de residuales para confirmar los supuestos de normalidad y homogeneidad del modelo 3.1 para digestibilidad de proteína. . . . .	74
B.3	Digestibilidad aparente de materia seca de ingredientes para el camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> . Valores presentados en la tabla 3.3. . . . .	75
B.4	Evaluación de residuales para confirmar los supuestos de normalidad y homogeneidad del modelo 3.1 para digestibilidad de materia seca. . . . .	76
C.1	Tukey modelo de crecimiento del <i>Litopenaeus vannamei</i> . . . . .	77
C.2	Evaluación de residuales para confirmar los supuestos de normalidad y homogeneidad del modelo de crecimiento del <i>Litopenaeus vannamei</i> . . . . .	78

## Resumen

En los últimos años, el cultivo en baja salinidad está creciendo a nivel mundial y para asegurar la sostenibilidad económica y ecológica de la acuicultura se plantea incrementar el uso de fuentes de proteína alternativas para el reemplazo de la harina de pescado y sistemas de producción intensivos amigables con el medio ambiente, como la tecnología del biofloc que ayuda a controlar la calidad de agua y aporta beneficios nutricionales. En este estudio, se evaluó el efecto de la salinidad y dietas sin harina de pescado sobre la fisiología digestiva y crecimiento en el camarón blanco cultivado en biofloc. Con ese fin, se realizaron los siguientes estudios: Primero, se evaluó la digestibilidad *in vitro* en fuentes de proteína vegetal, animal terrestres y marinas con el método de pH-stat. Segundo, se determinó la digestibilidad aparente de los ingredientes en baja salinidad (5 ups) y agua marina (35 ups). Por último, se evaluó el desempeño productivo y actividad enzimática digestiva en dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína de origen animal terrestre y vegetal en distintas proporciones en un cultivo de biofloc en baja salinidad. Los resultados obtenidos para el primer experimento indicaron que, el grado de hidrólisis de los ingredientes de origen animal terrestre son mayores a la harina de pescado. En el segundo experimento, la digestibilidad aparente de proteína disminuyó en la pasta de soya y la digestibilidad aparente de materia seca en la harina de carne y hueso en baja salinidad. En el tercer experimento, los organismos cultivados en el sistema de biofloc presentaron un mejor crecimiento, el cultivo en baja salinidad resultó en un menor rendimiento productivo y las dietas sin harina de pescado no influyeron en el crecimiento. Entre las enzimas digestivas evaluadas, la tripsina juega un papel clave para la asimilación de nutrientes. En conclusión, la salinidad puede influir en la digestibilidad y crecimiento, sin embargo, el *L. vannamei* puede ser cultivado con dietas sin harina de pescado, independientemente del tipo de fuente de proteína, ya sea vegetal o animal terrestre con un sistema de cultivo de biofloc.

## Abstract

In recent years, low salinity farming is growing worldwide and to ensure the economic and ecological sustainability of aquaculture, the use alternatives protein sources to replace fishmeal and production systems has increased intensive production systems friendly to the environment, such as biofloc technology that helps control water quality and nutritional contributions. In this study, was evaluated the effect of salinity and fishmeal-free diets on digestive physiology and growth of white shrimp cultured in biofloc. To this end, verify the following studies: First, digestibility *in vitro* in sources of vegetable protein, terrestrial and marine animals was evaluated with the pH-stat method. Second, the apparent digestibility of the ingredients in low salinity (5 ups) and sea water (35 ups) were determined. Finally, growth performance and digestive enzymatic activity in diets without fishmeal were evaluated using terrestrial and vegetable animal protein sources in different proportions in a biofloc culture at low salinity. The results obtained for the first experiment indicated that the degree of hydrolysis of ingredients of terrestrial animal origin were greater than of fishmeal. In the second experiment, the apparent digestibility of protein decreased in soybean paste and the apparent digestibility of dry matter in meat and bone meal at low salinity. In third experiment, the organisms cultured in the biofloc system presented better growth, the culture in low salinity resulted in a lower productive yield and diets without fishmeal did not influence growth. Among the digestive enzymes evaluated, trypsin plays a key role for nutrient assimilation. In conclusion, salinity can influence digestibility and growth, however, the *L. vannamei* can be cultivated with diets without fishmeal, regardless of the type of protein source, either vegetable or terrestrial animal with a biofloc culture system.

---

---

# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1 Fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado.

La Harina de pescado (*HP*) es uno de los principales componentes en las dietas para cultivo de organismos acuáticos. Con el rápido desarrollo de la acuicultura en las ultimas décadas generó un aumento en la demanda de *HP*, pero su limitada cantidad de producción causo un incremento en el precio y en consecuencia a este problema se necesito determinar fuentes alternativas de proteínas para su sustitución (Olsen y Hasan, 2012). Se ha generado un considerable esfuerzo en la investigación para reducir la cantidad de *HP* en la dieta, por lo tanto, se espera que la producción de alimento para camarones no incluya *HP* (Hardy y Tacon, 2002; Olsen y Hasan, 2012; A. G. Tacon, Hasan, y Metian, 2011).

Entre las fuentes de proteína que se han evaluado en las dietas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se encuentran: proteína animal terrestre, por ejemplo, harinas de subproductos cárnicos (Forster, Dominy, Obaldo, y Tacon, 2003; C. Hernández, Olvera-Novoa, Aguilar-Vejar, González-Rodríguez, y de la Parra, 2008; Tan et al., 2005; Zhu, Mai, Zhang, Wang, y Yu, 2004), harina de subproductos avícolas (*HA*) (Davis y Arnold, 2000; Gamboa-Delgado, Castañeda-Solís, Nieto-López, Villarreal-Cavazos, y Cruz-Suárez, 2014; Samocha, Davis, Saoud, y DeBault, 2004) y harinas de subproductos sanguíneos (Dominy y Ako, 1988; Ye, Wang, Li, Sun, y Liu, 2011).

Los subproductos de aves de corral se han utilizado como reemplazo de *HP* con resultados prometedores. Davis y Arnold (2000) utilizaron harina de subproducto de aves de corral y soja coextruida (*HASc*) y *HA* para reducir el contenido de *HP* en las dietas sin afectar el crecimiento, supervivencia y palatabilidad. Gamboa-Delgado et al. (2014) determinaron que la contribución del nitrógeno dietético de la *HA* al crecimiento es similar a la *HP*, aunque el autor señaló que el aumento de *HA* en la dieta disminuye el crecimiento debido a su baja calidad lipídica. Dong et al. (1993) evaluaron diversas fuentes de *HA* y su composición proximal varia según su origen y metodología de fabricación.

El reemplazo de *HP* con harinas de carne y huesos (*HCyH*) es de un 60 % a 75 % (Forster et al., 2003; Tan et al., 2005; Zhu et al., 2004), y varia según la fabricación y proporción de los materiales utilizados. Forster et al. (2003) reemplazaron el 75 % de *HP* con *HCyH* que contenía una proporción de 90 %, 5 % y 5 % de subproducto de res, cerdo y ave, respectivamente. Sin embargo, al reducir la porporción de subproducto de

carne de res disminuyó el crecimiento del camarón blanco. Tan et al. (2005) reportó que dietas con *HCyH* presentan deficiencias de metionina y omega-3.

C. Hernández et al. (2008) evaluaron la harina de carne porcina (*HCP*) procesada que puede reemplazar hasta un 35 % el aporte proteico de la *HP*. Los autores señalan que un reemplazo mayor al 35 % disminuye crecimiento y digestibilidad, posiblemente por una deficiencia de metionina en la dieta.

Otras fuentes de proteína son las de origen vegetal. La harina de soja (*HS*) tiene un aceptable nivel de contenido de aminoácidos y nivel de proteína por lo que ha sido ampliamente estudiada (Cruz-Suárez et al., 2009; Maldonado et al., 2012; Olmos, Ochoa, Paniagua-Michel, y Contreras, 2011; Ray, Lewis, Browdy, y Leffler, 2010; Sookying y Davis, 2011; Sookying, Silva, Davis, y Hanson, 2011). Sookying et al. (2011) evaluaron una dieta basada en fuente proteína vegetal en sistemas intensivos con resultados satisfactorios en crecimiento y supervivencia. Maldonado et al. (2012) determinaron que el camarón blanco *L. vannamei* tiene la capacidad de asimilar una dieta basada en proteína vegetal donde la soja es la principal fuente de proteína con altos niveles de carbohidratos. Por otra parte, Bauer, Prentice-Hernandez, Tesser, Wasielesky Jr, y Poersch (2012) evaluaron una combinación de concentrado proteico de soja y harina de floc microbiano, donde la soja representó el 50 % del aporte de proteína para el reemplazo total de la *HP*. La *HS* presenta una alta digestibilidad en el *L. vannamei*, pero su proceso de fabricación puede afectar negativamente la digestibilidad (Cruz-Suárez et al., 2009). No obstante, la selección genética en soja puede incrementar la digestibilidad y crecimiento en el camarón blanco, esta respuesta se debe a un mejor balance en su composición de aminoácidos (Fang, Yu, Buentello, Zeng, y Davis, 2016; Qiu et al., 2018).

La harina de canola (*HCA<sub>n</sub>*) se puede incluir en la dieta hasta un 30 % en este nivel no afecta el crecimiento pero en niveles mayores a 15 % presenta una tendencia a incrementar la mortalidad (Lim et al., 1997). Sin embargo, Suárez et al. (2009) determinaron que la *HCA<sub>n</sub>* con *HS* puede reemplazar la *HP* hasta un 80 % en la dieta del camarón blanco.

Fuentes de proteína no convencionales como la harina de altramuza<sup>1</sup> y la harina de semilla de piñón<sup>2</sup> que tiene un proceso de descascarado y desengrasado con la elimi-

---

<sup>1</sup>El *Lupinus mutabilis*, conocido como lupino es una leguminosa de origen americano cultivada en los Andes.

<sup>2</sup>El género *Jatropha* pertenece a la familia Euphorbiaceae con más de 170 especies a nivel mundial, de las que más de 100 son nativas de América. El piñón (*Jatropha curcas L.*), presenta una gran

nación de ésteres de forbol por solventes orgánicos y inactivación de antinutrientes e inhibidores de tripsina y lectina por autoclave (121°C por 15 min) podrían reemplazar el 50 % de la *HP* sin afectar el crecimiento (Harter et al., 2011; Molina-Poveda, Lucas, y Jover, 2013). Los granos secos de destilados de sorgo y algas marinas (*Hypnea cervicornis* y *Cryptonemia crenulata*) podrían incluirse en dietas prácticas hasta un 40 % (Adedeji et al., 2017; da Silva y Barbosa, 2009).

Cuando se evalúa el reemplazo de la *HP* el efecto del sistema de cultivo es un factor muy importante para elaborar una dieta libre de *HP*, dependiendo del sistema de cultivo los organismos cultivados pueden obtener nutrientes adicionales provenientes de la producción endógena del alimento natural (Cuzon, Lawrence, Gaxiola, Rosas, y Guillaume, 2004; A. Tacon et al., 2002). Amaya, Davis, y Rouse (2007) elaboró una dieta a base de ingredientes vegetales en sistemas semintensivos con fertilización inorgánica obteniendo resultados prometedores y Ray et al. (2010) en sistemas superintensivos con biofloc.

## 1.2 Sistemas superintensivos con flóculos bacterianos.

En las últimas décadas se ha desarrollado e implementado un sistema de cultivo en acuicultura denominado "Tecnología de Biofloc (*BFT*)"<sup>3</sup> (Emerenciano, Gaxiola, y Cuzon, 2013). Este sistema de cultivo provee una fuente suplementaria de proteína y puede reducir hasta un 25 % el nivel de proteína en la dieta, mejora el crecimiento y la utilización de alimento, recirculación de nutrientes, mantiene la calidad del agua a través del balance C/N controlando los niveles de amonio, nitrito y nitrato (Avnimelech, Verdegem, Kurup, y Keshavanath, 2008; Emerenciano, Ballester, Cavalli, y Wasielesky, 2012; Xu, Pan, Zhao, y Huang, 2012) al ser un sistema de bajo o nulo recambio de agua previene el brote de enfermedades (Cuzon et al., 2004; Emerenciano et al., 2013; Funge-Smith y Briggs, 1998; A. Tacon et al., 2002) y obteniendo una mayor productividad comparado a otros sistemas de cultivo y reduciendo el impacto ambiental (Bossier y Ekasari, 2017; Ray et al., 2010) con un cultivo ambientalmente amigable (Emerenciano et al., 2013).

En cultivos de *BFT* se ha logrado un reemplazo total de *HP* con dietas a base de

---

distribución geográfica en México.

<sup>3</sup>por sus siglas en inglés, **Biofloc Technology**.

proteína vegetal (Ray et al., 2010), también cultivos de baja salinidad (Moreno-Arias et al., 2017), por otra parte, el reemplazo total de la *HP* no fue posible, Jatobá et al. (2017) determinó una sustitución del 33% de *HP* por concentrado proteico de soya (con aceite de pescado) y Tesser, Cardozo, Camaño, Wasielesky, et al. (2019) hasta un 75% (con aceite de soya).

Remover el exceso de sólidos suspendidos para mejorar la calidad de agua (Ray et al., 2010) y utilizarlo para elaborar harina de biofloc a sido evaluado por Dantas Jr et al. (2016) que lograron sustituir hasta un 30% del aporte de proteína de la *HP* y Kuhn et al. (2010) evaluaron su nivel de inclusión hasta un 30% reemplazando el 100% y 67% de la proteína de *HS* y *HP*, respectivamente.

### **1.3 Cultivo del camarón blanco *Litopenaus vannamei* en baja salinidad.**

En camarones peneidos los patrones de adaptación de temperatura y salinidad depende de su estadio de vida (Lester y Pante, 1992). Ponce-Palafox, Martinez-Palacios, y Ross (1997) determinaron que en condiciones experimentales hay un mayor crecimiento cuando la temperatura y salinidad son similares al ambiente costero del lugar donde los organismos son originarios.

El camarón blanco presenta un patrón tipo 3 de osmorregulación, i.e. la metamorfosis marca la aparición del tipo de osmorregulación del adulto. La tolerancia a bajas salinidades incrementa progresivamente a partir PL2 esto sugiere que el epitelio especializado en la osmorregulación no está completamente desarrollado y es progresivamente adquirido (Chong-Robles et al., 2014). El camarón blanco al ser un hiper osmorregulador puede tolerar amplios intervalos de salinidades en etapas de postlarvas y juveniles con la remarcable capacidad de crecer en bajas salinidades y cultivados en altas densidades (Ray et al., 2010; Samocha, Lawrence, et al., 2004).

El cultivo en bajas salinidades es una posible alternativa para problemas ambientales porque los efluentes pueden ser utilizados para irrigación de cultivos agrícolas y evita propagar enfermedades (Samocha et al., 2002).



## 1.4 Influencia de la nutrición en la actividad de enzimas digestivas.

Las peptidasas son las que hidrolizan los enlaces peptídicos<sup>4</sup> en péptidos y proteínas, se liberan cantidades equivalentes de grupos amino (o imino-) y carboxilo. Las peptidasas, que cortan consecutivamente los aminoácidos terminales COOH o NH<sub>2</sub>- (o NH-) del extremo de la cadena, se denominan exopeptidasas, i.e. carboxipeptidasa A, B y aminopeptidasa N. Las enzimas que hidrolizan un enlace peptídico específico sin tener en cuenta su posición en el polipéptido o molécula de proteína se denominan endopeptidasas o más comúnmente proteinasas (Pandey, Larroche, y Soccol, 2017, Cap. 10). En este grupo se encuentra la familia de proteasas de serina<sup>5</sup> como la tripsina y quimotripsina que son consideradas las enzimas más importantes y responsables de aproximadamente el 60 % en la digestión de proteínas y son las enzimas proteolíticas más abundantes en la glándula digestiva de crustáceos (Wei, Zhang, Yu, Li, y Xiang, 2014).

Sainz, Garcia-Carreno, y Hernández-Cortés (2004) describieron tres fenotipos de tripsina conocidos como isoenzimas<sup>6</sup> A, B y C. La isoenzima C tiene mayor eficiencia fisiológica, actividad específica y menor  $K_m$  pero requiere mayores concentraciones de Ca<sup>+2</sup>, se necesita usar aproximadamente 30 mM CaCl<sub>2</sub> en la solución del sustrato para asegurar una máxima actividad en todas las isoenzimas y concentraciones mayores a 50 mM CaCl<sub>2</sub> la actividad enzimática empieza a disminuir. Por otra parte, las isoenzimas no son afectadas por los cambios en la actividad de la tripsina, dieta, ciclo de muda y son sintetizados de la misma forma estando en estadio juvenil o adulto (J. C. S. Hernández y Murueta, 2009).

El sistema cultivo puede influenciar las actividades enzimáticas digestivas, cuando los organismos son cultivados en agua eutrófica provenientes de cultivo en estanques se presentan mayores actividades de proteasas de serina, colagenasa, amilasa, lipasa, celulasa y fosfatasa ácida que en camarones cultivados en agua de pozo (agua clara),

---

<sup>4</sup>Un enlace peptídico es el enlace amida que se forma cuando el grupo carboxilo de un aminoácido se une al grupo amino de otro para formar un péptido.

<sup>5</sup>Las serina proteasas son la clase más ampliamente caracterizada e incluyen tripsinas que cortan proteínas en el extremo C-terminal de la arginina o lisina, quimotripsinas que cortan en el extremo C-terminal de aminoácidos hidrofóbicos grandes como fenilalanina, tirosina o leucina y elastasas que después de pequeños aminoácidos neutros como alanina y glicina

<sup>6</sup>Son formas alternativas de la misma actividad enzimática que existen en diferentes proporciones en diferentes tejidos y difieren en la composición y secuencia de aminoácidos y en la estructura cuaternaria multimérica; en su mayoría, pero no siempre, tienen estructuras similares.

probablemente debido a la productividad natural que sirve como fuente de sustrato orgánico (Moss, Divakaran, y Kim, 2001).

En sistemas de *BFT*, Wang et al. (2016) evaluaron la adición de diferentes fuentes de carbono y las actividades enzimáticas de proteasas, lipasas y celulasas en el hepatopaneas fueron significativamente mayores al control (agua clara) a excepción de la amilasa (Xu y Pan, 2012), también evaluaron la actividad enzimática extracelular del *BFT* mostrando diferencias entre las distintas fuentes de carbono empleadas en las actividades de amilasas y celulasas.

En el camarón blanco la salinidad influye en la actividad de las enzimas digestivas, en baja salinidad la actividad de la tripsina aumenta posiblemente por la necesidad de energía extra del alimento para compensar la energía pérdida por la osmorregulación (Li et al., 2008). Por otra parte, Gao et al. (2016) reporta que los niveles de ARNm de quimotripsina y tripsina en salinidades menores a 10 ups se regularon negativamente, esos resultados concuerdan con los reportados por Gao et al. (2012). En cultivo *BFT* en baja salinidad la actividad enzimática de tripsina, proteasa, amilasa y lipasa son mayores que el sistema de cultivo con recirculación en agua clara (Moreno-Arias et al., 2017).

### 1.4.1 Hipótesis

Ho: El cultivo de camarón *L. vannamei* en baja salinidad y alimentado **con** dietas sin harina de pescado **no** afecta la fisiología digestiva, el crecimiento y la supervivencia.

Ha: El cultivo de camarón *L. vannamei* en baja salinidad y alimentado **con** dietas sin harina de pescado **si** afecta la fisiología digestiva, el crecimiento y la supervivencia.

### 1.4.2 Objetivo general

Determinar el efecto de la baja salinidad en la digestibilidad de ingredientes para la aplicación de dietas sin harina de pescado sobre el crecimiento y supervivencia, en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

#### 1.4.2.1 Objetivos específicos

1. Determinar el grado de hidrólisis proteica, empleando homogenizados de hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei*, en diversos ingredientes vegetales y animales.
2. Evaluar la digestibilidad aparente de ingredientes vegetales y animales en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* en salinidades de 5 ups y 35 ups.
3. Evaluar el crecimiento y supervivencia en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* con dietas practicas sin harina de pescado en salinidades de 5 ups y 35 ups.
4. Determinar el efecto de dietas sin harina de pescado sobre la actividad enzimática digestiva de tripsina, quimotripcina y lipasa en juveniles de camarón blanco en salinidades de 5 ups y 35 ups.

## Referencias

- Adedeji, A. A., Zhou, Y., Fang, X., Davis, D. A., Fahrenholz, A., y Alavi, S. (2017). Utilization of sorghum distillers dried grains in extruded and steam pelleted shrimp diets. *Aquaculture Research*, 48(3), 883–898.
- Amaya, E. A., Davis, D. A., y Rouse, D. B. (2007). Replacement of fish meal in practical diets for the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*, 262(2-4), 393–401.
- Avnimelech, Y., Verdegem, M., Kurup, M., y Keshavanath, P. (2008). Sustainable land-based aquaculture: rational utilization of water, land and feed resources. *Mediterranean Aquaculture Journal*, 1(1), 45–54.
- Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M. B., Wasielesky Jr, W., y Poersch, L. H. (2012). Substitution of fishmeal with microbial flocculant meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 342, 112–116.
- Bossier, P., y Ekasari, J. (2017). Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. *Microbial biotechnology*, 10(5), 1012–1016.
- Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L. M., y Giffard-Mena, I. (2014). Osmoregulation pattern and salinity tolerance

- of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquaculture*, 422, 261–267.
- Cruz-Suárez, L. E., Tapia-Salazar, M., Villarreal-Cavazos, D., Beltran-Rocha, J., Nieto-López, M. G., Lemme, A., y Rique-Marie, D. (2009). Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 292(1-2), 87–94.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., y Guillaume, J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235(1-4), 513–551.
- Dantas Jr, E., Valle, B., Brito, C., Calazans, N., Peixoto, S., y Soares, R. (2016). Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture nutrition*, 22(2), 335–342.
- da Silva, R. L., y Barbosa, J. M. (2009). Seaweed meal as a protein source for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of applied phycology*, 21(2), 193–197.
- Davis, D. A., y Arnold, C. (2000). Replacement of fish meal in practical diets for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 185(3-4), 291–298.
- Dominy, W. G., y Ako, H. (1988). The utilization of blood meal as a protein ingredient in the diet of the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 70(3), 289–299.
- Dong, F. M., Hardy, R. W., Haard, N. F., Barrows, F. T., Rasco, B. A., Fairgrieve, W. T., y Forster, I. P. (1993). Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. *Aquaculture*, 116(2-3), 149–158.
- Emerenciano, M., Ballester, E. L., Cavalli, R. O., y Wasielesky, W. (2012). Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (latreille, 1817). *Aquaculture research*, 43(3), 447–457.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., y Cuzon, G. (2013). Biofloc technology (bft): a review for aquaculture application and animal food industry. *Biomass now-cultivation and utilization*, 301–328.
- Fang, X., Yu, D., Buentello, A., Zeng, P., y Davis, D. A. (2016). Evaluation of new non-genetically modified soybean varieties as ingredients in practical diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 451, 178–185.
- Forster, I., Dominy, W., Obaldo, L., y Tacon, A. (2003). Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931). *Aquaculture*, 219(1-4), 655–670.
- Funge-Smith, S. J., y Briggs, M. R. (1998). Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture*, 164(1-4), 117–133.
- Gamboa-Delgado, J., Castañeda-Solís, J. d. D., Nieto-López, M. G., Villarreal-Cavazos, D., y Cruz-Suárez, L. E. (2014). Isotopic evaluation of the nutritional contribution

- of poultry by-product meal and fish meal to the growth of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(4), 430–438.
- Gao, W., Tan, B., Mai, K., Chi, S., Liu, H., Dong, X., y Yang, Q. (2012). Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to long-term low salinity stress. *Aquaculture*, 364, 186–191.
- Gao, W., Tian, L., Huang, T., Yao, M., Hu, W., y Xu, Q. (2016). Effect of salinity on the growth performance, osmolarity and metabolism-related gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 4, 125–129.
- Hardy, R. W., y Tacon, A. G. (2002). Fish meal: historical uses, production trends and future outlook for sustainable supplies. *Responsible marine aquaculture*, 311–325.
- Harter, T., Buhrke, F., Kumar, V., Focken, U., Makkar, H., y Becker, K. (2011). Substitution of fish meal by *Jatropha curcas* kernel meal: effects on growth performance and body composition of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 17(5), 542–548.
- Hernández, C., Olvera-Novoa, M. A., Aguilar-Vejar, K., González-Rodríguez, B., y de la Parra, I. A. (2008). Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 277(3-4), 244–250.
- Hernández, J. C. S., y Murueta, J. H. C. (2009). Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 290(3-4), 190–195.
- Jatobá, A., Vieira, F. d. N., Silva, B. C. d., Soares, M., Mouriño, J. L. P., y Seiffert, W. Q. (2017). Replacement of fishmeal for soy protein concentrate in diets for juvenile *Litopenaeus vannamei* in biofloc-based rearing system. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(9), 705–713.
- Kuhn, D. D., Lawrence, A. L., Boardman, G. D., Patnaik, S., Marsh, L., y Flick Jr, G. J. (2010). Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 303(1-4), 28–33.
- Lester, L. J., y Pante, J. R. (1992). Penaeid temperature and salinity responses. En A. W. FAST y L. J. LESTER (Eds.), *Marine shrimp culture* (p. 515 - 534). Amsterdam: Elsevier.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., y Qin, J. G. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274(1), 80–86.
- Lim, C., Beames, R., Eales, J., Prendergast, A., McLeese, J., Shearer, K., y Higgs, D. (1997). Nutritive values of low and high fibre canola meals for shrimp (*Penaeus*

- vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 3(4), 269–279.
- Maldonado, C., Guillen, S., Pantoja, O., Arena, L., Ezquerro-Bauer, M., Alvarez-González, C., ... Gaxiola, G. (2012). Effect of plant protein concentrates on nutrition physiology of *Litopenaeus vannamei* (boone, 1883) juveniles. *Aquaculture Research*, 43(8), 1209–1222.
- Molina-Poveda, C., Lucas, M., y Jover, M. (2013). Evaluation of the potential of andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets. *Aquaculture*, 410, 148–156.
- Moreno-Arias, A., López-Elías, J., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M., Martínez-Córdova, L., y Ramírez-Suárez, J. (2017). Replacement of fishmeal by vegetable meal mix in the diets of *litopenaeus vannamei* reared in low-salinity biofloc system: effect on digestive enzymatic activity. *Aquaculture Nutrition*, 23(2), 236–245.
- Moss, S., Divakaran, S., y Kim, B. (2001). Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (boone). *Aquaculture Research*, 32(2), 125–131.
- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J., y Contreras, R. (2011). Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100 % fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and bacillus probiotic strains. *Marine drugs*, 9(6), 1119–1132.
- Olsen, R. L., y Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 120–128.
- Pandey, A., Larroche, C., y Soccol, C. R. (2017). *Current developments in biotechnology and bioengineering: current advances in solid-state fermentation*. Elsevier.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C. A., y Ross, L. G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, boone, 1931. *Aquaculture*, 157(1-2), 107–115.
- Qiu, X., Buentello, A., Shannon, R., Mustafa, A., Abebe, A., y Davis, D. (2018). Evaluation of three non-genetically modified soybean cultivars as ingredients and a yeast-based additive as a supplement in practical diets for pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture nutrition*, 24(1), 173–183.
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., y Leffler, J. W. (2010). Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299(1-4), 89–98.
- Sainz, J. C., Garcia-Carreno, F. L., y Hernández-Cortés, P. (2004). *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry*

- and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 138(2), 155–162.
- Samocha, T. M., Davis, D. A., Saoud, I. P., y DeBault, K. (2004). Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 231(1-4), 197–203.
- Samocha, T. M., Hamper, L., Emberson, C. R., Davis, A. D., McIntosh, D., Lawrence, A. L., y Van Wyk, P. M. (2002). Review of some recent developments in sustainable shrimp farming practices in texas, arizona, and florida. *Journal of applied Aquaculture*, 12(1), 1–42.
- Samocha, T. M., Lawrence, A. L., Collins, C. A., Castille, F. L., Bray, W. A., Davies, C. J., ... Wood, G. F. (2004). Production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse-enclosed raceways using low salinity groundwater. *Journal of Applied Aquaculture*, 15(3-4), 1–19.
- Sookying, D., y Davis, D. A. (2011). Pond production of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed high levels of soybean meal in various combinations. *Aquaculture*, 319(1-2), 141–149.
- Sookying, D., Silva, F. S. D., Davis, D. A., y Hanson, T. R. (2011). Effects of stocking density on the performance of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured under pond and outdoor tank conditions using a high soybean meal diet. *Aquaculture*, 319(1-2), 232–239.
- Suárez, J., Gaxiola, G., Mendoza, R., Cadavid, S., Garcia, G., Alanis, G., ... Cuzon, G. (2009). Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931). *Aquaculture*, 289(1-2), 118–123.
- Tacon, A., Cody, J., Conquest, L., Divakaran, S., Forster, I., y Decamp, O. (2002). Effect of culture system on the nutrition and growth performance of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (boone) fed different diets. *Aquaculture nutrition*, 8(2), 121–137.
- Tacon, A. G., Hasan, M. R., y Metian, M. (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture technical paper*(564), I.
- Tan, B., Mai, K., Zheng, S., Zhou, Q., Liu, L., y Yu, Y. (2005). Replacement of fish meal by meat and bone meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (boone). *Aquaculture Research*, 36(5), 439–444.
- Tesser, M., Cardozo, A., Camaño, H., Wasielesky, W., y cols. (2019). Replacement of fishmeal and fish oil with vegetable meal and oil in feedstuffs used in the growing phase of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, in biofloc systems. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(2), 703–710.
- Wang, C., Pan, L., Zhang, K., Xu, W., Zhao, D., y Mei, L. (2016). Effects of different

- carbon sources addition on nutrition composition and extracellular enzymes activity of bioflocs, and digestive enzymes activity and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-exchange culture tanks. *Aquaculture research*, 47(10), 3307–3318.
- Wei, J., Zhang, X., Yu, Y., Li, F., y Xiang, J. (2014). Rna-seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 11, 37–44.
- Xu, W.-J., y Pan, L.-Q. (2012). Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating c/n ratio in feed. *Aquaculture*, 356, 147–152.
- Xu, W.-J., Pan, L.-Q., Zhao, D.-H., y Huang, J. (2012). Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture*, 350, 147–153.
- Ye, J.-D., Wang, K., Li, F.-D., Sun, Y.-Z., y Liu, X.-H. (2011). Incorporation of a mixture of meat and bone meal, poultry by-product meal, blood meal and corn gluten meal as a replacement for fish meal in practical diets of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein levels. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e337–e347.
- Zhu, W., Mai, K., Zhang, B., Wang, F., y Yu, Y. (2004). A study on the meat and bone meal and poultry by-product meal as protein substitutes of fish meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Ocean University of China*, 3(2), 157–160.



---

---

## CAPÍTULO 2

---

# EVALUACIÓN DE DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

## 2.1 Introducción

El reemplazo de la harina de pescado (*HP*) como principal fuente de proteína para la elaboración de alimentos balanceados ha sido abordado durante años, considerando el aumento de la demanda de alimento para acuicultura debido a su rápido crecimiento se establece como un objetivo primordial seleccionar fuentes de proteína que permitan su reemplazo total o parcial sin afectar los principales parámetros productivos en el cultivo del camarón blanco *L. vannamei* (Tacon, 2020).

Estas fuentes de proteína alternativas a la *HP* deben permitir la elaboración de alimentos con formulaciones rentables y que no dependan de un solo ingrediente, es decir, deben ser flexibles teniendo en cuenta la disponibilidad de los nutrientes, principalmente la digestibilidad de la proteína, un nutriente clave para el crecimiento (Lemos, Lawrence, y Siccardi, 2009).

La evaluación de la digestibilidad *in vitro* puede aplicarse al control de calidad de ingredientes, de forma rápida, precisa, segura, utilizando enzimas de especies de interés comercial, se ejecuta en condiciones de reacción estables y es apropiado para diferentes fuentes de ingredientes, incluidos los de origen marinos, animales terrestres y vegetales (J. Ezquerro, Garcia-Carreno, y Carrillo, 1998; Lemos, Ezquerro, y Garcia-Carreno, 2000; Maldonado et al., 2012).

El método de titulación por pH-stat es un enfoque clásico y probablemente el método más utilizado para controlar las reacciones de hidrólisis en la fase intestinal de las digestiones *in vitro* (Mat, Le Feunteun, Michon, y Souchon, 2016). Consiste en mantener constante el pH de un alimento en contacto con una mezcla de fluido digestivo, mientras que la reacción enzima-sustrato normalmente lo modificaría y este cambio de pH está directamente relacionado con la producción de enlaces peptídicos hidrolizados (Guerra et al., 2012).

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la digestibilidad *in vitro* de diferentes fuentes de proteína en el camarón blanco, *L. vannamei* por el método de pH-stat.

## 2.2 Material y Métodos

### 2.2.1 Obtención de organismos

Los juveniles de *L. vannamei* de 15 g se obtuvieron de los estanques exteriores de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (*UMDI*), Sisal, provenientes del área de reproducción, los cuales fueron alimentados con una dieta comercial al 35 % de proteína y mantenidos a salinidad de 35 ups.

### 2.2.2 Determinación de la digestibilidad *in vitro*.

Se obtuvieron los extractos enzimáticos de los hepatopáncreas de organismos recién sacrificados, a los cuales después de extraerles dicho órgano se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los hepatopáncreas fueron triturados en agua ajustada a pH 8 con 0.1 M NaOH a  $4^{\circ}\text{C}$  (Dilución 1:10) y se centrifugará a 10,000 *rpm* durante 30 min. Los extractos enzimáticos son conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La actividad de proteasas fue estimada según Maldonado et al. (2012) en homogeneizados usando azocoll.

El grado de hidrólisis se determinó en el pH-stat (718 Titrande Metrohm Switzerland) por triplicado para cada uno de los ingredientes y las muestras se pasaron por un tamiz de  $<250\ \mu\text{m}$  y se colocaron 80 mg proteína que fueron homogeneizados en 5 ml de agua destilada que se colocaron dentro del recipiente de hidrólisis; el pH fue ajustado a 8 con NaOH al 0.1M. La reacción se inició con la adición del homogeneizado enzimático con una actividad proteolítica de 4 U/mL. El pH se mantuvo en 8 y se midió la cantidad de NaOH 0.1 N utilizado para mantener dicho pH durante 45 min a  $28^{\circ}\text{C}$  (J. Ezquerro et al., 1998; Maldonado et al., 2012).

El porcentaje de grado de hidrólisis se determinó usando la formula de Adler-Nissen et al. (1986):

$$DH \% = 100BN_b \left( \frac{1}{\alpha} \right) \left( \frac{1}{MP} \right) \left( \frac{1}{h_{tot}} \right) \quad (2.1)$$

Tabla 2.1: Valores de  $h_{tot}$  para diferentes fuentes de proteína (Adler-Nissen et al., 1986).

Proteína	$h_{tot}$
Caseína	8.2
Hemoglobina	8.3
Concentrado suero de leche	8.8
Carne (res)	7.6
Concentrado proteico de pescado	8.6
Harina de soya	7.8
Concentrado de soya (lavado ácido)	7.8
Concentrado de soya (extracción con alcohol)	7.8
Concentrado de proteína de soya	7.8
Gluten de trigo	8.3

Donde  $B$  es el consumo de NaOH 0.1 N en mL,  $N_b$  es la normalidad de la base,  $\alpha$  el promedio del grado de disociación de los grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>,  $MP$  la masa de proteína hidrolizada en g, y  $h_{tot}$  el total de enlaces peptídicos en el sustrato de proteína en meqv/g proteína.

El grado de disociación ( $\alpha$ ) para los grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> son calculó de la siguiente manera:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (2.2)$$

Donde  $pK$  es el valor de disociación promedio para los grupos  $\alpha$ -amino liberados durante la hidrólisis y depende de la temperatura, longitud de la cadena peptídica y la naturaleza del aminoácido terminal. A 28 °C la temperatura de hidrólisis que se utilizo en el presente estudio, el valor de pK promedio para los grupos  $\alpha$ -amino de péptidos y proteínas es 7.7. A pH 8  $\alpha$  puede ser calculado como 0.66, por lo tanto, el valor de  $1/\alpha$  utilizado fue de 1.5. El parámetro  $h_{tot}$  se da como enlaces peptídicos en meqv por gramo de proteína. Esto se calcula a partir de análisis de aminoácidos sumando los mmoles de cada aminoácido individual por gramo de proteína. El  $h_{tot}$  se detalla en la tabla 2.1.

### 2.2.3 Análisis proximal de los ingredientes.

El análisis proximal de los ingredientes se determinó de la siguiente manera: para el contenido de proteína, consistió en un análisis elemental por nitrógeno basado en la

combustión directa y espontánea de la muestra en una atmósfera de oxígeno puro a 950-1400 °C. Carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre son transformados a CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> son transportados por He a una celda infrarroja con CO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> son removidos. Entonces, N<sub>2</sub> se midió por conductividad térmica diferencial, el análisis elemental es realizado por un Elemental Combustion System 4010 (Costech Analytical Technologies Inc., Valencia, CA, USA); los lípidos son extraídos por el método de Goldfish y la ceniza por incineración en una mufla a 500 °C.

## 2.2.4 Análisis estadístico

Para las diferencias entre los valores de  $DH$  de los ingredientes se utilizó un modelo de efectos mixtos no lineales:

$$Y_{ij} = \{(\beta_1 + b_{1i}) + [(\beta_2 + b_{2i}) - (\beta_1 + b_{1i})] \exp[\exp(\beta_3)t_{ij}]\} \text{Ingrediente}_{ij} + \epsilon_{ij} \quad (2.3)$$

Donde  $Y_{ij}$  es el  $DH$  % de la medida en cada pool enzimático  $i$  en el tiempo  $t_{ij}$  en minutos  $j$  ( $j$  entre 5 y 45),  $\beta_1$  representó los valores en los parámetros de asíntota o máximo valor del  $DH$ ,  $\beta_2$  el valor de  $DH$  en el minuto 0,  $\beta_3$  el logaritmo de la tasa  $DH$ ;  $b_{1i}$  y  $b_{2i}$  es el efecto aleatorio de la medida en cada pool enzimático  $i$  con  $b_i \sim N(0; \Psi)$  y  $\epsilon_{ij}$  el error residual [ $\epsilon_{ij} \sim N(0; \sigma^2 \delta_{si}^2)$ ] donde  $s$  representó las diferentes varianzas ( $\delta$ ) por cada nivel de ingrediente. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de los residuales fueron visualmente evaluados con gráficos de cuantil-cuantil (Normal Q-Q) y frecuencia de distribución de residuales a través del tiempo (ver A.0.3). Cuando fueron observadas diferencias significativas en  $\beta_1$ , se usó la prueba de rangos múltiples de Tukey con corrección de Bonferroni. Los modelos fueron realizados con la función "NLME" de la paquetería *nlme* usando software R.

## 2.3 Resultados

La composición proximal de los ingredientes se presenta en la tabla 2.2. Los ingredientes se pueden clasificar según su origen: vegetal; los valores de proteína estuvieron entre 39 y 51 g/100g, con niveles de extracto etéreo <2; los de origen animal terrestre entre 53 y 85 g/100g y la harina de subproductos de ave con el mayor valor de ceniza y extracto etéreo 21 y 14 g/100g, respectivamente. Fuentes de proteína marina; los

valores de proteína se encontraron entre 71 y 57 g/ 100g, la harina de pescado presentó un mayor valor de extracto etéreo.

Tabla 2.2: Análisis proximal de los ingredientes utilizados en el estudio de digestibilidad *in vitro* en base seca (g/100g).

Ingredientes	Humedad	PC	EE	Ceniza
Harina de subproducto de ave <sup>a</sup>	9.7	53	14	21
Harina de pescado <sup>a</sup>	11	57	7	15
Harina de calamar <sup>a</sup>	10	71	3	14
Pasta de soya <sup>a</sup>	9	51	1	6
Harina de carne y hueso (1) <sup>b</sup>	10	70	1	15
Harina de sangre <sup>b</sup>	10	85	0.5	5
Harina de carne y hueso (2) <sup>b</sup>	10	69	2	15
Pasta de canola <sup>a</sup>	11	39	2	6

PC, proteína cruda; EE, extracto etéreo;

<sup>a</sup>Proteínas Marinas y Agropecuarias SA de CV, México.

<sup>b</sup>Apelsa Guadalajara SA de CV, México.

Los valores de grado de hidrólisis a través del tiempo se presentan en la figura 2.1. Los valores máximos de *GH* % se presentan de la siguiente manera: caseína >harina de carne y hueso (1) >harina de subproducto de ave, harina de carne y hueso (2) >harina de pescado, harina de calamar, pasta de soya, pasta de canola >harina de sangre.

Los porcentajes de digestibilidad se relativizan tomando en cuenta a la caseína como un estándar que representa el 100 % de digestibilidad. Las fuentes de proteína de origen terrestre presentaron una digestibilidad entre el 44 y 63 %, excepto la harina de sangre con un 11 %. Las fuentes de origen marino entre un 21 y 27 % y las fuentes vegetales entre un 18 y 19 % se presentan en la tabla 2.4.

Tabla 2.3: Parámetros del análisis de regresión asintótica del grado de hidrólisis por pH-stat durante 45 minutos en fuentes de proteína animal terrestre, marino y vegetal con extractos enzimáticos de *L. vannamei*.

Fuente	$\phi_1$		$\phi_2$		$\phi_3$		95 % CI			Ecuación de regresión
							$\phi_1$	$\phi_2$	$\phi_3$	
HA	5.56	(0.25)	2.59	(0.13)	-3.04	(0.08)	[5.07, 6.04]	[2.32, 2.85]	[-3.19, -2.89]	$5.56+(-2.97)\exp[\exp(-3.04)t]$
HCA	2.58	(0.29)	1.25	(0.13)	-3.57	(0.15)	[2.01, 3.15]	[0.99, 1.51]	[-3.87, -3.28]	$2.58+(-1.33)\exp[\exp(-3.57)t]$
PCAN	2.26	(0.28)	0.88	(0.13)	-3.60	(0.10)	[1.72, 2.81]	[0.62, 1.14]	[-3.79, -3.41]	$2.26+(-1.38)\exp[\exp(-3.60)t]$
HCH(2)	5.39	(0.50)	2.46	(0.16)	-3.69	(0.26)	[4.40, 6.38]	[2.15, 2.77]	[-4.20, -3.18]	$5.39+(-2.93)\exp[\exp(-3.69)t]$
CA	12.09	(0.36)	1.33	(0.15)	-3.33	(0.05)	[11.39, 12.80]	[1.02, 1.63]	[-3.43, -3.22]	$12.09+(-10.77)\exp[\exp(-3.33)t]$
HCH(1)	7.66	(0.24)	1.56	(0.12)	-3.20	(0.03)	[7.19, 8.14]	[1.31, 1.80]	[-3.25, -3.14]	$7.66+(-6.11)\exp[\exp(-3.20)t]$
HP	3.38	(0.24)	1.53	(0.12)	-3.28	(0.07)	[2.91, 3.85]	[1.30, 1.76]	[-3.42, -3.15]	$3.38+(-1.85)\exp[\exp(-3.28)t]$
HS	1.35	(0.24)	0.81	(0.12)	-3.12	(0.16)	[0.88, 1.81]	[0.58, 1.04]	[-3.44, -2.79]	$1.35+(-0.54)\exp[\exp(-3.12)t]$
PS	2.35	(0.27)	0.94	(0.12)	-3.78	(0.16)	[1.83, 2.87]	[0.71, 1.16]	[-4.09, -3.46]	$2.35+(-1.41)\exp[\exp(-3.78)t]$

HA, Harina de subproducto de ave; HCA, Harina de Calamar; PCAN, Pasta de Canola; HCH(2), Harina de carne y hueso (2); CA, Caseína ; HCH(1), Harina de carne y hueso (1)

HP, Harina de pescado; HS, Harina de sangre; PS, Pasta de canola.

Se presenta entre paréntesis su error estándar; IC, intervalo de confianza;  $t$ , tiempo (min)

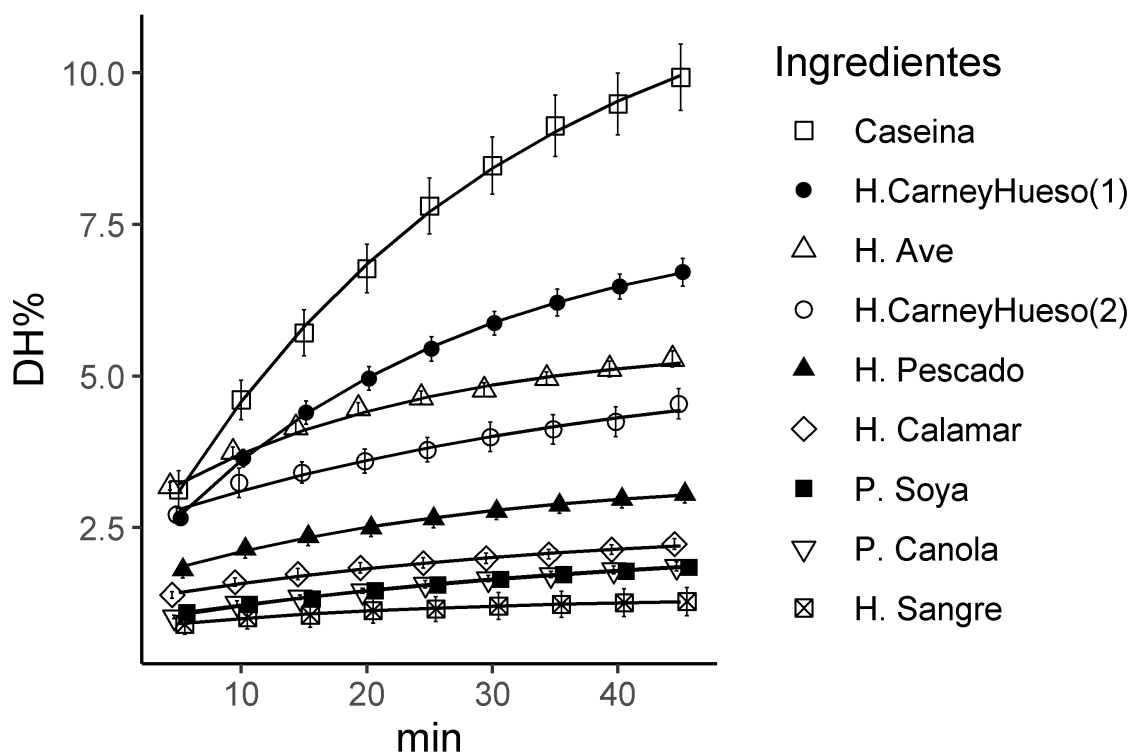


Figura 2.1: Grado de hidrólisis proteica por el método de pH-stat con extractos enzimáticos de hepatopáncreas de *L. vannamei* en fuentes de proteína marina, animal terrestre y vegetal. Las barras de error representan los errores estándar.

## 2.4 Discusión

Una de las metas en la industria de alimentos para la acuicultura es la reducción del uso de la harina de pescado provenientes de peces pelágicos pequeños (Olsen y Hasan, 2012) e incrementar el uso de fuentes de proteína que son localmente disponibles para asegurar una sostenibilidad económica y ecológica a largo plazo (Tacon, 2020). El uso de estas materias primas locales requiere métodos efectivos de control de calidad ya que los ingredientes pueden variar en términos de contenido y disponibilidad de nutrientes (Glencross et al., 2008; Lemos et al., 2009). La variación en la calidad nutricional del ingrediente se puede deber a una variación natural, por ejemplo, las variedades de soya pueden influir en la digestibilidad y crecimiento del camarón blanco (Fang, Yu, Buentello, Zeng, y Davis, 2016); también los procesos en la producción de ingredientes como la harina de carne y hueso cuando es producida en un sistema de baja temperatura se puede obtener un producto de mayor calidad (Hendriks, Cottam, Morel, y Thomas, 2004) o la harina de subproductos de ave con variabilidad en su composición química y digestibilidad de la proteína (Dong et al., 1993). En éste estudio, la evaluación proximal



Tabla 2.4: Estimaciones de valores máximos de GH %, tiempo medio de GH % ( $T_{0,5}$ ) y porcentaje de digestibilidad *in vitro* de cada ingrediente. Se presentan sus medias (error estándar).

Ingrediente	GH % <sup>†</sup>	$T_{1/2}$ (min)	Digestibilidad (%) <sup>‡</sup>
Caseína	12.09 <sup>a</sup> (0.36)	8.38 <sup>abc</sup> (0.05)	
Harina de carne y hueso (1)	7.66 <sup>b</sup> (0.24)	7.35 <sup>ab</sup> (0.03)	63.37
Harina de subproducto de ave	5.55 <sup>c</sup> (0.25)	6.29 <sup>a</sup> (0.08)	45.96
Harina de carne y hueso (2)	5.39 <sup>c</sup> (0.50)	12.05 <sup>abc</sup> (0.26)	44.56
Harina de pescado	3.38 <sup>d</sup> (0.24)	8.02 <sup>abc</sup> (0.07)	27.95
Harina de calamar	2.57 <sup>d</sup> (0.29)	10.72 <sup>bc</sup> (0.15)	21.32
Pasta de soya	2.35 <sup>de</sup> (0.27)	13.15 <sup>c</sup> (0.16)	19.41
Pasta de canola	2.26 <sup>de</sup> (0.28)	11.04 <sup>c</sup> (0.10)	18.70
Harina de sangre	1.34 <sup>e</sup> (0.23)	6.80 <sup>abc</sup> (0.16)	11.15

Diferentes letras en el superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

<sup>†</sup>Parámetro estimado del modelo 2.3.

<sup>‡</sup>El porcentaje de digestibilidad se examinó en relación con el estándar de caseína

de los ingredientes (tabla 2.2) se encuentra dentro de los valores esperados (García-Galano, Villarreal-Colmenares, y Fenucci, 2007; Hertrampf y Piedad-Pascual, 2012).

La digestibilidad *in vitro* es una poderosa herramienta para investigar los efectos de la composición y estructura de alimentos o ingredientes en la digestión de manera rápida, económica y segura (Alarcon, Moyano, y Díaz, 2002), y permite evitar, o al menos respaldar estudios *in vivo* que tienen un alto costo, complejidad técnica y consideraciones éticas (Moyano, Saenz de Rodriganez, Díaz, y Tacon, 2015). Aunque la digestión y absorción del alimento es dinámico y con reacciones enzimáticas complejas que pueden ser afectadas por la estructura química de los nutrientes y la fisiología del propio organismo (Savoie, 1994). Las evaluaciones *in vitro* utilizando extractos enzimáticos de hepatopáncreas con el método de pH-stat pueden proporcionar una estimación adecuada de la calidad nutricional de ingredientes y alimentos para camarones (Alarcón et al., 2007; Córdova-Murueta, Navarrete-del Toro, y García-Carreño, 2017; J. Ezquerro et al., 1998; Galicia-González et al., 2010; Garcia-Carreño, Navarrete del Toro, y Ezquerro, 1997; Lemos et al., 2000, 2009; Lemos y Nunes, 2008; Maldonado et al., 2012; Yasumaru, De Maesschalck, Wouters, y Lemos, 2018). El pH-stat tiene la ventaja de ser fácil de operar, tiempos de trabajo cortos y repetibilidad aunque presenta sus limitaciones éstas pueden superarse con un manejo adecuado de las condiciones de reacción, como la temperatura, y la selección de la concentración enzima:sustrato (Moyano et al., 2015). En éste trabajo, se realizó con una temperatura de 28 °C (Maldonado et al., 2012) y una proporción 4 U para 80 mg de proteína cruda (Lemos et al., 2009) para

un *DH* con mayor precisión y resultados reproducibles.

La evaluación del *GH* en leguminosas como la soya pueden verse negativamente afectado por factores antinutricionales que inhiben la actividad enzimática, como la tripsina (Alarcon et al., 2002; Lemos et al., 2000). Garcia-Carreño et al. (1997) reportaron un aumento en el *GH* cuando se les aplica un tratamiento por calor, sin embargo, un sobreprocesamiento puede declinar la solubilidad de la proteína y su digestibilidad, el cual puede ser atribuido a una desnaturalización que altera la estructura de la proteína bloqueando el sitio activo de las enzimas (Jannathulla et al., 2017). Los valores de *DH* para la harina de soya son similares a los presentados por Lemos et al. (2009), Maldonado et al. (2012) y Yasumaru et al. (2018), por otra parte, J. M. Ezquerra, García-Carreño, Civera, y Haard (1997) y Garcia-Carreño et al. (1997) presentan valores de *DH* mayores, esto puede explicarse porque se utilizaron distintas proporciones de enzima:sustrato.

La harina de sangre tiene un alto contenido de proteína cruda y elevados porcentajes de lisina (>7%) y arginina (>2%) (NRC, 2011), esto significa mayores sitios donde puede actuar la tripsina, sin embargo, se han reportado bajas digestibilidades (Liu, Ye, Kong, Wang, y Wang, 2013; Suresh, Nates, et al., 2011). Una posible explicación es que la harina de sangre es comúnmente secada por aspersión a temperaturas altas, esto provoca que el despliegue de la proteína al calentarse lleva las cadenas laterales aromáticas a la superficie y mejore la interacción hidrofóbica intermolecular, generando menos disponibilidad de los sitios donde actúa la tripsina (Lan y Pan, 1993).

El *DH* de la harina de subproducto de ave y harinas de carne y hueso fueron superiores a la harina de pescado, por lo tanto, son fuentes de proteína fácilmente hidrolizables. Dong et al. (1993) reporta que el contenido de ceniza en harinas de subproductos de aves pueden afectar la digestibilidad de la proteína, en este estudio el *DH* no se vio afectado.

## 2.5 Conclusión

*DH* presenta una estrecha relación entre la ruptura del enlace peptídico por las proteasas digestivas del hepatopáncreas del camarón blanco y la calidad de la fuente de proteína y esta puede ser una herramienta útil para proporcionar información nutricional rápida en la estimación de la digestibilidad de fuentes de proteína para las

dietas del camarón blanco.

## Referencias

- Adler-Nissen, J., y cols. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier applied science publishers.
- Alarcón, F. J., de Oña, C., Díaz, M., García-Carreño, F. L., Moyano, F. J., y Navarrete del Toro, M. A. (2007). The effect of proteinase inhibitors in food protein hydrolysis by digestive proteinases of white shrimp (*Penaeus vannamei*) larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(1), 120–126.
- Alarcon, F. J., Moyano, F. J., y Díaz, M. (2002). Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised ph-stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(7), 697–704.
- Córdova-Murueta, J., Navarrete-del Toro, M., y García-Carreño, F. (2017). Advances in the study of activity additivity of supplemented proteases to improve digestion of feed protein by *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 23(2), 414–421.
- Dong, F. M., Hardy, R. W., Haard, N. F., Barrows, F. T., Rasco, B. A., Fairgrieve, W. T., y Forster, I. P. (1993). Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. *Aquaculture*, 116(2-3), 149–158.
- Ezquerria, J., Garcia-Carreño, F., y Carrillo, O. (1998). In vitro digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 163(1-2), 123–136.
- Ezquerria, J. M., García-Carreño, F. L., Civera, R., y Haard, N. F. (1997). ph-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 157(3-4), 251–262.
- Fang, X., Yu, D., Buentello, A., Zeng, P., y Davis, D. A. (2016). Evaluation of new non-genetically modified soybean varieties as ingredients in practical diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 451, 178–185.
- Galicia-González, A., Goytortúa-Bores, E., Palacios, E., Civera-Cerecedo, R., Moyano-López, F. J., Cruz-Suárez, L. E., y Ricque-Marie, D. (2010). Chemical composition and digestibility of three mexican safflower meals used as ingredients in diets for whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the world Aquaculture Society*, 41, 191–202.
- Garcia-Carreño, F., Navarrete del Toro, A., y Ezquerria, M. (1997). Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. i: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *Journal of Marine Biotechnology*, 5, 36–40.

- García-Galano, T., Villarreal-Colmenares, H., y Fenucci, J. (2007). Manual de ingredientes proteicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. *EUDEM, Mar del Plata*.
- Glencross, B., Hawkins, W., Evans, D., Rutherford, N., McCafferty, P., Dods, K., . . . Buirchell, B. (2008). Variability in the composition of lupin (*lupinus angustifolius*) meals influences their digestible nutrient and energy value when fed to rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 277(3-4), 220–230.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., y Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11), 591–600.
- Hendriks, W., Cottam, Y., Morel, P., y Thomas, D. (2004). Source of the variation in meat and bone meal nutritional quality. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 17(1), 94–101.
- Hertrampf, J. W., y Piedad-Pascual, F. (2012). *Handbook on ingredients for aquaculture feeds*. Springer Science & Business Media.
- Jannathulla, R., Dayal, J. S., Ambasankar, K., Khan, H. I., Madhubabu, E. P., y Muralidhar, M. (2017). Effect of protein solubility of soybean meal on growth, digestibility and nutrient utilization in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 25(5), 1693–1706.
- Lan, C. C., y Pan, B. S. (1993). In-vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 109(1), 59–70.
- Lemos, D., Ezquerra, J., y Garcia-Carreno, F. (2000). Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, 186(1-2), 89–105.
- Lemos, D., Lawrence, A., y Siccardi, A. (2009). Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by in vitro ph-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 295(1-2), 89–98.
- Lemos, D., y Nunes, A. (2008). Prediction of culture performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* by *in vitro* (ph-stat) degree of feed protein hydrolysis with species-specific enzymes. *Aquaculture nutrition*, 14(2), 181–191.
- Liu, X.-H., Ye, J.-D., Kong, J.-H., Wang, K., y Wang, A.-l. (2013). Apparent digestibility of 12 protein-origin ingredients for pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *North American Journal of Aquaculture*, 75(1), 90–98.
- Maldonado, C., Guillen, S., Pantoja, O., Arena, L., Ezquerra-Bauer, M., Alvarez-González, C., . . . Gaxiola, G. (2012). Effect of plant protein concentrates on nutrition physiology of *Litopenaeus vannamei* (b oone, 1883) juveniles. *Aquacul-*

- ture Research*, 43(8), 1209–1222.
- Mat, D. J., Le Feunteun, S., Michon, C., y Souchon, I. (2016). In vitro digestion of foods using ph-stat and the infogest protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*, 88, 226–233.
- Moyano, F. J., Saenz de Rodriganez, M. A., Díaz, M., y Tacon, A. G. (2015). Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 7(4), 223–242.
- NRC. (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National academies press.
- Olsen, R. L., y Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 120–128.
- Savoie, L. (1994). Digestion and absorption of food: usefulness and limitations of in vitro models. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 72(4), 407–414.
- Suresh, A. V., Nates, S., y cols. (2011). Attractability and palatability of protein ingredients of aquatic and terrestrial animal origin, and their practical value for blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* fed diets formulated with high levels of poultry byproduct meal. *Aquaculture*, 319(1-2), 132–140.
- Tacon, A. G. (2020). Trends in global aquaculture and aquafeed production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1), 43–56.
- Yasumaru, F. A., De Maesschalck, C., Wouters, R., y Lemos, D. (2018). In vitro degree of protein hydrolysis using enzyme extracts from larval and postlarval *Litopenaeus vannamei* (boone). *Aquaculture Research*, 49(12), 3933–3937.

---

---

## CAPÍTULO 3

---

# EVALUACIÓN DE DIGESTIBILIDAD *IN VIVO*

## 3.1 Introducción

Los coeficientes de digestibilidad aparente, proporcionan estimaciones de la disponibilidad de nutrientes en los alimentos, se pueden usar para seleccionar ingredientes que optimicen el valor nutricional y el costo de las dietas formuladas (Liu, Ye, Kong, Wang, y Wang, 2013).

La digestibilidad de un ingrediente alimenticio depende principalmente de su composición química y de las características digestivas de la especie. Sin embargo, los factores no relacionados con la formulación de la dieta, como los detalla de Carvalho, Ota, Kadry, Tacon, y Lemos (2016) pueden ser: el sistema de cultivo y medio ambiente; procesamiento del ingrediente; lixiviación de las heces; y interacciones entre los componentes de la dieta pueden afectar la digestibilidad de la dieta en condiciones prácticas de cultivo.

El *L. vannamei* tiene una amplia tolerancia a los cambios de salinidad (J. Ponce-Palafox, Martínez-Palacios, y Ross, 1997; J. T. Ponce-Palafox et al., 2019) y el cultivo de camarones en baja salinidad está creciendo en muchas áreas del mundo (Saoud, Davis, y Rouse, 2003). Se ha determinado que el cultivo en baja salinidad produce cambios en la enzimática digestiva e incrementa el número de células B en el hepatopáncreas (Li et al., 2008). Existen pocos estudios donde se evaluó la influencia de la salinidad sobre la digestibilidad de ingredientes, Cabanillas Beltrán, Ponce Palafox, Martínez Palacios, Chávez Sánchez, y Ross (2001) compararon dietas con altos niveles de proteína de soya en salinidades de 16 y 35 ppt. En el *Penaeus monodon* la salinidad de 16 ppt influyó en la digestibilidad de la soya pero no en la harina de pescado (Shiau, Lin, y Chiou, 1992).

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la digestibilidad aparente de ingredientes de origen marino, terrestre y vegetal en el *L. vannamei* cultivado en baja salinidad.

## 3.2 Material y Métodos

### 3.2.1 Diseño experimental.

Para cumplir con el objetivo señalado se diseñaron 2 experimentos en diferentes tiempos, ya que por cuestiones de disponibilidad de infraestructura no fue posible realizar el análisis de las dietas al mismo tiempo en ambas salinidades, para ambos ensayos los organismos se obtuvieron de los estanques exteriores de la *UMDI*, Sisal, provenientes de un desove múltiple, los cuales fueron alimentados con una dieta comercial al 35 % de proteína, las condiciones del experimento se mantuvieron en temperatura de  $28 \pm 1$  °C con una salinidad de  $35 \pm 0.5$  ups y para el tratamiento de agua dulce  $4 \pm 2$  y un oxígeno de  $6.5 \pm 2$  mg O<sub>2</sub>/ml.

El bioensayo se llevará a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición de la *UMDI*, Sisal. Los experimentos durarán a cinco semanas aproximadamente, de las cuales una semana fue utilizada para diluir las concentraciones de salinidad hasta <5ups, así como la aclimatación al sistema y alimento.

El diseño fue completamente aleatorizado con tres replicas por ingrediente en cada salinidad. La densidad de siembra fue de 10 organismos por tanque con un peso promedio de  $5 \pm 1.8$ ; Se utilizó como marcador para la digestibilidad *in vivo* a la zeolita Suárez et al. (2009).

### 3.2.2 Elaboración de dietas.

Los ingredientes secos se tamizaron a menos de 250 mm y se mezclaron por 20 minutos y posteriormente se adicionaron los aceites, y se continuo el mezclado hasta formar una pasta, la cual se pasó por un molino de robillo sin fin para extruirla y formar los pellets, los cuales fueron secados a 60 °C y posteriormente se almacenaron en 4 °C durante todo el experimento.



Tabla 3.1: Composición de ingredientes de las dietas de referencia y prueba.

Ingredientes	Dietas (g / 100g en base seca)	
	Prueba	Referencia
H. Pescado	37.1	53
H. de trigo	10	15
Almidón	13	20
Ingrediente de prueba <sup>†</sup>	30	
Aglutinante	1	1
Aceite de pescado	3.5	5
Lecitina de soya	1.4	2
Vitamina C	0.02	0.02
Premezcla de vitaminas y minerales	2	2
Zeolita	1.5	1.5
Colesterol	0.5	0.5
TOTAL	100	100

<sup>†</sup>Harina de ave, harina de carne y hueso (1,2), pasta de canola, pasta de soya, harina de pescado

### 3.2.3 Composición de las dietas.

La composición de las dietas fue en base a la usaba por Bureau y Hua (2006) donde se puede incluir un ingrediente al 30 %, que corresponde al ingrediente a estudiar, se presentan en la tabla 3.1. En la tabla 3.2 se presenta la composición proximal de las dietas empleadas en ambos experimentos.

Los ingredientes de prueba están en base a los resultados obtenidos en el experimento del capítulo 2, es decir se baso su formulación en la digestibilidad *in vitro* que presentaron las diferentes fuentes de proteína.

### 3.2.4 Alimentación y colecta de heces

La cantidad de alimento suministrada a los camarones, fue en proporción al 10 % de su biomasa (Maldonado et al., 2012; Suárez et al., 2009), se racionaron en dos porciones por día, para obtener la cantidad de dos gramos de heces para su análisis en digestibilidad.

La colecta de heces para digestibilidad se realizó mediante sifoneo con una manguera de plástico de cada tanque a una cubeta de cinco litros dentro de ella un tamiz

de 10 micras de abertura de malla para recolectar las heces. Posteriormente, las heces fueron lavadas con agua destilada y colocadas en una charola de aluminio para después introducirlas en estufas a 60 °C, durante 24 horas y se guardaron en dedales de centrifuga de 50 ml en refrigeración a -4 °C, para su análisis.

### 3.2.5 Método de análisis de la digestibilidad *in vivo*.

El método de digestibilidad *in vivo* se realizó, usando como marcador la zeolita (Cuzon y Guillaume, 1997), y se define como un método de análisis de las cenizas libres de carbono (AIA), ya que la zeolita proviene de la tierra de diatomeas, las cuales presentan al silíceo (Si) como componente de las tecas. Este método combina el lavado con ácido con la incineración de las muestras (para lo cual se utilizaron crisoles y una mufla para poder llevar a 500 °C la temperatura y garantizar la completa incineración de las muestras), tanto del alimento al cual se le incluyó una cantidad conocida del marcador, y las heces fecales, de las cuales también se obtiene el marcador recolectado.

### 3.2.6 Análisis estadísticos

. Para el análisis de % de digestibilidad se evaluó con un modelo:

$$DA_{ij} = \mu + \beta Fuente_{ij} + \beta Salinidad_j + \beta Fuente_{ij} : \beta Salinidad_j + \epsilon_{ij} \quad (3.1)$$

Donde  $DA_{ij}$  es la digestibilidad aparente de proteína o materia seca observado  $i$  en la salinidad  $j$  (dos niveles).  $\beta Fuente_{ij}$  representó las fuentes de proteína evaluadas y  $\beta Salinidad_j$  los parametros de agua dulce y salada. El  $\epsilon_{ij}$  es el error residual con  $\epsilon_{ij} \sim N(0; \sigma_s^2)$ ,  $\sigma_s^2$  es una estructura de varianza con diferente dispersión por estrato de salinidad. Los supuestos de normalidad de los residuales fueron visualmente evaluados con gráficos de cuantil-cuantil (Normal Q-Q) y su homocedasticidad e independencia al comparar los residuales con los valores ajustados del modelo. Los parámetros son estimados usando máxima verosimilitud restringida (restricted maximum likelihood, REML). El modelo fue realizado con la función *gls* de la paquetería “nlme” usando software R.

### 3.3 Resultados

La composición proximal de las dietas está presente en la tabla 3.2. La cantidad de proteína en las dietas se mantuvo entre 31-43 g/ 100g siendo las dietas  $>$ a 40 g/ 100g las dietas de carne y hueso 1 y 2, respectivamente.

Tabla 3.2: Composición proximal (g/100g) de las dietas de prueba para la digestibilidad aparente del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Dietas	Humedad	Proteína	Extracto etéreo
Dieta ave	6	38	11
Dieta canola	4	34	8
Dieta carne y hueso (1)	5	43	7.5
Dieta pescado	6	39	9.6
Dieta carne y hueso (2)	5	42	8
Dieta soya	6	37	8
Dieta de referencia	5	31	7

Los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca se encuentran en la tabla 3.3 y la proteína digestible se muestran en la tabla 3.4. Los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) presentados en los ingredientes estuvieron entre un intervalo de 28 % a 95 % en agua dulce y 68 % a 94 en agua salada. La DAMS con mayor porcentaje fue para la harina de pescado, pasta de canola y pasta de soya en ambas salinidades. El menor valor de DAMS se encuentran en las fuentes de proteína animal terrestre (harinas de carne y hueso, y harina de ave). El cultivo en agua dulce disminuyó considerablemente la DAMS en la harina de carne y hueso (2) comparado con el cultivo en agua salada ( $p < 0.05$ ).

Los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína (DAP) estuvieron en un intervalo de 58 % a 92 % en agua dulce y 80 % a 96 % en agua salada. Se presentó el valor más alto en la pasta de canola y pasta de soya en agua salada y en agua dulce la harina de ave y carne y hueso (1). Se presentaron interacciones significativas con los niveles de fuente de proteína y salinidad ( $p < 0.001$ ). El cultivo en agua dulce disminuyó significativamente la digestibilidad de pasta de canola, pasta de soya y harina de pescado ( $p < 0.05$ ), por otra parte, la harina de carne y hueso (2) incrementó su DAP en agua dulce.

Tabla 3.3: Digestibilidad aparente de materia seca (DAMS, %) de ingredientes para el camarón blanco *L. vannamei*. Se presenta su promedio (error estándar).

Fuente	DAMS		95 % CI	Salinidad
H. de ave	89 <sup>c</sup>	(0.6)	[87, 90]	Agua Dulce
P. de canola	95 <sup>a</sup>	(0.6)	[94, 96]	
H. carne y hueso(2)	28 <sup>f</sup>	(0.6)	[26, 29]	
H. carne y hueso(1)	87 <sup>cd</sup>	(0.6)	[85, 88]	
H. de pescado	94 <sup>ab</sup>	(0.6)	[93, 95]	
P. soya	95 <sup>ab</sup>	(0.6)	[93, 95]	
<hr/>				
H. de ave	88 <sup>cd</sup>	(0.6)	[87, 89]	Agua Salada
P. de canola	95 <sup>ab</sup>	(0.6)	[93, 95]	
H. carne y hueso(2)	68 <sup>e</sup>	(0.6)	[67, 69]	
H. carne y hueso(1)	85 <sup>d</sup>	(0.6)	[84, 86]	
H. de pescado	92 <sup>b</sup>	(0.6)	[90, 93]	
P. de soya	94 <sup>ab</sup>	(0.6)	[93, 95]	
<hr/>				
ANOVA dos vías				
Fuente	<.0001			
Salinidad	<.0001			
Fuente:Salinidad	<.0001			

Se presentan sus medias y su error estándar; CI= intervalos de confianza.

Diferentes letras en el superíndice indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), a > b.

### 3.4 Discusión

Los coeficientes de digestibilidad de materia seca (DAMS) pueden proporcionar una estimación de la materia orgánica que no se digiere, por lo tanto, coeficientes de DAMS altos representan menos desperdicio del alimento porque la cantidad que digiere y absorbe el organismo es mayor y una menor cantidad de heces son desechadas (Brunson, Romaine, y Reigh, 1997). La digestibilidad de la materia seca de los ingredientes consumidos por *L. vannamei* tiende a disminuir a medida que aumenta el contenido de cenizas de los ingredientes (Yang et al., 2009). En el presente estudio la DAMS de la harina de pescado fue significativamente mayor a la presentada por la harina de ave, Dong et al. (1993) reporta bajos coeficientes de digestibilidad cuando las harinas de ave presentan altos niveles de cenizas posiblemente por la calidad de está, conteniendo una mayor proporción de desperdicio provenientes de huesos o cartilagos, por otra parte, Gamboa-Delgado, Castañeda-Solís, Nieto-López, Villarreal-Cavazos, y Cruz-Suárez (2014) evaluaron la contribución del nitrógeno dietético de la harina de ave al crecimiento y está fue similar a la harina de pescado. Con la harinas de carne y hueso (2) fueron significativamente menores en ambas salinidades, con respecto a esto se puede

Tabla 3.4: Digestibilidad aparente de proteína (DAP, %) de ingredientes para el camarón blanco *L. vannamei*. Se presenta su promedio (error estándar).

Fuente	DAP		95 % CI	Salinidad
H. de ave	91 <sup>abcd</sup>	(1.6)	[87, 94]	Agua Dulce
P. de canola	83 <sup>de</sup>	(1.6)	[79, 86]	
H. carne y hueso(2)	90 <sup>bcd</sup>	(1.6)	[86, 93]	
H. carne y hueso(1)	93 <sup>abc</sup>	(1.6)	[89, 96]	
H. de pescado	85 <sup>cde</sup>	(1.6)	[82, 88]	
P. de soya	59 <sup>f</sup>	(1.6)	[55, 62]	
H. de ave	89 <sup>bcd</sup>	(0.5)	[88, 90]	Agua Salada
P. de canola	97 <sup>a</sup>	(0.5)	[95, 97]	
H. carne y hueso(2)	81 <sup>e</sup>	(0.5)	[79, 81]	
H. carne y hueso(1)	90 <sup>bc</sup>	(0.5)	[89, 91]	
H. de pescado	92 <sup>b</sup>	(0.5)	[91, 93]	
P. de soya	97 <sup>a</sup>	(0.5)	[95, 97]	
ANOVA dos vías				
Fuente	<.0001			
Salinidad	<.0001			
Fuente:Salinidad	<.0001			

Se presentan sus medias y su error estándar; CI= intervalos de confianza.

Diferentes letras en el superíndice indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), a > b.

atribuir a su proceso de elaboración o de la materia prima que se utilizó por ejemplo en *Penaeus setiferus* tiene una limitada capacidad para digerir los componentes fibrosos del hueso, cartílago y tejido conectivo (Brunson et al., 1997). I. Forster, Dominy, Obaldo, y Tacon (2003) reporta que si la materia prima proviene de origen rumiante tiene un impacto positivo significativo en la digestibilidad de proteína y materia seca en el camarón blanco.

En las fuentes de proteína vegetal la DAMS está relacionada con la cantidad y composición química de los carbohidratos que contengan (Liu et al., 2013). El aumento de la fibra cruda presentes en ingredientes de origen vegetal disminuye la DAMS, debido a que la fibra cruda está compuesta principalmente por celulosa y esta resulta no digestible (Lee, 2002; McGoogan y Reigh, 1996). Por otra parte, la selección de nuevas líneas de soya podría mejorar en el valor nutricional de las harinas de soya para los camarones mejorando su digestibilidad (Zhou, Davis, y Buentello, 2015).

A diferencia de la DAMS, la DAP fue relativamente alta para la mayoría de los ingredientes probados. Se han reportado resultados similares para otras especies de camarones, como *Penaeus monodon*, *P. setiferus* L, *Palaemon serratus* y *Pandalus*

*platyceros* (Brunson et al., 1997; J. Forster y Gabbott, 1971; Yang et al., 2009).

Existen pocos estudios donde se evaluó la influencia de la salinidad sobre la digestibilidad de ingredientes, Cabanillas Beltrán et al. (2001) determinaron que la DAMS en la harina de pescado aumentó en salinidad de 16 ups. El autor también reporta que la harina de soya incremento su digestibilidad en lípidos y carbohidratos pero no tuvo ningún efecto en la DAP. Por otra parte, en el *Penaeus monodon* la salinidad a 16 ups incrementó la digestibilidad de materia seca y proteína en soya pero no se vio afectada en caseína o harina de pescado (Shiau et al., 1992). Gucic, Cortés-Jacinto, Civera-Cerecedo, Ricque-Marie, y Martínez-Córdova (2013) reportaron que para el *L. vannamei* cultivado en salinidades de 5 y 35 ups no hay un efecto significativo en la variación de la digestibilidad de lípidos y carbohidratos en dietas comerciales. En el presente estudio, la baja salinidad afecto negativamente a la DAP en pasta de soya, pasta de canola y harina de pescado pero de manera positiva a la harina de carne y hueso (2).

### 3.5 Conclusión

Las digestibilidad de las fuentes de proteína evaluadas fueron adecuadas para el camarón blanco, sin embargo, la salinidad juega un papel importante en el desarrollo del camarón y por lo visto puede influenciar en la digestibilidad dependiendo de su origen ya sea animal terrestre o vegetal. Se necesita una mayor comprensión sobre los factores que afectan la digestibilidad cuando se cultiva en bajas salinidades porque dependiendo del origen o proceso de los ingredientes de una dieta esta puede verse positiva o negativamente afectada su digestibilidad.

## Referencias

- Brunson, J., Romaine, R., y Reigh, R. (1997). Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquaculture Nutrition*, 3(1), 9–16.
- Bureau, D., y Hua, K. (2006). Letter to the editor of aquaculture. *Aquaculture*, 2(252), 103–105.

- Cabanillas Beltrán, H., Ponce Palafox, J. T., Martínez Palacios, C. A., Chávez Sánchez, M. C., y Ross, L. G. (2001). Comparison of the digestibility of diets based on fishmeal and soybean meal in *Litopenaeus vannamei* boone 1931, using different temperatures and salinities for culture. *Ciencias marinas*, 27(4), 577–593.
- Cuzon, G., y Guillaume, J. (1997). Détermination de l'optimum de croissance selon le rapport protéines-énergie chez la crevette. *Aquatic Living Resources*, 3, 123–132.
- de Carvalho, R. A., Ota, R. H., Kadry, V. O., Tacon, A. G., y Lemos, D. (2016). Apparent digestibility of protein, energy and amino acids of six protein sources included at three levels in diets for juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in high performance conditions. *Aquaculture*, 465, 223–234.
- Dong, F. M., Hardy, R. W., Haard, N. F., Barrows, F. T., Rasco, B. A., Fairgrieve, W. T., y Forster, I. P. (1993). Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. *Aquaculture*, 116(2-3), 149–158.
- Forster, I., Dominy, W., Obaldo, L., y Tacon, A. (2003). Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931). *Aquaculture*, 219(1-4), 655–670.
- Forster, J., y Gabbott, P. (1971). The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51(4), 943–961.
- Gamboa-Delgado, J., Castañeda-Solís, J. d. D., Nieto-López, M. G., Villarreal-Cavazos, D., y Cruz-Suárez, L. E. (2014). Isotopic evaluation of the nutritional contribution of poultry by-product meal and fish meal to the growth of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(4), 430–438.
- Gucic, M., Cortés-Jacinto, E., Civera-Cerecedo, R., Ricque-Marie, D., y Martínez-Córdova, L. R. (2013). Apparent carbohydrate and lipid digestibility of feeds for whiteleg shrimp, *litopenaeus vannamei* (decapoda: Penaeidae), cultivated at different salinities. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1201–1213.
- Lee, S.-M. (2002). Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 207(1-2), 79–95.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., y Qin, J. G. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274(1), 80–86.
- Liu, X.-H., Ye, J.-D., Kong, J.-H., Wang, K., y Wang, A.-l. (2013). Apparent digestibility of 12 protein-origin ingredients for pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *North American Journal of Aquaculture*, 75(1), 90–98.
- Maldonado, C., Guillen, S., Pantoja, O., Arena, L., Ezquerro-Bauer, M., Alvarez-

- González, C., . . . Gaxiola, G. (2012). Effect of plant protein concentrates on nutrition physiology of *Litopenaeus vannamei* (boone, 1883) juveniles. *Aquaculture Research*, 43(8), 1209–1222.
- McGoogan, B. B., y Reigh, R. C. (1996). Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture*, 141(3-4), 233–244.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C. A., y Ross, L. G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *penaeus vannamei*, boone, 1931. *Aquaculture*, 157(1-2), 107–115.
- Ponce-Palafox, J. T., Pavia, Á. A., López, D. G. M., Arredondo-Figueroa, J. L., Lango-Reynoso, F., del Refugio Castañeda-Chávez, M., . . . V, P.-G. (2019). Response surface analysis of temperature-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production. *Aquaculture*, 503, 312–321.
- Saoud, I. P., Davis, D. A., y Rouse, D. B. (2003). Suitability studies of inland well waters for *litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture*, 217(1-4), 373–383.
- Shiau, S.-Y., Lin, K.-P., y Chiou, C.-L. (1992). Digestibility of different protein sources by *Penaeus monodon* raised in brackish water and in sea water. *Journal of Applied Aquaculture*, 1(3), 47–54.
- Suárez, J., Gaxiola, G., Mendoza, R., Cadavid, S., Garcia, G., Alanis, G., . . . Cuzon, G. (2009). Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931). *Aquaculture*, 289(1-2), 118–123.
- Yang, Q., Zhou, X., Zhou, Q., Tan, B., Chi, S., y Dong, X. (2009). Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *litopenaeus vannamei*, boone. *Aquaculture Research*, 41(1), 78–86.
- Zhou, Y.-G., Davis, D. A., y Buentello, A. (2015). Use of new soybean varieties in practical diets for the pacific white shrimp, *litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 21(5), 635–643.



---

---

## CAPÍTULO 4

---

# EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CON DIETAS SIN HARINA DE PESCADO CULTIVADOS EN SISTEMAS DE BIOFLOC Y BAJA SALINIDAD

## 4.1 Introducción

El cultivo en baja salinidad del camarón marino *Litopenaeus vannamei* está creciendo a nivel mundial (FAO, 2020), particularmente donde hay disponibles aguas continentales viables de baja salinidad (Roy, Davis, Saoud, y Henry, 2007). El cultivo en bajas salinidades tiene la ventaja de que los efluentes pueden ser utilizados para irrigación de cultivos agrícolas y de evitar enfermedades debido al uso de agua no contaminada ayuda a reducir el riesgo y transmisión de enfermedades (Samocha et al., 2002).

La cantidad y calidad de la proteína en la dieta son factores primarios que limitan el crecimiento del camarón blanco *L. vannamei* (Samocha et al., 2004). La harina de pescado es una fuente de proteína con una excelente fuente de aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales de cadena larga, vitaminas y minerales (NRC, 2011). Tradicionalmente la harina de pescado es la principal fuente de proteína en la formulación de alimentos para camarón y se prevé que para el 2025 el alimento comercial para camarones alcance las 10 millones de toneladas (Tacon, 2020). La limitada producción de harina de pescado condujo a identificar fuentes de proteína alternativas para su sustitución (Olsen y Hasan, 2012).

En la búsqueda de fuentes de proteína alternativas en alimentos acuícolas se enfrenta a ciertos retos que son: (i) variabilidad en su contenido de proteína; (ii) viabilidad de aumentar su producción y (iii) la aceptación del consumidor. Dentro de los ingredientes que pueden utilizarse para sustituir la harina de pescado, incluyen productos de plantas, animales terrestres, subproductos de pesca, harina de insectos, biomasa microbiana (harina de biofloc y levadura), harina de macroalgas y microalgas. Se debe de tener en cuenta que no es necesario que una sola fuente de proteína reemplace la harina de pescado, porque se pueden usar múltiples ingredientes en combinación para beneficiarse de sus perfiles nutricionales (Hua et al., 2019). Tacon (2020) propone que para asegurar la sostenibilidad económica y ecológica a largo plazo en el sector acuícola se debe de incrementar el uso de fuentes de proteína localmente disponibles.

Por otra parte, la capacidad de producir cultivos superintensivos utilizando dietas libres de harina de pescado es una cualidad importante en el cultivo del camarón (Ray, Lewis, Browdy, y Leffler, 2010). La tecnología de biofloc se basa en promover el crecimiento de comunidades complejas de microorganismos autotróficos y heterotróficos para la formación de flóculos que están compuestos de bacterias, algas, protozoos,

alimento no consumido y heces (Emerenciano, Gaxiola, y Cuzon, 2013). El biofloc tiene dos roles principales; mantener la calidad de agua y una fuente de alimento nutritivo (C. E. Boyd et al., 2020). La tecnología del biofloc mejora el crecimiento, supervivencia y calidad del producto final, generando una mejor aceptación en el mercado (Chan-Vivas et al., 2019). Magaña-Gallegos et al. (2018) determinó que la contribución del biofloc al crecimiento es aproximadamente de un 55 % a 100 %, por el contrario, Ray y Lotz (2017) estima una contribución del 1 al 16 % de nitrógeno al camarón y con mejores rendimientos productivos en un cultivo de agua clara.

En sistemas de cultivo de biofloc puede contribuir a la digestibilidad, Xu y Pan (2012) determinó la actividad enzimática extracelular del biofloc contribuyendo con actividades enzimáticas como las amilasas y celulasas. Wang et al. (2016) determinó un incremento en las actividades enzimáticas de proteasas, lipasas y celulasas en el hepatopáncreas de organismos cultivados en biofloc. Moreno-Arias et al. (2017) determinó que el biofloc en baja salinidad incrementó la actividad de proteasa, tripsina y lipasa en el camarón blanco del *L. vannamei*.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la baja salinidad y comparar los sistemas de producción de agua clara y biofloc con dietas sin harina de pescado utilizando mezclas de harina vegetal y animal terrestre en la calidad de agua, parámetros productivos y actividad enzimática digestiva en el camarón blanco *L. vannamei*.

## 4.2 Material y Métodos

### 4.2.1 Diseño experimental.

Los organismos se obtuvieron de los estanques exteriores de la *UMDI*, Sisal, provenientes de un desove múltiple, los cuales fueron alimentados con una dieta comercial al 35 % de proteína. El bioensayo tuvo una duración de 45 días y se llevo a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición de la *UMDI*, Sisal. Los tratamientos consistían en: (i) salinidad, con dos concentraciones 35 ups (agua marina) y <5 ups (baja salinidad); (ii) sistema de cultivo, tratamiento de agua clara y biofloc; (iii) dietas, tres dietas experimentales sin harina de pescado y una dieta comercial(control, con harina de pescado).



Figura 4.1: Diagrama del diseño experimental.

Tabla 4.1: Proceso de aclimatación de juveniles de camarón blanco para tratamiento de baja salinidad

Días	Salinidad inicial (ups)	Salinidad final (ups)
1	35	25
2	25	15
3	15	12
4	12	9
5	9	7
6	7	5

Para el tratamiento de baja salinidad los organismos se aclimataron durante seis días como se detalla el procedimiento en la tabla 4.1 con agua dulce de pozo.

Para el tratamiento de *BFT*, se preparo un mes antes de comenzar el experimento para alcanzar una calidad de agua constante y la formación de flóculos bacterianos (Chan-Vivas et al., 2019). Se prepararon 24 unidades experimentales, 12 por cada salinidad. Una unidad experimental consistía en un tanque de fibra de vidrio de 100 L de capacidad (73cm x 44 cm x 33cm) que se mantuvo sin recambio de agua y aireación constante durante toda la duración del experimento, solamente se reponía el agua perdida por evaporación que consistía en un 3-4% a la semana. Para mantener la proporción C:N se utilizó melaza de caña de azúcar, las cantidades que se utilizaron fueron calculadas como se describe en Emerenciano, Gaxiola, y Cuzon (2013).

Para el tratamiento de agua clara, para cada salinidad consiste en un sistema de recirculación cerrada con filtro de arena y termoregulado (RESUN CW-1000P) con

12 unidades experimentales, cada una con un flujo de agua de  $6 \text{ L min}^{-1}$  y aireación constante.

El diseño fue completamente aleatorizado con tres replicas por dieta en cada sistema de cultivo (biofloc y agua clara) en agua marina y baja salinidad. La densidad de siembra fue de 15 organismos por tanque con un peso promedio de  $8 \pm 1.2 \text{ g}$ .

#### 4.2.2 Análisis de calidad de agua.

La temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y el oxígeno disuelto ( $\text{mg/L}$ ) se midieron a las 09:00 horas durante todo el período experimental con una sonda multiparamétrica (Hach Co. modelo HQD40). El pH mediante un potenciómetro HANNA con (+/- 0.1) de error. La salinidad (ups) se midió con un refractómetro Atago (modelo Maste-S / Mill). El nitrógeno amoniacal total (TAN,  $\text{mg/L}$ ) y los nitritos ( $\text{mg/L}$ ) se midieron dos veces por semana mediante un método colorimétrico (Grasshoff, Kremling, y Ehrhardt, 2009; Strickland y Parsons, 1972). El volumen de Biofloc ( $\text{ml/L}$ ) se determinó de acuerdo con Magaña-Gallegos et al. (2018).

#### 4.2.3 Dietas experimentales.

En este experimento se compararon tres dietas experimentales y una comercial (Silver cup, El pedregal, S.A. de C.V. como control). La formulación de las dietas experimentales se encuentran en la tabla 4.2, todas las dietas eran isoproteicas y isocalóricas. El alimento comercial mostraba en la etiqueta que contenía  $35 \text{ g} / 100 \text{ g}$  de proteína cruda y  $7 \text{ g} / 100 \text{ g}$  de grasa cruda. Las dietas experimentales son elaboradas con diferentes proporciones de proteína animal terrestre y vegetal, se detallan de la siguiente manera: A50V50, , 50 % proteína animal terrestre y 50 % proteína vegetal, A70V30, 70 % proteína animal terrestre y 30 % proteína vegetal; A30V70, 30 % proteína animal terrestre y 70 % proteína vegetal. Los ingredientes que se utilizaron para las dietas son seleccionados según los resultados de la digestibilidad *in vitro* y *in vivo*.

La elaboración de las dietas experimentales consistió en que los ingredientes secos se tamizaron a menos de  $250 \text{ mm}$  y se mezclaron por 20 minutos y posteriormente se adicionaron los aceites, y se continuo el mezclado hasta formar una pasta, la cual se pasó por un molino de robillo sin fin para extraerla y formar los pellets, los cuales fueron

Tabla 4.2: Formulación y composición de las dietas experimentales.

Ingredientes	Dietas experimentales (g/100g)		
	A50V50	A70V30	A30V70
Harina de subproducto de ave	20	25	8
Harina de calamar	1	1	1
Pasta de soya	20	9	27
Harina carne y hueso	8	14.5	6
Harina de trigo	24.8	30.1	18.7
Pasta de canola	15	10	27
Aceite de pescado	3.5	3	4.1
Lecitina de soya	1.5	1.2	2
Vitamina C	0.0286	0.0286	0.0286
Premezcla de vitaminas y minerales	2	2	2
Colesterol	0.5	0.5	0.5
Paprika	1	1	1
Carboximetil	1	1	1
Composición proximal (g/100g, en base seca)			
Materia seca	95	94	94
Proteína cruda	35.44	35.61	35.32
Grasa cruda	8.25	8.14	7.69
Ceniza	10	12	9
Energía bruta (Kj/g)	14.4	16.2	15.3

secados a 60 °C y posteriormente se almacenaron en 4 °C durante todo el experimento.

#### 4.2.4 Análisis proximal de las dietas

El análisis proximal de los ingredientes se determinó de la siguiente manera: para el contenido de proteína, consistió en un análisis elemental por nitrógeno basado en la combustión directa y espontánea de la muestra en una atmósfera de oxígeno puro a 950-1400 °C. Carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre son transformados a CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> son transportados por He a una celda infrarroja con CO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> son removidos. Entonces, N<sub>2</sub> se midió por conductividad térmica diferencial, el análisis elemental es realizado por un Elemental Combustion System 4010 (Costech Analytical Technologies Inc., Valencia, CA, USA); los lípidos son extraídos por el método de Goldfish y la ceniza por incineración en una mufia a 500 °C. El contenido energético de los ingredientes son medidos en una bomba calorimétrica adiabática (PARR, Moline, IL, USA).

#### 4.2.5 Índices de evaluación de rendimiento productivo.

Cada 15 días, se tomaba una muestra aleatoria de 10 organismos por cada tanque, eran individualmente pesados y regresados a sus respectivos tanques. Luego de 45 días de cultivo, todos los camarones de cada tanque son individualmente pesados. Los índices de rendimiento productivo son calculados de la siguiente manera:

$$\text{Supervivencia}(\%) = 100 \times C_f/C_i$$

$$\text{Índice hepatosomático (IHP, \%)} = 100 \times (\text{Peso del hepatopáncreas}/\text{Peso del organismo})$$

Donde  $C_f$  número de camarones al final del experimento y  $C_i$  número de camarones al inicio del experimento.

#### 4.2.6 Enzimas digestivas.

Se obtuvieron los hepatopáncreas de los juveniles provenientes del experimento de crecimiento, los cuales se almacenaron en microtubos de 1.5 mL posteriormente sumergidos en nitrógeno líquido (-195 °C) y almacenados a -40 °C hasta el momento de su análisis.

La actividad de la tripsina fue con BAPNA (N-a-benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) 3.5 mmol/L como sustrato en Tris 100 mmol/L a pH 8 (Erlanger, Kokowsky, y Cohen, 1961); quimotripsina se utilizó sustrato SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilide) 1 mmol/L en 100 mmol/L Tris pH 8 (DelMar, Largent, Brodrick, y Geokas, 1979); una unidad de enzima definida como 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilida liberada por minuto, un coeficiente de extinción molar de  $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 410 nm. La actividad de la lipasa: 4-nitrofenil octanoato 1 mmol/L en 500 mmol/L Tris y 6 mmol/L de taurocolato de sodio pH 7.4; una unidad de actividad de lipasa definida como 1  $\mu\text{mol}$  de nitrofenol hidrolizado por minuto, coeficiente de extinción molar  $16300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 415 nm (Gjellesvik, Lombardo, y Walther, 1992).

Para la determinación de la proteína soluble se utilizó el método descrito por Bradford (1976).

## 4.2.7 Análisis estadístico

### 4.2.7.1 Regresión de crecimiento

Para las diferencias entre los valores de crecimiento entre las dietas experimentales se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos:

$$\begin{aligned}
 y_{ij} = & \alpha + \beta_1 \text{Tiempo}_{ij} + \beta_2 \text{Dieta}_j + \beta_3 \text{Cultivo}_j + \beta_4 \text{Salinidad}_j \\
 & + \beta_5 \text{Tiempo} \times \text{Dieta}_{ij} \\
 & + \beta_6 \text{Tiempo} \times \text{Cultivo} \times \text{Salinidad}_{ij} \\
 & + a_j + \epsilon_{ij}
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

Donde  $y_{ij}$  es el peso promedio de cada unidad experimental  $i$  medida en cada muestreo  $j$  ( $j$  entre 1 y 45 días),  $\beta_1$  representó la pendiente general,  $\beta_{2-4}$  el valor del intercepto de dietas experimentales (cuatro niveles), cultivo (dos niveles) y salinidad (dos niveles),  $\beta_5$  las pendientes por dieta,  $\beta_6$  la interacción de las pendientes de cultivo en cada nivel de salinidad;  $a_i$  es el efecto aleatorio de la medida en cada unidad experimental  $i$  con  $a_i \sim N(0; \sigma_a^2)$  y  $\epsilon_{ij}$  el error residual  $\epsilon_{ij} \sim N(0; \sigma^2)$ . Los supuestos de normalidad y homogeneidad de los residuales fueron visualmente evaluados con gráficos de cuantil-cuantil (Normal Q-Q), frecuencia de distribución de residuales a través del tiempo y autocorrelación de residuales (ver C.2). Los modelos fueron realizados con la función "LME" de la paquetería *nlme* usando software R.



#### 4.2.7.2 Análisis enzimas digestivas.

Los resultados se presentan como medias  $\pm$  error estándar (ES). Se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) y se analizó la interacción de efectos mayores (dieta, cultivo y salinidad) se evaluó en un análisis factorial de  $(4 \times 2 \times 2)$ . Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando una matriz de correlaciones para explorar las diferencias entre las dietas experimentales en cultivos de agua clara y biofloc en ambas salinidades. Los modelos fueron realizados con la función "GLS" de la paquetería *nlme* usando software R.

### 4.3 Resultados

Los parámetros físico y químico del agua se muestran en la tabla 4.3. Los valores de temperatura no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos. Los valores de oxígeno disuelto en agua dulce a 5 ups son mayores a 35 ups independientemente del cultivo. Los valores de sólidos sedimentables en biofloc no presentan diferencias significativas por salinidad. Los valores de pH fueron significativamente menores en biofloc a 35 ups.

Tabla 4.3: Valores de calidad de agua del cultivo en agua clara y biofloc del *L. vannamei* durante 45 días de cultivo. Los datos se presentan con promedio  $\pm$  ES.

	Agua clara		Biofloc	
	5 ups	35 ups	5 ups	35 ups
OD (mg/L)	$6.1 \pm 0.1^a$	$5.4 \pm 0.1^b$	$6.4 \pm 0.4^a$	$5.1 \pm 0.6^b$
Temp. (°C)	28.1	28.2	28.2	28.3
pH	$8.4 \pm 0.12^a$	$8.2 \pm 0.11^a$	$8 \pm 0.15^a$	$6.9 \pm 0.41^b$
TAN (mg/L)	$0.01 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$	$0.01 \pm 0.04$	$0.02 \pm 0.02$
NO <sub>2</sub> (mg/L)	$0.01 \pm 0.01^c$	$0.01 \pm 0.01^c$	$0.23 \pm 0.04^a$	$0.12 \pm 0.06^b$
SS (mL/L)	ND	ND	$18 \pm 5.3$	$21 \pm 7.1$

TAN, nitrógeno amoniacal total; NO<sub>2</sub>, nitrito; OD, oxígeno disuelto; SS, sólidos sedimentables.

ND, no detectable.

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes  $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ .

Las fluctuaciones de nitrito y nitrógeno amoniacal total se muestran en la figura 4.2. Los valores previos al inicio del cultivo muestran una clara disminución de los niveles de NO<sub>2</sub> y TAN que corresponde a la maduración del biofloc. Durante el experimento

las condiciones se mantienen estables y con valores menores 1 mg/L de  $\text{NO}_2$  y TAN, excepto el día 35 con un ligero incremento en  $\text{NO}_2$  a 5 ups.

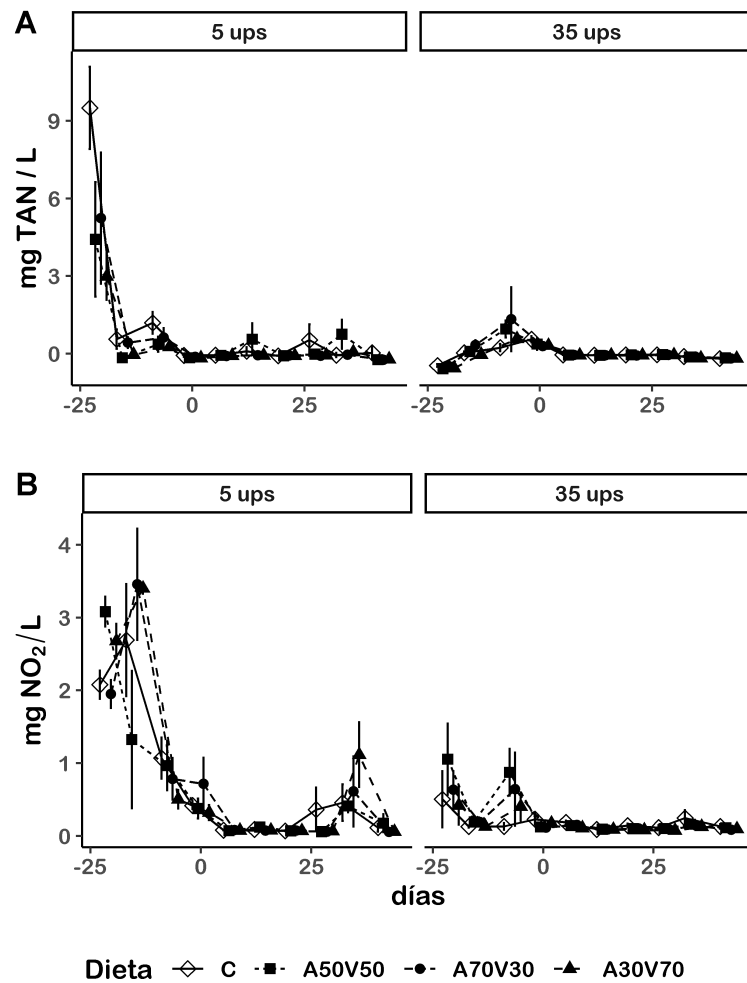


Figura 4.2: Comportamiento de las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (A) y nitrito (B) con el tiempo previo y durante el cultivo de biofloc por cada salinidad en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Los puntos de datos representan el promedio de cada dieta y las barras de error presentan el error estándar.

En el modelo de crecimiento, la salinidad a 35 ups fue superior a 5 ups ( $p < 0.001$ ), el crecimiento en biofloc se mantuvo superior ( $p < 0.01$ ) independientemente de la salinidad (ver 4.3). Las dietas experimentales independientemente del cultivo y la salinidad no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). A pesar de que no se presentan diferencias significativas entre las dietas los valores de crecimiento de la dieta A70V30 son ligeramente inferiores a las demás dietas (ver tabla 4.4).

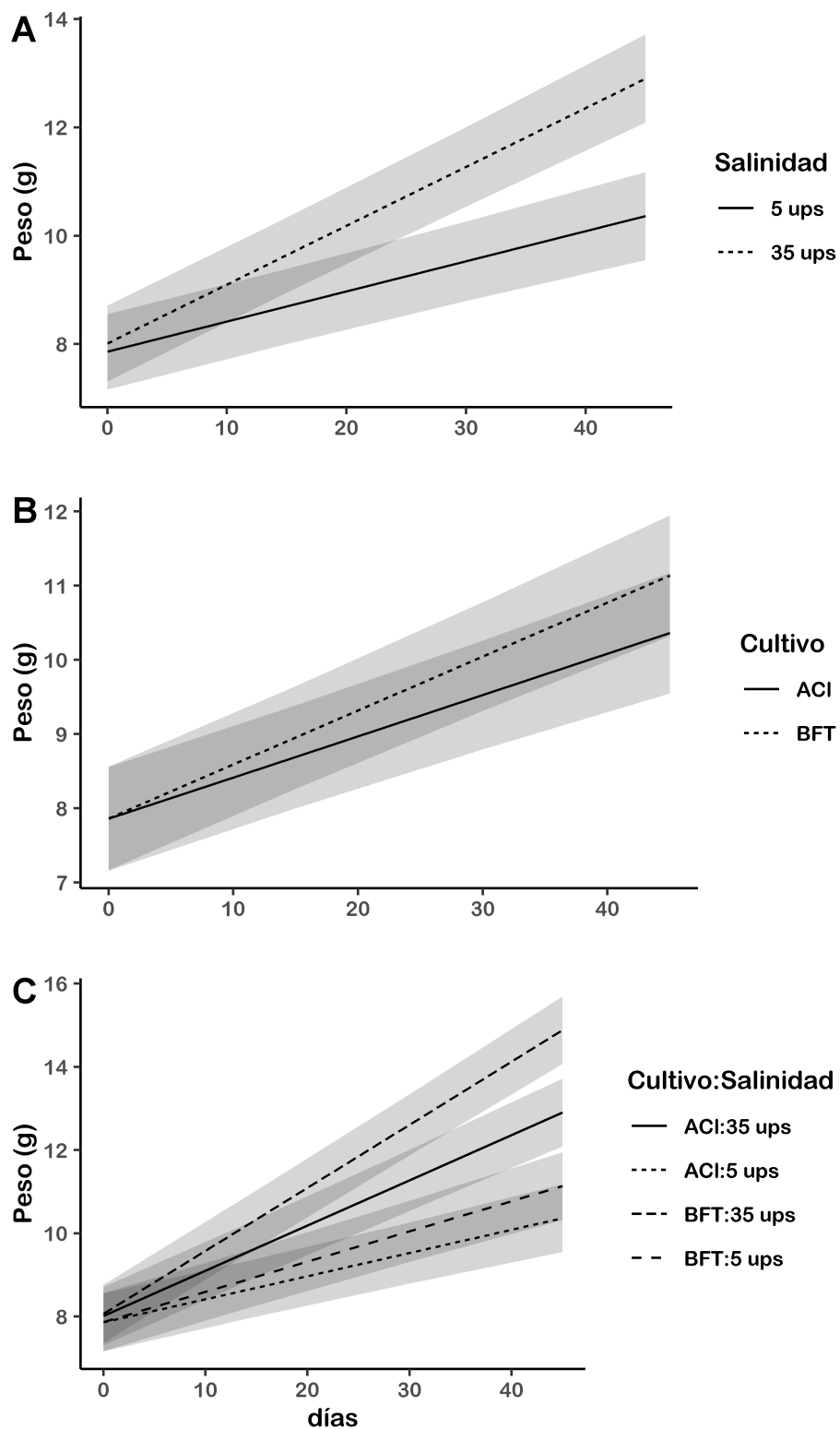


Figura 4.3: Efectos fijos de (A) la pendiente de crecimiento por salinidad (B) por cultivo y (C) el cultivo por cada salinidad en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Se dibuja un intervalo de confianza del 95 % alrededor de los efectos estimados.

Tabla 4.4: Valores de peso inicial (PI, g), final (PF, g) e incremento por semana (IS, g/semana) de *L. vannamei* cultivados en dos salinidades en sistemas de cultivo biofloc (*BFT*) y agua clara (ACI) con dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína vegetal y animal terrestre durante 45 días. Los valores se presentan con promedio (error estándar).

Salinidad	Cultivo	Dieta	PI	PF	IS <sup>†</sup>
Baja salinidad (<5 ups)	ACI	C	7.9 (0.55)	10.65 (1.24)	0.42 (0.07)
		A50V50	7.67 (0.06)	9.16 (0.50)	0.21 (0.07)
		A70V30	7.92 (0.32)	9.96 (0.58)	0.28 (0.07)
		A30V70	8.1 (0.35)	9.44 (0.79)	0.21 (0.07)
	<i>BFT</i>	C	7.87 (0.27)	10.91 (0.21)	0.49 (0.07)
		A50V50	7.8 (0.06)	10.56 (1.12)	0.42 (0.07)
		A70V30	7.9 (0.12)	9.83 (0.47)	0.35 (0.07)
		A30V70	7.88 (0.24)	10.72 (0.15)	0.42 (0.07)
Agua Marina (35 ups)	ACI	C	7.89 (0.31)	13.03 (0.11)	0.84 (0.07)
		A50V50	8.25 (0.13)	12.08 (0.55)	0.56 (0.07)
		A70V30	8.18 (0.48)	12.04 (0.50)	0.63 (0.07)
		A30V70	8.01 (0.14)	12.59 (0.42)	0.7 (0.07)
	<i>BFT</i>	C	8.36 (0.31)	14.83 (0.71)	1.05 (0.07)
		A50V50	8.16 (0.27)	14.33 (0.15)	0.98 (0.07)
		A70V30	8.43 (0.29)	13.75 (0.56)	0.84 (0.07)
		A30V70	8.11 (0.27)	14.63 (0.19)	0.98 (0.07)

<sup>†</sup> Los valores se obtienen a partir del modelo 4.1

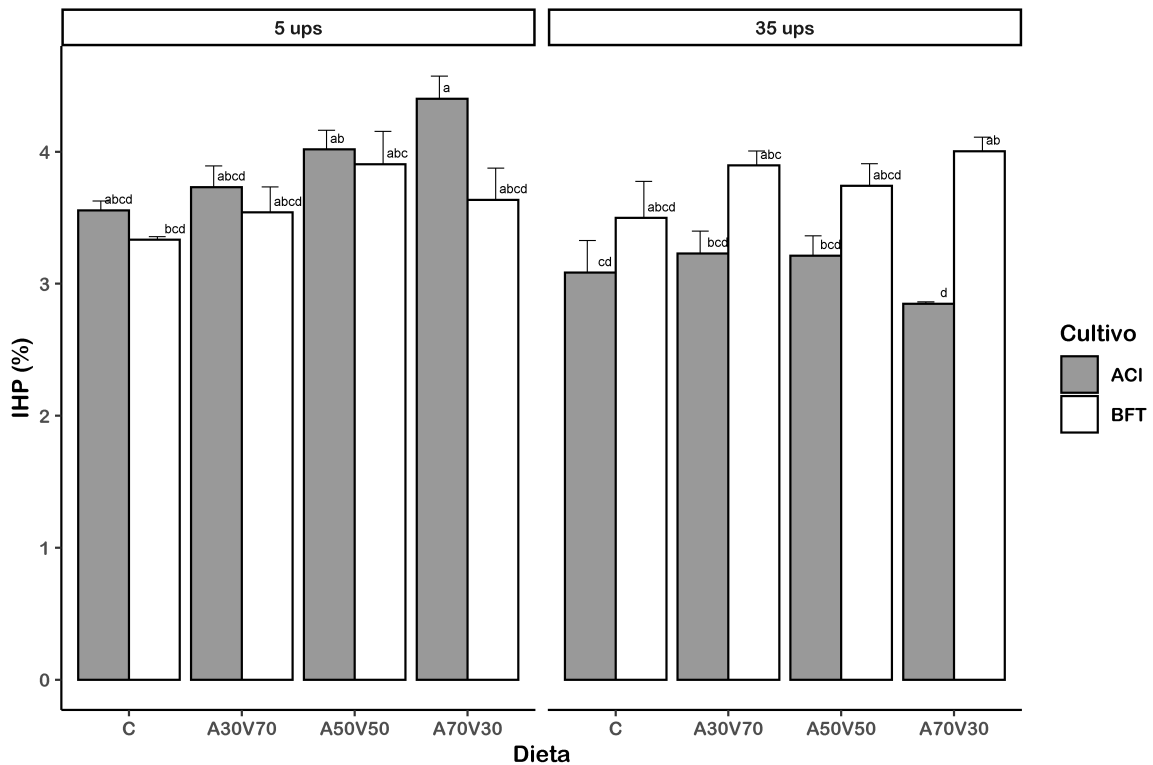


Figura 4.4: Valores de índice hepatosomático en el camarón blanco *L. vannamei* cultivado en 5 ups y 35 ups de salinidad en sistema de agua clara (ACI) y biofloc (BFT) con dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína vegetal y animal terrestre durante 45 días. Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes  $p < 0.05$ .

En el índice hepatosomático se encuentran diferencias significativas por la dieta en el cultivo de cada salinidad ( $p < 0.05$ ). En la figura 4.4 se observa que los valores de biofloc en agua a 35 ups son superiores a el cultivo en agua clara y su mayor diferencia se encuentra en la dieta A70V30. En el cultivo en 5 ups el IHP es superior en agua clara y menor en biofloc, y se presenta un mayor valor en la dieta A70V30 en agua clara.

Las enzimas digestivas de tripsina, quimotripsina y lipasa, en la tabla 4.5 se detallan los efectos mayores. En salinidades de 5 ups se presentan valores de tripsina y quimotripsina superiores a los presentados en 35 ups ( $p < 0.05$ ), excepto en lipasa ( $p > 0.05$ ). En cultivo de biofloc fue ligeramente superior en actividades de quimotripsina ( $p < 0.05$ ). Las interacciones del tipo de cultivo en cada salinidad solo se presentan en tripsina y sus proporciones de tripsina/quimotripsina (T/Q) ( $p < 0.05$ ). La interacción de dieta por cada tipo de cultivo en cada salinidad se observa en la figura 4.6 (A), se observan las mayores diferencias en la salinidad de 5 ups dependiendo del tipo de cultivo en las dietas A70V30 y C.

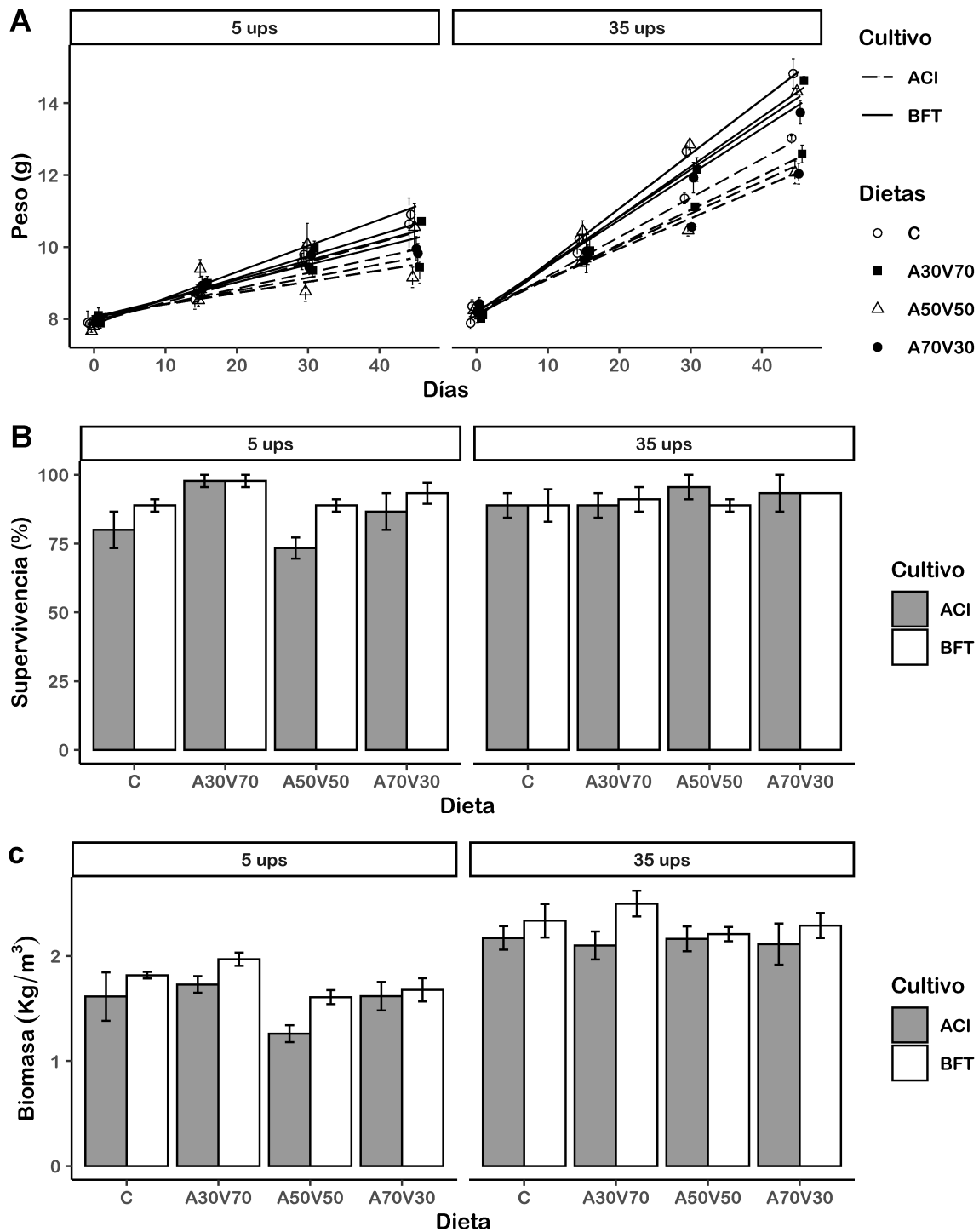


Figura 4.5: Crecimiento de *L. vannamei* a través del tiempo (A), supervivencia (B) y biomasa final (C) cultivados en dos salinidades en sistemas de cultivo biofloc (*BFT*) y agua clara (*ACI*) con dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína vegetal y animal terrestre durante 45 días. Cada punto o barra presenta el promedio y la barra de error representa  $\pm$  ES.

Tabla 4.5: Efectos principales de la salinidad, tipo de cultivo y dieta experimental en la expresión de tripsina y quimotripsina y lipasa (expresados en U/mgProt) y la proporción de la actividad de tripsina a quimotripsina (T/Q) y la actividad de tripsina a lipasa (T/L) en el *L. vannamei* cultivado con dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína vegetal y animal terrestre durante 45 días.

Efectos Principales		Tripsina	Valor $p$	Quimotripsina	Valor $p$	Lipasa	Valor $p$	T/Q	Valor $p$	T/L	Valor $p$
Salinidad	5 ups	420.90 <sup>a</sup>	*	1929.77 <sup>a</sup>	***	33.21	NS	0.23	NS	15.60 <sup>a</sup>	**
	35 ups	345.14 <sup>b</sup>		1614.02 <sup>b</sup>		43.80		0.22		10.68 <sup>b</sup>	
Cultivo	ACI	383.73	NS	1664.46 <sup>b</sup>	**	33.20	NS	0.24	NS	14.91	NS
	BFT	382.31		1879.34 <sup>a</sup>		43.8		0.21		11.35	
Dieta	C	409.02 <sup>a</sup>	***	1762.78	NS	48.87	NS	0.23 <sup>a</sup>	**	12.48	NS
	A30V70	402.34 <sup>a</sup>		1802.44		36.65		0.23 <sup>a</sup>		13.87	
	A50V50	256.61 <sup>b</sup>		1818.26		27.53		0.16 <sup>b</sup>		11.78	
	A70V30	464.11 <sup>a</sup>		1704.12		40.96		0.28 <sup>a</sup>		14.40	
Cultivo x Salinidad	ACI:35 ups	379.14 <sup>ab</sup>	*	1546.26	NS	38.88	NS	0.25 <sup>a</sup>	*	13.13	NS
	ACI:5 ups	388.33 <sup>ab</sup>		1782.65		27.54		0.22 <sup>a</sup>		16.69	
	BFT:35 ups	311.14 <sup>b</sup>		1681.78		48.72		0.19 <sup>b</sup>		8.20	
	BFT:5 ups	453.48 <sup>a</sup>		2076.90		38.88		0.24 <sup>a</sup>		14.51	

NS, No significativo. \* $p < .05$ . \*\* $p < .01$ . \*\*\* $p < .001$

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes  $p < 0.05$ , a >ab >b.

Los valores de proporción en las expresión enzimática de tripsina/quimotripsina (T/Q) y tripsina/lipasa (T/L) se detallan en la figura 4.7. El menor valor de T/Q se encuentra en la dieta A50V50 y el mayor valor en A70V30 ambas dietas en la salinidad de 5 ups en biofloc. En los valores de T/L no se encuentran diferencias significativas en la dieta por cultivo en cada salinidad ( $p>0.05$ ), solo en el efecto principal de salinidad ( $p<0.05$ ) (ver tabla 4.5).

Los valores de expresión enzimática de tripsina en función de la pendiente de crecimiento presentan diferencias significativas entre las tendencias para el tipo de cultivo en cada salinidad ( $p<0.05$ ). En la figura 4.8 se aprecia que la tendencia de expresión de la tripsina aumenta en los cultivos en agua clara conforme incrementa la tasa de crecimiento. Por otra parte, en el cultivo de biofloc se encuentra una tendencia inversa y en ambos casos, ya sea el cultivo en agua clara o biofloc, estas pendientes son mayores en agua 5 ups.

El análisis de componentes principales (PCA) usando la matriz de correlaciones se exploró la respuesta de los juveniles de *L. vannamei* y son presentadas en la figura 4.9. En la figura 4.9 Dim1 vs. Dim2 muestra un patrón. Dim1 y Dim2 juntos cuentan el 67.8% de la variación de las diferencias de crecimiento y actividad de las enzimas digestivas del hepatopáncreas. Para el Dim1, las principales diferencias son observadas en el crecimiento y valores de tripsina. Para el Dim2 las principales diferencias son relacionadas con la expresión de lipasa.

## 4.4 Discusión

El oxígeno disuelto (OD) es un importante factor limitante en el cultivo de *L. vannamei* (C. E. Boyd y Tucker, 2014). Los niveles de OD que pueden ser letales para el *L. vannamei* son aproximadamente de 1 mg/L (Hopkins, Stokes, Browdy, y Sandifer, 1991). Aunque la temperatura, salinidad y pH influyen los niveles que pueden ser letales para *L. vannamei* (Zhang, Zhang, Li, y Huang, 2006), los valores de OD en el presente estudio son los adecuados para ambas salinidades. Los valores de temperatura se mantuvieron dentro de los niveles apropiados para el crecimiento y desarrollo del camarón (J. Ponce-Palafox, Martinez-Palacios, y Ross, 1997; J. T. Ponce-Palafox et al., 2019). pH tiene una relación inversa con la salinidad en un sistema de biofloc (Ray y Lotz, 2017), Maicá, de Borba, y Wasielesky Jr (2012) encontró una tendencia similar en la que se le atribuyó a una intensificación de los procesos de nitrificación conforme



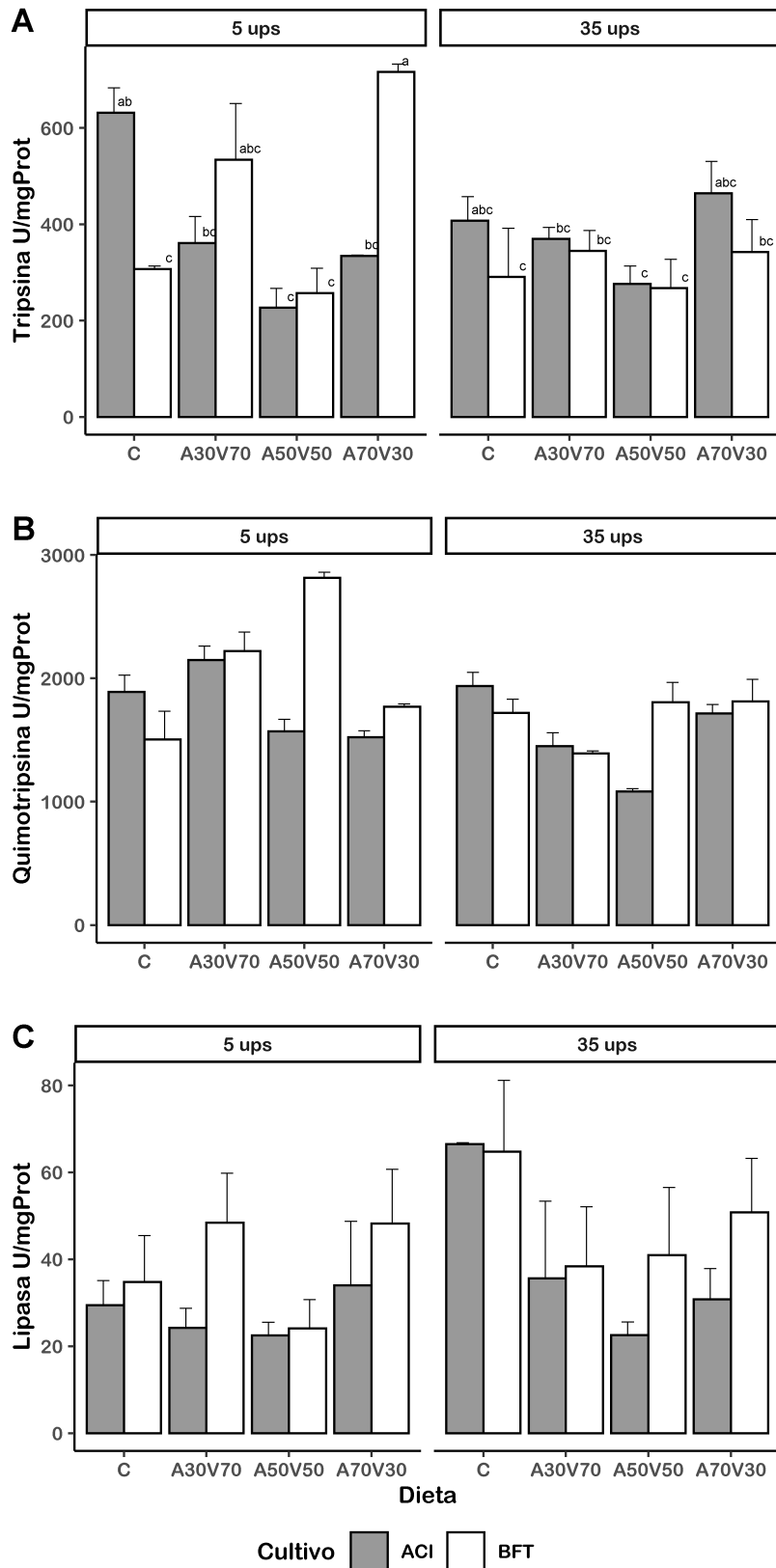


Figura 4.6: Expresión de tripsina (A), quimotripsina (B) y lipasa (C) en el *L. vannamei* cultivado en 5 ups y 35 ups de salinidad en sistema de agua clara (ACI) y biofloc (BFT) con dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína vegetal y animal terrestre durante 45 días. Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes  $p < 0.05$ .

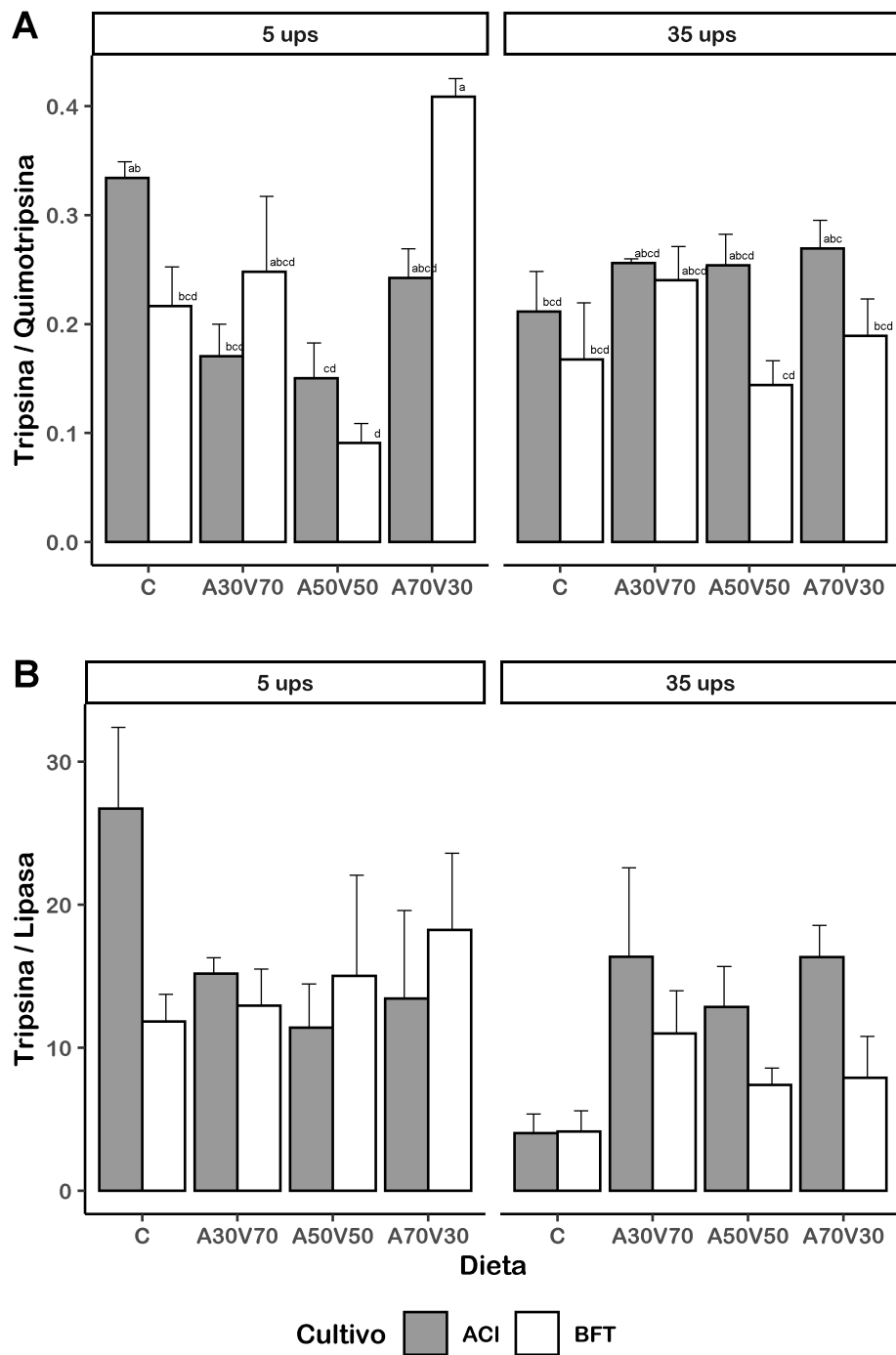


Figura 4.7: Proporción de la actividad de tripsina a quimotripsina (A) y la actividad de tripsina a lipasa (B) en el *L. vannamei* cultivado en 5 ups y 35 ups de salinidad en sistema de agua clara (ACI) y biofloc (BFT) con dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína vegetal y animal terrestre durante 45 días. Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes  $p < 0.05$ .

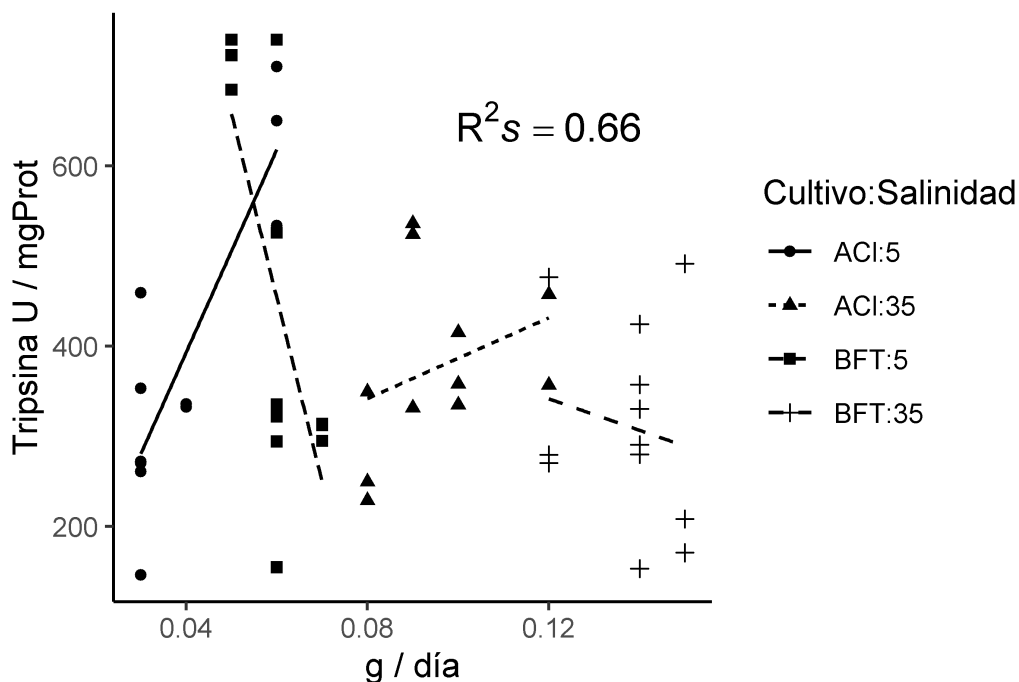


Figura 4.8: Actividad de la tripsina en función de la pendiente de crecimiento del *L. vannamei* cultivado en 5 ups y 35 ups de salinidad en sistema de agua clara (ACI) y biofloc (BFT) con dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína vegetal y animal terrestre durante 45 días.

incrementa la salinidad, Esparza-Leal, Xavier, y Wasielesky (2016) presenta resultados similares pero su pH se mantuvo estable posiblemente esto ocurrió porque incremento la alcalinidad artificialmente agregando bicarbonato de sodio para aumentar el pH (Furtado, Poersch, y Wasielesky Jr, 2011).

Se ha reportado que sistemas de cultivo biofloc en baja salinidad con nitritos mayores a 4 mg/L presentan una mortalidad del 100% (Esparza-Leal et al., 2016), de manera similar se observó en cultivos de 0 y 2 ppt cuando se presentaron los picos de nitrito la mortalidad aumentó (Maicá et al., 2012), sin embargo, Moreno-Arias et al. (2017) reporta supervivencias mayores al 80% en sistema de biofloc en salinidades de 5 ppt y nitritos mayores a 4 mg/L, para *L. vannamei* las concentraciones mínimas de nitrito para su cultivo son de 2.5 mg/L en salinidad de 8 ppt (Furtado et al., 2016), estas son concentraciones mayores a las sugeridas por Gross, Abutbul, y Zilberg (2004) que fueron estimados a partir de los valores de LC50 a 96 horas, siendo estas de 0.45 mg/L a 2 ppt. El nitrito afecta la capacidad de transporte del oxígeno (Jensen, 1995), en camarones peneidos produce una disminución de hemocianina oxigenada, pH,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ , niveles de proteína soluble, aminoácidos libres y osmolalidad, también aumenta la cantidad de desoxi-hemocianina (baja afinidad al oxígeno), excreción de amonio, niveles de urea, P50 (afinidad de oxígeno),  $\text{pO}_2$  (presión parcial de oxígeno)

en la hemolinfa, respectivamente (J. Chen y Cheng, 1995; Cheng y Chen, 1998, 1999). En juveniles de *L. vannamei* la susceptibilidad del nitrito aumenta cuando la salinidad disminuye (Lin y Chen, 2003) ya que el nitrito es un competidor activo del mecanismo de absorción cloruros (Cheng y Chen, 1998). En un cultivo de biofloc los compuestos nitrogenados como el TAN y NO<sub>2</sub> interactúan entre sí, cuando las concentraciones de TAN decrecen las concentraciones de NO<sub>2</sub> aumentan (Moreno-Arias et al., 2017). Por otra parte, durante la maduración del biofloc, las condiciones ambientales son mas desfavorables para el crecimiento del camarón (Llarío et al., 2019), donde un sistema maduro son más efectivos para evitar altas concentraciones de amoníaco y nitrito en el sistema de biofloc (Ferreira et al., 2020). En el presente estudio, el comportamiento de los compuestos nitrogenados del sistema de biofloc (figura 4.2) corresponden a un sistema maduro que mantuvo niveles constantes de TAN y NO<sub>2</sub>; y en niveles seguros durante el cultivo de biofloc.

El *L. vannamei* tiene una amplia tolerancia a la salinidad y temperatura (J. Ponce-Palafox et al., 1997), aunque se a determinado que el crecimiento y supervivencia en bajas salinidades depende del tamaño/edad, es decir, postlarvas y juveniles (Laramore, Laramore, y Scarpa, 2001). Sin embargo, cuando se compara en la literatura sobre crecimiento en diferentes salinidades en juveniles de *L. vannamei* no es concluyente (Li et al., 2017). Laramore et al. (2001) logró cultivar exitosamente juveniles en salinidades de 2 a 30 ppt, sin diferencias significativas en su crecimiento, Samocha, Lawrence, y Pooser (1998) reporta que obtuvo crecimientos semanales mayores a 1.67 g en salinidades entre 2 y 8 ppt, aunque el autor no evaluó un control en salinidades mayores a 8 ppt. Jaffer et al. (2020) presentó tasas de crecimiento específico mayores a 1.77 % y su factor de conversión alimenticia fue similar en salinidades de 1-25 ppt, Esparza-Leal et al. (2019) no reporta diferencias significativas en el crecimiento en salinidades de 1-35 ppt, excepto por una supervivencia relativamente menor en el tratamiento de 10 ppt. Por otra parte, Bray, Lawrence, y Leung-Trujillo (1994) obtuvo mejores crecimientos en 5 y 15 ppt comparado con 35 ppt y Zhang, Zhang, Li, y Gao (2009) reportan una mejor tasa de crecimiento en 5 ppt pero con supervivencias menores a 30 %. En contraste, otros autores presentan una disminución del crecimiento en bajas salinidades, Esparza-Leal, Ponce-Palafox, Valenzuela-Quiñónez, Beltrán, y Figueroa (2009) presentan una disminución en el crecimiento en salinidades de 0.52 a 0.88 ppt comparado al control con 34 ppt y Gao et al. (2012) con salinidades de 2 y 30 ppt; Li et al. (2007) obtuvo un mejor crecimiento en 17 ppt comparado con 3 y 32 ppt. En el sistema de biofloc, Maicá et al. (2012) un mejor rendimiento en salinidad de 25 ppt comparado con 4 ppt y Esparza-Leal et al. (2016) determina una mortalidad del 100 % en salinidades de 2 y 4 ppt en las primeras dos semanas de cultivo, mientras que salinidades de 8 y 12 ppt

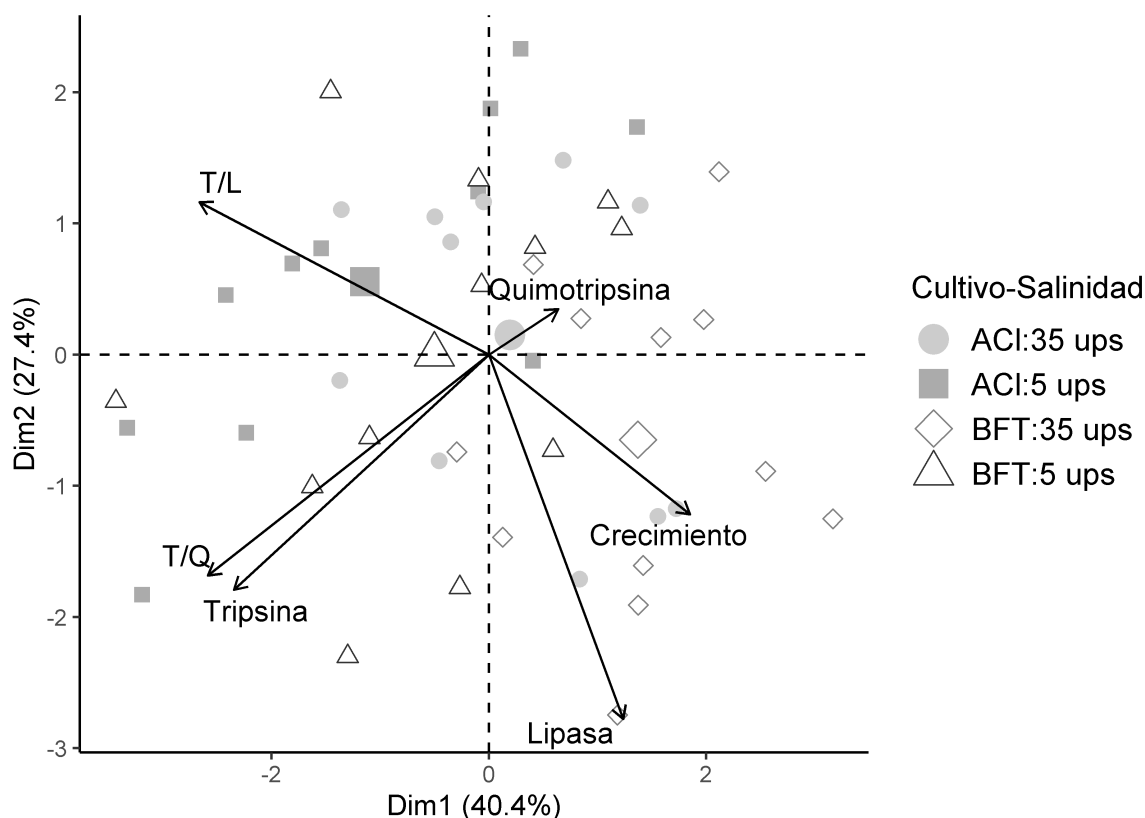


Figura 4.9: PCA de actividad enzimática y parámetros de crecimiento del *L. vannamei* cultivado en 5 ups y 35 ups de salinidad en sistema de agua clara (ACI) y biofloc (BFT) con dietas sin harina de pescado utilizando fuentes de proteína vegetal y animal terrestre durante 45 días.

tienen un menor crecimiento que salinidades mayores a 16 a 35 ppt.

Una disminución en el crecimiento se puede deber a la composición iónica del agua al utilizar agua de pozo de baja salinidad que pueden ser deficientes en  $K^+$  y  $Mg^{2+}$  (C. A. Boyd, Boyd, y Rouse, 2007), se ha reportado que la suplementación con muriato de potasio (KCl) y dolomita ( $CaMg(CO_3)_2$ ) para elevar los niveles de  $K^+$  y  $Mg^{2+}$  de 6.2 y 4.6 a 40 y 20 mg/L, respectivamente, mejora la supervivencia y el crecimiento (Davis, Boyd, Rouse, y Saoud, 2005; McNevin, Boyd, Silapajarn, y Silapajarn, 2004). Roy et al. (2007) determinó que un nivel de  $K^+$  menor a 20 mg/L y con la más alta proporción de Na:K afectan negativamente el crecimiento y supervivencia del *L. vannamei* y los valores cercanos a 28:1 de Na:K que corresponden a proporción de agua marina obtuvieron un mejor crecimiento. Esparza-Leal et al. (2009) utilizó agua de diferentes localidades de un mismo acuífero con diferencias en su concentración iónica y reportó la menor tasa de crecimiento donde la concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  fueron las más bajas. McGraw y Scarpa (2003) evaluó la importancia de los iones de  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$

y  $\text{SO}_4^{2-}$  con agua destilada a la que se agrego sodio, cloruro, calcio y carbonato (agua dulce artificial), donde el principal factor que afectó la supervivencia a corto plazo (48 h) fue el  $\text{K}^+$  ( $>10$  mg/L).

Otro factor importante es la alcalinidad, el agua con alta alcalinidad provoca una tensión del dióxido de carbono muy baja, lo que disminuye los niveles de tensión del dióxido de carbono en la sangre y provoca una alcalosis en los animales acuáticos (Yao et al., 2016). Ge, Li, Wang, Li, y Li (2019) evaluó los mecanismos de respuesta de *Exopalaemon carinicauda* a un estrés salino-alcalino y cuando los organismos son expuestos a una salinidad de 5 ppt y con niveles de alcalinidad de carbonado de 1, 5 y 10 mmol/L (50, 250 y 500 mg/L  $\text{CaCO}_3$ ) la mortalidad incremento significativamente en un periodo de 14 días y aumentaron los niveles de expresión molecular de dos isoformas de anhidrasa carbónica (AC): la asociada a la membrana celular y citosólica. El análisis filogenético realizado por dichos autores coloca las dos isoformas de AC en el mismo grupo con el *L. vannamei*. En *Macrobrachium rosenbergii* altos niveles de alcalinidad afectan negativamente el crecimiento y supervivencia (Adhikari, Chaurasia, Naqvi, y Pillai, 2007). Brown, Wickins, y MacLean (1991) reporta resultados similares y una menor deposición de calcio en el exoesqueleto ocurre en aguas con alta alcalinidad.

Los acuíferos de la península de Yucatán se derivan de sedimentos marinos, incluye en su mayoría iones disueltos de calcio, magnesio, sulfato, bicarbonatos y cloro ( $\text{Cl}^-$ ), y en minoría estroncio (Perry et al., 2003). La alcalinidad y el calcio en aguas subterráneas cercanas a la costa presentan una mayor concentración respecto al interior (Stoessel, Ward, Ford, y Schuffert, 1989). Gullian, Aramburu, Sanders, y Lope (2010) reporta concentraciones de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  de 18.3, 175 y 372 mg/L, respectivamente; y una alcalinidad de 415 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  en agua a 5 ppt en la península de Yucatán. Perfiles iónicos realizados en la UMDI-Sisal en el 2017 reporta concentraciones de potasio, magnesio y sulfato de 24.7, 106 y 74 mg/L, respectivamente; con una alcalinidad de 333.7 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  (*datos sin publicar*).

Los resultados de crecimiento en el presente estudio indican que la baja salinidad a 5 ups resultó en un menor crecimiento (figura 4.3) independientemente del tipo de cultivo (biofloc o agua clara). La tasa de crecimiento semanal (tabla 4.4) son similares a los reportados por Araneda, Pérez, y Gasca-Leyva (2008) para el *L. vannamei* en baja salinidad. Esta disminución del crecimiento puede deberse a un desbalance iónico (Esparza-Leal et al., 2009; Roy et al., 2007) y/o al estrés salino-alcalino (Ge et al., 2019). Futuras investigaciones para elucidar estos aspectos deben de realizarse.

El IHP refleja el almacenamiento de reservas de energía y estado de utilización de nutrientes debido a que el hepatopáncreas está envuelto en diversas actividades metabólicas, incluyendo síntesis y secreción de enzimas digestivas, y absorción de nutrientes (Li et al., 2011). En cultivo de biofloc el IHP puede indicar una mayor acumulación de nutrientes (Emerenciano, Cuzon, Arévalo, Miquelajauregui, y Gaxiola, 2013). En el presente estudio, la salinidad de 35 ups el biofloc presentó un mayor IHP reflejando una mayor acumulación de nutrientes, al contrario, la salinidad de 5 ups presentó un mayor IHP en el sistema de agua clara, esto se puede deber a que el cambio de salinidad incremento el metabolismo, donde el sistema de biofloc provee energía extra y calidad nutricional (Magaña-Gallegos et al., 2018) que mejora la capacidad adaptativa del camarón.

La tripsina y quimotripsina que son consideradas las enzimas más importantes y responsables de aproximadamente el 60 % en la digestión de proteínas, son las enzimas proteolíticas más abundantes en la glándula digestiva de crustáceos (Wei, Zhang, Yu, Li, y Xiang, 2014).

Moss, Divakaran, y Kim (2001) determinó que el sistema cultivo puede influenciar las actividades enzimáticas digestivas, cuando los organismos son cultivados en agua eutrófica presentan mayores actividades de proteasas de serina, colagenasa, amilasa, lipasa, celulasa y fosfatasa ácida, posiblemente a la productividad natural que sirve como fuente de sustrato orgánico.

En sistemas de cultivo de biofloc, Wang et al. (2016) evaluó las actividades enzimáticas de proteasas, lipasas y celulasas en el hepatopáncreas que fueron significativamente mayores al control (agua clara) a excepción de la amilasa (Xu y Pan, 2012), también evaluaron la actividad enzimática extracelular del biofloc mostrando diferencias en las actividades de amilasas y celulasas. En el camarón blanco la salinidad influye en la actividad de las enzimas digestivas, en baja salinidad la actividad de la tripsina aumenta posiblemente por la necesidad de energía extra del alimento para compensar la energía pérdida por la osmorregulación (Li et al., 2008). Por otra parte, Gao et al. (2016) reporta que los niveles de ARNm de quimotripsina y tripsina en salinidades menores a 10 ups se regularon negativamente. Moreno-Arias et al. (2017) en cultivo *BFT* en baja salinidad la actividad enzimática de tripsina, proteasa, amilasa y lipasa son mayores que el sistema de cultivo con recirculación en agua clara. En el presente estudio, la tripsina fue ligeramente superior en agua clara a 35 ups, por otra parte, el cultivo a 5 ups los niveles de expresión de tripsina dependieron de la dieta en el sistema de cultivo. Rungruangsak-Torrissen, Moss, Andresen, Berg, y Waagbø (2006) reporta un

crecimiento mas lento en las actividades de quimotripsina mas altas y menor proporción de T/Q, es decir, son indicadores biológicos confiables para comparar la calidad de la dieta, eficiencia digestiva y potencial tasa de crecimiento. En el presente estudio se puede observar que la expresión de la actividad de la tripsina (y proporción T/Q) en función del crecimiento es diferente según el sistema de cultivo (figura 4.8).

K. Chen et al. (2015) reportó que a baja salinidad uno de los principales procesos metabólicos implicados en la regulación osmótica es el metabolismo de lípidos. En el presente trabajo la actividad enzimática de la lipasa no presento diferencias significativas, únicamente en los efectos mayores con la proporción T/L (tabla 4.5).

En el cultivo de biofloc, Ray et al. (2010) determinó que una dieta a base de proteína vegetal es comparable a una dieta con harina de pescado, Moreno-Arias et al. (2017) presenta resultados similares en cultivos de baja salinidad, por otro lado, el reemplazo total de la harina de pescado (*HP*) no fue posible, Jatobá et al. (2017) determinó una sustitución del 33 % de *HP* por concentrado proteico de soya (con aceite de pescado) y Tesser, Cardozo, Camaño, y Wasielesky (2019) hasta un 75 % (con aceite de soya). En el presente trabajo las dietas experimentales sin harina de pescado no presentaron diferencias significativas en los diferentes cultivos y salinidades pero el cultivo de biofloc mejoró notablemente el crecimiento del *L. vannamei*.

## 4.5 Conclusión

En conclusión, el *L. vannamei* puede ser cultivado con dietas sin harina de pescado, independientemente del tipo de fuente de proteína, ya sea vegetal o animal terrestre. Se obtiene un mejor rendimiento productivo en organismos cultivados en biofloc en salinidades de 5 ups y 35 ups. El comportamiento de su actividad enzimática digestiva y su relación con el crecimiento esta influenciado principalmente por el sistema de cultivo y la salinidad. Sin embargo, se necesitan futuras investigaciones para mejorar el rendimiento productivo en una baja salinidad.

## Referencias

Adhikari, S., Chaurasia, V., Naqvi, A. A., y Pillai, B. (2007). Survival and growth



- of *Macrobrachium rosenbergii* (de man) juvenile in relation to calcium hardness and bicarbonate alkalinity. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7(1), 23–26.
- Araneda, M., Pérez, E. P., y Gasca-Leyva, E. (2008). White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight. *Aquaculture*, 283(1-4), 13–18.
- Boyd, C. A., Boyd, C. E., y Rouse, D. (2007). Potassium adsorption by bottom soils in ponds for inland culture of marine shrimp in alabama. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(1), 85–91.
- Boyd, C. E., D’Abramo, L. R., Glencross, B. D., Huyben, D. C., Juarez, L. M., Lockwood, G. S., ... others (2020). Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(3), 578–633.
- Boyd, C. E., y Tucker, C. S. (2014). Handbook for aquaculture water quality. *Handbook for Aquaculture Water Quality*, 439.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Bray, W., Lawrence, A., y Leung-Trujillo, J. (1994). The effect of salinity on growth and survival of penaeus vannamei, with observations on the interaction of ihhn virus and salinity. *Aquaculture*, 122(2-3), 133–146.
- Brown, J. H., Wickins, J. F., y MacLean, M. H. (1991). The effect of water hardness on growth and carapace mineralization of juvenile freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de man. *Aquaculture*, 95(3-4), 329–345.
- Chan-Vivas, E., Edén, M.-G., Maldonado, C., Escalante, K., Gaxiola, G., y Cuzon, G. (2019). Does biofloc improve the energy distribution and final muscle quality of shrimp, *litopenaeus vannamei* (boone, 1883)? *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(2), 460–468.
- Chen, J., y Cheng, S. (1995). Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Journal of Comparative Physiology B*, 164(7), 530–535.
- Chen, K., Li, E., Li, T., Xu, C., Wang, X., Lin, H., ... Chen, L. (2015). Transcriptome and molecular pathway analysis of the hepatopancreas in the pacific white shrimp *litopenaeus vannamei* under chronic low-salinity stress. *PLoS One*, 10(7), e0131503.
- Cheng, S.-Y., y Chen, J.-C. (1998). Effects of nitrite exposure on the hemolymph electrolyte, respiratory protein and free amino acid levels and water content of *penaeus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 44(1-2), 129–139.

- Cheng, S.-Y., y Chen, J.-C. (1999). Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology*, 45(1), 35–46.
- Davis, D. A., Boyd, C. E., Rouse, D. B., y Saoud, I. P. (2005). Effects of potassium, magnesium and age on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* post-larvae reared in inland low salinity well waters in west alabama. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(3), 416–419.
- DelMar, E., Largman, C., Brodrick, J., y Geokas, M. (1979). A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, 99(2), 316 - 320.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Miquelajauregui, M. M., y Gaxiola, G. (2013). Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *litopenaeus vannamei* (boone) reared under biofloc conditions. *Aquaculture international*, 21(5), 987–1007.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., y Cuzon, G. (2013). Biofloc technology (bft): a review for aquaculture application and animal food industry. *Biomass now-cultivation and utilization*, 301–328.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., y Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 271–278.
- Esparza-Leal, H. M., Ponce-Palafox, J. T., Cervantes-Cervantes, C. M., Valenzuela-Quiñónez, W., Luna-González, A., López-Álvarez, E. S., ... Gómez-Peraza, R. L. (2019). Effects of low salinity exposure on immunological, physiological and growth performance in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 50(3), 944–950.
- Esparza-Leal, H. M., Ponce-Palafox, J. T., Valenzuela-Quiñónez, W., Beltrán, H. C., y Figueroa, J. L. A. (2009). The effect of low salinity water with different ionic composition on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931) in intensive culture. *Journal of Applied Aquaculture*, 21(4), 215–227.
- Esparza-Leal, H. M., Xavier, J. A. A., y Wasielesky, W. (2016). Performance of *litopenaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks under biofloc conditions at different salinities and zero-water exchange. *Aquaculture international*, 24(5), 1435–1447.
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. la sostenibilidad en acción*. Food & Agriculture Org.
- Ferreira, G. S., Silva, V. F., Martins, M. A., da Silva, A. C. C. P., Machado, C., Seiffert, W. Q., y do Nascimento Vieira, F. (2020). Strategies for ammonium and nitrite control in *litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs. *Aquacultural*

*Engineering*, 88, 102040.

- Furtado, P. S., Poersch, L. H., y Wasielesky Jr, W. (2011). Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (bft) systems. *Aquaculture*, 321(1-2), 130–135.
- Furtado, P. S., Valenzuela, M. A., Rodriguez-Fuentes, G., Campos, B. R., Wasielesky Jr, W., y Gaxiola, G. (2016). Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *litopenaeus vannamei* in two salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49(3), 201–211.
- Gao, W., Tan, B., Mai, K., Chi, S., Liu, H., Dong, X., y Yang, Q. (2012). Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to long-term low salinity stress. *Aquaculture*, 364, 186–191.
- Gao, W., Tian, L., Huang, T., Yao, M., Hu, W., y Xu, Q. (2016). Effect of salinity on the growth performance, osmolarity and metabolism-related gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 4, 125–129.
- Ge, Q., Li, J., Wang, J., Li, Z., y Li, J. (2019). Characterization, functional analysis, and expression levels of three carbonic anhydrases in response to ph and saline-alkaline stresses in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Cell Stress and Chaperones*, 24(3), 503–515.
- Gjellesvik, D., Lombardo, D., y Walther, B. (1992). Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1124(2), 123–134.
- Grasshoff, K., Kremling, K., y Ehrhardt, M. (2009). *Methods of seawater analysis*. John Wiley & Sons.
- Gross, A., Abutbul, S., y Zilberg, D. (2004). Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35(3), 315–321.
- Gullian, M., Aramburu, C., Sanders, B., y Lope, R. (2010). Viability of culturing pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* in low-salinity groundwater from the yucatán peninsula (se, méxico). *Aquaculture*, 302(3-4), 202–207.
- Hopkins, J. S., Stokes, A. D., Browdy, C. L., y Sandifer, P. A. (1991). The relationship between feeding rate, paddlewheel aeration rate and expected dawn dissolved oxygen in intensive shrimp ponds. *Aquacultural Engineering*, 10(4), 281–290.
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., ... Struggnell (2019). The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3), 316–329.
- Jaffer, Y., Saraswathy, R., Ishfaq, M., Antony, J., Bundela, D., y Sharma, P. (2020). Effect of low salinity on the growth and survival of juvenile pacific white shrimp,

- Penaeus vannamei*: A revival. *Aquaculture*, 515, 734-761.
- Jatobá, A., Vieira, F. d. N., Silva, B. C. d., Soares, M., Mouriño, J. L. P., y Seiffert, W. Q. (2017). Replacement of fishmeal for soy protein concentrate in diets for juvenile *Litopenaeus vannamei* in biofloc-based rearing system. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(9), 705–713.
- Jensen, F. B. (1995). Uptake and effects of nitrite and nitrate in animals. *Nitrogen Metabolism and Excretion*. CRC Press, Boca Raton, 289–303.
- Laramore, S., Laramore, C. R., y Scarpa, J. (2001). Effect of low salinity on growth and survival of postlarvae and juvenile *litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(4), 385–392.
- Li, E., Arena, L., Lizama, G., Gaxiola, G., Cuzon, G., Rosas, C., . . . Van Wormhoudt, A. (2011). Glutamate dehydrogenase and na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> atpase expression and growth response of *litopenaeus vannamei* to different salinities and dietary protein levels. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(2), 343–349.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Chen, X., Yu, N., Lai, Q., y Qin, J. G. (2007). Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture*, 265(1-4), 385–390.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., y Qin, J. G. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274(1), 80–86.
- Li, E., Wang, X., Chen, K., Xu, C., Qin, J. G., y Chen, L. (2017). Physiological change and nutritional requirement of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1), 57–75.
- Lin, Y.-C., y Chen, J.-C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *litopenaeus vannamei* (boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224(1-4), 193–201.
- Llario, F., Falco, S., Sebastián-Frasquet, M.-T., Escrivá, J., Rodilla, M., y Poersch, L. H. (2019). The role of *Bacillus amyloliquefaciens* on *litopenaeus vannamei* during the maturation of a biofloc system. *Journal of Marine Science and Engineering*, 7(7), 228.
- Magaña-Gallegos, E., González-Zúñiga, R., Arevalo, M., Cuzon, G., Chan-Vivas, E., López-Aguilar, K., . . . Gaxiola, G. (2018). Biofloc and food contribution to growth and broodstock of *farfantepenaeus brasiliensis* (latreille, 1817) determined by stable isotopes and fatty acids. *Aquaculture Research*, 49(5), 1782–1794.
- Maicá, P. F., de Borba, M. R., y Wasielesky Jr, W. (2012). Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *litopenaeus vannamei* (boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. *Aquaculture*

- Research*, 43(3), 361–370.
- McGraw, W. J., y Scarpa, J. (2003). Minimum environmental potassium for survival of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (boone) in freshwater. *Journal of Shellfish Research*, 22(1), 263–268.
- McNevin, A. A., Boyd, C. E., Silapajarn, O., y Silapajarn, K. (2004). Ionic supplementation of pond waters for inland culture of marine shrimp. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35(4), 460–467.
- Moreno-Arias, A., López-Elías, J., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M., Martínez-Córdova, L., y Ramírez-Suárez, J. (2017). Replacement of fishmeal by vegetable meal mix in the diets of *litopenaeus vannamei* reared in low-salinity biofloc system: effect on digestive enzymatic activity. *Aquaculture Nutrition*, 23(2), 236–245.
- Moss, S., Divakaran, S., y Kim, B. (2001). Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (boone). *Aquaculture Research*, 32(2), 125–131.
- NRC. (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National academies press.
- Olsen, R. L., y Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 120–128.
- Perry, E., Velazquez-Oliman, G., Socki, R. A., Gómez-Pompa, A., Allen, M. F., Fedick, S. L., y Jiménez-Osornio, J. J. (2003). The lowland maya area: Three millennia at the human-wildland interface.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C. A., y Ross, L. G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *penaeus vannamei*, boone, 1931. *Aquaculture*, 157(1-2), 107–115.
- Ponce-Palafox, J. T., Pavia, Á. A., López, D. G. M., Arredondo-Figueroa, J. L., Lango-Reynoso, F., del Refugio Castañeda-Chávez, M., ... V, P.-G. (2019). Response surface analysis of temperature-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production. *Aquaculture*, 503, 312–321.
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., y Leffler, J. W. (2010). Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299(1-4), 89–98.
- Ray, A. J., y Lotz, J. M. (2017). Comparing salinities of 10, 20, and 30‰ in intensive, commercial-scale biofloc shrimp (*litopenaeus vannamei*) production systems. *Aquaculture*, 476, 29–36.
- Roy, L. A., Davis, D. A., Saoud, I. P., y Henry, R. P. (2007). Effects of varying

- levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth, and respiration of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture*, 262(2-4), 461–469.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L., Berg, A., y Waagbø, R. (2006). Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in atlantic salmon (*salmo salar* l.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(1), 7.
- Samocha, T. M., Hamper, L., Emberson, C. R., Davis, A. D., McIntosh, D., Lawrence, A. L., y Van Wyk, P. M. (2002). Review of some recent developments in sustainable shrimp farming practices in texas, arizona, and florida. *Journal of applied Aquaculture*, 12(1), 1–42.
- Samocha, T. M., Lawrence, A. L., Collins, C. A., Castille, F. L., Bray, W. A., Davies, C. J., ... Wood, G. F. (2004). Production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse-enclosed raceways using low salinity groundwater. *Journal of Applied Aquaculture*, 15(3-4), 1–19.
- Samocha, T. M., Lawrence, A. L., y Pooser, D. (1998). Growth and survival of juvenile penaeus vannamei in low salinity water in a semi-closed recirculating system. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, 50(2), 55–59.
- Stoessell, R., Ward, W., Ford, B., y Schuffert, J. (1989). Water chemistry and  $\text{CaCO}_3$  dissolution in the saline part of an open-flow mixing zone, coastal yucatan peninsula, mexico. *Geological Society of America Bulletin*, 101(2), 159–169.
- Strickland, J. D. H., y Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis.
- Tacon, A. G. (2020). Trends in global aquaculture and aquafeed production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1), 43–56.
- Tesser, M., Cardozo, A., Camaño, H., y Wasielesky, W. (2019). Replacement of fishmeal and fish oil with vegetable meal and oil in feedstuffs used in the growing phase of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, in biofloc systems. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(2), 703–710.
- Wang, C., Pan, L., Zhang, K., Xu, W., Zhao, D., y Mei, L. (2016). Effects of different carbon sources addition on nutrition composition and extracellular enzymes activity of bioflocs, and digestive enzymes activity and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-exchange culture tanks. *Aquaculture research*, 47(10), 3307–3318.
- Wei, J., Zhang, X., Yu, Y., Li, F., y Xiang, J. (2014). Rna-seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 11, 37–44.
- Xu, W.-J., y Pan, L.-Q. (2012). Effects of bioflocs on growth performance, digestive

- enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating c/n ratio in feed. *Aquaculture*, 356, 147–152.
- Yao, Z., Guo, W., Lai, Q., Shi, J., Zhou, K., Qi, H., . . . Wang, H. (2016). *Gymnocypris przewalskii* decreases cytosolic carbonic anhydrase expression to compensate for respiratory alkalosis and osmoregulation in the saline-alkaline lake qinghai. *Journal of Comparative Physiology B*, 186(1), 83–95.
- Zhang, P., Zhang, X., Li, J., y Gao, T. (2009). Effect of salinity on survival, growth, oxygen consumption and ammonia-n excretion of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture research*, 40(12), 1419–1427.
- Zhang, P., Zhang, X., Li, J., y Huang, G. (2006). The effects of body weight, temperature, salinity, ph, light intensity and feeding condition on lethal do levels of whiteleg shrimp, *litopenaeus vannamei* (boone, 1931). *Aquaculture*, 256(1-4), 579–587.

---

## Conclusiones generales

La evaluación de la digestibilidad *in vitro* determinó que las fuentes de proteína de origen animal terrestre presentan un grado de hidrólisis mayor a la harina de pescado, por lo tanto, estas fuentes de proteína son fácilmente hidrolizables por las enzimas digestivas del hepatopáncreas del camarón blanco *L. vannamei*. Por otra parte, las fuentes de proteína vegetales presentaron una hidrólisis más lenta y en menor medida que la harina de pescado.

Se determinó que la digestibilidad *in vivo* puede ser influenciado por la salinidad y su fuente de proteína. La digestibilidad aparente de materia seca en baja salinidad disminuyó dependiendo de la composición de la materia prima utilizada en la harina de carne y hueso. La digestibilidad aparente de proteína disminuyó en la pasta de soya en baja salinidad.

Se determinó que el cultivo en baja salinidad resultó en un menor crecimiento independientemente del sistema de cultivo y dieta experimental utilizada. Los organismos cultivados en el sistema de biofloc presentaron un mejor crecimiento, el *L. vannamei* logró aprovechar las dietas sin harina de pescado utilizando diferentes proporciones de proteína animal terrestre y vegetal. De acuerdo con los resultados presentados, una dieta con 35 % de proteína cruda y utilizando hasta un 70 % fuentes de proteína animal terrestre se pueden obtener resultados satisfactorios en los parámetros productivos. Por otra parte, el comportamiento de su actividad enzimática digestiva y su relación con el crecimiento esta influenciado principalmente por el sistema de cultivo y la salinidad. Sin embargo, no se observaron patrones claros dependiendo de su fuente de proteína.



---

---

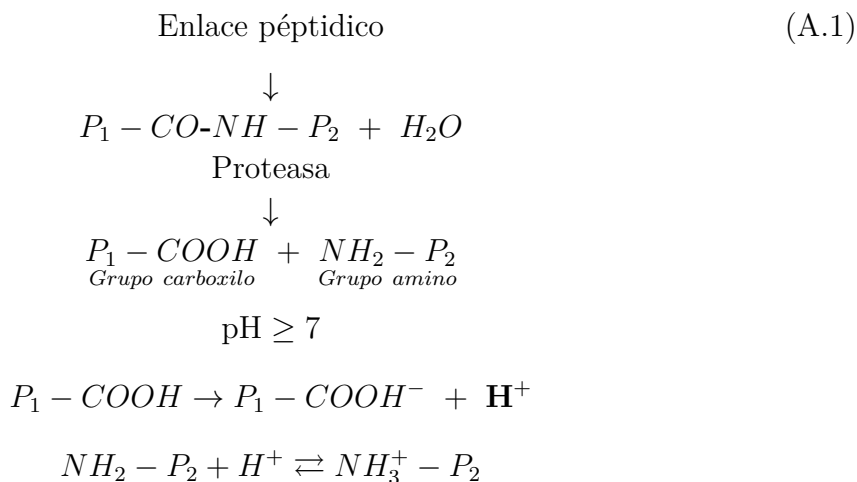
# APÉNDICE A

---

## pH-Stat

### A.0.1 Principios del método de pH-stat en las reacciones de hidrólisis proteica.

Durante la hidrólisis de un enlace peptídico, se produce un grupo carboxílico ( $-\text{CO}-\text{OH}$ ) junto con un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ), en el extremo C- y el extremo N- de los dos péptidos producidos, respectivamente. A pH neutro o básico, los grupos carboxílicos neoformados liberan su protón, que puede ser titulado por una solución básica (NaOH típicamente), esto se describe en la ecuación A.1.



Globalmente, se describe como el  $\mathbf{H}^+$  es liberado y éste puede ser titulado por NaOH.

## A.0.2 Descripción del modelo utilizado para la evaluación del *DH* proteica del *Litopenaeus vannamei*.

El modelo de regresión asintótica (Ver figura 2.1) es obtenido por:

$$y(x) = \phi_1 + (\phi_2 - \phi_1)\exp[\exp(\phi_3)x] \quad (\text{A.2})$$

Donde  $\phi_1$  es la asíntota de  $x \rightarrow \infty$ ,  $\phi_2$  es  $y(0)$  y el parámetro  $\phi_3$  es el logaritmo de la tasa constante. El tiempo medio correspondiente es  $t_{0,5} = \log 2 / \exp(\phi_3)$ . Debido a que  $\phi_1$  y  $\phi_2$  ocurren linealmente en la expresión del modelo, el ajuste de mínimos cuadrados iteran sobre un único parámetro.

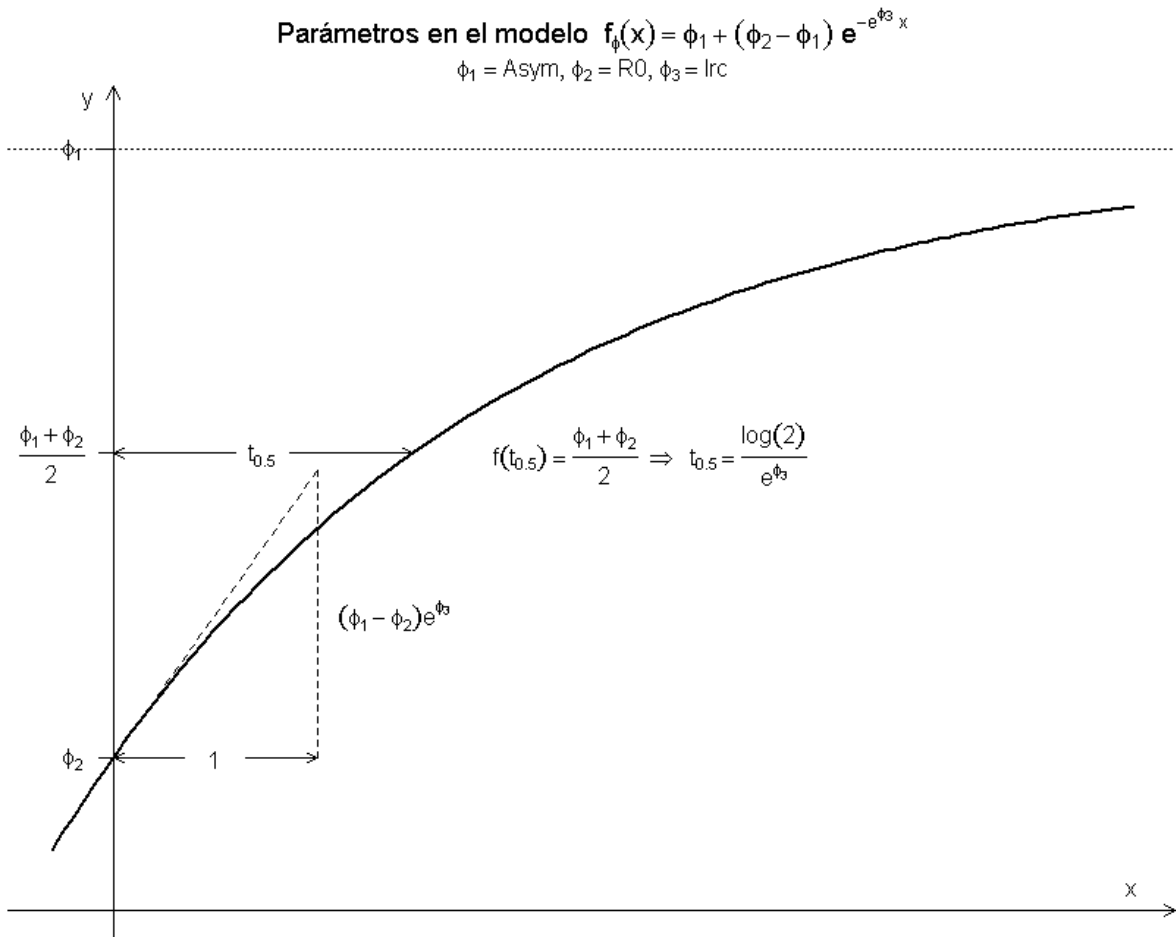
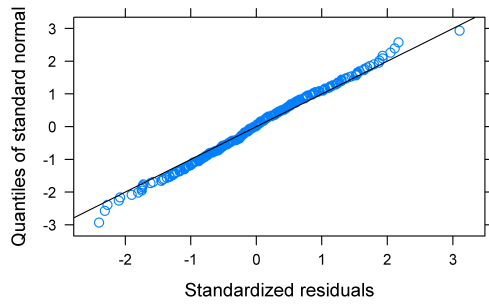
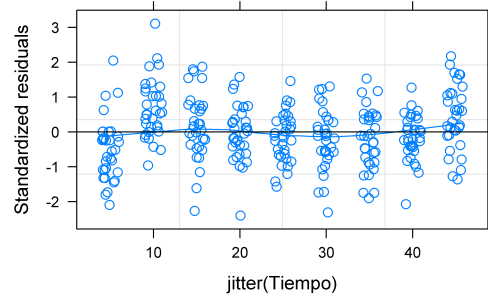


Figura A.1: Modelo de regresión asintótica donde se muestran los parámetros  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  cuando la respuesta en  $x = 0$  y  $t_{0,5}$ , como el tiempo de respuesta medio.

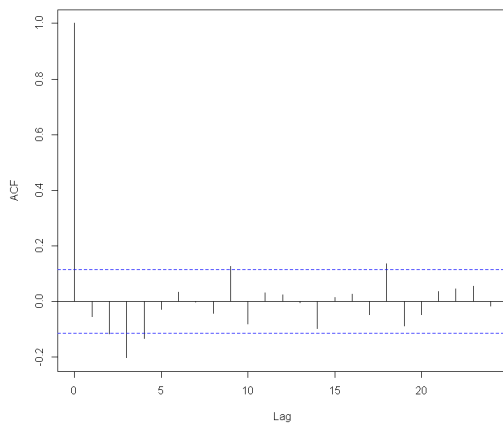
### A.0.3 Evaluación de residuales del modelo 2.3.



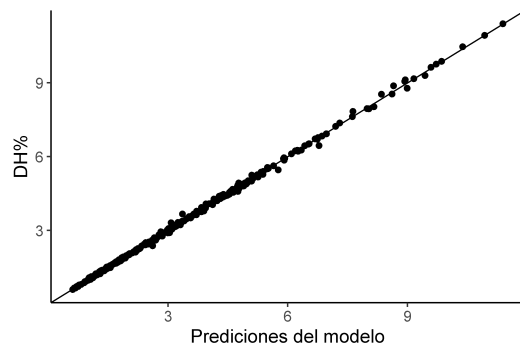
(a) Normal Q-Q



(b) Residuales vs. Tiempo



(c) Autocorrelación de residuales



(d) Valores predichos vs. Observados

Figura A.2: Evaluación de residuales para confirmar los supuestos de normalidad y homogeneidad del modelo 2.3

---

---

## APÉNDICE B

---

### Análisis digestibilidad *in vivo*

#### B.0.1 Evaluación de residuales de modelo 3.1 de digestibilidad *in vivo*.

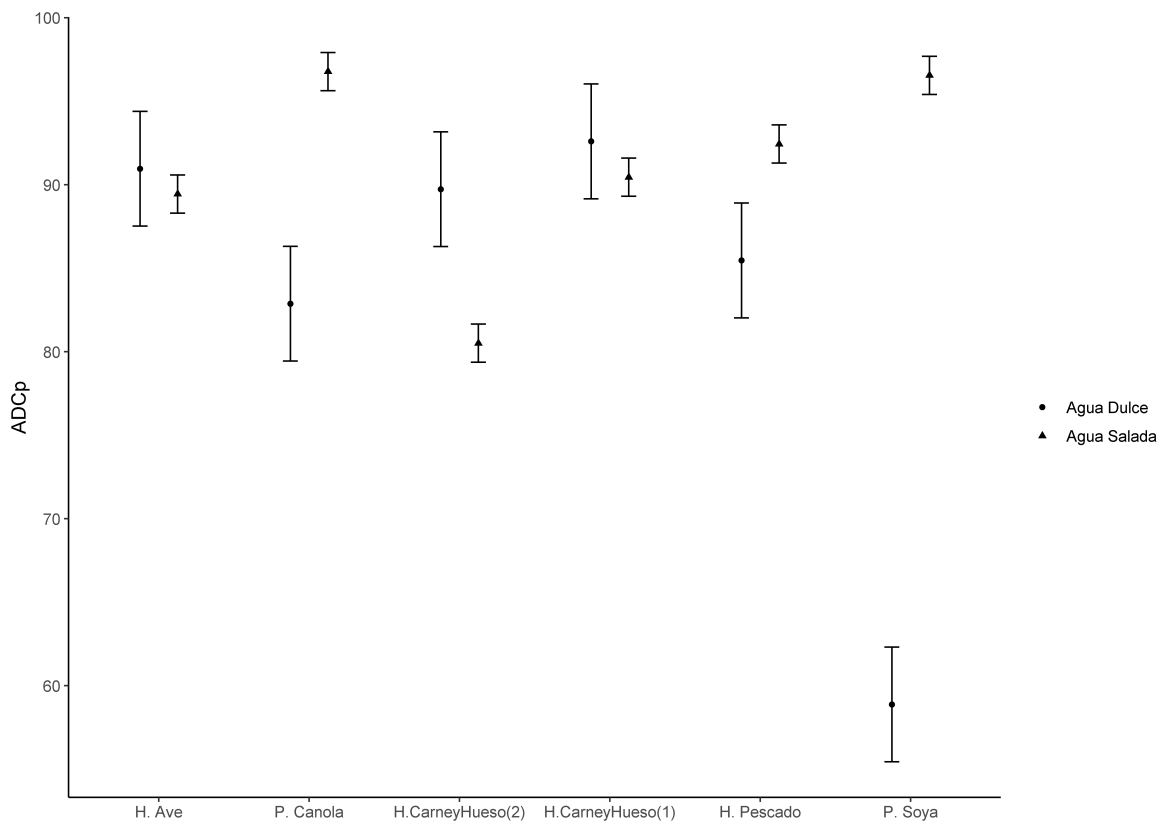
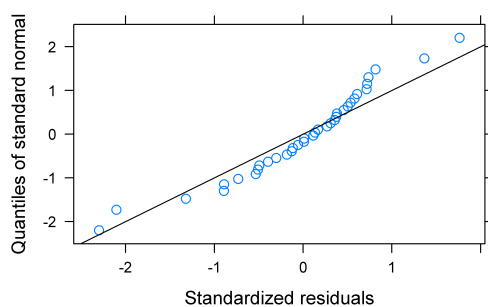
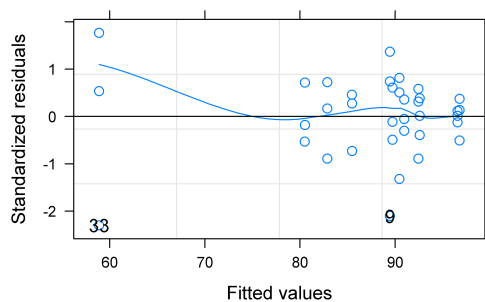


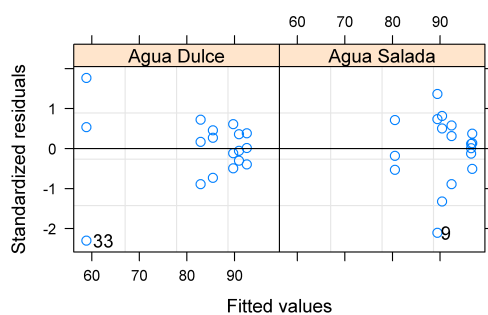
Figura B.1: Digestibilidad aparente de proteína de ingredientes para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Valores presentados en la tabla 3.4.



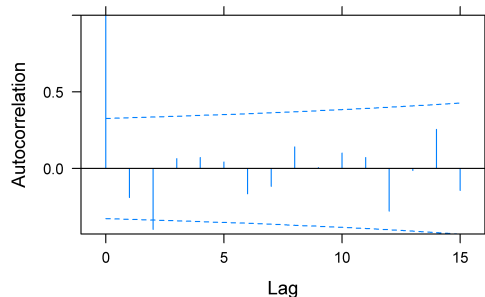
(a) Normal Q-Q.



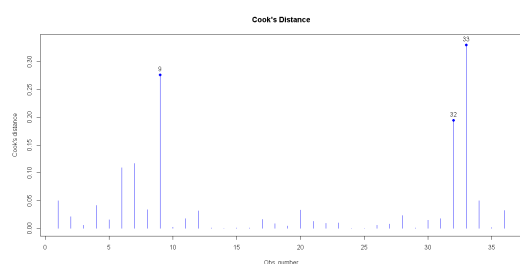
(b) Residuales vs. ajustados.



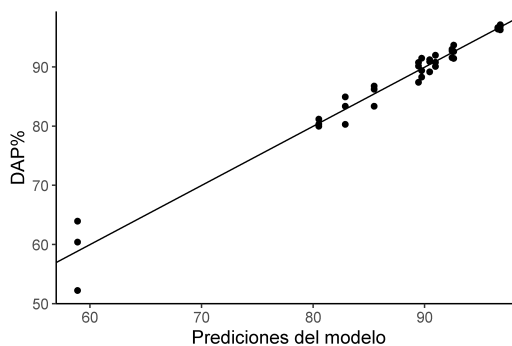
(c) Residuales vs Salinidad.



(d) Auto correlación de residuales.



(e) Distancia de Cook.



(f) Valores ajustados vs observados.

Figura B.2: Evaluación de residuales para confirmar los supuestos de normalidad y homogeneidad del modelo 3.1 para digestibilidad de proteína.

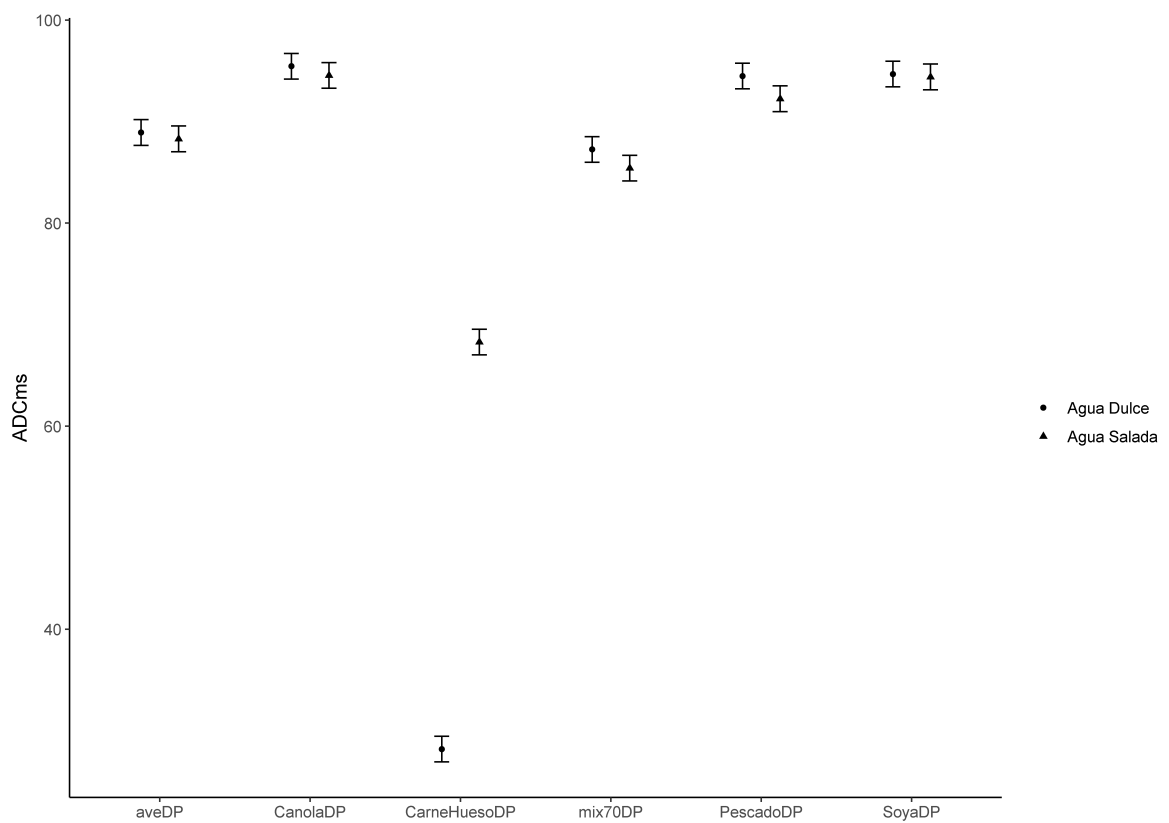
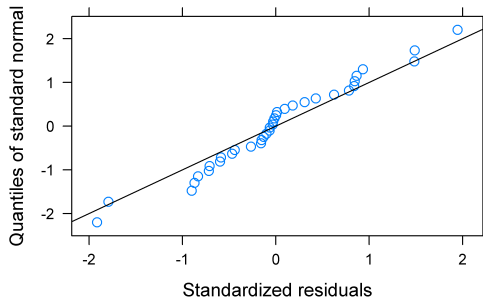
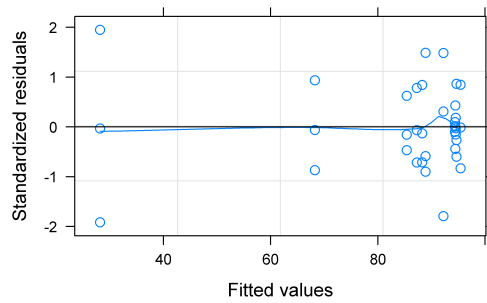


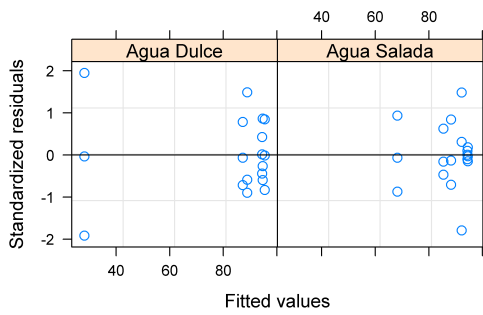
Figura B.3: Digestibilidad aparente de materia seca de ingredientes para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Valores presentados en la tabla 3.3.



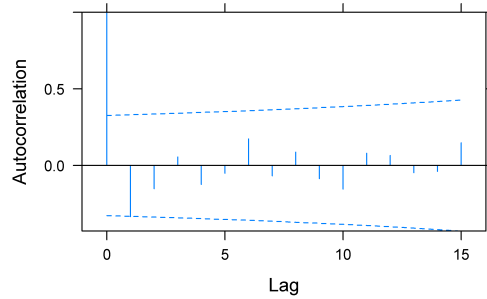
(a) Normal Q-Q.



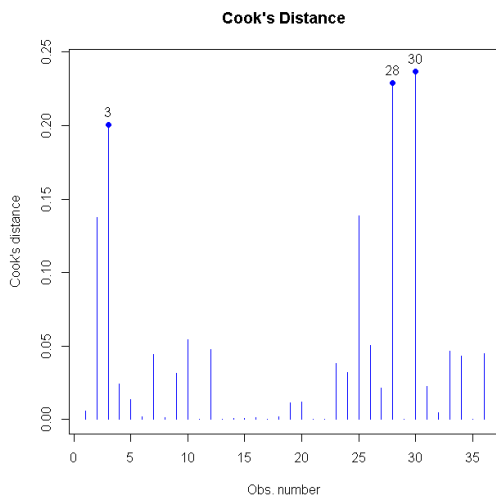
(b) Residuales vs. ajustados.



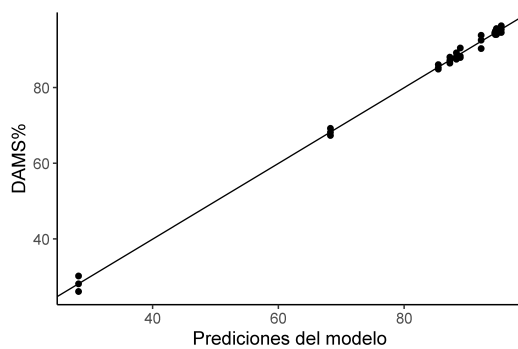
(c) Residuales vs Salinidad.



(d) Auto correlación de residuales.



(e) Distancia de Cook.



(f) Valores ajustados vs observados.

Figura B.4: Evaluación de residuales para confirmar los supuestos de normalidad y homogeneidad del modelo 3.1 para digestibilidad de materia seca.

---

---

# APÉNDICE C

---

## Modelos Lineales Mixtos

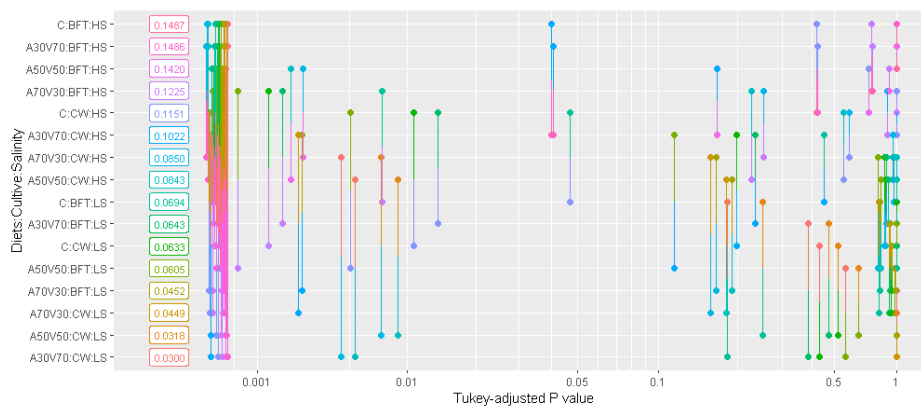
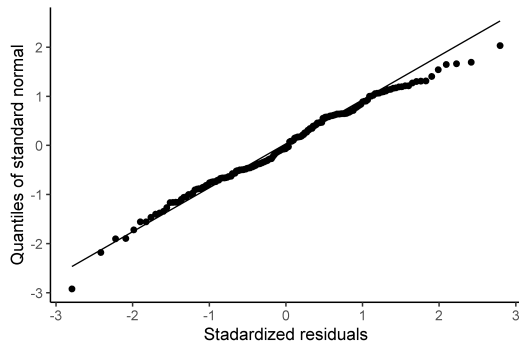
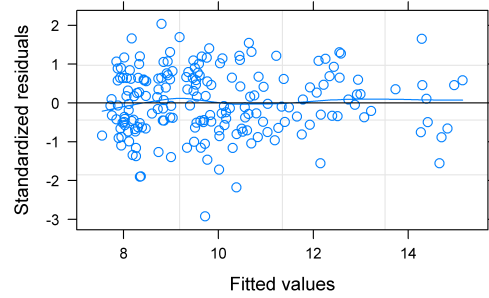


Figura C.1: Tukey modelo de crecimiento del *Litopenaeus vannamei*.

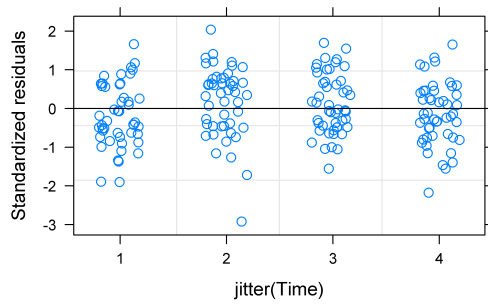




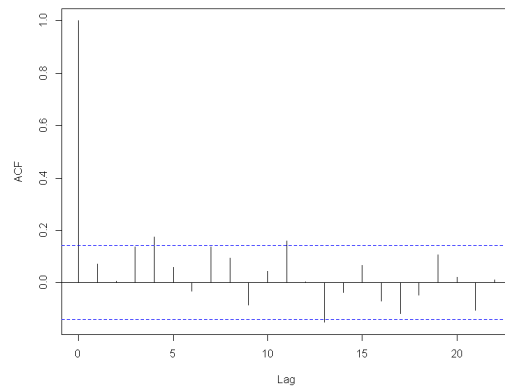
(a) Normal Q-Q.



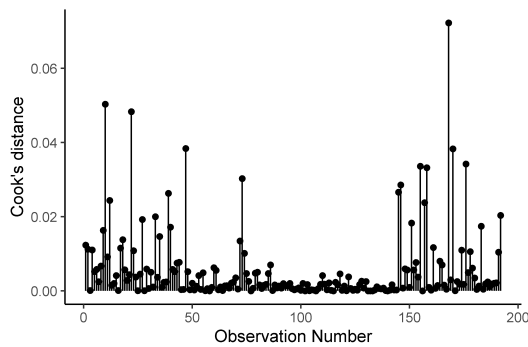
(b) Residuales vs. ajustados.



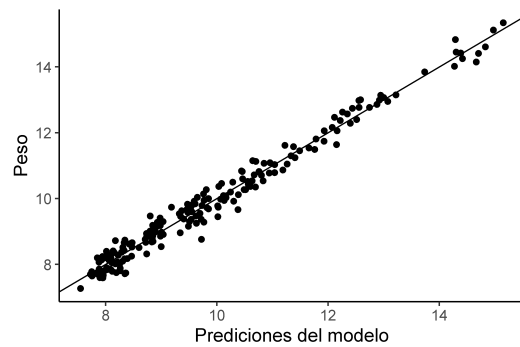
(c) Residuales vs Tiempo.



(d) Auto correlación de residuales.



(e) Distancia de Cook.



(f) Valores ajustados vs observados.

Figura C.2: Evaluación de residuales para confirmar los supuestos de normalidad y homogeneidad del modelo de crecimiento del *Litopenaeus vannamei*.

---

# Curriculum vitae

Alvaro Fabricio Barreto Altamirano, es ingeniero acuícola, graduado de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua en 2011. Realizó su maestría en la Universidad Nacional Autónoma de México, en la unidad multidisciplinaria de docencia e investigación campus Sisal durante enero de 2014 a diciembre 2015. Cuenta con experiencia docente en áreas de acuicultura en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua y en manejo de reproductores de camarones. Participación en proyectos de cambios en la composición y de la cobertura de los bosques de manglares y su biodiversidad. Ha participado en diferentes simposios internacionales de nutrición acuícola, realizado ponencia en congresos nacionales, las principales temáticas abordadas son las fuentes de proteínas alternativas a la harina pescado en peces y camarones, y tecnología de biofloc.