

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., ubicado a 17 Km. de la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México. Se realizaron dos experimentos en los que se evaluaron tres dietas; el primero de ellos bajo condiciones de cultivo controlado en laboratorio (experimento 1), mientras que el segundo se llevó a cabo en condiciones de cultivo semi-intensivo en estanques supralitorales (experimento 2). Lo anterior con el fin de evaluar las dietas experimentales en ambos sistemas de cultivo.

III.1. Dietas experimentales.

Se evaluaron tres dietas isoprotéicas (38% de proteína cruda): una dieta control (sin langostilla) y dos donde se sustituyó el 20 y el 40% de la proteína aportada por la harina de pescado con proteína de harina de langostilla (Tabla VI).

TABLA VI. Dietas utilizadas en los experimentos de laboratorio para *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris* y de estanquería supralitoral para *L. stylirostris*.

DIETA 38% PROTEÍNA	CARACTERISTICAS
CONTROL	Sin harina de langostilla
20% SUS	20% de sustitución de proteína de pescado por proteína de langostilla en la dieta
40% SUS	40% de sustitución de proteína de pescado por proteína de langostilla en la dieta

III.1.1. Composición y elaboración de las dietas experimentales.

Las dietas experimentales se formularon utilizando el programa de computadora MIXIT2. Los ingredientes utilizados en su elaboración fueron: harinas de pescado, langostilla, calamar y trigo; pasta de soya, grenetina, aceite de pescado, lecitina de soya, pre-mezclas de vitaminas y minerales (Tabla VII).

TABLA VII. Composición de las dietas experimentales utilizadas en los experimentos en laboratorio y estanquería supralitoral (base seca).

INGREDIENTE	DIETAS (38% Proteína)		
	CONTROL	20% sustitución de harina de langostilla	40% sustitución de harina de langostilla
Harina de pescado ¹	25.6	20.5	15.4
Harina de langostilla ²	0.0	8.2	16.4
Pasta de soya	25.0	25.0	25.0
Harina de calamar	5.0	5.0	5.0
Harina de trigo	35.4	32.3	29.0
Grenetina	4.0	4.0	4.0
Aceite de pescado ³	1.00	1.00	1.20
Lecitina de soya	1.00	1.00	1.00
Vitaminas ⁴	0.37	0.37	0.37
Vitamina C ⁵	0.09	0.09	0.09
Minerales ⁶	2.50	2.50	2.50
Cloruro de Colina 62%	0.06	0.06	0.06
TOTAL (g)	100.0	100.0	100.0

1. Harina de sardina SC-02 1098. El nivel de inclusión en la dieta disminuye conforme aumenta el nivel de sustitución de la harina de langostilla.
2. Harina de langostilla procesada a nivel industrial (HL0498-L7) en la Planta Harinera de la Conservadora San Carlos. B.C.S.
3. Aceite de sardina (PIASA)
4. Premezcla de vitaminas (PIASA) 1098-S
5. Vitamina C con 35% de agente activo.
6. Premezcla de minerales (PIASA) 1098-S

Las dietas se elaboraron en la planta de alimentos experimentales del CIBNOR, siguiendo el proceso ilustrado en la figura 2.

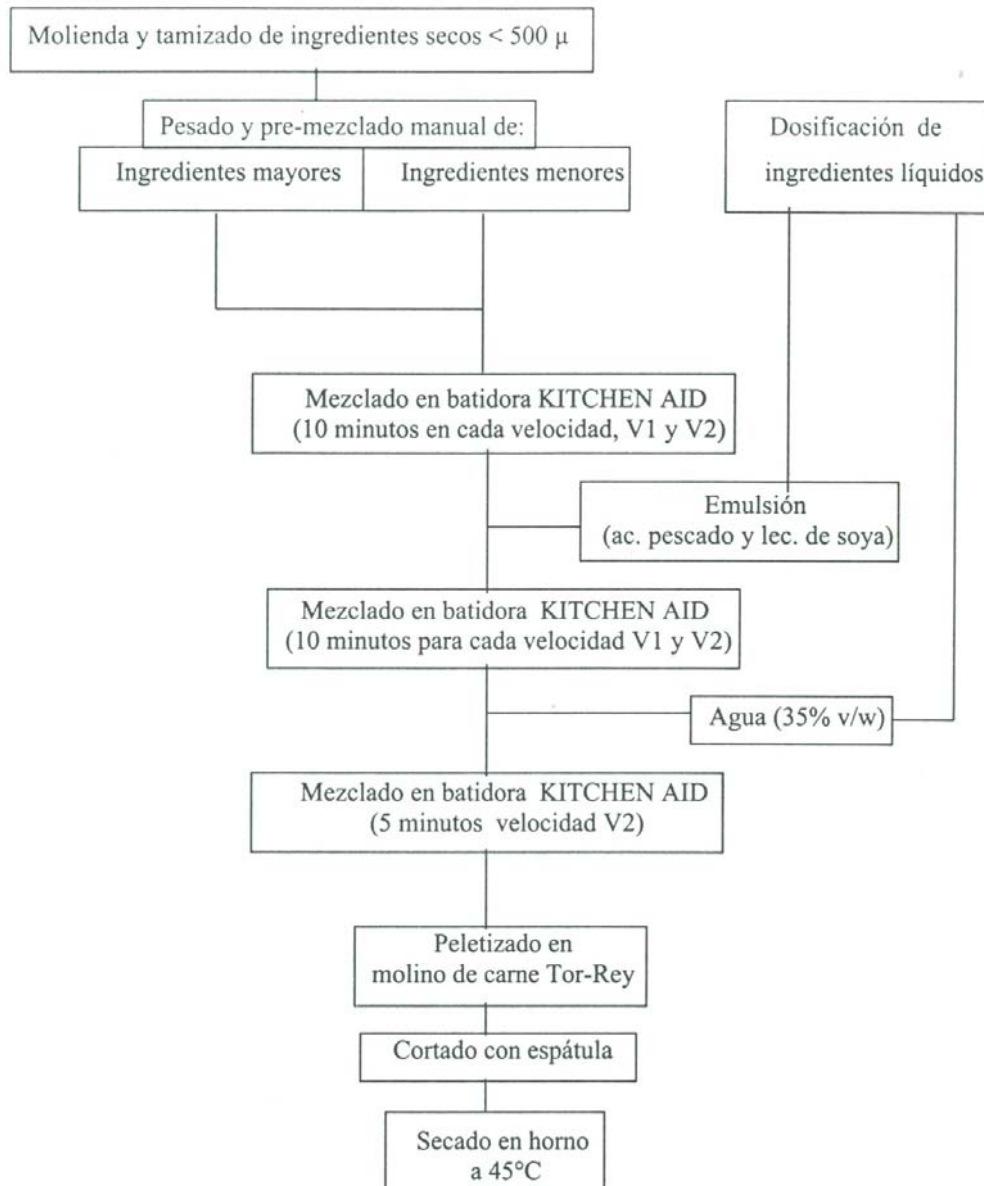


FIGURA 2. Diagrama de flujo de la elaboración de las dietas experimentales.

Todos los ingredientes se molieron y se tamizaron hasta obtener el tamaño de partícula deseado ($<500\mu$). Los ingredientes se mezclaron manualmente uno a uno por separado, se formaron dos lotes, uno para los ingredientes mayores (harina de pescado, langostilla, trigo integral y calamar; pasta de soya y grenetina) y otro para los menores (pre-mezcla de vitaminas y minerales; cloruro de colina y vitamina C). Posteriormente se homogeneizaron en una mezcladora (KITCHEN AID^{MR}); se les adicionó una emulsión de aceite de pescado y lecitina de soya. A la mezcla resultante se le agregó agua (35% con respecto al peso de la mezcla, aproximadamente) y se continuó mezclando hasta obtener una pasta homogénea, la cual se pasó tres veces por un molino de carne TOR-REY^{MR} mod. 22 con un dado de $\frac{1}{8}$ " de diámetro (tamaño de orificio). La primera vez se hizo rápidamente tratando de que la masa se homogenizara más en el molino y activar el proceso de gelatinización de la grenetina; la segunda vez se realizó más lento para que se gelatinizara y la tercera se pasó un poco más lento para permitir la completa gelatinización y ligamiento del alimento. Los fideos resultantes se cortaron para obtener "pellets" del tamaño deseado para posteriormente se secaron en un horno eléctrico (HAFO 1600 series) a 45°C durante 12 horas, aproximadamente, hasta obtener una humedad inferior al 11%.

III.1.2. Análisis químico y mecánico: A los ingredientes utilizados en la fabricación de las dietas experimentales, así como a las mismas dietas, una vez elaboradas, se les realizó un análisis proximal en los laboratorios de Nutrición Acuícola del CIBNOR para conocer su contenido en proteína (micro Kjeldahl), grasa (Soxhlet), humedad (horno a 70°C durante 24 hrs); fibra cruda (hidrólisis ácido-básica) y ceniza cruda (mufla a 550°C durante 24 hrs). Según los métodos de la A.O.A.C. (1995) (Tablas VIII y IX). Además, se determinó el grado de lixiviación del alimento elaborado mediante una prueba mecánica donde el alimento fue sumergido en agua agitando periódicamente (cada 15 minutos) hasta observar un desmoronamiento total del alimento (Akiyama y Chwang, 1989; Zendejas, 1991; Subramanyam, 1994).

TABLA VIII. Composición química proximal de los ingredientes utilizados en la fabricación de las dietas experimentales (base seca).

INGREDIENTE	NUTRIENTE			
	PROTEÍNA	LÍPIDOS	HUMEDAD	CENIZA
Harina de pescado	61.24 ± 0.176	14.58 ± 0.156	3.71 ± 0.158	17.81 ± 0.21
Harina de calamar	79.38 ± 0.33	8.37 ± 0.348	14.44 ± 0.124	7.34 ± 2.5
Harina de langostilla	38.15 ± 0.35	15.46 ± 0.12	10.05 ± 0.23	33.12 ± 0.16
Pasta de soya	46.10 ± 0.254	8.52 ± 0.185	6.61 ± 0.097	7.91 ± 0.231
Harina de trigo Integral	13.62 ± 0.495	6.11 ± 0.288	7.33 ± 0.113	2.22 ± 0.047
Grenetina	99.30 ± 2.11	4.59 ± 0.585	5.12 ± 0.274	4.15 ± 0.07

Valores promedio de 3 réplicas ± Desviación estandar

TABLA IX. Composición química proximal de las dietas experimentales (base seca).

NUTRIENTE	CONTROL	20% SUS	40% SUS
PROTEÍNA	37.14 ± 0.09	37.93 ± 0.36	37.14 ± 0.76
LÍPIDOS	8.74 ± 0.03	8.21 ± 0.002	8.05 ± 0.01
FIBRA	1.46 ± 0.10	2.44 ± 0.18	3.41 ± 0.21
CENIZAS	11.43 ± 0.71	13.33 ± 0.32	14.87 ± 0.71
HUMEDAD	10.95 ± 0.141	9.99 ± 0.377	10.21 ± 0.165
ENERGÍA (cal/g)	4600.57	4465.72	4342.32
E-L-N ⁻¹	41.23	38.09	36.53

Valores promedio de 3 réplicas ± Desviación estandar

1. Energía bruta (cálculos teóricos)

2. Extracto Libre de Nitrógeno (100 - valores de proteína + lípidos + fibra + ceniza)



EL SABER DE MIS
HAY MEJORANDO
BIBLIOTECA
FACULTAD DE PESQUERÍA

III.2. EXPERIMENTO 1. Condiciones de laboratorio.

III.2.1. Sistema de cultivo. El experimento 1 se llevó a cabo en el laboratorio de cultivos marinos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). El sistema de cultivo consistió de 24 acuarios (cajas de plástico), 26.5 X 54.5 X 73.5 cm. con una capacidad 30 l/acuario, aproximadamente (Figura 3). El agua se bombeó desde el mar pasando a través de un sistema de filtros de arena y de cartucho de 5 μ . El sistema funcionó con recambios de agua, manual, del 50% diario. Se colocó un calentador sumergible de 250 watts (EBO-JAGER) en cada acuario, a fin de mantener la temperatura constante ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Se mantuvo un fotoperíodo natural con 14 horas de luz (5:30 a 19:30 horas) y 10 horas de oscuridad (19:30 a 5:30 horas).



FIGURA 3. Sistema de cultivo en condiciones de laboratorio utilizado para la evaluación de dietas con langostilla para *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei*.

III.2.2. Organismos experimentales: Se trabajó con juveniles de dos especies de camarones peneidos. Los juveniles de camarón azul, *L. stylirostris*, fueron donados por la empresa Acuacultores de la Península, S.A. (APSA); mientras que los juveniles de camarón blanco, *L. vannamei*, se obtuvieron del laboratorio de cultivos marinos del CIBNOR.

Se utilizaron organismos de ambas especies con un peso promedio de $35\text{mg} \pm 5\text{mg}$. El peso se seleccionó con base en la disponibilidad de camarones, azul y blanco y lo más cercano a los pesos utilizados para el experimento 2 ($28\text{mg} \pm 5\text{mg}$), para poder comparar los resultados.

III.2.3. Diseño experimental: Se probaron tres dietas experimentales con cuatro repeticiones cada una, donde se evaluó la sustitución de proteína de harina de pescado por proteína de harina de langostilla en dietas para camarones juveniles de *Litopenaeus stylirostris* y *Litopenaeus vannamei*, bajo condiciones de cultivo intensivo en laboratorio.

El experimento tuvo una duración de 45 días, (Noviembre-Diciembre) período suficiente para encontrar una respuesta significativa hacia los tratamientos experimentales, los camarones seleccionados se distribuyeron en los 24 acuarios aleatoriamente con una densidad de 12 organismos por acuario (2.5 org/lt).

La frecuencia de alimentación fue de tres veces al día; 10:00, 15:00 y 20:00 horas. La cantidad de alimento inicial fue del 20% de la biomasa total promedio de los organismos en cada acuario, la cual se ajustó posteriormente de acuerdo con la demanda de los organismos, pero tratando de que esta alimentación fuera a saciedad (*ad libitum*).

Se realizaron biometrías (peso) de los organismos cada 15 días, al inicio, dos intermedias y al final del experimento. Todos los organismos se contaron y pesaron tratando de eliminar, lo mejor posible, el exceso de agua de sus cuerpos por medio de toallas de papel absorbente.

Se llevó a cabo un monitoreo diario de los parámetros fisicoquímicos. Salinidad y temperatura por medio de un salinómetro YSI modelo 33, oxígeno disuelto utilizando un oxímetro YSI modelo 57. Además, diariamente se determinó la sobrevivencia mediante el conteo de los organismos y número de mudas. Se hizo una estimación del alimento consumido aparente, así como una limpieza de los acuarios, sifoneando el excedente de alimento y las

heces de los organismos. Estas operaciones se realizaron por la mañana (9:00 horas) antes de la primera alimentación de los camarones.

III.2.4. Criterios de evaluación biológica: Se utilizaron los siguientes criterios para la evaluación biológica de los organismos expuestos a los tratamientos en ambos experimentos.

- Porcentaje de sobrevivencia (S): Es el porcentaje de organismos vivos durante el tiempo de experimentación.

$$S = (N_i / N_f) \times 100$$

Donde: N_f, número final de organismos.
N_i, número inicial de organismos.

- Tasa de Crecimiento Específico (TCE): La tasa de crecimiento de un animal es un índice sensitivo a la calidad de proteína, denota el crecimiento promedio por día en términos de porcentaje y supone que el incremento en peso se da en forma exponencial (Hopkins, 1992).

$$TCE = (\ln P_f - \ln P_i / t) \times 100$$

Donde: ln, logaritmo natural.
P_f, peso final del organismo.
P_i, peso inicial del organismo.
t ; tiempo

- Tasa de Crecimiento Absoluto (TCA): Es el crecimiento en peso por unidad de tiempo (Hopkins, 1992).

$$TCA = (P_f - P_i / t) \times 100$$

Donde: P_f, peso final del organismo.
P_i, peso inicial del organismo.
t ; tiempo

- Factor de conversión alimenticia aparente (FCA): Es la cantidad de alimento (gramos) necesaria para que el camarón aumente un gramo en peso. Este factor se corrige en función de la mortalidad, de acuerdo a Kitabayashi, *et al.* (1971).

$$FCA = \frac{\text{Alimento total consumido}}{\text{Peso final total} + \frac{1}{2} (\text{peso promedio final} + \text{peso promedio inicial}) (\text{número de muertos}) - \text{peso inicial total}}$$

- Biomasa: En términos acuaculturales es el peso total de los organismos cosechados por acuario.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a pruebas estadísticas utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS V.5.1 (1991). Se usó estadística descriptiva, análisis de varianza de una sola vía (ANDEVA) de Fisher ($\alpha = 0.05$) y la prueba *a posteriori* de rangos múltiples de mínima diferencia significativa (MDS) (Daniel, 1987; Snedecor y Cochran, 1995).

III.3. EXPERIMENTO 2. Estanquería supralitoral.

III.3.1. Sistema de cultivo: Se encuentra localizado dentro de las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Se usaron 12 estanques supralitorales de forma trapezoidal invertida en un corte transversal y con un espejo de agua rectangular con dimensiones de 6m X 16m X 2m., 200m³ aproximadamente (máxima capacidad), nivel de 1.5m y un desagüe central de 4" y 6" dependiendo del estanque, ya que dichos estanques fueron construidos en tiempos diferentes. Todos los estanques están recubiertos con manta-vinil, de color gris fabricada con polivinilo de alta densidad con doble membrana y fibra interna entrecruzada con espesor de 0.5mm (Aramburu, 1997) (Figura 4).



FIGURA 4. Vista panorámica de los estanques supralitorales utilizados en la evaluación de dietas con langostilla para el camarón azul, *Litopenaeus stylirostris*.

El control del nivel de agua se mantuvo por medio de tubos de 4" de diámetro y 50 cm. de longitud formando una "T", cuyos extremos estaban cubiertos con malla mosquitero con luz de malla de 2mm para evitar la fuga de organismos. Estos tubos se conectaban unos con otros mediante coples de 4" de diámetro, a excepción del extremo del tubo que se conectó con el desagüe central del estanque. El agua se obtuvo de un canal central de abastecimiento, el cual es llenado con agua de mar por medio de dos bombas centrífugas de succión con motor de 10 HP (1700rpm) y salida de 4" cada una. Los recambios de agua en los estanques fueron desde 10% hasta un máximo de 50% diario (particularmente los días de las mediciones biométricas donde se bajaba el nivel de agua), basándose para ello en los niveles de oxígeno y de microalgas presentes en cada uno de los estanques. Se mantuvo una aireación continua en cada estanque por medio de un soplador (blower) ROFMAN^{MR} de 6 HP el cual abasteció de aire a todos los estanques mediante mangueras de ½". Una manguera se conectaba al tubo nivelador, arriba mencionado, en su parte media para producir un efecto difusor del aire. La segunda manguera tenía en la punta una pieza cilíndrica de PVC rellena con cemento y estaba colocada en la punta la cual sirvió como muerto y como difusor (Figura 5).

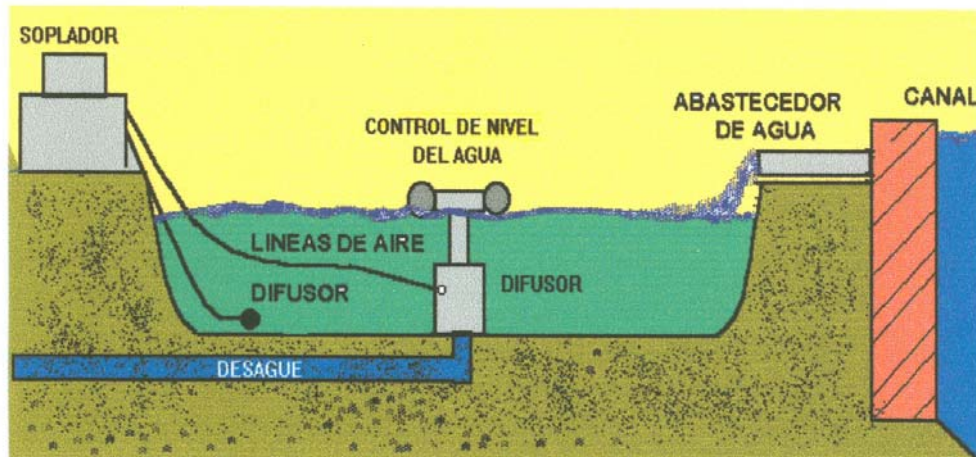


FIGURA 5. Esquema lateral de los estanques supralitorales de cultivo utilizados en el experimento de dietas con harina de langostilla para el camarón azul, *Litopenaeus stylirostris*.

III.3.2. Organismos experimentales: Se utilizaron juveniles de camarón azul *L. stylirostris*, donados por la empresa Acuacultores de la Península, S.A., con peso promedio de $28\text{mg} \pm 5\text{mg}$.

III.3.3. Diseño experimental: En este sistema de cultivo semi-intensivo en estanquería supralitoral, se aplicaron los mismos tratamientos y repeticiones que en el experimento 1 durante 60 días, del 19 de Octubre al 17 de Diciembre de 1998.

III.3.3.1. Fertilización de los estanques: Una vez que los estanques alcanzaron un nivel de agua de 50 cm cada estanque fue fertilizado con urea (500 g) y fosfato (166 g) a razón de 3:1 (Nitrógeno-Fósforo), la fertilización se aplicó con una semana de antelación con la finalidad de originar la producción de microalgas en los estanques. Durante el experimento se llevó a cabo una segunda fertilización guardando las mismas proporciones, pero solo en aquellos estanques, donde la población de microalga bajaba considerablemente.

III.3.3.2. Siembra de los camarones en los estanques: Se seleccionaron 9600 juveniles de camarón azul que, una vez fertilizados los estanques, fueron sembrados, previa aclimatación durante hora y media, en donde se igualaron las condiciones fisicoquímicas del agua (principalmente salinidad y temperatura) presentes en los contenedores que transportaron a los organismos con las condiciones del agua en los estanques. La densidad de siembra fue de 800 org. por estanque ($8\text{org}/\text{m}^2$).

III.3.3.3. Monitoreo del crecimiento: Se realizaron mediciones biométricas cada quince días donde se pesaron los organismos a la vez que se observaba su estado físico general. Los organismos colectados fueron regresados a sus respectivos estanques una vez concluída la biometría. Además, se realizaron muestreos poblacionales cada 30 días para estimar la sobrevivencia y biomasa aproximada de los camarones en los estanques, para lo cual se bajó el nivel de agua hasta 50 cm aproximadamente, y se utilizó una atarraya con un diámetro de 2.18 m. realizando 11 lances por estanque, los organismos colectados se revisaron y contaron uno a uno para posteriores estimaciones de biomasa y sobrevivencia (FAMAC, 1997).

III.3.3.4. Alimentación: La alimentación inicial fue del 20% de la biomasa total en cada estanque con una frecuencia de tres veces al día (9:00, 14:00 y 20:00 horas); se ajustó la cantidad de alimento de acuerdo con la demanda de los organismos, por medio del uso de

charolas de alimentación, una por cada estanque. Se trató siempre de que la alimentación en los estanques fuera *ad libitum*. Durante los primeros días del experimento el alimento se suministró por boleo manual, procurando que se distribuyera por todo el estanque, debido a que el tamaño de partícula del alimento (Tabla X), traspasaba la malla de la charola de alimentación y eso dificultaba la estimación del consumo del mismo.

TABLA X. Tamaño de partícula y forma de alimentación según el peso del camarón azul, *Litopenaeus stylirostris*, cultivado en estanquería supralitoral.

PESO DEL ORGANISMO	TAMAÑO DE PARTÍCULA	FORMA DE ALIMENTACIÓN	NIVEL DE PROTEÍNA (%)
< 100 mg	Partícula fina (0.4 - 0.8mm)	Boleo	38%
100 a 500 mg	Partícula media (1 - 2mm)	Boleo	38%
0.5 a 1 g	Partícula grande (3 - 4 mm)	Charola	38%
1 a 2.5 g	Pellet (> 5 mm)	Charola	38%

III.3.3.5. Operaciones de rutina: En los estanques se llevó a cabo un monitoreo diario (8:30 y 19:30 hrs) de parámetros fisicoquímicos tales como salinidad y temperatura mediante el uso de un salinómetro YSI Modelo 33, oxígeno por medio de un oxímetro YSI Modelo 57, pH con un potenciómetro de bolsillo HACH y turbidez utilizando un disco de sechii. Además de un conteo de microalgas cada tercer día, que se llevó a cabo mediante la observación al microscopio de las células por medio de un hematocitómetro (1mm²), los conteos se realizaron por cuadruplicado, (¹Arredondo, 1998 com.pers.).

La limpieza superficial de los estanques se realizó mediante el uso de una red de alberca para desechar los restos de materia en suspensión, vegetación y cualquier otro objeto que cayera al estanque. Al mismo tiempo que se realizaron las biometrías y dado que el nivel del agua en los estanques disminuía, se limpió el fondo del estanque de flora y fauna de compañamiento sedentaria tal como macroalgas e hidrozoarios en los estanques que las presentaban.

¹Dra. Bertha Arredondo. Biología Experimental. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. A.P. 19-B, La Paz, B.C.S. México. 23000

III.3.4. Criterios de evaluación biológica: Se utilizaron los siguientes criterios para la evaluación biológica de los organismos de cada tratamiento experimental.

- Porcentaje de sobrevivencia (S)
- Tasa de Crecimiento Absoluto (TCA).
- Tasa de Crecimiento Específico (TCE)
- Factor de Conversión Alimenticia (FCA):

$$FCA = \frac{\text{Alimento consumido}}{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}$$

- Biomasa

La población se estimó por medio de los criterios expuestos por FAMAC (1997), los cuales son:

- Número promedio de animales (NPACA)

$$NPACA = NCA / NA$$

Donde: NCA, número de animales colectados

NA, número de lances con la atarraya

- Factor de Eficiencia de la Atarraya (FEA): es equivalente al área que cubre la atarraya en un lance multiplicado por la calificación del atarrayador.

$$FEA = A(CA)$$

Donde: A, área de la atarraya

CA, calificación de atarrayador (%)

- Calificación del atarrayador (CA): Se calcula tirando la atarraya en tierra y se mide el área abierta por el atarrayador en su mejor tiro

$$CA (\%) = \frac{\text{Área abierta por el atarrayador}}{\text{Área}} \times 100$$

- Área de la atarraya (A): $A = \pi (\text{radio de la atarraya})^2$
- Densidad (D): Es el número de animales promedio por área
$$D = \text{NPACA} / \text{FE}$$
- Densidad total (DT): Es el número total de animales presentes en el estanque
$$\text{DT} = D (\text{AE})$$

Donde: D, densidad

AE, área del estanque

Los resultados obtenidos en este experimento fueron sometidos a los mismos análisis estadísticos utilizados en el experimento 1.