

**SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE)
ALIMENTADAS CON *Chaetoceros muelleri* PRODUCIDO CON
FERTILIZANTES AGRÍCOLAS**

**LARVAL SURVIVAL OF *Litopenaeus vannamei* (BOONE)
FED *Chaetoceros muelleri* PRODUCED WITH
AGRICULTURAL FERTILIZERS**

Enrique Valenzuela-Espinoza^{1*}
Víctor Gendrop-Funes^{1**}
Roberto Pérez-Castañeda²
Jorge G. Wilburn-González¹

¹ Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada, CP 22800, Baja California, México
* E-mail: evale@faro.ens.uabc.mx
** E-mail: vgendrop@faro.ens.uabc.mx

² Centro de Investigación Social
Universidad Autónoma de Tamaulipas
9 Hidalgo y Juárez
Ciudad Victoria, CP 87000, Tamaulipas, México

Recibido en octubre de 1998; aceptado en abril de 1999

RESUMEN

Se comparó la supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas y medio f/2 (control). La microalga se cultivó en agua de mar natural fertilizada con 36.8 mg L⁻¹ N-NH₄NO₃ y 3.5 mg L⁻¹ P-P₂O₅, como sustitutos de nitrógeno y fósforo del medio f/2. La alimentación durante el estadio nauplio₅ a protozoa_{III} se mantuvo a una densidad de 100–150 × 10³ células mL⁻¹. De mysis₁ a postlarva₁ se empleó *Artemia franciscana* recién eclosionada como única fuente de alimento. El crecimiento promedio de *C. muelleri* con fertilizantes agrícolas fue mayor y significativamente diferente ($P < 0.05$) con respecto al control en los días 2, 3 y 4 del cultivo; sin embargo, al día 5 no existen diferencias significativas. La supervivencia de la larva al estadio mysis₁ alimentada con *C. muelleri* producido con fertilizantes agrícolas y medio f/2 fue 69% y 77.5%, respectivamente; se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para este estadio. Sin embargo, la supervivencia hasta postlarva₁ en ambos tratamientos (60.1% y 65.6%) no es significativa. Se concluye que el uso de estos nutrientes derivados de fertilizantes agrícolas como sustitutos de nitrógeno y fósforo del medio f/2 constituyen una alternativa viable para el cultivo de *C. muelleri* como alimento para larvas de *L. vannamei*.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, *Chaetoceros muelleri*, supervivencia, fertilizantes agrícolas.

ABSTRACT

Larval survival of *Litopenaeus vannamei* fed *Chaetoceros muelleri* produced with agricultural fertilizers and f/2 medium (control) was compared. The microalgae were cultivated in natural sea water fertilized with 36.8 mg L⁻¹ N-NH₄NO₃ and 3.5 mg L⁻¹ P-P₂O₅ as a substitute for nitrogen and phosphorus in the f/2 medium. Microalgal concentration during feeding of nauplius₅ stages to protozoa_{III} was maintained at a density of 100–150 × 10³ cells mL⁻¹. From mysis_I to postlarvae₁ stages, *Artemia franciscana* nauplii were the only source of food. Average growth of *C. muelleri* with agricultural fertilizers was greater and significant ($P < 0.05$) with respect to the control on days 2, 3 and 4 of the culture; however, on day 5, there was no significant difference in the cellular density. Survival of the larvae of the mysis_I stage fed *C. muelleri* produced with agricultural fertilizers and f/2 medium was 69% and 77.5%, respectively, and showed significant differences ($P < 0.05$). However, survival at the postlarvae₁ stage in both treatments (60.1% and 65.6%) was not significantly different. We conclude that the use of nutrients from agricultural fertilizer as a substitute for nitrogen and phosphorus in the f/2 medium constitutes a viable alternative for the culture of *C. muelleri* as food for larvae of *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, *Chaetoceros muelleri*, survival, agricultural fertilizers.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el creciente interés en el desarrollo del cultivo de crustáceos ha centrado su atención en reducir los costos de producción de microalgas y simplificar los sistemas de cultivo para la producción. Tradicionalmente, para el cultivo de microalgas se han utilizado diversos medios de cultivo, como los reportados por Guillard y Ryther (1962), Mathiessen y Torner (1966), Stein (1973), Guillard (1975) y Ukeles (1976). Estos medios generalmente son preparaciones de laboratorio y su empleo para el cultivo no resulta práctico e incrementa el costo en la alimentación de las larvas protozoas y la posterior producción de postlarvas de camarón. Una alternativa para disminuir el costo en la producción de microalgas a gran escala es utilizar fertilizantes inorgánicos comerciales, por ser éstos de menor costo que las sales de grado reactivo.

En los cultivos de camarones peneidos, los métodos más usados para la producción algal son el método abierto, que consiste en añadir nutrientes a los recipientes de cultivo larvario para generar biomasa de microalgas, o el método cerrado, que consiste en cultivar una sola especie o mezcla de microalgas en recipientes individuales y en condiciones controladas, añadiendo sólo

INTRODUCTION

The growing interest in crustacean aquaculture has shown that it is necessary to reduce microalgal production costs and simplify production culture systems. Traditionally, various culture media have been used to cultivate microalgae, such as those reported by Guillard and Ryther (1962), Mathiessen and Torner (1966), Stein (1973), Guillard (1975) and Ukeles (1976). These media are generally laboratory preparations and their use in cultures is not practical and increases the costs of feeding protozoa larvae, as well as the subsequent production of postlarvae shrimp. One way to decrease costs in large-scale microalgal production is to use commercial inorganic fertilizers, because they are less expensive than reagent-grade salts.

In the culture of penaeid shrimp, the methods most commonly used for algal production are the open method, which consists of adding nutrients to the larval culture recipients in order to generate microalgal biomass, or the closed method, which consists of cultivating just one species or a combination of microalgae in individual recipients under controlled conditions, and adding only the required amount of microalgae per larval stage (Liao *et al.*, 1983). In both methods, the nitrogen

la cantidad requerida de microalgas por estadio larval (Liao *et al.*, 1983). En ambos métodos, las fuentes de nitrógeno y fósforo para el cultivo de microalgas, en su mayoría, han sido de grado reactivo. Aunque en cultivos larvarios de otros organismos, como moluscos bivalvos, se ha experimentado con éxito el uso de microalgas producidas con fertilizantes agrícolas (McAnally-Salas *et al.*, 1992), poco se ha investigado sobre el efecto de las microalgas para alimentar larvas protozoicas de camarón mediante un medio de cultivo que contenga nitrato de amonio y ácido fosfórico y que sea compatible con el medio ambiente específico para el crecimiento de larvas de *Litopenaeus vannamei*. Si bien el amonio es el principal producto de excreción de crustáceos (Hartenstein, 1972), esta forma ionizada (NH_4^+) se transforma por hidrólisis a NH_3 , la cual tiene una alta solubilidad lipídica, y al pasar a través de las membranas celulares de las branquias (Fromm y Guillete, 1968), incrementa su concentración en la sangre a nivel tóxico (Campbell, 1973; Whitfield, 1974; Bower y Bidwell, 1978), por lo cual se considera uno de los tóxicos más comunes en los sistemas de cultivo intensivo.

El propósito del presente trabajo es evaluar la supervivencia de larvas de *L. vannamei* alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas, considerando la hipótesis que la fuente y concentración de nutriente son condiciones que afectarán la supervivencia larval de *L. vannamei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de microalgas

La microalga marina *C. muelleri* se adquirió de la Universidad de Texas A&M y se mantuvo en el laboratorio a una temperatura entre 22.5 y 24°C con el medio f/2 de Guillard (1975), el cual se empleó como control para esta investigación. El medio experimental estuvo constituido por 36.8 mg L⁻¹ de nitrato de amonio y 3.5 mg L⁻¹ de pentóxido de fósforo. La secuencia del cultivo

and phosphorous used to cultivate the microalgae are, for the most part, of reagent grade. Even though the use of microalgae produced with agricultural fertilizers has been successful in larval cultures of other organisms, such as bivalve mollusks (McAnally-Salas *et al.*, 1992), there is little information on the effect of feeding microalgae to shrimp protozoa larvae in a culture medium that contains ammonium nitrate and phosphoric acid, and that is compatible with the specific environment for growing *Litopenaeus vannamei* larvae. Even though ammonia is the principal product of excretion of crustaceans (Hartenstein, 1972), this ionized form (NH_4^+) is transformed through hydrolysis to NH_3 , which has a high lipidic solubility. Upon passing through the cellular membranes of the gills (Fromm and Guillete, 1968), the concentration of NH_3 in the blood increases to toxic levels (Campbell, 1973; Whitfield, 1974; Bower and Bidwell, 1978), making it one of the most common toxic agents in intensive cultivation systems.

The purpose of this work is to evaluate the survival of *L. vannamei* larvae fed *Chaetoceros muelleri* that were produced with agricultural fertilizers, based on the hypothesis that the source and concentration of the nutrient are conditions that affect the survival of *L. vannamei* larvae.

MATERIALS AND METHODS

Microalgae culture

The marine microalga *C. muelleri* was obtained from Texas A&M University. It was kept in the laboratory between 22.5 and 24°C in the f/2 medium of Guillard (1975), which was used as control in this study. The experimental medium consisted of 36.8 mg L⁻¹ ammonium nitrate and 3.5 mg L⁻¹ of phosphorus pentoxide. The general culture was conducted in Erlenmeyer flasks, in which 150 mL of medium with agricultural fertilizer and the respective controls were prepared in duplicate. They were autoclaved at 121°C, 1.05 kg cm⁻² of pressure for 10 minutes.

general se realizó en matraces Erlenmeyer, en los cuales se preparó por duplicado 150 mL de medio basado en fertilizantes agrícolas y sus respectivos controles. Éstos se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1.05 kg cm⁻² de presión durante 10 minutos. Después, cada Erlenmeyer recibió asepticamente 7 mL de *C. muelleri*. El tiempo de cultivo en este nivel fue de cuatro días, con iluminación continua a una irradiancia fotosintéticamente activa de 73 μmol m⁻² s⁻¹ (Biospherical Instruments Inc., modelo QSL-100, sensor de 4 π), proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 W). Se continuó en matraces Fernbach, preparados por duplicado con 1.5 L de medio constituido por fertilizantes agrícolas y sus respectivos controles. Se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1.05 kg cm⁻² de presión durante 10 minutos. Cada Fernbach recibió 150 mL de inóculo (obtenido del nivel Erlenmeyer) en condiciones asepticas y el tiempo de cultivo fue cuatro días a una irradiancia de 100 μmol m⁻² s⁻¹. La biomasa obtenida en Fernbach fue utilizada como inóculo para el nivel experimental en garrafón. Previo a la inoculación de *C. muelleri* en garrafón, el agua de mar a utilizar fue irradiada con lámparas de ultravioleta de 25 W, tratada con hipoclorito de sodio y tiosulfato de sodio, para lo cual se prepararon soluciones de hipoclorito de sodio (416 mL de NaOCl al 6% aforado a 1 L con agua destilada) y tiosulfato de sodio (248.1 g aforado a 1 L con agua destilada). De la solución de hipoclorito de sodio se introdujo 0.25 mL L⁻¹ al garrafón aforado con agua de mar y se dejó reposar 24 horas; posteriormente, se neutralizó el cloro adicionando 0.1 mL de tiosulfato de sodio por litro de agua de mar. Finalmente, se introdujo aireación por dos horas para completar la reacción (Pruder y Bolton, 1978).

Al cuarto día, la biomasa obtenida en Fernbach (1.65 L) se transfirió a garrafones con 16.35 L de medio de cultivo, en los cuales se ensayó por duplicado con el medio basado en fertilizantes agrícolas y sus respectivos controles f/2. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura entre 22.5 y 24°C, salinidad de 32‰, flujo de

Each Erlenmeyer flask received 7 mL of *C. muelleri* under aseptic conditions. The culture time of this level was four days, with constant illumination at a photosynthetically active irradiance of 73 μmol m⁻² s⁻¹ (Biospherical Instruments Inc., model QSL-100, 4 π sensor), provided by fluorescent lamps (75 W, Sylvania). The culture continued in Fernbach flasks, in which 1.5 L of medium with agricultural fertilizers and the respective controls were prepared in duplicate; they were autoclaved at 121°C, 1.05 kg cm⁻² of pressure for 10 minutes. Each Fernbach flask received 150 mL of inoculum (obtained from the Erlenmeyer level) under aseptic conditions and the culture time was four days with an irradiance of 100 μmol m⁻² s⁻¹. The biomass obtained in the Fernbach flasks was used as the inoculum in the carboy level. Before *C. muelleri* was inoculated into the carboy, the sea water was irradiated with 25-W ultraviolet lamps and treated with sodium hypochlorite and sodium thiosulfate solutions. The preparations of these solutions were: for sodium hypochlorite, 416 mL of 6% NaOCl plus distilled water to obtain 1 L, and for sodium thiosulfate, 248.1 g plus distilled water to obtain 1 L. The carboy received 0.25 mL L⁻¹ of the sodium hypochlorite solution, was topped off with sea water and left to rest for 24 hours. The chlorine solution was then neutralized with the addition of 0.1 mL of sodium thiosulphate per liter of sea water. Finally, aeration was introduced for two hours to complete the reaction (Pruder and Bolton, 1978).

On the fourth day, the biomass obtained in Fernbach flask (1.65 L) was transferred to the carboys containing 16.35 L of culture medium. Duplicate assays were made of the medium with agricultural fertilizer and the respective f/2 controls. The culture conditions were: temperature between 22.5 and 24°C, salinity of 32‰, air flow of 4 L min⁻¹ and continuous irradiance with four solar fluorescent lamps of 75 W, which supplied 110 μmol m⁻² s⁻¹. These conditions were maintained for five days, during which daily records were made of cellular density with a Neubauer

aire de 4 L min⁻¹ e irradiancia continua con cuatro lámparas fluorescentes solar de 75 W, que suministraban 110 μmol m⁻² s⁻¹. Permanecieron en estas condiciones hasta cinco días, en los cuales se cuantificó diariamente la densidad celular con una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad, observando mediante un microscopio compuesto (Zeiss). De los resultados de densidad celular se calculó la tasa de crecimiento (μ), divisiones por día, tiempo de duplicación y producción diaria, mediante las ecuaciones descritas por Guillard (1973).

Cultivo de larvas

Los nauplios de *L. vannamei* fueron producto de una sola hembra adulta silvestre, la cual se indujo a madurar mediante ablación unilateral. Posteriormente, se obtuvieron los nauplios, los cuales se aclimataron y se colocaron cinco repeticiones de cada tratamiento a una densidad de 120 nauplios L⁻¹ en conos tipo Imhoff de polietileno con 1.5 L de agua de mar. El agua fue tratada con EDTA-Na₂ a una concentración de 10 mg L⁻¹ (Castille y Lawrence, 1981). Se mantuvieron con flujo de aire constante y en baño María para mantener la temperatura entre 27 y 28°C.

Cuando los organismos alcanzaron el último subestadio naupliar se inició el experimento. A cinco conos se suministró alimento de *C. muelleri* producida con f/2 y a otros cinco conos se suministró la microalga producida con fertilizantes. La alimentación se inició con una densidad de 100 × 10³ células mL⁻¹. A partir del estadio protozoa_I la densidad se incrementó a 150 × 10³ células mL⁻¹; de protozoa_{III} a mysis_I, el alimento consistió de 100 × 10³ células mL⁻¹ de microalgas y 0.2 nauplios mL⁻¹ de *Artemia franciscana* y se hizo recambio de agua del 100%. Por último, de mysis_I a mysis_{III} los recambios de agua fueron del 75% por día y se alimentaron con 0.5 nauplios mL⁻¹ de *A. franciscana* viva (Aquacop, 1983). Una vez que las larvas de cada tratamiento se metamorfosearon al estadio PL_I se suspendió el experimento (tabla 1). Se llevaron registros

counting chamber of 0.1 mm depth, using a compound microscope (Zeiss). The cellular density results were used to calculate the growth rate (μ), divisions per day, doubling time and daily production, with the equations described by Guillard (1973).

Larvae culture

Nauplii of *L. vannamei* were obtained from one wild adult female, which was induced to maturity with unilateral ablation. After the nauplii were acclimated, five repetitions were made for each treatment at a density of 120 nauplii L⁻¹ in Imhoff polyethylene cones with 1.5 L of sea water. The water was treated with EDTA-Na₂ at a concentration of 10 mg L⁻¹ (Castille and Lawrence, 1981). They received a constant air flow and were kept in water baths to maintain temperature between 27 and 28°C.

The experiment began after the organisms reached the last nauplius substage. Five cones received *C. muelleri* produced in the f/2 medium and five cones received the microalga produced with agricultural fertilizers. Feeding began with a density of 100 × 10³ cells mL⁻¹. From the protozoa_I stage, density was increased to 150 × 10³ cells mL⁻¹; from protozoa_{III} to mysis_I, the food consisted of 100 × 10³ cells mL⁻¹ of microalgae and 0.2 nauplii mL⁻¹ of *Artemia franciscana*; water exchange was 100%. From mysis_I to mysis_{III} water exchange was 75% per day and they were fed 0.5 nauplii mL⁻¹ of live *A. franciscana* (Aquacop, 1983). The experiment ended once the larvae from each treatment had metamorphosed to stage PL_I (table 1). Daily records were made of the larval development, taking a sample with replacement of five larvae from each treatment. Two 250-mL samples were taken from each treatment to evaluate the survival of each stage. Temperature was recorded for each culture with a mercury thermometer (±1°C), as was salinity, with a Reichert-Jung refractometer (±1‰), and pH, with a Hatch Portable Water Test Kit (± 0.5).

Tabla 1. Secuencia del cultivo larvario experimental.

Table 1. Sequence of the experimental larval culture.

Día	Estadio	Alimento <i>C. muelleri</i> células mL ⁻¹	Alimento <i>Artemia</i> nauplios mL ⁻¹	% de recambio de agua
1	N ₅	1.0 × 10 ⁵	---	---
2	PZ _I	1.5 × 10 ⁵	---	---
3	PZ _I -PZ _{II}	1.5 × 10 ⁵	---	---
4	PZ _{II}	1.5 × 10 ⁵	---	---
5	PZ _{II} -PZ _{III}	1.5 × 10 ⁵	---	---
6	PZ _{III}	1.5 × 10 ⁵	---	---
7	PZ _{III} -M _I	1.0 × 10 ⁵	0.2	100
8	M _I	---	0.5	75
9	M _{II}	---	0.5	75
10	M _{II} -M _{III}	---	0.5	75
11	M _{III}	---	0.5	75
12	Pl _I			Cosecha

diarios del desarrollo larvario, tomando una muestra con reemplazo de cinco larvas de cada tratamiento. Del mismo modo, se tomaron dos muestras de 250 mL de cada tratamiento para evaluar la supervivencia en cada estadio. En cada condición de cultivo se registró: temperatura, con un termómetro de mercurio ($\pm 1^\circ\text{C}$); salinidad, con un refractómetro Reichert-Jung ($\pm 1\%$); y pH, con un Hatch Portable Water Test Kit (± 0.5).

Se realizó un análisis de homogeneidad de varianzas de Bartlett como requisito para estadística paramétrica y se aplicó la transformación arco seno a los porcentajes de supervivencia obtenidos en los diferentes replicados antes de proceder al análisis de varianza. Para validar diferencias significativas entre las medias de ambos tratamientos se realizó un ANOVA de una vía para cada estadio larval (Zar, 1984).

The Bartlett test of homogeneity of variance was made as a requisite for the parametric statistics and arcsine transformations were applied to the survival percentages obtained for the different replicates before proceeding to the analysis of variance. A one-way ANOVA was made for each larval stage to determine significant differences between the means of both treatments (Zar, 1984).

RESULTS

Microalgae culture

The culture temperature of *C. muelleri* varied from 22.5 to 24°C, with a mean value of 23.1 \pm 0.14°C; pH fluctuated between 8 and 9 units, with an average of 8.4 \pm 0.08; and salinity was kept at

RESULTADOS

Cultivo de microalgas

La temperatura del cultivo de *C. muelleri* varió entre 22.5 y 24°C, con un valor medio de $23.1 \pm 0.14^\circ\text{C}$; el pH fluctuó entre 8 y 9 unidades, con un promedio de 8.4 ± 0.08 ; y la salinidad se mantuvo en 32‰. El crecimiento de *C. muelleri* en las condiciones antes descritas se muestra en la figura 1, donde la concentración inicial celular promedio en el medio control f/2 y experimental con fertilizantes fue similar (tabla 2A, B). Se encontró mayor densidad celular con los fertilizantes para los días 2, 3 y 4, la cual fue significativa ($P < 0.05$) respecto al medio f/2; al día 5 se registraron crecimientos máximos de 3.16 y 3.31×10^6 células mL^{-1} , respectivamente (fig. 1; tabla 2A, B). A las 48 horas del cultivo con fertilizantes, la tasa de crecimiento de *C. muelleri* ($\mu = 1.57$) y las divisiones por día (2.26) fueron mayores que las de las algas cultivadas en medio f/2 ($\mu = 1.21$; divisiones por día = 1.75). Al tercer día, la tasa de crecimiento del cultivo en fertilizantes disminuyó de 1.57 a 0.29 y las divisiones por día de 2.26 a 0.42. En cambio, en el medio f/2, la tasa de crecimiento disminuyó de 1.21 a 0.67 y las divisiones por día de 1.75 a 0.97 (tabla 2A, B); estos parámetros presentaron la misma tendencia hasta el quinto día. El tiempo de duplicación fue inversamente proporcional a los parámetros arriba descritos en ambos tratamientos. De lo anterior, se determinó que la fase de crecimiento exponencial para ambos tratamientos está comprendida entre los días 1 y 3.

Cultivo de larvas

La temperatura en el cultivo de larvas se mantuvo en un intervalo de 27 a 28°C, con un promedio de $27.5 \pm 0.13^\circ\text{C}$; el pH fluctuó entre 8.0 y 9.0 unidades, con un valor promedio de 8.2 ± 0.07 ; y la salinidad se mantuvo en 32‰. En estas condiciones, la supervivencia de *L. vannamei* disminuyó gradualmente conforme transcurrieron los días del desarrollo larvario y no se observaron

32‰. Figure 1 shows the growth of *C. muelleri* under the above descriptions. The average initial cellular concentrations in the f/2 control medium and the medium with fertilizers were similar (table 2A, B). Significantly greater ($P < 0.05$) cellular density was observed for the medium with fertilizers on days 2, 3 and 4 with respect to the f/2 medium; on day 5, maximum growths of 3.16 and 3.31×10^6 cells mL^{-1} were recorded, respectively (fig. 1, table 2A, B). After 48 hours in the culture with fertilizers, the growth rate of *C. muelleri* ($\mu = 1.57$) and divisions per day (2.26) were greater than that of the algae cultured in f/2 medium ($\mu = 1.21$; divisions per day = 1.75). On day 3, the growth rate of the culture with fertilizers decreased from 1.57 to 0.29 and the divisions per day from 2.26 to 0.42. In the f/2 medium, the growth rate decreased from 1.21 to 0.67 and the divisions per day from 1.75 to 0.97 (table 2A, B); the same trend is observed for the parameters until day 5. Doubling time was inversely proportional to the parameters described for both treatments. The results indicate that the exponential growth phase for both treatments occurs between days 1 and 3.

Larvae culture

The temperature of the larvae culture was kept between 27 and 28°C, with an average of $27.5 \pm 0.13^\circ\text{C}$; pH fluctuated between 8.0 and 9.0 units, with an average value of 8.2 ± 0.07 ; and salinity remained at 32‰. Under these conditions, survival of *L. vannamei* decreased gradually as larval development advanced. No differences were observed in the metamorphosis times of the protozoa substages when the different diets were provided. A greater number of surviving larvae was found in the control medium (f/2): 104.4 ± 2.58 (87%) for protozoa, 93 ± 2.12 (77.5%) for mysis and 78.8 ± 2.92 (65%) for postlarvae on days 2, 8 and 12 of the larval culture, respectively (table 3A). However, when the larvae were fed the microalgae produced with fertilizers, the number and average survival were 97.8 ± 2.78 (81.5%) for protozoa, 82.8 ± 2.03 (69%) for

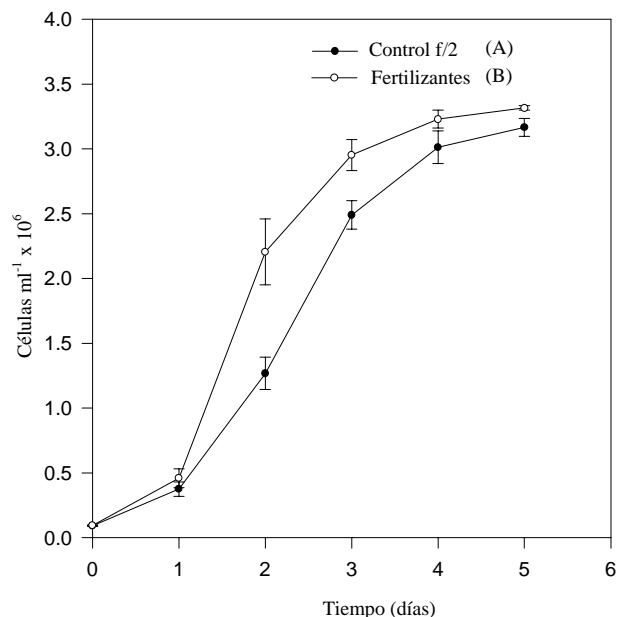


Figura 1. Crecimiento promedio de *Chaetoceros muelleri* cultivada en 18 L con el medio f/2 (A) y con fertilizantes agrícolas (B). La barra vertical indica el error estándar.

Figure 1. Mean growth of *Chaetoceros muelleri* cultured in 18 L with f/2 medium (A) and agricultural fertilizers (B). The vertical bar indicates standard error.

diferencias en los tiempos de metamorfosis en los subestadios protozoa cuando se suministraron las diferentes dietas. En el medio control (f/2), se encontró el mayor número promedio de larvas supervivientes, 104.4 ± 2.58 (87%), en estadio protozoa, 93 ± 2.12 (77.5%) para mysis y 78.8 ± 2.92 (65%) postlarvas, a los días 2, 8 y 12 del cultivo larvario, respectivamente (tabla 3A). En contraste, al alimentar larvas con microalgas producidas con fertilizantes, el número y la supervivencia promedio fueron 97.8 ± 2.78 (81.5%) para protozoa, 82.8 ± 2.03 (69%) para mysis y 72.2 ± 2.22 (60.1%) para postlarvas, durante el mismo intervalo de tiempo que el control (fig. 2; tabla 3B). La supervivencia después de siete días de experimentación (estadio mysis), alimentada con *C. muelleri* producido con el medio f/2, fue mayor a la obtenida con el tratamiento alterno. Se

mysis and 72.2 ± 2.22 (60.1%) for postlarvae, during the same time period as the control (fig. 2; table 3B). After seven days of testing (mysis stage), survival of the organisms fed *C. muelleri* produced with the f/2 medium was greater than that obtained with the other treatment. Significant differences ($P < 0.05$) were observed between treatments. At the end of the experiment, no significant differences ($P > 0.05$) were observed for postlarval survival with both treatments (fig. 2; table 3A, B).

DISCUSSION

Microalgae culture

Temperature, pH and salinity are among the principal factors that affect microalgal produc-

Tabla 2. Valores poblacionales promedio de *Chaetoceros muelleri* cultivada en 18 L con medio f/2 (**A**) y medio con fertilizantes agrícolas (**B**); μ = tasa de crecimiento, TD = tiempo de duplicación, D = divisiones por día, PD = producción diaria.

Table 2. Mean population values of *Chaetoceros muelleri* cultured in 18 L with f/2 medium (**A**) and agricultural fertilizers (**B**); μ = growth rate, TD = duplication time, D = divisions per day, PD = daily production.

Tiempo (días)	Densidad celular (células mL ⁻¹)	μ	TD (días)	D (división día ⁻¹)	PD (células mL ⁻¹)
A					
0	92,750	---	---	---	---
1	375,750	1.40	0.49	2.01	283,000 ± 28,795
2	1,268,500	1.21	0.57	1.75	892,750 ± 42,915
3	2,490,375	0.67	1.02	0.97	1,221,815 ± 74,509
4	3,012,250	0.19	3.64	0.27	521,875 ± 49,379
5	3,165,000	0.05	14.01	0.07	152,750 ± 42,426
Promedio		1.09	0.69	1.57	
B					
0	94,000	---	---	---	---
1	458,750	1.58	0.43	2.28	364,750 ± 37,510
2	2,205,250	1.57	0.44	2.26	1,746,500 ± 114,352
3	2,950,500	0.29	2.37	0.42	747,250 ± 88,299
4	3,228,750	0.09	7.75	0.13	276,250 ± 44,306
5	3,315,000	0.02	26.29	0.04	86,250 ± 10,606
Promedio		1.14	1.08	1.65	

encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos. Al final del experimento, la supervivencia de postlarvas obtenidas en los dos tratamientos no fue significativamente diferente entre tratamientos ($P > 0.05$) (fig. 2; tabla 3A, B).

DISCUSIÓN

Cultivo de microalgas

Entre los principales factores que influyen en la producción microalgal está la temperatura, pH

tion. In this study, they were maintained within the optimum range reported for *C. muelleri* (Treece and Yates, 1988).

The cellular production obtained with agricultural fertilizers was greater than that obtained with the f/2 control medium on days 2, 3 and 4 of the culture (fig. 1; table 2A, B). This is due to the use of two combined sources of nitrogen (NH_4NO_3), where ammonium is one of the forms reduced from the nitrogen and when nitrate mixes with ammonium in the culture medium, nitrate reductase is inhibited due to the presence of

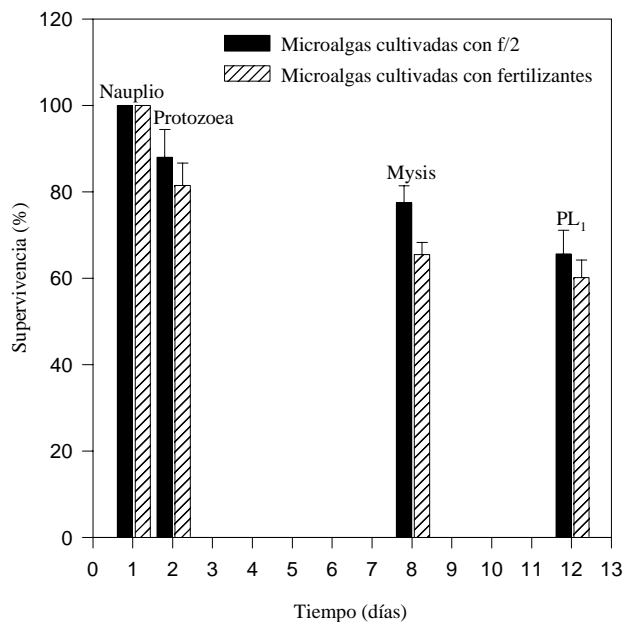


Figura 2. Supervivencia promedio de *Litopenaeus vannamei* en sus diferentes estadios larvarios. La barra vertical indica el error estándar.

Figure 2. Mean survival of *Litopenaeus vannamei* in its different larval stages. The vertical bar indicates standard error.

y salinidad, los cuales se mantuvieron en el intervalo óptimo reportado para la especie *C. muelleri* (Treece y Yates, 1988).

La producción celular que se obtuvo al utilizar fertilizantes agrícolas fue mayor que la obtenida con el medio control f/2 para los días 2, 3 y 4 del cultivo (fig. 1; tabla 2A, B). Esta diferencia es el resultado de utilizar dos fuentes combinadas de nitrógeno (NH₄NO₃), donde el amonio es una de las formas reducidas del nitrógeno y cuando se combina nitrato con amonio en el medio de cultivo, se inhibe el nitrato reductasa debido a la presencia del amonio, el cual es utilizado para la formación de aminoácidos sin gasto energético previo (Syrett, 1981; Lobban *et al.*, 1985). Estudios hechos con *Biddulphia aurita* han mostrado que el amonio es utilizado a una razón de 2.3 a 2.4 veces más rápido que el nitrato (Lui y Roels,

ammonium, which is used for the formation of amino acids without a prior energy budget (Syrett, 1981; Lobban *et al.*, 1985). Studies conducted on *Biddulphia aurita* have shown that ammonium is used 2.3 to 2.4 times faster than nitrate (Lui and Roels, 1972). Results on nitrogen consumption in the form of ammonium nitrate by *Isochrysis galvana* (clone T-Iso) indicate that ammonium is consumed eight times faster than nitrate in a period of five days (Valenzuela-Espinoza, 1997). Thus, the growth of cells with the f/2 medium was slow, because its nitrogen source (NO₃⁻) requires enzymatic activity on the part of the cell to transform nitrate to nitrite and then to ammonium before it is incorporated as amino acids by the cell. This implies an energy budget (ATP) (Syrett, 1981; Wheeler, 1983), and is reflected in a lower production during the first days of growth (fig. 1).

1972). Resultados sobre consumo de nitrógeno en forma de nitrato de amonio por *Isochrysis galbana* (clon T-Iso) indican que el amonio es consumido ocho veces más rápido que el nitrato en un periodo de cinco días (Valenzuela-Espinoza, 1997). Así, el crecimiento de las células con el medio f/2 fue lento porque su fuente de nitrógeno (NO_3^-) requiere de actividad enzimática por parte de la célula para transformar el nitrato a nitrito y después a amonio, antes de ser incorporado a los aminoácidos por la célula, lo cual implica un gasto de energía (ATP) (Syrett, 1981; Wheeler, 1983), reflejándose esto en una menor producción en los primeros días del crecimiento (fig. 1).

Esta preferencia de las microalgas por el amonio se tradujo en una tasa de crecimiento y divisiones por día mayores con los fertilizantes durante las primeras 48 horas. Para los días subsiguientes se registraron valores poblacionales menores para el cultivo con fertilizantes respecto al control. Sin embargo, al día 5 de cultivo, la concentración celular entre los dos tratamientos no fue significativa ($P > 0.05$) (fig. 1; tabla 2A, B). La diferencia en las tasas de crecimiento se atribuye a la disponibilidad de nitrógeno para las células y su concentración en el cultivo, lo cual se reflejó en sus parámetros de crecimiento. Resultados similares han sido reportados por Droop (1975), quien establece que la tasa de crecimiento de la biomasa microalgal en cultivo disminuye cuando el abastecimiento de nutrientes es escaso para las necesidades metabólicas de la población algal. Debido a la importancia de la cantidad y calidad nutricional de la microalga para proveer una dieta adecuada para larvas protozoas de camarón (Preston *et al.*, 1992), la cosecha del cultivo se realizó, en los días 3 y 4, para ambos tratamientos, porque se ha demostrado que las células se encuentran en fase de crecimiento exponencial y en su mejor estado fisiológico (Guillard, 1975).

Cultivo de larvas

Los factores fisicoquímicos (temperatura, salinidad y pH) en el cultivo larvario de *L.*

This preference of the microalgae for ammonium results in higher growth rates and divisions per day with the agricultural fertilizers during the first 48 hours. Lower stock values were recorded for the culture with agricultural fertilizers with respect to the control in the subsequent days. However, on day 5, the cellular concentration in both treatments was not significant ($P > 0.05$) (fig. 1; table 2A, B). The difference in the growth rates is attributed to nitrogen availability for the cells and its concentration in the culture, which is reflected in their growth parameters. Similar results have been reported by Droop (1975), who found that the growth rate of a microalgal biomass decreases when the supply of nutrients does not meet the metabolic needs of the algal stock. Since quantity and nutritional quality of the microalga are important criteria for providing an appropriate diet for shrimp protozoa larvae (Preston *et al.*, 1992), both cultures were harvested on days 3 and 4, because the cells are in the exponential growth phase and their best physiological state (Guillard, 1975).

Larvae culture

The physicochemical factors (temperature, salinity and pH) of the larval culture of *L. vannamei* were within the optimum range for the species (Aquacop, 1983; Treece and Yates, 1988) and, therefore, they were not considered to have affected the survival and development of the organisms.

The change from one larval stage to another is critical and organisms may be lost due to natural mortality and/or handling. In this study, the organisms were not sampled during substages (fig. 2). However, the fatalities from nauplius to protozoa were higher than those of the subsequent stages (fig. 2, table 3A, B). This may be due to the quality of the nauplii, since studies conducted by Aquacop (1983) indicate that nauplius viability varies in relation to the condition of the broodstock.

In commercial laboratories of larval production, microalgae are provided from nauplius 5 stage (McVey and Fox, 1983). Since the objective

vannamei estuvieron dentro del intervalo óptimo para la especie (Aquacop, 1983; Treece y Yates, 1988); por tanto, se considera que no influyeron en la supervivencia y desarrollo del organismo.

Los cambios de estadio para la larva son críticos y pueden ocasionar la pérdida de organismos por mortalidad natural, a la cual se añade la inducida por manipuleo. En este estudio, no se muestreó la población durante subestadios (fig. 2). No obstante, las mortalidades de nauplio a protozoa fueron mayores que las obtenidas en los estadios siguientes (fig. 2; tabla 3A, B). Esto puede ser debido a la calidad del nauplio, ya que, según estudios realizados por Aquacop (1983), se ha encontrado que la viabilidad del nauplio varía de acuerdo con las condiciones de los reproductores.

En los laboratorios comerciales de producción de larvas, la microalga se suministra a partir del estadio naupliar 5 (McVey y Fox, 1983). En este estudio, como se requería comprobar el efecto del medio de cultivo y la calidad de la biomasa celular producida con fertilizantes y considerando que para el cultivo larvario de *Penaeus monodon* se ha establecido un nivel de 0.025 mg L^{-1} de NH_3 (Jayasankar y Muthu, 1983) y 0.01 mg L^{-1} de NH_3 específicamente para nauplios (Chin y Chen, 1987), se inició la fase experimental a partir de este estadio (tabla 1). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la supervivencia, con 81.5% al suministrar microalgas producidas con fertilizantes agrícolas (fig. 2; tabla 3B), al metamorfosearse a mysis, lo cual indica que durante los estadios de protozoa, la microalga suministrada en medio con fertilizantes tuvo efectos significativos en la supervivencia de larvas de *L. vannamei*. Al comparar los porcentajes de supervivencia presentados en este estudio con los reportados por Fuze *et al.* (1985), se determinó que son menores, pero son similares a los valores reportados por Aquacop (1983), donde se establece una supervivencia que fluctúa entre el 65% y 80% de nauplio a postlarva₄. La diferencia en el número total de larvas obtenidas en estadio protozoa (104.4 ± 2.58 ; 87%) en el medio control f/2, sólo es 6% mayor respecto a las obtenidas con fertilizantes agrícolas (97.8 ± 2.78 ; 81.5%). Este

of this study was to determine how agricultural fertilizers affect the culture medium and quality of the cellular biomass, and considering that the larval culture of *Penaeus monodon* has been established at a level of 0.025 mg L^{-1} of NH_3 (Jayasankar and Mothu, 1983) and of 0.01 mg L^{-1} of NH_3 specifically for nauplii (Chin and Chen, 1987), the experimental phase started with this stage (table 1). Significant differences were observed ($P < 0.05$) for survival, 81.5%, when microalgae produced with agricultural fertilizers were provided during metamorphosis to mysis (fig. 2; table 3B), indicating that during the protozoa stages, the microalgae produced with agricultural fertilizers significantly affected larval survival of *L. vannamei*. The survival percentages of this study compared to those reported by Fuze *et al.* (1985) are lower, but they are similar to the values reported by Aquacop (1983) that fluctuated between 65% and 80% from nauplius to postlarvae₄. The difference in the total number of larvae obtained in the protozoa stage (104.4 ± 2.58 ; 87%) in the f/2 control medium is only 6% higher than that obtained with the agricultural fertilizers (97.8 ± 2.78 ; 81.5%). This may be due to the decomposition of excess food, the accumulation of fecal matter or the presence of trace elements in the ammonium nitrate fertilizer (Valenzuela-Espinoza *et al.*, in press), which cause changes in the water quality of the culture medium, and are assumed to have caused physiological stress that generated the loss of organisms during the experiment, until reaching an accumulated percentage of 6%. However, the changes from one larval stage to another were simultaneous in both treatments. It is probable that the culture medium with agricultural fertilizers might not have been entirely suitable for the maximum survival of *L. vannamei* larvae; however, the protein, lipid and carbohydrate composition of *C. muelleri* cultured with ammonium nitrate and phosphoric acid does not differ ($P > 0.05$) from that obtained with the f/2 culture medium (Cebrero-Núñez, 1994). Therefore, it can be concluded that the cellular quality of *C. muelleri* complies with the nutritional requirements of

Tabla 3. Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con medio f/2 (A) y con fertilizantes agrícolas (B).**Table 3.** Survival of *Litopenaeus vannamei* larvae fed *Chaetoceros muelleri* produced with f/2 medium (A) and with agricultural fertilizers (B).

Estadio	Día	Larvas por tratamiento					Promedio y desviación estándar	Supervivencia (%)
		1	2	3	4	5		
A								
Nauplio	1	120	120	120	120	120	120	100.0
Protozoa	2	105	96	108	111	102	104.04 ± 2.58	87.0
Mysis	8	93	87	99	96	90	93.00 ± 2.12	77.5
Postlarva	12	84	74	70	85	81	78.80 ± 2.92	65.6
B								
Nauplio	1	120	120	120	120	120	120	100.0
Protozoa	2	99	93	105	90	102	97.8 ± 2.78	81.5
Mysis	8	81	78	81	84	90	82.8 ± 2.03	69.0
Postlarva	12	72	69	67	73	80	72.2 ± 2.22	60.1

porcentaje se puede deber a la descomposición de alimento en exceso, acumulación de material fecal o la presencia de elementos traza contenidos en el fertilizante agrícola nitrato de amonio (Valenzuela-Espinoza *et al.*, en prensa), los cuales causan cambios en la calidad del agua del medio de cultivo; por tanto, se presume pudieron ejercer tensión fisiológica, que generó la pérdida de los organismos durante el experimento hasta llegar a un porcentaje acumulado de 6%. No obstante, los cambios de estadios larvales fueron simultáneos en ambos tratamientos. Es probable que el medio de cultivo con fertilizantes no haya sido del todo compatible para la máxima supervivencia de larvas de *L. vannamei*; sin embargo, la composición en proteínas, lípidos y carbohidratos de *C. muelleri* cultivada con nitrato de amonio y ácido fosfórico no difiere ($P > 0.05$) de aquella obtenida con el medio de f/2 (Cabrero-Núñez, 1994). Por ende, se puede concluir que la calidad celular de *C. muelleri* cumple con el requisito nutricional

protozoa larvae of *L. vannamei*. On the other hand, the monospecific culture of *C. muelleri* in laboratories with reagent-grade inorganic salts increases costs, if it is to be fed to shrimp protozoa larvae. However, the cost of the medium with agricultural fertilizers is eight times less than that of the f/2 medium and produces the same microalgal biomass. Therefore, it is a viable alternative for the culture of *C. muelleri* to be fed to protozoa larvae of *L. vannamei*.

English translation by Jennifer Davis.

para la alimentación de larvas protozoas de *L. vannamei*. Por otro lado, el cultivo monoespecífico en el laboratorio con sales inorgánicas de grado reactivo contribuye a incrementar el costo del cultivo de *C. muelleri*, el cual es requerido para la alimentación de larvas protozoas de camarón. En cambio, el costo del medio con

fertilizantes agrícolas resulta ocho veces más económico que el medio f/2 y produce igual biomasa microalgal, por lo cual se presenta como una alternativa viable para cultivar *C. muelleri* destinada a la alimentación de larvas protozoas de *L. vannamei*.

REFERENCIAS

- Aquacop (1983). Penaeid larval rearing in the Centre Oceanologique du Pacifique. In: J. McVey (ed.), CRC Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture, pp. 123–127.
- Bower, C.E. and Bidwell, J.P. (1978). Ionization of ammonia in seawater: Effects of temperature, pH and salinity. J. Fish. Res. Board Canada, 35: 1012–1016.
- Campbell, J.W. (1973). Nitrogen excretion. In: C.L. Prosser (ed.), Comparative Animal Physiology. 3rd ed. W.D. Saunders, Toronto, Ontario, 966 pp.
- Castille, F.L. and Lawrence, A.L. (1981). The effects of EDTA (ethylenedinitrotetraacetic acid) on the survival and development of shrimp nauplii (*Penaeus stylirostris* Stimpson) and the interaction of EDTA with the toxicities of cadmium, calcium, and phenol. J. World Maricult. Soc., 12(2): 292–304.
- Cabrero-Núñez, F. (1994). Determinación bioquímica de *Chaetoceros muelleri* (Schutz) cultivada con fertilizantes agrícolas, en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, BC, México, 36 pp.
- Chin, T.S. and Chen, J.C. (1987). Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture, 66: 247–253.
- Droop, M.R. (1975). The nutrient status of alga cell in batch culture. J. Mar. Biol. Assoc. UK, 55: 541–551.
- Fromm, P.O. and Guillete, J.R. (1968). Effect of ambient ammonia on blood ammonia and nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 26: 887–896.
- Fuze, D.M., Wilkenfeld, J.S. and Lawrence, A.L. (1985). Studies on the use of boiled chicken egg yolk as a feed for rearing penaeid shrimp larvae. Texas J. Sci., 37(4): 371–382.
- Guillard, R.R.L. (1973). Division rates. In: J.R. Stein (ed.), Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge Univ. Press, pp. 289–313.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith and M.H. Chanley (eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum, New York, pp. 296–360.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). Can. J. Microbiol., 8: 229–239.
- Hartenstein, R. (1972). Nitrogen metabolism in non-insect arthropods. In: J.W. Campbell (ed.), Comparative Biochemistry of Nitrogen Metabolism. I. The Invertebrates. Academic Press, New York, pp. 299–372.
- Jayasankar, P. and Muthu, M.S. (1983). Toxicity of ammonia to the larvae of *Penaeus japonicus* Bate. Jap. J. Zool., 10: 305–393.
- Liao, I.C., Su, H.M. and Lin, S.H. (1983). Larval foods for penaeid prawns. In: J. McVey (ed.), CRC Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture, pp. 43–69.
- Lobban, C.S., Harrison, P. and Duncan, M.J. (1985). The Physiological Ecology of Seaweeds. Cambridge Univ. Press, pp. 75–110.
- Lui, N.S.T. and Roels, O.A. (1972). Nitrogen metabolism of aquatic organisms. II. The assimilation of nitrate, nitrite, and ammonia by *Biddulphia aurita*. J. Phycol., 8: 259–264.
- Matthiessen, G.C. and Torner, R.C. (1966). Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's County, Massachusetts. Mar. Res. Found. Mass., iv + 138 pp.
- McAnally-Salas, L.S., Ocampo-Aranda, F.J. y García-Pámanes, L.E. (1992). Efecto de la microalga *Pavlova lutheri* (Droop) Hibberd cultivada con fertilizantes agrícolas en el crecimiento y supervivencia de larvas y postlarva del mejillón *Mytilus edulis* (L.). Ciencias Marinas, 18(4): 57–74.
- McVey, J.P. and Fox, J.M. (1983). Hatchery techniques for penaeid shrimp utilized by Texas A&M-NMFS Galveston Laboratory program. In: J. McVey (ed.), CRC Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture, pp. 129–154.
- Preston, N.P., Burford, M.A., Common, F.E. and Rothlisberg, P.C. (1992). Natural diet of larval *Penaeus merguensis* (Decapoda: Penaeidae) and its effect on survival. Mar. Biol., 113: 181–191.
- Pruder, G.D. and Bolton, E.T. (1978). System configuration and performance: Bivalve molluscan mariculture. Proc. 9th Annual Meeting World Mariculture Society, pp. 747–759.

- Stein, J.R. (1973). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge Univ. Press, 448 pp.
- Syrett, P.J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. In: Platt (ed.), Physiological Bases of Phytoplankton Ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210: 182–210.
- Trecece, G.D. and Yates, M.E. (1988). Laboratory manual for the culture of penaeid shrimp larvae. Marine Advisory Service. Sea Grant College Program. Texas A&M Univ., 95 pp.
- Ukeles, R. (1976). Cultivation of plants. In: O. Kinne (ed.), Marine Ecology. Vol. 3. John Wiley, New York, pp. 367–446.
- Valenzuela-Espinoza, E. (1997). Uso de un medio alterno al f/2 para el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso). Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, BC, México, 51 pp.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. and Núñez-Cebrero, F. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacult. Eng. (in press).
- Wheeler, P.A. (1983). Phytoplankton nitrogen metabolism. In: E.J. Carpenter and D.G. Capone (eds.), Nitrogen in the Marine Environment. Academic Press, New York, pp. 309–346.
- Whitfield, M. (1974). The hydrolysis of ammonium ions in sea water: a theoretical study. J. Mar. Biol. Assoc. UK., 54: 565–580.
- Zar, J.H. (1984). Biostatistical Analysis. 2nd ed. Prentice-Hall, 718 pp.