Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda.[1]

César Molina[*1]; Eduardo Cadena[2]; Fermin Orellana[3].

[1]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M." (CENAIM), Campus Politécnico Prosperina, Via perimetral Km 30,5. Casilla 09-01-4519, Guayaquil, Ecuador. Teléfono 593 4 916132 Ext. 207. Fax: 593-4-916120. cemolina@cenaim.espol.edu.ec
[2]Facultad de Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Politécnico Prosperina, Via perimetral Km 30,5. Guayaquil, Ecuador.
[3]Facultad de Agronomia, Veterinaria y Acuacultura, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

RESUMEN: La alimentación en granjas camaroneras está basada en su mayoría en tablas de alimentación para el cálculo de la ración, las cuales no consideran ni los hábitos naturales de alimentación ni el estado fisiológico por el que atraviesa el camarón. En base a esto, el presente trabajo evaluó el efecto que tienen el ritmo circadiano y el ciclo de muda sobre la actividad enzimática y su relación con el crecimiento y conversión alimenticia. Los resultados de este estudio muestran una sincronización de la muda con el ciclo lunar, encontrándose en cuarto menguante aproximadamente el 50% de la población de camarones mudados, alcanzando el pico máximo en luna nueva (80%) que corresponden a los primeros 5 días de marea baja y alta. Las mayores actividades específicas de amilasa y lipasa se presentaron en los estadíos Do y D2, y la menor en D3 durante el ciclo de muda. Mientras que para proteasas en los estadíos B, C y Do se encontró la mayor actividad, coincidiendo con la etapa donde el camarón consume 18% mas alimento. El glicógeno hepatopáncreatico presentó una alta concentración en los estadíos A, D1 y D3. Un efecto significativo ($P<0,05$) del horario de alimentación (08:00h-16:00h, 10:00h-18:00h, 12:00h-20:00h y 14:00h-22:00h) sobre la magnitud y aparición de los picos enzimáticos fue observado. Los camarones alimentados a las 12:00h-20:00h produjeron la mayor actividad específica de proteasa, amilasa y lipasa, con un pico máximo a las 14h00 y un segundo de menor intensidad a las 02h00. En camarones alimentados 2 veces al día, no se encontró diferencias estadísticas ($P>0,05$) en términos de biomasa ganada entre las 3 raciones alimenticias evaluadas (tabla de alimentación, 6% de la biomasa y de acuerdo al estadío de muda); en tanto que sí se observó una biomasa ganada significativamente ($P<0,05$) mas alta en los camarones alimentados en el horario de 12:00h-20:00h que en los otros. Un aumento progresivo de la supervivencia (del 5 al 11%), fue observado a medida que el alimento fue suplido en raciones acordes al ciclo de muda y al horario de alimentación 12:00h-20:00h. Así también las mejores tasas de conversión alimenticia y de eficiencia proteica fueron obtenidas por el grupo de camarones alimentados en función del estadío de muda y en el horario de 12h00-20h00. Una estrategia de alimentación adecuada a los hábitos naturales de alimentación de la especie en cultivo, y al ciclo de muda, permitirá maximizar la eficiencia de utilización del alimento, reducir los excesos de alimentos no consumidos, disminuir el tiempo de exposición del alimento al agua evitando así la consiguiente pérdida de nutrientes por lixiviación y estabilidad física del balanceado.

PALABRAS CLAVES: alimentación, camarón, ciclo de muda, actividad enzimatica.

INTRODUCCION

El éxito en el cultivo de las diferentes especies de camarón depende en gran parte de una adecuada nutrición y un buen manejo del alimento (Artiles *et al.* 1996). La alimentación en las piscinas camaroneras está basada en su mayoría en tablas para calcular las raciones diarias a partir de un porcentaje de la biomasa y del peso promedio de los camarones presente en el estanque, las cuales

[1] Molina, C., Cadena, E., Orellana, F., 2000. Alimentación de Camarones en Relación a la Actividad Enzimática Como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo. R, (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

no consideran ni los hábitos de alimentación ni el estado fisiológico por el que atraviesa el camarón (Molina y Piña, 1999). Además, si se considera que el costo del alimento balanceado puede representar hasta el 50% del gasto de producción, dependiendo del sistema de cultivo utilizado, especie, manejo, calidad de agua y tipo de alimento, es relevante encontrar estrategias de alimentación que permitan disminuir los gastos generados por éste rubro (Molina y Piña, 1999).

Para alcanzar este objetivo es necesario estudiar los procesos fisiológicos del organismo que afectan la capacidad de consumo y digestión del alimento, en el cual la actividad enzimática cumple una acción de vital importancia (Dall, 1992). La actividad de éstas enzimas, presentes en el hepatopáncreas, son las que controlan los procesos de digestión y varían por factores como: ayuno (Cuzon, 1980), edad y tamaño de los animales (Lee y Lawrence 1982, 1985), cantidad y frecuencia de alimentación (Sridhar *et al.* 1995), fuente y nivel de proteína del alimento (Le Moullac *et al*. 1994, 1997), estimulantes alimenticios (Takii *et al.* 1986), estadío de muda (Van Wormhoudt *et al*. 1995a), y ritmo circadiano (Van Wormhoudt,1977).

Estudios realizados sobre el comportamiento de los camarones, indican que existe una relación entre la ritmicidad lunar y el proceso del ciclo de muda (Dall *et al*. 1990), esta observación fue remarcada por Robertson *et al*. (1987) quienes indicaron la necesidad de determinar esta posible relación y su importancia en el manejo de sistemas de cultivo de camarón. Griffith y Wigglesworth (1993) realizaron en Ecuador y Colombia trabajos con *P. vannamei* y *P. schmitti* relacionando el crecimiento con las fases lunares, encontrando un crecimiento rítmico de mas de 1g por semana durante luna nueva y llena. Así también, Dall (1986) y Chan *et al*. (1988) han demostrado que existen etapas dentro del ciclo de muda del camarón donde el consumo del alimento se suspende o disminuye, proceso que no es tomado en consideración al aplicar el alimento balanceado.

Por otro lado, en crustáceos se ha encontrado que ciertos fenómenos biológicos ocurren rítmicamente alrededor de la misma hora (ritmo circadiano, De Coursey, 1983). Esto se observó en muchos aspectos, desde bioquímicos relacionados con la concentración de proteínas, aminoácidos libres (Richard *et al*. 1979; Boghen y Ceccaldi (1987), ácidos grasos (Moureau *et al*. 1984), pigmentos y secreción de enzimas digestivas (Van Wormhoudt, 1977) hasta otros como la actividad alimenticia (Hernandez-Cortez *et al*. 1998). Nolasco (1998) en crustáceos y Heilman y Spieler (1999) en peces, reportan y hacen referencia a varios autores que señalan una sincronización diaria de la alimentación como una estrategia para incrementar la producción en acuicultura.

Los diversos criterios sobre el comportamiento alimenticio de los camarones hacen que las técnicas de alimentación utilizadas discrepen entre productores, ocasionando en muchos casos elevadas tasas de conversión alimenticia y por ende una menor rentabilidad.

Por lo tanto, para hacer más efectiva y apropiada la alimentación de camarones se debe considerar sus hábitos naturales de alimentación en términos de horario, frecuencia y cantidad, sobre todo en vista de que en la producción camaronera el suministro del alimento artificial esta orientado a conseguir mejores producciones en el menor tiempo posible.

Consecuentemente, para poder asociar conceptos de nutrición, optimización alimenticia y rendimiento económico, es necesario obtener información que permita ajustar las tablas de alimentación, considerando el marcado efecto que tienen el ciclo de muda y el ritmo circadiano sobre la actividad de las enzimas digestivas y el correspondiente aprovechamiento del alimento consumido. Con esta expectativa y procurando mejorar la eficiencia de los alimentos suministrados, en este estudio se evaluó el efecto que tienen estos 2 procesos fisiológicos sobre la actividad enzimática y su relación con el crecimiento y conversión alimenticia.

MATERIALES Y METODOS

Evaluación de la tasa de ingestión

Ciclo de Muda

Cinco camarones en un mismo estadio de muda fueron colocados por acuario (60x30x36 cm) de 50 l. Los animales con peso promedio de 2,69±0,30 g, n=30 fueron alimentados con una dieta de 40% de proteína a las 08:00h y 15:00h suministrando el 10% de su biomasa en cada ocasión. El ensayo se realizó durante 3 ciclos de muda (1 mes) utilizando 6 réplicas (acuarios). La observación e identificación del estadio de muda en el camarón se lo realizó en los urópodos de acuerdo a lo descrito por Smith y Dall (1985) y Robertson *et al*. (1987) para *P. esculentus*, *P. setiferus y P. stylirostris.* Durante este ensayo se estimo la duración del ciclo de muda y sus sub-estadíos (postmuda temprana A, postmuda tardía B, intermuda C, premuda temprana Do y D1, premuda tardía D2 y D3).

Ritmo Circadiano

Seis camarones (6,25±0,39 g n=60) por acuario de 50 l fueron alimentados cada 2h con 1,5 g de balanceado con 40% de proteína. Este estudio se realizó durante 24h con 10 réplicas. Para determinar la tasa de ingestión, en ambos ensayos el alimento no consumido fue sifoneado sobre una malla previamente pesada, después de 2 horas de haber sido suministrado. Este remanente fue lavado con agua destilada y secado en estufa durante 24 horas a 60°C, posteriormente fue pesado para determinar el porcentaje de alimento ingerido en base a la biomasa de cada acuario. Adicionalmente se realizó un blanco (acuario sin camarón, solo pellet) con el objeto de determinar un factor de corrección por pérdida de alimento, debido al movimiento de agua, aireación, sifoneo y lavado de los sobrantes. Este blanco contó con igual número de réplicas al utilizado en ambos ensayos.

La tasa de ingestión fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de ingestión} = \frac{\text{Alimento suministrado - (Alimento no consumido x B)}}{\text{Biomasa del acuario}} \times 100$$

$$\text{Blanco (B)} = \frac{\text{Alimento suministra do}}{\text{Alimento recuperado}}$$

El factor de conversión alimenticia (FCA) fue calculado de acuerdo a la fórmula presentada por Cruz-Ricque y Guillaume (1987) y la tasa de eficiencia proteica con la formula PER= biomasa ganada/proteína suministrada.

Análisis de la actividad enzimática

Ciclo de Muda

Camarones entre 3 y 5g obtenidos de una granja camaronera fueron aclimatados a las condiciones del laboratorio y alimentados con una dieta de 40% proteína. Después de 2 semanas, diez camarones por estadio de muda fueron disectados para extraer sus hepatopáncreas, manteniendo estos a -80 °C hasta la realización de los análisis. Quince horas previas a la selección de animales se sifoneó el alimento no consumido y las heces. El muestreo se realizó en el mismo horario (entre las

09.00h-11:00h), para evitar cualquier efecto del ritmo circadiano en la actividad de las enzimas digestivas y nutrientes a analizar (Cuzon *et al*. 1982; Le Moullac *et al*. 1997).

Ritmo Circadiano

Un total de 680 animales de peso promedio inicial de 1,31±0,14 g fueron distribuidos en 4 tanques exteriores circulares de 10 Tm y alimentados con una dieta de 40% de proteína. El alimento fue repartido 2 veces al día, con una ración equivalente al 10% de su biomasa. A cada tanque se asignó un horario diferente de alimentación (08:00h-16:00h, 10:00h-18:00h, 12:00h-20:00h y 14:00H-22:00h). Este ensayo tuvo una duración de 15 días, con una tasa de recambio diario de agua de 150% y fotoperíodo natural (06h00-18h00). En el último día del experimento, el alimento sobrante fue sifoneado 2h después de la segunda ración, y se mantuvieron a los camarones en ayuno por 48h. Concluido éste período, fueron disectados tres camarones en intermuda, para extraer el hepatopáncreas, realizándose esta rutina cada 2h para cada tratamiento (horario de alimentación), en un periodo de 24h.

Preparación del suero enzimático y métodos de análisis

Un micro homogenizador de tejido (Wheaton®) fue utilizado para macerar el hepatopáncreas en 0,5 ml de agua desionizada y enrasado hasta 1,5 ml en tubos de microensayos (eppendorf®). Los tubos fueron mantenidos en hielo hasta su centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C, tomando para cada análisis alícuotas individuales del sobrenadante, las cuales fueron congeladas a -80 °C. En la Tabla 1 se resumen los métodos empleados para la determinación de la actividad enzimática y de nutrientes en el hepatopáncreas.

Tabla 1. Características de las metodologías empleadas en los análisis de enzimas y nutrientes a temperatura de 25 °C.

Análisis (Autor)	Substrato	Solución Tampón y pH	Actividad específica	Longuitud de onda (nm)
Glicógeno (1)			μg de glucosa/ml	485
Proteína (2)			mg de proteína / g hepatopáncreas	595
Amilasa (3)	Almidón soluble, 1%	Fosfato de Sodio, pH 6,9	(mg maltosa/min/mg proteína	550
Proteasas (4)	Azocaseina 2%	Tris-ClH 50 mM, pH 7,2	mM tirosina/min/mg de proteína	440
Lipasa (5)	β-Naftil caprilato 200 mM,	Tris-ClH 50 mM , pH 7,2	mM ácidos grasos /min/mg de proteína	540

(1) Dubbois *et al.* 1956; (2) Bradford, 1976; (3) Rick y Stegbauer, 1974; (4) García-Carreño y Haard, 1993.

Los resultados de las determinaciones enzimáticas fueron calculados de acuerdo a lo descrito por Bergmeyer *et al.* (1974) y expresados como cantidad de producto liberado/minuto/mg de proteína presente en el hepatopáncreas (actividad específica= U/mg proteína), excepto para la determinación de lipasa que se estableció como una unidad de actividad al incremento de 0,001 de absorbancia.

En el ensayo de ciclo de muda se pesaron los camarones y hepatopáncreas disectados para estimar el índice hepatosomático (IHS).

$$\text{Indice hepatosomático} = \frac{\text{Peso del hepatopáncreas}}{\text{Peso del camarón}} \times 100$$

Ensayo de crecimiento

Ciclo de Muda

Tres raciones de alimento (A, B, y C) fueron evaluados mediante crecimiento, para lo cual se sembraron ocho camarones (1,58±0,17g, n= 192) en acuarios de 50 l, empleándose 8 réplicas por tratamiento. Para el tratamiento A se utilizó una tabla de alimentación (Akiyama y Chuang, 1989). El tratamiento B recibió el 6% de la biomasa, la cual se calculó al promediar la tasa de ingestión de cada uno de los estadios de muda obtenida en el ensayo anterior, más el 1,5% producto de la pérdida de alimento reportada en el blanco. En el tratamiento C la cantidad de alimento fue suministrada en base a la biomasa por estadío de muda. El cálculo fue realizado usando los valores determinados en el ensayo de tasa de ingestión para cada estadio de muda, reemplazando estos en la siguiente fórmula:

$$_{A-D3} = (Y_E/100 \times NC_E) \times PP$$

Donde:

Y= porcentaje de la biomasa correspondiente a cada estadio
NC = número de camarones en determinado estadio de muda
PP = peso promedio de la población presente en el acuario
E = estadio de muda

Los animales de los tres tratamientos fueron alimentados a las 08:00h y 16:00h con una dieta de 40% de proteína, durante 60 días. Los camarones fueron pesados cada quince días para ajustar la ración de alimento a suministrar.

En el tratamiento C, cada dos días se identificó los estadios de muda del 50% de la población de cada acuario, y de todos los animales durante el muestreo de biomasa.

Ritmo Circadiano

Cuatro horarios de alimentación (08:00h-16:00h, 10:00h-18:00h, 12:00h-20:00h y 14:00h-22:00h) fueron evaluados usando 6 réplicas (acuarios de 50 l) por tratamiento (horario de alimentación). Un total de 216 juveniles (1,09 ±0,01 g) fueron sembrados, y alimentados a saciedad 2 veces al día con una dieta de 40% de proteína, registrándose la cantidad de alimento diariamente suministrado por un lapso de 2 meses.

Condiciones del cultivo

Durante los ensayos el foto período fue 12h luz y 12h oscuridad. La tasa de recambio de agua fue 1200% diario, y el agua de mar fue previamente filtrada por arena y filtro de piola y tratada con UV.
Los parámetros físicos del agua medidos semanalmente se mantuvieron en los siguientes promedios: temperatura 24±0,5^{o}C (n=6), oxígeno disuelto 5,08±0,23 ppm (n=6), pH 8,36±0,01 (n=10) y salinidad 34±1µps (n=6).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el programa Data Desk. La prueba de Anderson-Darling fue realizada para establecer la normalidad de los datos y la prueba de Bartle para homogeneidad de varianza. Los datos de actividad específica de las enzimas digestivas obtenidos en el estudio del ritmo circadiano fueron evaluados por un análisis de regresión múltiple. Los resultados expresados como porcentaje fueron transformados por arcoseno previo a un análisis de varianza (ANOVA). Una vez que se verificaron diferencias significativas ($P<0,05$) los datos fueron analizados por la prueba de mínima diferencia significativa (Least Significant Difference, LSD) para contrastes entre tratamientos.

RESULTADOS

Ciclo de muda

Duración

Durante el período de estudio se pudo observar que el ciclo de muda en los juveniles *P. vannamei* con peso promedio de 2,69±0,30 g tuvo una duración aproximada de 11,03±1,13 días. La fase de premuda representó el 50%, intermuda 33,33% y la postmuda 16,67**%** de todo el ciclo de muda (Tabla 2).

Tabla 2. Duración del ciclo de muda en el juvenil *P. vannamei*.
Valor promedio de 3 ciclos de muda (±Error estándar).

	Estadíos de Muda						
	A	B	C	Do	D1	D2	D3
Duración (días)	1	1	4±0,19	1±0,24	2±0,29	2±0,29	1

La figura 1 muestra la relación entre las fases lunares y el número de camarones mudados. En luna nueva**,** aproximadamente el 80% de camarones mudaron en los primeros 5 días contados desde el inicio del aguaje, mientras que en luna llena solo mudaron alrededor del 30% de la población en el mismo período de tiempo. Durante los primeros 5 días de quiebra (marea baja) en cuarto creciente, un 30% de la población de camarones mudó, mientras que en cuarto menguante se incrementó al 47% en el mismo lapso de tiempo.

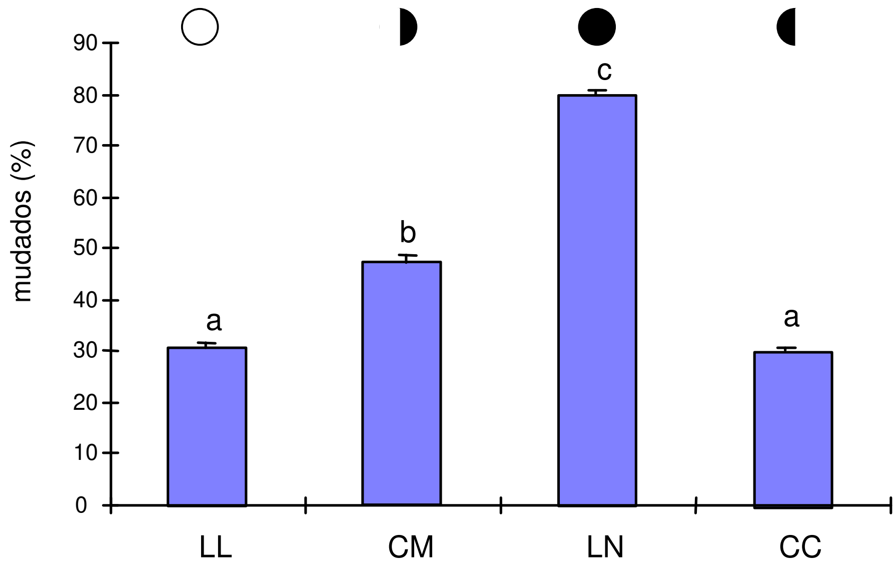

Figura 1. Camarones que mudan por fase de luna. Luna llena (LL); Cuarto menguante (CM); Luna nueva (LN); Cuarto creciente (CC).

Tasa de ingestión

La cantidad de alimento consumido en los estadíos B, C y Do fue significativamente mayor ($P<0,05$) que en los estadíos A, D1, D2 y D3. No se encontró diferencias estadísticas ($P>0,05$) entre B, C y Do ni entre A, D1, D2 y D3. La figura 2 muestra desde premuda D1 hasta postmuda A, un período de consumo de alimento inferior al 3% de la biomasa. Es a partir de postmuda tardía B hasta premuda temprana Do que los camarones aumentan en al menos un 33% su ingestión de alimento alcanzando en intermuda (C) un consumo superior al 50% de lo observado durante premuda D1 a postmuda A.

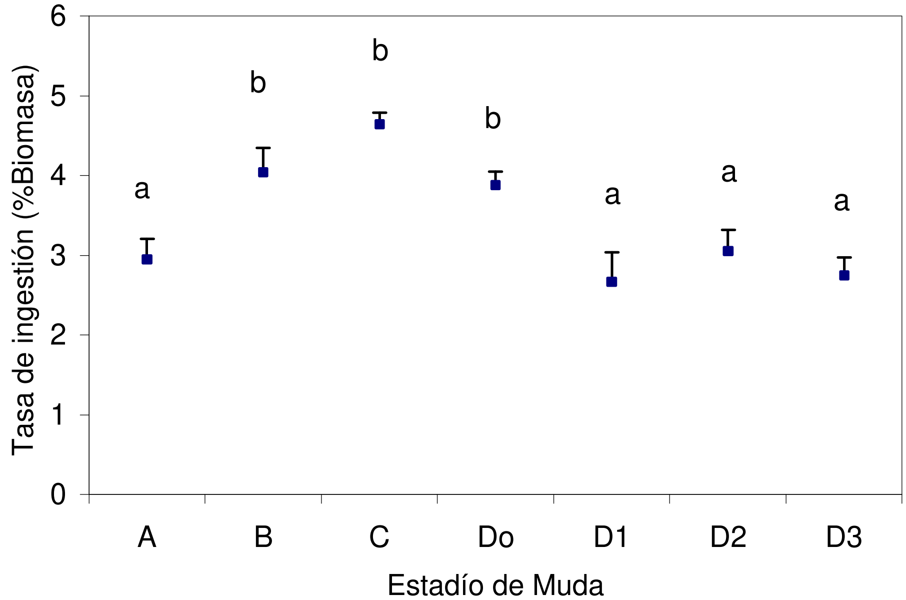

Figura 2. Tasa de ingestión de juveniles *P. vannamei* por estadío de muda obtenida después de 3 ciclos de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=6). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05)

Indice hepatosomático y glicógeno

La figura 3 muestra que los camarones alcanzan un índice hepatosomático (3,7%) significativamente (P<0,05) mayor en los estadíos B, C, Do y D2 comparado con A, D1 y D3 aunque postmuda temprana A no es estadísticamente diferente (P>0.05) de postmuda tardía B.

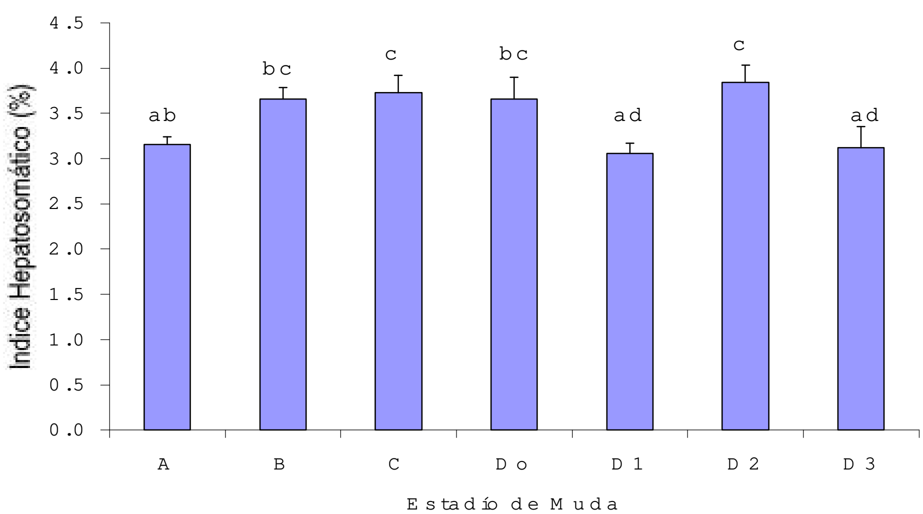

Figura 3. Indice hepatosomático por estadío de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (P>0.05).

En lo que respecta al glicógeno en el hepatopáncreas del camarón, se encontró que existe una concentración significativamente (P<0.05) mayor de este nutriente en los estadíos de postmuda A y premuda D1 y D3. Además se encontró diferencias significativas (P<0.5), entre los estadíos A y B (Fig. 4).

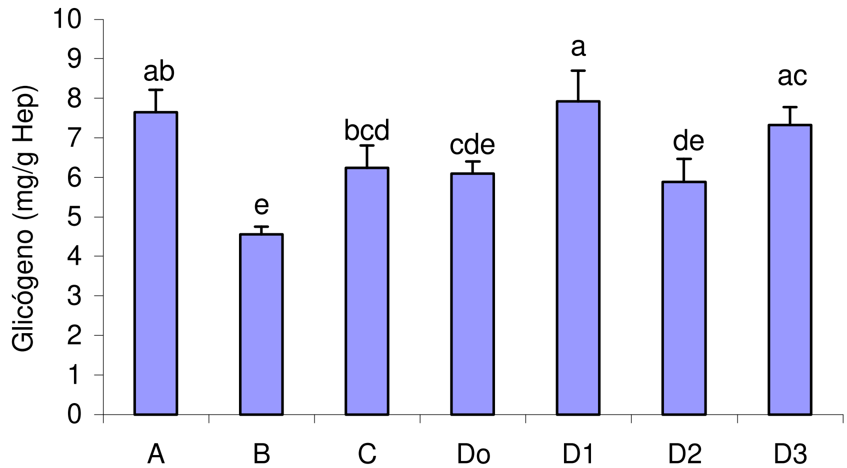

Figura 4. Concentración de glicógeno en el hepatopáncreas del camarón *Penaeus vannamei* por estadío de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (P>0,05).

Actividad enzimática

El LSD determinó la mayor actividad específica (U/mg de proteína) de amilasa en los camarones en estadío Do el cual fue estadísticamente superior (P<0,05) a D1, D3, A, B y C aunque no significativamente diferente (P>0,05) a D2. No hubo diferencias significativas entre la actividad de amilasa en el estadío D2 y los registrado en B y C pero si fue diferente con respecto a D3 y A (Fig. 5).

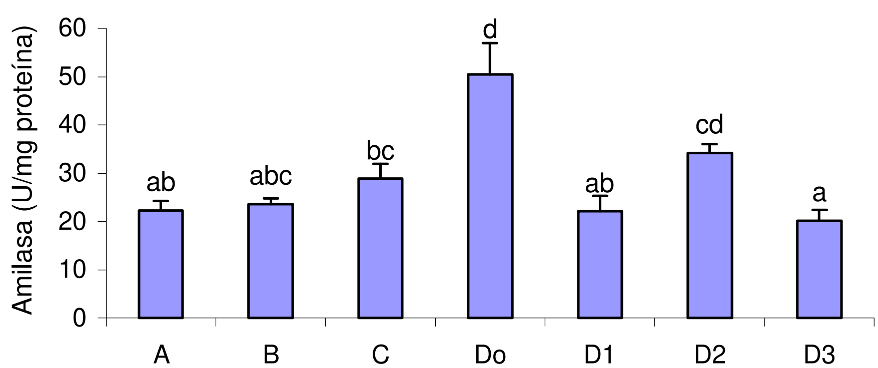

Figura 5. Actividad específica de amilasa por estadío de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (P>0.05).

La actividad específica de lipasa fue significativamente (P<0.05) menor en el estadío D3. La mayor actividad específica fue encontrada en el estadío Do siendo estadísticamente diferente (P<0,05) a los otros estadíos a excepción de C y D2. La actividad de lipasa en los estadíos D1, D2, A, B y C no mostraron ser diferentes estadísticamente (P>0.05) entre ellos (Fig. 6).

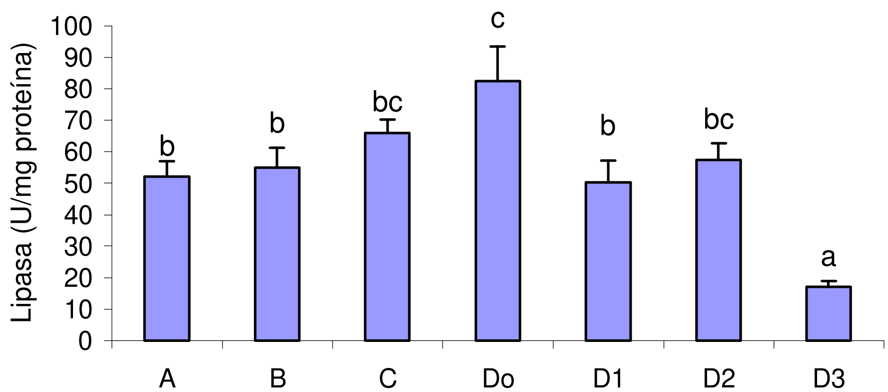

Figura 6. Actividad de lipasa por estadío de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (P>0,05).

La actividad específica de proteasas en los estadíos A, D1 y D3 fue significativamente menor (P<0.05) a los estadíos B, C, Do y D2. No se encontró diferencias estadísticas (P>0.05) entre A, D1 y D3 ni entre B, C y Do (Fig. 7). Un segundo pico de actividad fue registrado en D2 el cual no fue significativamente diferente (P>0.05) de ninguno de los otros estadíos a excepción de D3.

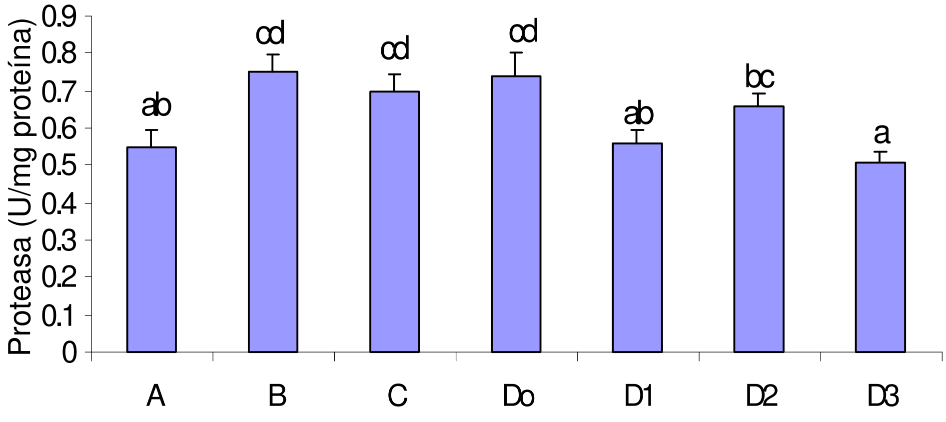

Figura 7. Actividad de proteasas totales por estadío de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (P>0.05).

Crecimiento

Después de 60 días de cultivo el ANOVA no reportó diferencias estadísticas (P>0.05) entre las biomasas finales y tasas de crecimiento específico de los camarones alimentados con las 3 raciones alimenticias (Tabla 3). En tanto que si se observó una diferencia significativa (P<0.05) entre los pesos promedios finales. Los camarones alimentados en base a la tabla de alimentación crecieron 0,78 g significativamente (P<0.05) más que los otros dos tratamientos. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos B y C. Es importante resaltar que, a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticas (P>0.05) entre supervivencias (Tabla 3) los camarones alimentados en función del estadío de muda presentaron una menor mortalidad y variabilidad de resultados entre sus réplicas en comparación con los otros tratamientos aún bajo el continuo muestreo semanal. El grupo de camarones alimentados en función del estadío de muda presentó un factor de conversión alimenticia significativamente menor (P<0.05) a los tratamientos A y B (Tabla 3). No se encontraron diferencias estadísticas (P>0.05) entre estos dos últimos tratamientos. Así también la mejor tasa de eficiencia proteica fue presentada por el tratamiento C y la menor por el tratamiento A (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio (± error estándar) obtenidos después de 8 semanas de alimentación a juveniles *P. vannamei*.

Determinaciones	Tabla de alimentación	6% Biomasa	Ciclo de Muda
Peso promedio inicial (g)	1,56±0,01	1,56±0,02	1,63±0,03
Peso promedio final (g)	5,75±0,25a	4,97±0,26b	4,97±0,18b
Biomasa inicial (g)	12,48±0,24	12,46±0,13	13,08±0,11
Biomasa final (g)	34,06±2,00a	32,14±2,31a	32,98±1,62a
Supervivencia (%)	75±5,27a	81,25±5,27a	82,81±2,29a
Factor de conversión alimenticia	2,12±0,12a	2,45±0,18a	1,18±0,10b
Tasa de Eficiencia proteica	0,82±0,02a	1,21 ±0,01b	1,66±0,04c
Tasa de crecimiento específico (%)	1,77±0,10a	1,66±0,14a	1,64±0,07a

Valores con letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente (P>0.05).

Ritmo Circadiano

Tasa de Ingestión

La mayor cantidad de alimento consumido equivalente al 1,3 y 1,0% de la biomasa fue observado a las 12.00h y 14:00h, respectivamente disminuyendo gradualmente hasta alcanzar el 0,1% a las 24:00h (Fig. 8).

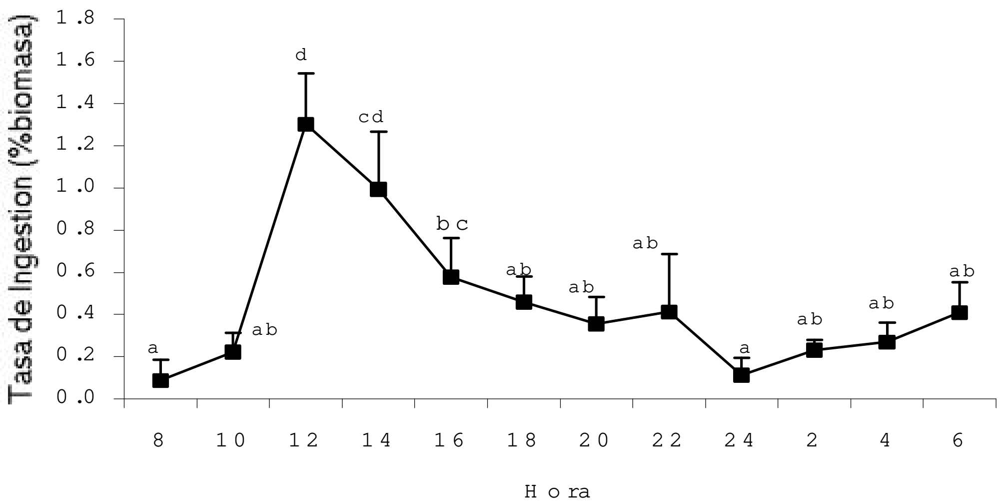

Figura 8. Tasa de ingestión del *P. vannamei* a diferentes horas del día. Las barras verticales indican el error estándar (n=6). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

Tasa de crecimiento

Los 4 grupos de camarones alimentados en cada uno de los horarios de alimentación ensayados no fueron significativamente diferentes (P>0,05) entre si en términos de peso promedio final, tasa de crecimiento específica y supervivencia después de 2 meses de cultivo (Tabla 4). En tanto que se observó una significativamente (P<0,05) mayor biomasa final cuando fueron alimentados en el horario de las 12:00h y 20.00h con respecto a los otros 3 horarios de alimentación. La mejor utilización de la proteína (EP) y del alimento (FCA) fue obtenida cuando el alimento fue suministrado en el horario de 12:00h y 20:00h, estos valores fueron significativamente diferentes (P<0.05) a los otros 3 horarios como lo muestra la Tabla 4. No se encontró diferencias estadísticas (P>0.05) entre estos últimos 3 tratamientos.

Tabla 4. Valores promedio (± error estándar) obtenidos después de 8 semanas de alimentación a juveniles *P. vannamei*.

	Horario de Alimentación			
	08h00 y 16h00	10h00 y 18h00	12h00 y 20h00	14h00 y 22h00
Determinaciones				
Peso promedio inicial (g)	1,08±0,01	1,08±0,005	1,09±0,007	1,01±0,005
Peso promedio final (g)	6,00±0,21ª	6,01±0,26a	6,42±0,21a	6,28±0,29a
Biomasa inicial (g)	9,74±0,06	9,76±0,04	9,78±0,15	9,0896±0,04
Biomasa final (g)	46,85±1,47ª	46,84±1,55a	58,19±2,00b	47,62±2,52a
Supervivencia (%)	79,6±5,3ª	87,0±3,4a	92,6±5,5a	83,3±4,8a
Factor de conversión alimenticia	2,13±0,15ab	2,24±0,05a	1,86±0,04bc	2,35±0,13a
Tasa de eficiencia proteica	1,19±0,07a	1,12 ±0,03a	1,34±0,03b	1,08±0,05a
Tasa de crecimiento específico (%)	3,05±0,07a	3,05±0,07a	3,17±0,07a	3,09±0,09a

Valores con letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente (P>0,05).

Actividad enzimática

El análisis de regresión múltiple mostró una actividad específica (U/mg de proteína) de amilasa, lipasa y proteasa significativamente superior a las 14.00h independientemente del horario de alimentación. Hubo efecto significativo de la hora en que se entregó el alimento sobre la magnitud y aparición de los picos enzimáticos (Fig. 9, 10 y 11). Las mayores actividades de proteasa y lipasa promedio se determinaron en los camarones alimentados en el horario de las 12h00 y 20h00, significativamente superior a los obtenidos en los otros 3 horarios de alimentación (Tabla 5). El suministrar alimento a las 08:00h y 16:00h produjo una significativa (P>0,05) mayor actividad de amilasa seguida por los alimentados a las 12:00h y 20:00h, 10:00h y 18:00h y 14:00h y 22:00h (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad especifica promedio de las enzimas amilasa, lipasa y proteasa de acuerdo al horario de alimentación e independiente de la hora del día.

	Horario de Alimentación			
	08:00h y 16:00h	10:00h y 18:00h	12.00h y 20:00h	14:00h y 22:00h
Enzimas				
Amilasa	11,1±0,7a	4,9±0,4b	8,5±1,2c	3,5±0,2d
Lipasa	64,0±7,4a	76,2±3,6a	96,8±12,1b	53,6±2,5c
Proteasas	0,8±0,001a	0,8±0,001a	1,0±0,1b	0,6±0,001c

Valores con letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente (P>0.05).

DISCUSION

Ciclo de muda

Existen diferentes resultados entre los peneidos respecto a la duración del ciclo de muda. Robertson *et al*. (1987) trabajando entre 27 y 29 ^{o}C con camarones adultos (43-57 g) *P. setiferus* y *P. stylirostris* determinaron que la duración del ciclo de muda fue de 13,6 y 11,5 días para cada especie. En *P. vannamei*, Charmantier *et al*. (1994) y Bentacourt *et al*. (1993) reportaron respectivamente una duración del ciclo de muda de aproximadamente 14 días en juveniles de 10 g y 11,7 días en adultos de 55 g a temperaturas de 28 ^{o}C. Estos resultados son similares a los encontrados en la presente investigación, en la cual camarones de 3 g mantenidos a 25 ^{o}C mudaron en un promedio de 11 días. Contrariamente, Chan *et al.* (1988) reportaron un ciclo de muda de 28-40 días para *P. vannamei* de 11,5-13 cm de longitud. Esta diferencia entre los resultados de los 3 estudios anteriores en *P. vannamei* y el de Chan *et al.* (1988) puede deberse a la baja temperatura del agua (20-22°C) con la que se desarrollo éste último. El prolongamiento del ciclo de muda pudo presentarse como consecuencia de una reducción del metabolismo, ocasionada por un descenso en la temperatura, tal como fue evidenciado para el *P. japonicus* por Choe (1971).

Es conocido que condiciones ambientales como las fases lunares ejercen influencia sobre la fisiología de los crustáceos originando respuestas diversas en éstos (DeCoursey, 1983; Dall *et al*. 1990; Griffith y Wigglesworth, 1993). Así tenemos por ejemplo que el anfípodo *Talitrus saltator* presenta una sincronización de la muda con el ciclo lunar (DeCoursey, 1983).

Los resultados de esta investigación muestran una ritmicidad lunar con el ciclo de muda, encontrándose cerca de la mitad de la población de camarones mudada en cuarto menguante alcanzando el pico máximo en luna nueva (80%). Una sincronización lunar también fue establecida en *P. duorarun*, donde se observó que en luna llena un alto porcentaje de la población de camarones muda en comparación con la luna nueva (Fuss y Ogren, 1966).

Tasa de Ingestión

Ciclo de muda

Después de determinar la tasa de ingestión durante 3 ciclos de muda, se pudo observar un 18% mas de consumo de alimento desde el estadío de postmuda tardía B hasta premuda temprana Do, aunque en término de duración, este periodo y el comprendido entre D1 y A sean iguales, de aproximadamente 6 días cada una. Esta disminución del consumo de alimento en los estadíos previos a la muda también ha sido observado en *P. esculentus* (Dall, 1986) y en *P. vannamei* por (Chan *et al*. 1988) y ha sido recientemente relacionada en crustáceos con la presencia de receptores de ecdiesteroides en el esófago anterior los cuales lo dilatan afectando la ingestión de alimento (Guckler *et al*. 1999). Esta relación podría tener validez si consideramos que en *P. japonicus* y *M. rosenbergii* la concentración total de ecdiesteroides alcanzan su máximo nivel en premuda temprana D1´´´ y regresa a los valores básales en postmuda temprana A (Blais *et al*. 1994). Este último es justamente el periodo donde se observó una reducción del consumo de alimento en este trabajo.

La disminución de la ingestión del alimento en la etapa previa y posterior a la muda (D3-A) junto con el elevado número de camarones que mudan durante luna nueva reportados en el presente trabajo también ha sido observados en *P. brasiliensis* y *P. paulensis* por Brisson (1977) descrito por Dall *et al*. (1990) pero de manera distinta. Ellos señalan un efecto del ciclo lunar sobre la ingestión de alimento e indican el mas bajo consumo de alimento en luna llena, seguido de un incremento en cuarto menguante y luna nueva hasta alcanzar el máximo consumo en cuarto creciente. El conocimiento de una sincronización de la muda de los camarones en sistemas de cultivo comerciales y una probable correlación con el ciclo lunar, puede ayudar a simplificar el suministro de alimento, con el consiguiente ahorro que implica el no proporcionar nutrientes en etapas de menor consumo.

Ritmo Circadiano

Varios autores afirman que existe, dependiendo de la especie, una alimentación circadiana en los camarones adultos, que se incrementa en horas de la tarde y/o noche. En *P. vannamei* (Robertson *et al*. 1993) y *P. setiferus* (McTigue y Feller, 1989) encontraron una conducta alimenticia diurna y nocturna mientras que en *P. esculentus* (Dall, 1986), *P. japonicus* (Reymond y Lagardère, 1990) y *P. monodon* (Cuzon *et al*., 1982) se observó una alimentación preferentemente nocturna. En el presente estudio los camarones alcanzaron el mayor consumo de alimento durante la tarde entre las 12:00h y 14:00h resultado que coincide con lo encontrado por Dall *et al*. (1990) quienes reportan que el *P. duorarum* también se alimenta al mediodía.

Uno de los problemas asociados con la alimentación de camarones es que la dieta artificial tiene una estabilidad limitada en el agua lo que se refleja en una disminución de la tasa de ingestión a medida que el alimento permanece más tiempo en el estanque (Sick *et al*. 1973). Razón por la cual algunos autores consideran que es conveniente alimentar varias veces al día. Robertson *et al*. (1993) y Cortéz-Jacinto *et al*. (1998) sugieren que el *P. vannamei* debería ser alimentado con una frecuencia de por lo menos cuatro veces al día, aunque estos autores difieren entre alimentar durante el día o la noche. Por el contrario, recientemente Velasco *et al*. (1999) determinó, en un sistema de cultivo controlado sin productividad natural y sin recambio de agua, que el incremento de la frecuencia alimenticia no tiene un efecto significativo en el crecimiento y supervivencia del *P. vannamei*, aunque hubo una menor acumulación del nitrógeno total inorgánico cuando alimentaron 2 veces al día (08:00h y 20:00h). Estos 2 contrapuestos resultados en frecuencias alimenticias pueden ser debido a que no se consideraron la hora del día en que hay una mayor actividad de alimentación, o que la cantidad de alimento suministrada al animal en la hora en que realmente fue requerido, resultó ser insuficiente. De ahí que el ritmo circadiano de alimentación debe ser tomado en consideración para optimizar la conversión del alimento en biomasa y disminuir la cantidad de alimento no consumido.

Actividad enzimática

Ciclo de Muda

Muchos estudios se han realizado con el fin de determinar las enzimas digestivas presentes en camarones (Carrillo y Gonzáles, 1998) pero pocos trabajos han evaluado el efecto que tiene el ciclo de muda en la actividad de estas enzimas y su incidencia en la utilización del alimento.

En el presente estudio, los estadíos B, C y Do, que presentaron la mayor actividad específica de proteasa coincidieron con la etapa donde el camarón consume mas alimento. No obstante, estos resultados difieren de los encontrados para la misma especie por Van Wormhoudt *et al.* (1995a) y Klein *et al.* (1996), donde el primer autor señala una mayor actividad específica de quimotripsina medida con BAPNA, en el estadío D2, mientras que el segundo autor reportó una mayor actividad específica de tripsina medida con SAPPNA, en D1. Esta diferencia probablemente se debe a la naturaleza de estos substratos que son específicos, a diferencia de la azocaseína usada en el presente estudio.

El total de lípidos presente en el hepatopáncreas del camarón es mayormente utilizado como reserva de energía durante el ayuno y la muda (Barclay *et al*. 1983). Ando *et al*. (1977) y Teshima *et al*. (1977) reportaron que el *P. japonicus* alcanzó la mayor concentración de lípidos en hepatopáncreas en Do y en todo el animal en D2, respectivamente. Teshima *et al*. (1977) también señalaron una caída del nivel de lípidos en el estadío de premuda tardía. Considerando que la enzima lipasa actúa sobre los lípidos, esto podría explicar por que en este estudio en el estadío Do se produjo la máxima actividad de lipasa y en la etapa previa a la muda D3 la actividad más baja.

Según Van Wormhoudt *et al*. (1995b), la amilasa representa el 1% de la proteína soluble del hepatopáncreas del *P. vannamei*. Fernandez *et al*. (1997), refiriéndose a estudios de Van Wormhoudt (1974), indicaron que el *Palaemon serratus* tuvo picos máximos de actividad de amilasa en C1 y D1-D2 y el *P. kerathurus* en A2, C3-4 y D2. En reproductores *P. notialis*, Fernandez *et al*. (1997) encontraron que la mayor actividad de amilasa en el hepatopáncreas se presentó en la fase de intermuda, sucediendo lo contrario en el estómago donde se incrementó desde premuda temprana alcanzando la máxima actividad en D1 y decreciendo hasta llegar al nivel mas bajo en D4. En el presente trabajo los juveniles *P. vannamei* alcanzan la mayor actividad específica de amilasa en Do y D2, y la menor en D3 durante el ciclo de muda.

Las tres enzimas evaluadas muestran 2 picos de actividad enzimática el primero es considerado como una respuesta al estímulo alimenticio, en este caso una determinada enzima digestiva se expresará en mayor o menor grado dependiendo de la cantidad y origen de los nutrientes (Le Moullac *et al*., 1994, 1997). En tanto que el segundo pico puede ser atribuido principalmente a una estimulación endocrina de la síntesis de enzimas digestivas, por la alta producción de ecdiesteroides observados en premuda D2 para la mayoría de especies de crustáceos decapodos (Skinner, 1985; Chan *et al*., 1988; Blais *et al*., 1994). Ceccaldi (1987) también mencionó la aparición de este segundo pico, solo durante las estaciones del año donde los crustáceos, están en un período de intenso crecimiento y por lo tanto mudando frecuentemente.

El nivel de glicógeno del hepatopáncreas estuvo alrededor de los 6 mg/g encontrado en Metapenaeus por Dall (1965). Una mayor acumulación de glicógeno se observó, a excepción de D2, desde el estadío D1 hasta A en parte por el consumo de alimento y además probablemente por la reabsorción de la quitina presente en el viejo exoesqueleto. Esta última observación puede ser sustentada por el aumento de la actividad de la quitinasa en la fase de premuda tardía en *P. japonicus* (Kono *et al*. 1995). La menor concentración de glicógeno en el estadío D2 probablemente se debió por el aumento de actividad de la amilasa (Figura 5) o a una mayor concentración de la hormona crustacea hiperglicemiante (cHH) mecanismos por los cuales se generaría una cantidad adicional de glucosa para cubrir su requerimiento energético o de síntesis de quitina.

Ritmo Circadiano

En crustáceos se ha encontrado que ciertos fenómenos biológicos ocurren rítmicamente alrededor de la misma hora (De Coursey, 1983). La duración cotidiana del fotoperíodo juega un papel importante en el ritmo circadiano de la actividad enzimática, siendo así, como para el *Paleamon serratus* se llegó a evidenciar por Van Wormhoudt (1977) que el punto máximo de la actividad enzimática se produce en las horas de la mañana, 5 horas después de la transición oscuridad luz, y el segundo en la tarde, doce horas después del primero. En 1998 Sugai y colaboradores, encontraron una mayor actividad de amilasa y maltasa en dos horas del día (04:00h y 18:00h) en juveniles *P. paulensis*. Gonzalez *et al*. (1995) determinaron que en organismos adultos de *P. schmitti* y *P. notialis* la tripsina, quimotripsina y proteasas generales tienen un ritmo bifásico con una separación aproximada de 12 horas entre los dos picos.

Estos resultados son coincidentes con los encontrados en éste estudio, observándose en juveniles *P. vannamei* un ritmo circadiano bifásico claramente definido, de las 3 enzimas analizadas (proteasa, amilasa y lipasa), evidenciado cuando los camarones fueron alimentados a las 12:00h y 20:00h. En este caso la mayor actividad específica de las enzimas citadas se produjo a las 14:00h, con un segundo pico de menor intensidad alrededor de las 02:00h. Una respuesta similar de 2 picos enzimáticos fue referida por Nolasco (1998) en la misma especie pero en horarios distintos de 11:00h y 23:00h, ésta diferencia fue causada probablemente por el foto período en que fue realizado el estudio.

Este comportamiento bifásico, pero menor en actividad enzimática, fue también observado en el horario de 10:00h y 18:00h ensayado en la presente investigación. En tanto que los animales que fueron alimentados a las 14:00h y 22:00h no presentaron picos enzimáticos definidos. Esta diferencia en respuestas de las enzimas digestivas indica el efecto que tienen las horas de alimentación, es decir el estímulo alimenticio, sobre la aparición del pico enzimático. González *et al*. (1995) reportaron en *P. schmitti* la máxima actividad fue alcanzada para la tripsina a las 4 horas, y para quimotripsina y proteasas generales 6 horas posteriores a su alimentación; en tanto que para el *P. notialis* el pico encontrado para las mismas tres enzimas fue después de 7.5 horas. Diaz-Granda (1997) en experimentos relacionados al horario de alimentación en *P. schmitti* bajo condiciones de cultivo semi-intensivo encontró que los camarones alimentados en diferentes horarios presentaban picos de actividad enzimática en diferentes horas, aunque en ciertos horarios se mantenían independientes de la hora de alimentación. En este trabajo la actividad de las enzimas y la hora del día en que aparecieron los picos enzimaticos se vio afectada por el horario en que se entrego el alimento aunque en algunas ocasiones la mayor actividad se expresaba entre las 12:00h y 14.00h.

Estos resultados sugerirían alimentar en mayor proporción a las 12:00h que es cuando se produce la mayor ingestión del alimento seguida por la mayor actividad de las 3 enzimas digestivas estudiadas. El segundo pico enzimático sugiere entregar la ración a las 02:00h que en base a lo observado sería conveniente alimentarlo 2h antes.

El comportamiento de algunas especies como sucede con los Peneidos, hace que una gran cantidad de alimento suministrado no sea consumido inmediatamente, sino en pequeñas dosis durante un lapso de tiempo bastante largo (Chamberlain, 1988). Sedgwick (1979) y Jory (1995) sugieren alimentar de 3 a 4 veces al día, como una practica para mejorar crecimiento y conversión alimenticia pudiendo ser una técnica muy efectiva para evitar la pérdida de nutrientes solubles en el agua, tal como ha sido comprobada por Reymond y Lagardere (1990).

Supervivencia y Crecimiento

Un aumento progresivo de la supervivencia (del 5 al 11%), fue observado a medida que el alimento fue suplido en raciones acordes al ciclo de muda y al horario de alimentación. La causa fisiológica para este incremento de supervivencia no es conocida, pero puede ser relacionado a que el suministro de alimento, en cantidades ajustadas a la capacidad de ingestión del camarón, promueve un mejor aprovechamiento del alimento. Esto es posible ya que el camarón está recibiendo nutrientes en los momentos de mayor actividad enzimática y en los estadíos de muda u horas de mayor consumo de alimento, tal como fue evidenciado por la mejor conversión alimenticia y eficiencia proteica obtenida en este trabajo.

De las tres raciones alimenticias evaluadas, el mayor peso final fue observado en el tratamiento que seguía la tabla de alimentación, aunque no se encontró diferencias en términos de biomasa ganada entre las 3 raciones. En cuanto a los horarios de alimentación estudiados, a pesar de que se encontró una significativa mayor actividad enzimática y biomasa ganada en los camarones alimentados a las 12:00h y 20.00h no se observó esta misma respuesta a nivel de peso final, esto pudo ser debido a que la segunda ración fue suministrada varias horas antes de que se produjera el segundo pico de mayor actividad enzimática. Esta mayor ganancia de biomasa en este horario es producto del mayor consumo de alimento y la más alta actividad enzimática encontrada entre las 12:00h y 14:00h en esta investigación, y puede ser la explicación de por que Robertson *et al*. (1993) obtuvieron un mayor incremento en peso al alimentar dos veces en el día a *P. vannamei*, que al alimentarlos por la noche en igual dosis.

El establecer el momento del día en que el camarón se encuentra fisiológicamente preparado para aprovechar el alimento que se le esta suministrando es un importante aspecto que no siempre es considerado. Razón por la cual el usar frecuencias de alimentación cercanas a los picos de actividad enzimática y en cantidades acordes al estadío de muda, permitirían obtener un máximo aprovechamiento del alimento.

Por lo tanto, una estrategia de alimentación adecuada a los hábitos naturales de alimentación de la especie en cultivo, y las etapas fisiológicas por las que atraviesa este organismo, permitirá maximizar la eficiencia de utilización del alimento, reducir los excesos de alimentos no consumidos, disminuir el tiempo de exposición del alimento al agua evitando así la consiguiente pérdida de nutrientes por lixiviación y estabilidad física del balanceado.

REFERENCIAS

Akiyama, D.M., Chwang, N.L.M., 1989. Shrimp feed requirements and feed management. In: Akiyama, D. M. (Ed.), Proceedings of the S.E. Asia shrimp farm management workshop. American Soybean Association, Singapore. 75-82.

Ando, T., Kanazawa, A., Teshima, S.,1977. Variation in the lipids of tissues during the molting cycle of prawn. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43, 1445-1449.

Artiles, M.A., Jaime, B. y Galindo, J., 1996. Manejo del alimento en el engorde semi - intensivo del camarón blanco (*Penaeus schmitti*) utilizando comederos. Rev. Cub. Inv. Pesq. 20 (1), 10-14.

Barclay, M.C., Dall, W., Smith, D.M., 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68, 229-244.

Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Grassl, M., Michal, G., 1974. Methods in Enzymology. Academic Press, New York, Vol. I pp: 308-317.

Betancourt, I., Calderon, J., Sagi, A., 1993. Estadios de muda en hembras adultas de *Penaeus vannamei* . Aquaculture Tropical. 1, 13-15

Blais, C., Sefiani, M., Toullec, J.Y., Soyez, D., 1994. *In vitro* production of ecdysteroids by Y-organs of *Penaeus vannamei* (*Crustacea, Decapoda*). Correlation with hemolymph titers. Invert. Reprod. Dev. 26, 3-12.

Boddeke, R.,1983. Survival strategies of penaeid shrimp and their significance for shrimp culture Proceedings of the first international conference in Warmwater Aquaculture, 9-11 February 1983, Hawaii. 1, 13-15.

Boghen, A. D., Ceccaldi, H.J., 1987. Cycle Circadien des Amines Libres et des Proteines de l'Hemolymphe chez *Cancer pagurus*. Biochem. Syst. Ecol. 15, 479-486.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Carrillo, O., Gonzalez, R., 1998. Control de la Digestión en camarones. Manuscrito del IV Simposium de Nutrición Acuícola, 15-18 Noviembre 1998, La Paz, Baja California Sur, México. I Parte.

Ceccaldi, H. J. 1987. La digestión en los crustaceos. In: Espinosa de los Monteros, J. Labarta, U. (Ed.). Nutrición en Acuicultura Vol. I. Industrias Gráficas España pp. 67-84.

Ceccaldi, H. J. 1989. Anatomy and Physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. AQUACOP IFREMER. Actes de Colloque, Advances in tropical aquaculture, 20 February – 4 March 1989, Tahiti, 243-259.

Cortez-Jacinto, E., Villareal, C. H., Portillo, C. G. 1998. Frecuencia y distribución alimenticia en el cultivo intensivo de juveniles del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Resúmen del IV Simposium de Nutrición Acuícola, 15-18 Noviembre 1998, La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.

Cruz-Ricque, L.E., Guillaume, J., Cuzon, G., Aquacop, 1987. Squid Protein effect on growth of four penaeid shrimp. J. World Aquacult. Soc. 18 (4), 209-217

Cuzon, G., Cahu, C., Aldrin, F., Messager, J.L., Stéphan, G., Mével, M., 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. Proc. World Maricul. Soc. 11, 410-423

Cuzon, G., Hew, M., Cognie, D., Soletechnik, P., 1982. Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp, *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture. 29, 33-44.

Chan, S.-M., Rankin, S. M., Keeley, L.L., 1988**.** Characterization of the moult stages in *P. vannamei*: Setogenesis and Hemolymph levels of total protein, Ecdysteroids, and glucose. Biol. Bull. 175, 185-192.

Charmantier, G., Soyez, C., Aquacop, 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the peneid shrimp *Penaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 178, 233-246.

Choe, S., 1971. Body increases during molt and molting cycle cycle of the oriental brown shrimp *Penaeus japonicus*. Mar. Biol. 9, 31-37.

Dall, W., 1965. Studies on the physiology of a shrimp, Metapenaeus sp. (Crustacea: Decapoda: Penaeid). IV. Carbohydrate metabolism. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 16, 163-180.

Dall, W., 1992. Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae. In: Allan, G., Dall, W. (Eds.). Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop. Australia. 57-63

Dall, W., 1986. Estimation of routine metabolic rate in a penaeid prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 96, 57-74.

Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C., Staples, D.J., 1990. The Biology of the Penaidae. In: Blaxter, J.H. S., Southward, A.J. (Eds.). Advances in Marine Biology Vol. 27. Academic Press, Cornwall, 489 pp.

DeCoursey, P.J., 1983. Biological timing. In: Vernberg, F.J., Vernberg, W. B. (Eds.), The Biology of crustacea. Vol. 7 Academic press, New York, pp. 107-162.

Díaz-Granda, E., 1997. Horarios de alimentación del camarón *Penaues schmitti* en condiciones de cultivo semi-intensivo. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Marinas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.,1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356.

Fernandez, I., Nolasco, H., Vega, F., Oliva, M., Van Wormhoudt, A., 1998. Variación enzimática digestiva en función del ciclo de muda en el camarón rosa *Penaeus notialis*. Resúmen del IV Simposium de Nutrición Acuícola, 15-18 Noviembre 1998, La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.

García-Carreño, F.L., Haard, N.F., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes Planipes*) and crayfish (*Pacifastacus Astacus*) extracts. J. Food Biochem. 17, 97-113.

González, R., Gómez, M, Carrillo, O., 1995. Variaciones cronobiológicas en la actividad de las principales enzimas proteolíticas de *Penaeus schmitii* y *Penaeus notialis*. Rev. Invest. Mar. 16(3), 177-183

Griffith, D.R., Wigglesworth, J.M., 1993. Growth rhythms in the Shrimp *Penaeus vannamei* and *Penaeus schmitti*. Mar. Biol. 115, 295 299.

Guckler, R., Heinzel, H.-G., Tomaschko, K.-H. 1999. Membrane-Associated ecdysteroid receptors in decapods crustaceans. Ocurrence, Sensitivity, and Neuronal Integration.

Heilman, M., Spieler, R.E., 1999. The daily feeding rhytm to demand feeders and the effects of timed meal-feeding on the growth of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. Aquaculture 180, 53-64.

Hernandez-Cortez, P., Quadros-Seiffert, W., Navarrete del Toro, M.A., Portillo, G., Colado, G., Garcia-Carreño, F.L., 1998. Time series in food ingestion and proteolytic activity of digestive system of juvenile white shirmp, *Penaeus vannamei.* Resumenes del IV Simposium de Nutrición Acuícola, 15-18 Noviembre 1998, La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.

Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D., Van Hormhoudt A., 1996. Molecular Cloning and Secuencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. Int. J. Biochem. Cell Biol. 28 (5), 551-563.

Kono, M., Wilder, M., Matsui,t., Furukawa, K., Koga, D., Aida, K., 1995. Chitinolytic Enzymes activities in the hepatopancreas, Tail fan and Hemolymph of Kuruma Prawn *P. japonicus* during the Molt cycle. Fish. Sci. 61(4), 727- 728.

Le Boulay, C., Hormhoudt A.V., Sellos, D., 1996. Cloning and expression of cathepsin l-like proteinasa in the hepatopancreas of the shrimp *P. vannamei* during the intermolt cycle. J. Comp. Physiol. 166, 310-318.

Le Moullac, G., Van Wormhoudt, A., AQUACOP, 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). Aqua. Liv. Res. 7, 203- 210.

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 208, 107-125.

Lee, P.G., Lawrence, A. L., 1985. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus. J. World Aquacult. Soc. 16, 275-287.

Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1982. A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp Influences of diet, age and species. Physiologist. 25, 241.

McTigue, T.A., Feller, R.J., 1989. Feeding of juvenile white shrimp *P. setiferus*: periodic or continuos?. Mar. Ecol. Prog. Ser. 52, 227-233.

Moureau, C.E., Boucard, C.G., Ceccaldi, H.J., 1984. Variations Circadiennes des Activités Estérases de l'Hémolymphe de *Penaeus Japonicus*. Biochem. Syst. Ecol. 12, 103-107.

Nolasco, H., 1998. Actividad enzimática digestiva ritmos circadianos y su relación con la alimentación de camarón. Manuscritos del IV Simposium de Nutrición Acuícola, 15-18 Noviembre 1998, La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.

Reymond, H., Lagardère, J.P., 1990. Feeding rhythms and food of *P. japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in salt marsh ponds: Role of halophilic entomofauna. Aquaculture 84, 125-143.

Richard, P., Van Wormhoudt, A., Ceccaldi, H.J., 1979. Variations Circadiennes des Acides Aminés Libres du Muscle de *Penaeus Kerathurus*. Biochem. Syst. Ecol. 7, 65-67

Rick, W., Stegbauer, H. P., 1974. A-amylase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, Vol. II pp: 885-894.

Robertson, L., Bray, W., Leung-Trujillo J., Lawrence, A., 1987. Practical Molt Staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus Stylirostris*. J. World Aquacult. Soc. 18(3), 180 – 185

Robertson, L., Lawrence, A., Castille, F.L., 1993. Effect of feeding frequency and feeding time in growth of the *Penaeus vannamei* (Boone). Aquacult. Fish. Manage. 24, 1-6.

Sick, L., White, D., Baptist., 1973. The effect of duration of feeding amount of food, light intensity, and animal size on rate of ingestion of pelleted food by juvenile penaeid shrimp. Prog. Fish Cult. 35(1), 22-26.

Skinner, D. M., 1985. Molting and regeneration. In: Bliss, D. E., Mantel, L. H. (Eds.), The Biology of crustacea. Vol. 9 Academic press, New York, pp. 43-146.

Smith, D., Dall, W., 1985. Moult staging the tiger prawn *Penaeus esculentus* . In: Second Australian National Seminar. PC. Rothlisberg, Hill, B. and Staple, D. (Eds.) Cleveland. Australia. pp. 85-95.

Sridhar, M., Nair, N.J., Sridhar, N., 1995. Trypsin activity as a function of variation in shrimp *Penaeus indicus* (Crustacea/Arthropoda). Indian J. Mar. Sci. 24, 110-112.

Sugai, J., Orenha, C., Lopez, K., 1998. Variaciones circadianas de la actividad de la amilasa y maltasa en juveniles del camarón rosa *Pennaeus pauliensis*. Manuscritos del IV Simposium de Nutrición Acuícola, 15-18 Noviembre 1998, La Paz. B.S.C., México. II Parte

Taechanuruk, S., Stickney, R., 1982. Effect of feeding rate and feeding frequency on protein digestibility in the freshwater shrimp (*Macrobranchium rosembergii*). J. World Aquacult. Soc. 13, 63-72.

Takii, K., Shimeno, S., Takeda, M., Kamekawa, S., 1986. The effect of feeding stimulants in diet on digestive enzyme activities of eel. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 52, 1449-1454.

Teshima, Kanazawa, A., Okamoto, H., 1977. Variation in lipid classes during the molting cycle of the *Penaeus japonicus*. Mar. Biol. 39, 129-136.

Van Wormhoudt, A., 1977. Activités enzymatiques digestives chez *Palaemon serratus*: Variations annuelles de l´Acrophase des rythmes circadiens. Biochem. Syst. Ecol. 5, 301-307.

Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Donval, A., Plaire-Goux, S., Le Moullac, G., 1995a. Chymiotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). Experentia. 51, 159 -163.

Van Wormhoudt, A., Bourreau, G., Lemoullac, G., 1995b**.** Amylase polymorphism in crustacea decapoda: electrophoretic and immunological studies. Biochem. Syst. Ecol. 23, 139-149.

Velasco, M., Lawrence, A.L., Castille, F.L. 1999. Effect of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone), in zero-water exchange culture tanks. Aquaculture 179, 141-148.