



Zootechnical evaluation of *Penaeus vannamei* larvae fed endemic microalgae and a probiotic from the Gulf of California

Evaluación zootécnica de larvas de *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas endémicas y un probiótico del Golfo de California

Torres-Ochoa, E.¹, Cadena-Roa, M. A.^{1*}, Rojas Contreras, M.¹, Cota Sánchez, M. R.², Pacheco-Vega, J. M.³, Zavala-Leal, O.³.

¹Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Unidad Pichilingue. Apartado Postal 19-B. C.P. 23080, La Paz, Baja California Sur, México.

²Instituto Tecnológico de La Paz, Boulevard Forjadores de Baja California Sur No.4720 Apdo. Postal 43-B, C.P. 23080, La Paz, B.C.S., México.

³Universidad Autónoma de Nayarit, Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Bahía de Matanchén Km 12, Carretera a los Cocos, C.P. 63740, San Blas, Nayarit; México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Torres-Ochoa, E., Cadena-Roa, M. A., Rojas Contreras, M., Cota Sánchez, M. R., Pacheco-Vega, J. M., Zavala-Leal, O. (2019). Zootechnical evaluation of *Penaeus vannamei* larvae fed endemic microalgae and a probiotic from the Gulf of California. *Revista Bio Ciencias* 6, e404. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.01.11>



ABSTRACT

Three marine microalgae strains (*Schizochytrium* sp., *Navicula* sp., and *Grammatophora* sp.) and a mix of three probiotic bacteria (*Lactobacillus* spp.) were evaluated to feed white-shrimp larvae (*Penaeus vannamei*). These species were cultured outdoors without temperature or light control. *Chaetoceros muelleri* was cultured with standard techniques and used as control. *Penaeus vannamei* larvae were cultured at densities of 175 nauplii L⁻¹ in 70 L experimental units. Microalgae concentration was maintained between 70,000 and 125,000 cells mL⁻¹ and probiotic at 114 x 103 UFC mL⁻¹. Shrimp larvae were cultured in nauplius stage V and maintained up to Mysis I. The bromatological composition and its performance in larvae were assessed at the end of the experiment. The best survivals were observed in trials with the control *Chaetoceros*

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: November 22nd 2017.

Accepted/Aceptado: July 3rd 2018.

Available on line/Publicado: March 21st 2019.

RESUMEN

Se evaluaron tres cepas de microalgas marinas (*Schizochytrium* sp., *Navicula* sp. y *Grammatophora* sp.) y una mezcla de tres bacterias probióticas (*Lactobacillus* spp.) para alimentar larvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Estas especies fueron cultivadas al exterior sin control de temperatura y de luz. *Chaetoceros muelleri* se cultivó con técnicas estándar y se utilizó como control. Las larvas de *Penaeus vannamei* se cultivaron a densidades de 175 nauplios L⁻¹ en unidades experimentales de 70 L. La concentración de microalgas se mantuvo entre 70,000 y 125,000 células mL⁻¹ y el probiótico a 114 x 103 UFC mL⁻¹. Las larvas de camarón se cultivaron en nauplios estadio V y se mantuvieron hasta Mysis I. Al final del experimento, se evaluó la composición bromatológica y su desempeño en larvas. Las mejores supervivencias se observaron en ensayos realizados con *Chaetoceros muelleri* como control (61.6 %), la mezcla de *Grammatophora* sp. y *Schizochytrium* sp. con probióticos (58.3 %) y la mezcla de *Grammatophora* sp. y *Schizochytrium* sp. (55.8 %). Se observó una mortalidad cercana al 100 % con alimentación monoalgal de *Navicula* sp. Estos resultados sugieren que *Grammatophora* sp. + *Schizochytrium* sp. cultivadas al exterior pueden ser empleadas para alimentar larvas de camarón.

*Corresponding Author:

Marco Antonio Cadena Roa, Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Unidad Pichilingue. apartado Postal 19-B. C.P. 23080, La Paz, Baja California Sur, México. Phone: 52(311) 189 8403. E-mail: marco@uabcs.mx

muelleri (61.6 %), the mixture of *Grammatophora* sp. and *Schizochytrium* sp. plus probiotics (58.3 %) and the mixture of *Grammatophora* sp. and *Schizochytrium* sp. (55.8 %). A mortality close to 100 % was observed with *Navicula* sp. monoalgal fed. These results suggest that *Grammatophora* sp. + *Schizochytrium* sp. cultured outdoors can be used to feed shrimp larvae.

KEY WORDS

Penaeus vannamei, *Lactobacillus*, larvae culture, bromatological composition.

Introduction

The use of microalgae as food for shrimp larvae during the first life stages is a common practice in shrimp farming. As live food, microalgae are a source of high-quality nutrients given the varied content of essential aminoacids and fatty acids that are fundamental for shrimp growth and development (Pedroza-Islas, 2002). In shrimp-culture systems of tropical and subtropical areas, different strategies are implemented: microalgae can be supplied as single (monoalgal) or as several mixed species. Unfortunately, these feeding strategies are limited due to the reduced number of species that can be incorporated into shrimp culture, which are maintained at temperatures ranging 26-31 °C, while microalgae need controlled temperatures that range 22-26 °C, causing problems related to thermal shock. In addition, the unknown origin of these species in many cases results in ecological impacts and increases production costs due to the putative presence of non-native species (Gozlan, 2010).

Aquaculture faces a number of challenges to develop as profitable and sustainable activity. One of the most important challenges is to achieve aquaculture production without exploiting natural resources such as soil or water (Crab *et al.*, 2012). In this sense, some microalgae can promote bacterial growth in discontinuous cultures, enhancing metabolite products that are beneficial for the development of shrimp larvae. Over the last few years, this process has generated interest towards the use of probiotic bacteria in shrimp-culture systems (Leal *et al.*, 2010).

PALABRAS CLAVE

Penaeus vannamei, *Lactobacillus*, cultivo de larvas, composición bromatológica.

Introducción

La utilización de microalgas en el alimento de larvas de camarón durante las primeras etapas de vida es una actividad frecuente en los criaderos de cultivo. Esto se debe a que, como alimento vivo, son una fuente de nutrientes de alta calidad por la variedad de aminoácidos y ácidos grasos esenciales que contienen, los cuales son parte fundamental para el desarrollo y crecimiento de los camarones (Pedroza-Islas, 2002). Para suministrarlas en los criaderos de camarón instalados en áreas tropicales y subtropicales, se siguen varias estrategias, que es posible incluirlas como una sola especie (monoalgal) o mediante la mezcla de varias especies. Desafortunadamente, estas estrategias de alimentación se ven limitadas por el número reducido de especies que se pueden incorporar a los cultivos de camarón, los cuales se mantienen a temperaturas de 26-31 °C, mientras que las especies de microalgas requieren condiciones controladas de temperatura en un rango de 22-26 °C, lo que conlleva a problemas de shock térmico. Adicionalmente, el uso de estas especies de origen desconocido en muchos de los casos provoca impactos ecológicos en estos ambientes y mayores gastos de producción, ya que en varias ocasiones son especies no nativas de la región (Gozlan, 2010).

En la actualidad, la acuicultura está obligada a cumplir con una serie de retos para lograr desarrollarse como una actividad económicamente redituable y sustentable. Dentro de estos retos destaca el lograr la producción de productos provenientes del cultivo sin la explotación de los recursos naturales tales como la tierra o el agua (Crab *et al.*, 2012). En este sentido, existen algunas microalgas capaces de promover el crecimiento bacteriano en cultivos discontinuos, los cuales mejoran los productos de metabolitos beneficiosos para el desarrollo de las larvas de camarón. En los últimos años, este proceso ha generado un creciente interés por el uso de bacterias probióticas en los sistemas de cultivo del camarón (Leal *et al.*, 2010).

Por otro lado, cuando las bacterias y microalgas se cultivan en conjunto, se hacen más digeribles por larvas y pequeños organismos marinos, y estimula su crecimiento y supervivencia. Las bacterias participan activamente en el proceso de digestión de las microalgas suministradas debido a la producción de enzimas externas al sistema digestivo de

When microalgae and bacteria are cultured together, they become more digestible by larvae and other small marine organisms, stimulating growth and survival. Bacteria are actively engaged in the process of digestion of microalgae due to the production of enzymes that are external to the digestive system of larvae (Riquelme & Avendano-Herrera 2003). According to Natrah *et al.* (2013), microalgae act as capsules that incorporate beneficial bacteria into the digestive system of shrimp larvae. In addition, microalgae contribute to larval feeding with nutritional elements and compounds that inhibit the growth of pathogenic microorganisms, either by competitive exclusion mechanisms or by producing bactericide substances. Moreover, mixed cultures of bacteria and microalgae can promote microalgae growth in the culture systems (De-Bashan & Bashan, 2010). Although it is worth noting that the presence of microalgae and bacteria can affect the digestive physiology of shrimp.

The enzymatic activity, mobilization and storage of reserve energy have been evaluated for qualitative and quantitative determination of proteins, lipids and carbohydrates (Arcos-Ortega *et al.*, 2015). Nevertheless, the aquaculture industry must promote research for novel species of marine microalgae and bacteria that are able to maintain an efficient culture performance and present characteristics that enhance nutritional quality, especially digestive processes and water quality improvements (Crab *et al.*, 2012; Simões *et al.*, 2002). This type of research can positively impact shrimp culture, particularly improving the growth stage. In this regard, it has been detected that some bacteria-microalgae associations such as BFT (biofloc) in shrimp culture present dynamic processes due to the environmental variables that impact the systems, triggering the generation of metabolites that benefit shrimp welfare (Jagadeesan *et al.*, 2014; Natrah *et al.*, 2013). For instance, bacteria from the genus *Bacillus* can improve nutrient digestibility in shrimp larvae (Aguirre-Guzmán *et al.* 2012; Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). Furthermore, the temperature range of the environment in which bacteria and microalgae live is a variable that may influence microalgae-bacteria-shrimp interactions. Although it is not possible to generalize the effect of temperature over mutualist species, it is possible to predict whether bacteria and algae strains isolated from similar environments will show a positive interaction, and thus allow to generate balanced and controlled

las larvas (Riquelme & Avendano-Herrera, 2003). De acuerdo con Natrah *et al.*, (2013), las microalgas actúan como cápsulas que incorporan bacterias beneficiosas al sistema digestivo de las larvas. Además, contribuyen a la alimentación de las larvas con componentes nutricionales y compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, ya sea mediante mecanismos de exclusión o competitivos o bien, mediante la producción de sustancias bactericidas. Otro de los beneficios de los cultivos mixtos de microalgas y bacterias es la promoción del crecimiento de las mismas microalgas en el medio de cultivo (De-Bashan & Bashan, 2010). Aunque cabe resaltar que, en este tipo de procesos, la fisiología del tracto digestivo de los camarones se puede ver modificada por la presencia de las microalgas y las bacterias.

Se ha evaluado la actividad enzimática digestiva, la movilización y el almacenamiento de energía de reserva para la determinación cualitativa y cuantitativa de proteínas, lípidos y carbohidratos (Arcos-Ortega *et al.*, 2015). Sin embargo, la industria de la acuicultura debe hacer énfasis en investigaciones que identifiquen nuevas especies de microalgas y bacterias marinas que mantengan un rendimiento eficiente del cultivo con características que beneficien la calidad nutricional y en especial sobre los procesos digestivos y mejoramiento de la calidad del agua en los cultivos (Crab *et al.*, 2012; Simões *et al.*, 2002). Este tipo de investigaciones pueden impactar de manera positiva en los cultivos de camarón, en especial en la mejora en la etapa de crecimiento. En este sentido se ha visto que, para el cultivo del camarón, la relación bacterias-microalgas como BFT (biofloc) incorporadas al cultivo presenta un proceso dinámico debido a las variables ambientales que impactan en éste, desencadenando la generación de metabolitos que benefician el buen estado de los camarones (Jagadeesan *et al.*, 2015; Natrah *et al.*, 2013). Por ejemplo, las bacterias del género *Bacillus* pueden mejorar la digestibilidad de nutrientes en larvas de camarón (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2012; Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). El rango de temperaturas del medio en el que habitan las bacterias y microalgas es una variable que puede influir en la interacción microalgas-bacterias-camarones. Aunque no es posible generalizar el efecto de la temperatura sobre las especies mutualistas, sí es posible predecir si las cepas de bacterias y algas aisladas de ambientes similares mostrarán una interacción positiva, lo que permitirá generar sistemas de cultivo equilibrados y controlados, sobre todo en el control de la calidad del agua (Zhou *et al.*, 2009).

Actualmente, el número de especies de microalgas utilizadas comúnmente en acuicultura es limitado. Si se diversifica la variedad de microalgas a utilizar en esta actividad, se podrán fortalecer las áreas de producción de alimento vivo, generar mejoras en la calidad nutricional y disminuir afectaciones biológicas de los propios sistemas de cultivo (Crab *et al.*,

culture systems, mainly for water quality control (Zhou *et al.*, 2009).

The number of microalgae used in aquaculture is limited. If the variety of species used in this activity is diversified, areas of live feed production may be reinforced, the nutritional quality improved and the biological diseases within culture systems decreased (Crab *et al.*, 2012). By including new microalgae species in aquaculture, an optimization of intensive systems is expected, as well as the promotion of sustainable practices for shrimp development and water quality, which will allow to reduce production costs.

In this study, the effect of including four novel strains of probiotic microalgae and bacteria in diets of shrimp cultured in a subtropical environment (Bahía de La Paz, Mexico) was assessed. Several shrimp diets were evaluated with the following addition methods: monoalgae, mixed microalgae, and microalgae mixed with probiotic bacteria from laboratory strains (obtained from the digestive tract of an adult individual of *Penaeus vannamei*) containing *Lactobacillus* sp. (Keys: TD23, TD219, and R42C). In order to determine the capacity of shrimp larvae to digest the nutritional compounds contained in microalgae, we evaluated changes in the proximal composition of *P. vannamei* with different feeding strategies using microalgae and probiotic bacteria.

Material and Methods

Culture of microalgae and probiotic bacteria

The microalgae evaluated in this study were collected in Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mexico. These were isolated and preserved in the strain repository at Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS). Culture mediums were enriched in F/2 culture medium (Guillard, 1975). Strain culture was maintained in test tubes and flasks under controlled conditions and inoculating in progressive volumes. Fernbach flasks (≥ 1 L), carboys, and cylindrical translucent polycarbonate tanks (300 L) were maintained outdoors without artificial light or temperature control. The 300 L tanks were maintained at semi-continuous cultures (*i. e.* 30 % volume was daily harvested and refilled with enriched and sterilized sea water). This yield was used to feed the shrimp larvae. The experimental treatments were

2012). Con la inclusión de nuevas especies de microalgas se espera la optimización de sistemas intensivos de cultivo, la promoción de prácticas sustentables, tanto en el desarrollo de los camarones como en la calidad del agua de los cultivos, lo cual permitirá la disminución de los costos de producción.

En este trabajo se evaluó el efecto de incluir cuatro nuevas cepas de microalgas y bacterias probióticas en dietas de camarón cultivado en un ambiente subtropical (Bahía de La Paz, B.C.S.; México). Varias dietas de camarón fueron analizadas con distintos métodos de inclusión: monoalgal, microalgas mixtas y microalgas mezcladas con bacterias probióticas de cepas de laboratorio (obtenidas del tracto digestivo de *P. vannamei* adulto), con un contenido de *Lactobacillus* sp. (claves: TD23, TD219 y R42C). Con el propósito de evaluar la capacidad de las larvas de camarón para digerir los compuestos nutricionales contenidos en las microalgas, se evaluaron los cambios en la composición proximal de *P. vannamei* con distintas estrategias de alimentación con microalgas y la adición de bacterias probióticas.

Material y Métodos

Cultivo de microalgas y bacterias probióticas

Las microalgas evaluadas en este estudio fueron recolectadas en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Las microalgas fueron aisladas y preservadas en el depósito de cepas de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS). Los medios de cultivo fueron enriquecidos en medios de cultivo F/2 (Guillard, 1975). El cultivo de las cepas se mantuvo en tubos de ensayo y matraces en condiciones controladas e inoculando en volúmenes progresivos. Los cultivos en matraz (≥ 1 L), garrafones y tanques de policarbonato cilíndricos y translúcidos (300 L) se mantuvieron al aire libre sin luz artificial ni control de temperatura. Los tanques 300 L se mantuvieron en cultivos semicontinuos (30 % del volumen se cosechó diariamente y se completó el nivel de los tanques con agua de mar enriquecida y esterilizada). El rendimiento obtenido de cultivo se utilizó para alimentar a las larvas de camarón. Los tratamientos experimentales se compararon con *Chaetoceros muelleri*, utilizado como control de alimentación; éste se mantuvo a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ con luz continua (2,500 lux) con lámparas de luz de día y aireación constante.

Las cepas de bacterias evaluadas fueron proporcionadas por el depósito de Ciencia y Tecnología de Alimentos (BCSSU) de la UABCS. Las cepas presentaron características de morfología bacilar y no esporulante, catalasa-negativa y gram-positiva. Las bacterias probióticas se reactivaron y

compared with *Chaetoceros muelleri*, used as control feed, which was maintained at 21 ± 1 °C, continuous light (2 500 lux) using day-light lamps, and constant aeration. The bacteria strains evaluated were provided by the strain repository of Ciencia y Tecnología de Alimentos (BCSSU) from UABCS. These strains presented bacillary morphology and non-sporulating, catalase-negative and gram-positive characteristics. Probiotic bacteria were reactivated and cultured in MRS broth at 34 °C. Cultures were conducted at 1 L volumes and centrifuged at 3,500 rpm for 30 min, the supernatant was discarded and bacteria were recovered for resuspension using 500 mL of sterilized seawater to be furtherly added to the tanks (80 mL to each tank, at a density of 1×10^8 UFC mL⁻¹).

Experimental conditions for *Penaeus vannamei*

Penaeus vannamei nauplii (stages 4-5) were acquired from a local shrimp hatchery (Granjas Marinas de Sinaloa, S.A. de C.V.: GRANMAR) in Baja California Sur, Mexico. Nauplii were maintained in a 15 L polyethylene bucket with constant air stream and acclimated at 27–28 °C for 3 h. After hand-blending the bucket content, a volumetric count of the larvae was performed in order to estimate the number of nauplii mL⁻¹ considering 10 samples of 10 mL each, nauplii were distributed in the experimental units afterwards.

The experiment was conducted in an isolated culture room where the environmental temperature was maintained at 30 ± 1 °C using electric heaters. The culture system consisted in 24 units of 120 L flat-bottom glass-fiber tanks placed in a two-row arrangement. All experimental units were supplied with filtered seawater (1 µm), commercial chloride at 35 ppt was added and neutralized for 24 h with sodium thiosulfate. Air was supplied continuously through aquarium diffusers. Photoperiod was 12 -12 h without water exchanges. Seven trials with a control were conducted as follows:

All treatments were performed in triplicate (24 tanks), starting from stage Zoea I to Mysis I. Shrimp larvae were distributed in the treatments of each experiment at a density of 170 Nauplii L⁻¹ (i. e. 11,900 organisms per experimental tank). All experimental units were covered with a polyethylene sheet to avoid pollution among tanks. Temperature, pH, dissolved oxygen, and salinity were recorded on a daily basis using a Hanna HI9828 equipment.

cultivaron en caldo MRS con una temperatura de 34 °C. Los cultivos se realizaron en un volumen de 1 L y se centrifugaron a 3,500 rpm durante 30 min; se descartó el sobrenadante y se recuperaron las bacterias para ser resuspendidas en 500 mL de agua de mar esterilizada. Después de preparar el medio, eran añadidas a los tanques de cultivo (80 mL a cada tanque con una densidad de 1×10^8 UFC mL⁻¹).

Condiciones experimentales para *Penaeus vannamei*

Se utilizaron nauplios de *Penaeus vannamei* (estadios 4-5) proporcionados por el criadero Granjas Marinas de Sinaloa, S.A. de C. V. GRANMAR, localizado en Baja California Sur, México. Los nauplios se mantuvieron en un garrafón de polietileno de 15 L con una corriente de aire constante y se acondicionaron a un rango de temperatura de 27-28 °C durante 3 h. Después de mezclar manualmente el contenido del tanque, se realizó un conteo volumétrico de las larvas para estimar el número de nauplios mL⁻¹ considerando 10 muestreos de 10 mL cada uno. Después del conteo, los nauplios se distribuyeron en las unidades experimentales instaladas.

El experimento se realizó en un área de cultivo aislada en la cual se mantuvo la temperatura a 30 ± 1 °C, utilizando calentadores ambientales eléctricos. El sistema de cultivo consistió en 24 unidades de tanques de fibra de vidrio de fondo plano con una capacidad de 120 L c/u, colocados en un arreglo de 2 hileras. Todas las unidades experimentales eran suministradas con agua de mar filtrada (1 µm), además se añadió una solución de hipoclorito de sodio comercial a 35 ppt. La solución se neutralizó después de 24 horas con tiosulfato de sodio. La aeración fue continua mediante difusores de acuario. El fotoperiodo fue de 12-12 horas y sin recambios de agua. Se realizaron siete ensayos con un control de acuerdo con la siguiente descripción:

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado (24 tanques). El cultivo se comenzó a partir del estadio Zoea I hasta Mysis I. Las larvas de camarón se distribuyeron en cada uno de los tratamientos a una densidad de 170 Nauplios L⁻¹ (11,900 organismos por tanque experimental). Todas las unidades experimentales se cubrieron con una lámina de polietileno para evitar la contaminación entre cada uno de los tratamientos. Diariamente se registró la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la salinidad con el equipo Hanna HI9828.

El régimen de alimentación consistió en la adición de microalgas y dietas mixtas de microalgas y probióticos (ensayos de alimentación de A-H). Las microalgas presentaron una densidad celular de 80,000 a 120,000 células mL⁻¹ en los cultivos larvales, además se añadieron tres cepas de bacterias

Table 1.
Treatments and description of diets for *P. vannamei* larvae under culture conditions.

Tabla 1.
Tratamientos y descripción de dietas para larvas de *P. vannamei* en condiciones de cultivo.

Trial	Description
A.	<i>Chaetocerosmuelleri</i> (control)
B.	<i>Grammatophora</i> sp. (LPU-7)
C.	<i>Schizochytrium</i> sp. (LPU-1)
D.	<i>Navicula</i> sp. (LPU-6)
E.	<i>Grammatophora</i> sp.+ <i>Schizochytrium</i> sp.
F.	<i>Grammatophora</i> sp.+ <i>Schizochytrium</i> sp.+Probiotic
G.	<i>Navicula</i> sp.+ <i>Schizochytrium</i> sp.
H.	<i>Navicula</i> sp.+ <i>Schizochytrium</i> sp.+ Probiotic

The feeding regime comprised the addition of microalgae and microalgae-probiotic mix diets (feeding trial: A - H). Microalgae presented a cell density of 80,000 to 120,000 cells mL⁻¹ and three probiotic bacterial strains were added in equal proportions (1:1:1) to a final density of 114 x10³ UFC mL⁻¹. To determine the effect of diet on the zootechnical parameters of *Penaeus vannamei* larvae, survival and size were recorded from Zoea I to Mysis I stages. Considering all experimental units, the survival of organisms was estimated with the percentage of live organisms recorded at each stage; size was determined on the basis of total length of 50 organisms at the start of the experiment and 20 at the end; identification of the each of the early developmental stages of *P. vannamei* was made considering morphological characteristics (Kitani, 1986). Length was measured in a stereoscopic microscope using a manual micrometer (Reichert).

To evaluate the effect of diet on larvae composition, a sample of Zoea I was collected using a mesh sieve at the start of the experiment, while the remaining larvae were collected at the end. Larvae were washed with distilled water, placed in 55 mL Falcon flasks, lyophilized and stored at -40 °C for bromatological analysis, which consisted on ashes, protein (Bradford, 1976), total carbohydrates (Whyte, 1987) and total lipids (Bligh & Dyer, 1959); the latter was also estimated for microalgae.

To determine the presence of probiotic *Lactobacillus* spp. in the experimental tanks, 2 mL were sampled and

probióticas a proporciones iguales (1:1:1) y se sembraron a una densidad final de 114x10³ UFC mL⁻¹. Para la evaluación del efecto de las dietas en los parámetros zootécnicos de larvas de *Penaeus vannamei*, se llevó a cabo un seguimiento de la supervivencia y el tamaño de etapas de Zoea I a Mysis I. Considerando todas las unidades experimentales, la supervivencia de los organismos se estimó con base en el porcentaje de organismos vivos registrados en cada etapa; el tamaño se determinó con base en la longitud de 50 organismos al inicio del experimento y 20 al final. La identificación de cada una de las primeras etapas del desarrollo de *P. vannamei* se realizó con base en las características morfológicas (Kitani, 1986). La longitud total se midió con un estereoscopio con un micrómetro manual (Reichert).

Para evaluar el efecto sobre la composición de la larva, se colectó una muestra de éstas en estadio Zoea I mediante el uso de un tamiz de 30 µm de luz de malla al iniciar el experimento, el resto de las larvas se recolectó al finalizarlo. Las larvas se lavaron con agua destilada y se colocaron en tubos Falcon con 55 mL de capacidad, se liofilizaron y almacenaron a -40 °C hasta la realización de los análisis bromatológicos, los cuales consistieron en cenizas, proteínas (Bradford, 1976), carbohidratos totales (Whyte, 1987) y lípidos totales (Bligh & Dyer, 1959) éste último también se realizó en las microalgas.

Para determinar la presencia de probióticos de *Lactobacillus* sp. en los tanques experimentales, se tomaron muestras de 2 mL de muestra. La muestra se diseminó (20 µL) en cajas Pretri preparadas con un medio de cultivo MRS, posteriormente se incubaron durante 24 h a una temperatura constante de 34 °C. Después de la incubación se realizó el recuento de colonias. Las muestras se recolectaron al iniciar y al finalizar el experimento.

spread in Petri dishes (20 μ L) containing MRS medium and incubated for 24 h at 34 °C for colonies counts. Sampling was performed at the start and at the end of the experiment.

Statistical analyses

Prior to statistical analyses, normality tests and homogeneity of variance of data were performed. Survival percentage and protein, lipids and carbohydrates contents for microalgae and larvae were transformed to arc-sinus; subsequently, one-way variance analysis was performed at all cases. The effect of diet on growth from Zoea I to Mysis I was evaluated by one-way variance analysis at all trials. In cases where significant differences were found, *a posteriori* Tukey's HSD analysis was applied. Statistical analyses were carried out using STATISTICA 7.0 for Windows software (Statsoft, USA; $\alpha=0.05$).

Results and Discussion

Development of *P. vannamei* in culture

The cell density of microalgae varied among strains. Non-axenic cultures were maintained at semi-continuous conditions since day 4 (Figure 1). Lag phases were observed in all of the curves, this is evidenced by the different growth rates of each microalgae species when compared to the control (*C. muelleri*), which presented defined temperature and light conditions. Since day 4, cell density was affected in 30 % of the cultures, the highest concentrations were found in *C. muelleri*. The biomass concentration and growth potential were detected in the semi-continuous cultures of *Grammatophora* sp., *Schizochytrium* sp. and *Navicula* sp. The maximum concentration was shown on day 9 for the control experiment. The mass outdoor culture of microalgae offers the advantage of acquiring a low-cost live feed; in addition, the use of endemic microalgae for shrimp-larvae production decreases the environmental risks of introducing new species to a foreign habitat. In this connection, this type of research allows to support solutions for the current challenges to achieve an economically sustainable aquaculture, given that it integrates the already existing culture systems (microalgae and shrimp larvae) and that it constitutes a lipid-rich highly-nutritional feeding alternative (Crab et al., 2012).

According to the survival values obtained from stages Nauplii to Mysis I fed different diets (A, B, E and F),

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos previo a la realización de los análisis estadísticos. El porcentaje de supervivencia, el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos para microalgas y larvas, se transformaron en arco seno; posteriormente se realizó un análisis de varianza de una vía para cada caso. Para la evaluación de las dietas sobre el crecimiento de Zoea I y Mysis I se realizó un análisis de varianza de una vía para todos los ensayos. Para los casos donde se encontraron diferencias estadísticas significativas se realizó el análisis de la prueba *a posteriori* de Tukey. Para los análisis estadísticos se utilizó el software STATISTICA 7.0 para Windows (Statsoft, USA; $\alpha=0.05$).

Resultados y Discusión

Desarrollo de *P. vannamei* en cultivo

La densidad celular de las microalgas varió entre las cepas. Los cultivos no axénicos se mantuvieron en condiciones semi-continuas a partir del día 4 de cultivo (Figura 1). Se observaron fases de retraso en todas las curvas, este comportamiento se hace evidente en las diferentes tasas de crecimiento de cada especie de microalgas al ser comparadas con el experimento control (*C. muelleri*), el cual se encontraba en condiciones de luz y temperatura definidas. Se observó que a partir del día, 4 la densidad celular fue afectada en el 30 % de los cultivos, donde se encontraron las concentraciones más altas fue en *C. muelleri*. El potencial de crecimiento y concentración de biomasa en *Grammatophora* sp., *Schizochytrium* sp. y *Navicula* sp., se observó en los cultivos semicontinuos. La concentración máxima se detectó hasta el día 9 en el experimento control, el cultivo masivo al exterior de microalgas ofrece la ventaja de generar un alimento vivo a bajo costo. De manera adicional, el uso de microalgas endémicas en la producción de larvas de camarón disminuye los riesgos ambientales que ocurren si se introducen especies ajenas a la región donde se localizó el cultivo. En este sentido, el uso de este tipo de investigaciones permite reforzar varios de los retos propuestos en la actualidad para generar una acuicultura económicamente sustentable; ya que por un lado se lleva a cabo una integración de los sistemas de cultivo ya existentes (microalgas y larvas de camarón), y por el otro, presenta una alternativa de alimentación con calidad nutricional rica en lípidos (Crab et al., 2012).

En cuanto a los valores de supervivencia obtenidos en las etapas de Nauplio a Mysis I alimentadas con distintas especies de microalgas (A, B, E y F), probióticos y algas mixtas, éstos mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos. Los tratamientos en los que se observó mayor supervivencia fueron los tratamientos donde las larvas se

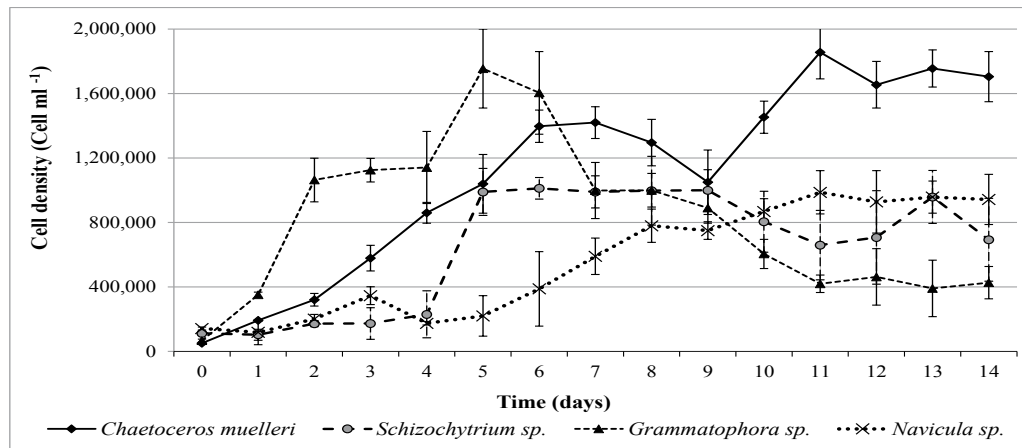


Figure 1. Increase of cell density in four microalgae species under semi-continuous controlled (*Chaetoceros muelleri*) and outdoor (*Grammatophora sp.*, *Schizochytrium sp.* and *Navicula sp.*) mass culture of microalgae.

Figura 1. Incremento de densidad celular en cultivos masivos de cuatro especies de microalgas bajo condiciones semicontroladas (*Chaetoceros muelleri*) y cultivadas al exterior (*Grammatophora sp.*, *Schizochytrium sp.* y *Navicula sp.*).

probiotics and mixed algae, these showed significant differences ($p < 0.05$) among treatments. The best survival was observed in larvae maintained with *Grammatophora sp.*+ *Schizochytrium sp.* (Gr+Sk), *Grammatophora sp.*+ *Schizochytrium sp.* + Probiotic (Gr+Sk+Prob) and *Chaetoceros muelleri* (control), while larvae maintained with *Navicula sp.* presented a mortality near 100 % (Figure 2). Previous publications report good bromatological composition when feeding organisms with this microalgae (*Navicula sp.*), which

mantuvieron con la mezcla de microalgas de *Grammatophora sp.* + *Schizochytrium sp.* (Gr + Sk), *Grammatophora sp.* + *Schizochytrium sp.* + Probiótico (Gr + Sk + Prob) y *Chaetoceros muelleri* (control). El tratamiento donde se alimentaron las larvas con *Navicula sp.* presentó una mortalidad cercana del 100 % (Figura 2). En publicaciones anteriores, se ha reportado una buena composición bromatológica al alimentar a los organismos con dietas que incluyen estas microalgas (*Navicula sp.*), inclusive se ha considerado para la formulación de gránulos para alimentar peces como la especie *Spaurus aurata* (Reyes-Becerril *et al.*, 2013; Pacheco-Vega *et al.*,

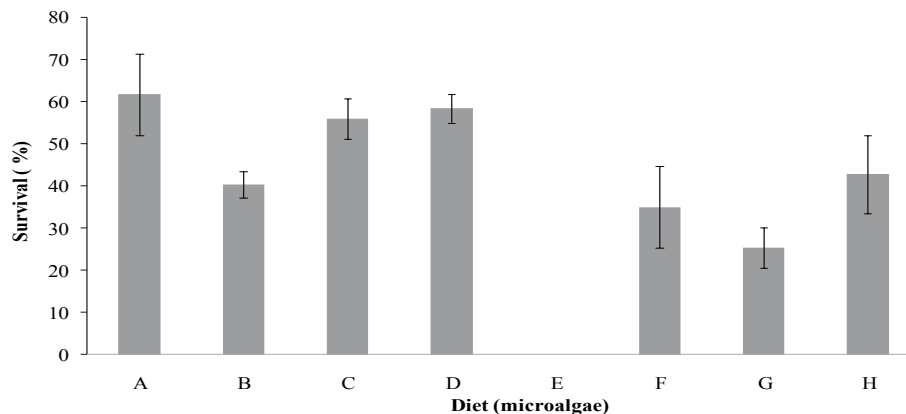


Figure 2. Survival of *Penaues vannamei* at the larval stage Zoea I fed with *Chaetoceros muelleri* (A), *Grammatophora sp.* (B), *Grammatophora sp.*+ *Schizochytrium sp.* (C), *Grammatophora sp.*+ *Schizochytrium sp.* + probiotic (D), *Navicula sp.* (E), *Schizochytrium sp.* (F), *Navicula sp.* + *Schizochytrium sp.* (G), *Navicula sp.* + *Schizochytrium sp.* + probiotic (H).

Figura 2. Supervivencia larval de Zoea I de *Penaues vannamei* alimentadas con *Chaetoceros muelleri* (A), *Grammatophora sp.* (B), *Grammatophora sp.*+ *Schizochytrium sp.* (C), *Grammatophora sp.*+ *Schizochytrium sp.* + probiotico (D), *Navicula sp.* (E), *Schizochytrium sp.* (F), *Navicula sp.* + *Schizochytrium sp.* (G), *Navicula sp.* + *Schizochytrium sp.* + probiotico (H).

has even been considered for the formulation of pellets for fish, such as the species *Sparus aurata* (Reyes-Becerril et al., 2013; Pacheco-Vega et al., 2015a). The bromatological composition of *Navicula* sp. was reported by Curbelo et al. (2004), who, given its good composition, proposed a live feed for shrimp larvae using this strain in combination with *Artemia salina*. In the present research, *Navicula* sp. cells settled in the bottom forming a film, resulting unavailable to larvae, this is because shrimp have a planktonic behavior during the first life stages and do not feed on settled microalgae (Sainzand-Hernández & Cordova-Murueta, 2009). Thus, in this experiment *Navicula* sp. was not consumed.

Larvae size presented differences among experiments, the largest size was reached with the control treatment (3.0 mm) and showed significant differences ($p < 0.05$) with regard to the rest of the trials (Figure 3). It is worth noting that the control treatment and those including monoalgal *Grammatophora* sp., *Grammatophora* sp. plus *Schizochytrium* sp., and *Grammatophora* sp. plus probiotics, reached Mysis I stage in day 9, whereas treatments of single *Schizochytrium* sp., in combination with *Navicula* sp. and probiotics, reached the same stage until day 11. According to this result, size may have been influenced by factors such as water quality

2015a). La composición bromatológica de *Navicula* sp. la reportó Curbelo et al. (2004) y debido a su buena composición, propusieron un alimento vivo para larvas de camarón que incluía una combinación de esta cepa con *Artemia salina*. En este trabajo las células de *Navicula* sp. se depositaron en el fondo formando una película que dificultó su consumo por las larvas, esto debido a que los camarones tienen un comportamiento planctónico en sus primeros estadios no se alimentan de microalgas sedimentadas. En este trabajo las larvas del tratamiento que contenía *Navicula* sp. no fueron consumidas por la razón antes mencionada.

El tamaño de las larvas mostró diferencias entre los tratamientos, en el tratamiento control fue donde se alcanzó la mayor talla (3.0 mm) y presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada con el resto de los tratamientos (Figura 3). Cabe señalar que tanto el tratamiento control como los que incluyen el tratamiento con *Grammatophora* sp., *Grammatophora* sp. + *Schizochytrium* sp., y *Grammatophora* sp. + probióticos, alcanzó la etapa de Mysis I en el día 9, mientras que los tratamientos con *Schizochytrium* sp., en combinación con *Navicula* sp. y con los probióticos, se alcanzó la misma etapa hasta el día 11. Con base en este resultado, es posible que los tamaños alcanzados hayan tenido influencia de los factores tales como la calidad del agua y las características intrínsecas de los géneros y especies de cepas de las algas seleccionadas.

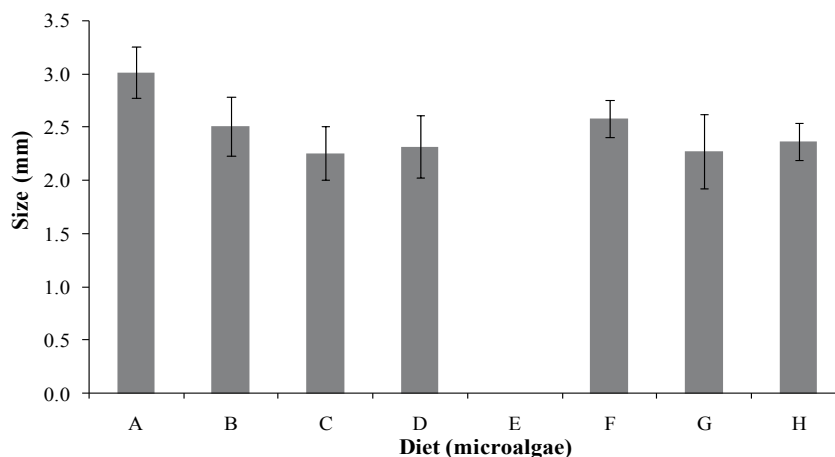


Figure 3. *Penaeus vannamei* sizes at the larval stage Mysis I fed with *Chaetoceros muelleri* (A), *Grammatophora* sp. (B), *Grammatophora* sp.+ *Schizochytrium* sp. (C), *Grammatophora* sp.+ *Schizochytrium* sp.+ Probiotic (D), *Navicula* sp. (E), *Schizochytrium* sp. (F), *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. (G), *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. + Probiotic (H).

Figura 3. Tallas de *Penaeus vannamei* en estadio larval Misis I alimentadas con *Chaetoceros muelleri* (A), *Grammatophora* sp. (B), *Grammatophora* sp.+ *Schizochytrium* sp. (C), *Grammatophora* sp.+ *Schizochytrium* sp.+ Probiótico (D), *Navicula* sp. (E), *Schizochytrium* sp. (F), *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. (G), *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. + Probiótico (H).

and characteristics intrinsic to the genera and species of the strains selected.

In recent years, it has been reported that in addition to bromatological components, around 10 000 secondary metabolites are known for microalgae (Fusetani, 2000), these are taxon-specific (genera and/or species) and may influence the organisms that feed on them (Roy & Pal, 2015; Van Durme *et al.*, 2013). Moreover, the combination of *Grammatophora* sp. and *Schizochytrium* sp. used to feed *Penaeus vannamei* larvae presented high survival. Diets comprising two microalgae species obtain better survival, this is subsequently reflected on benefits to larvae survival due to the varied nutritional supply provided by several microalgae, different from the limited input of a single microalgal diet (Jamali *et al.*, 2015). In our experiment, the microalgae demonstrated to be feasible for culture in outdoor conditions, without temperature or light control. In the present study, water quality remained homogenous among treatments and in acceptable ranges within culture conditions (Boyd & Tucker, 1998). Larval survival, growth and the elapsed time for metamorphosis are attributed to the biochemical composition of microalgae, given that cell components can present variations (proteins, lipids, carbohydrates).

Bromatological composition in shrimp larvae

The physical characteristics of microalgae-cell membranes are directly related to the activity of highly-digestive carbohydrates. Specifically, in trials with *Schizochytrium* sp., given this microalga presents flexible and digestible cell walls and high polysaccharides content (Darley *et al.*, 1973). In our study, the physical and chemical characteristics of feed (microalgae) showed a direct effect on larvae digestion and assimilation of nutrients (Table 2).

The total protein percentage in Zoea I ranged 55.7-66.9 %, the lowest values were found in the diet *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. + Probiotic and the highest in *Grammatophora* sp. For shrimp, protein requirements are of major importance in terms of nutrition. In this experiment, a high content of crude protein was detected in the bromatological analysis of microalgae. Therefore, this diet combination is favorable given that, in addition to the proteic contents, it is also easy to digest by *P. vannamei* larvae. Pacheco-Vega *et al.*, (2015a) reported that these microalgae species present low protein concentrations; however, the protein content is not relevant when analyzed alone, it can be supported

En los últimos años se ha reportado que además de los componentes bromatológicos, se conocen alrededor de 10,000 metabolitos secundarios (Fusetani, 2000) que son específicas de un taxón (géneros y especies) de microalgas y pueden influir en los organismos alimentados con estos (Roy & Pal, 2015; Van Durme *et al.*, 2013). Cabe resaltar que los tratamientos en combinación de *Grammatophora* sp. y *Schizochytrium* sp. utilizados para alimentar las larvas de *P. vannamei*, presentaron alta supervivencia. Las dietas que contienen dos especies de microalgas tienen mejor resultado en la supervivencia, esto se refleja subsecuentemente en beneficios en la supervivencia de las larvas debido al suministro de diversas microalgas con diferente valor nutricional, en contraste a los resultados observados en dietas con una sola microalga (Jamali *et al.*, 2015). Por otro lado, se observó que es factible el cultivo al exterior de las especies de microalgas estudiadas en este trabajo, sin importar la temperatura o el control de la luz. En este sentido, la calidad del agua se mantuvo homogénea entre todos los tratamientos y en rangos aceptables para las condiciones de cultivo (Boyd & Tucker, 1998). La supervivencia, el crecimiento y el tiempo transcurrido para la metamorfosis en las larvas, se atribuyen a la composición bioquímica de las microalgas, dado que los nutrientes de las células pueden variar (proteínas, lípidos y carbohidratos).

Composición bromatológica en larvas de camarón

Las características físicas de la membrana de las microalgas están directamente relacionadas con la actividad de los carbohidratos altamente digestivos. Específicamente los tratamientos en los que se encontraba *Schizochytrium* sp., ya que presentan paredes celulares flexibles y digeribles con un alto contenido de polisacáridos (Darley *et al.*, 1973). En este trabajo las características físicas y químicas de los alimentos (microalgas) presentaron un efecto directo sobre la digestión y absorción de nutrientes por las larvas de camarón (Tabla 2).

El porcentaje de proteína total en el estadio Zoea I se reportó en un rango de 55.7-66.9 %, en donde los valores más bajos se presentaron en las dietas con *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. + Probiótico; el contenido más alto fue en *Grammatophora* sp. Los requerimientos de proteína para el desarrollo del camarón son de gran importancia en términos de nutrición. En este experimento, se detectó un alto contenido de proteína cruda en los análisis bromatológicos en microalgas. Estos resultados indican una combinación favorable, ya que es posible que no sólo sea un alto contenido proteico, sino que además ésta sea fácil de digerir por las larvas de *P. vannamei*. Adicionalmente, Pacheco-Vega *et al.*, (2015a) mencionan que estas especies de microalgas presentan concentraciones bajas de proteínas; si se pretende analizar el contenido proteico por sí solo, este

in combination with different protein sources (plant or animal) or the presence of bacteria (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). Other factors influence the digestive process of feed in larvae, these can be exogenic factors such as temperature, food transit, pH of larvae, and dissolved oxygen, or endogenic factors, such as larvae size and location of the digestive organs, which provide important information to perform a comprehensive analysis on the use of feed by larvae (McGaw & Curtis, 2013). For instance, determining endogenic factors would allow us to characterize the development of the digestive tract of shrimp larvae until adulthood. Sainz-Hernández & Córdoba, (2009) detected that the feeding habits of shrimp larvae are mainly on the basis of microalgae, these habits are modified when they reach the juvenile stage, given that digestive enzymes such as trypsin and chemotrypsin (proteolytic enzymes) start to develop due to predation on small animals, which increases protein requirements in the diet.

Regarding water quality parameters (dissolved oxygen, temperature, and salinity), these were maintained within the optimal range for shrimp culture, thus these variables did not affect our results. A good and constant water quality is desirable for the development of sustainable aquaculture, where natural-resource exploitation must be avoided (Crab *et al.*, 2012).

The total lipid content observed was lower in larvae fed *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp., while higher concentrations were detected in larvae fed *Chaetoceros muelleri* (control) and *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp.+ Probiotic. Pacheco Vega *et al.* (2015b), found that *Grammatophora* sp. present a series of polyunsaturated fatty acids, which may enhance lipid digestibility.

Carbohydrates content ranged 1.76-6.75 %, the lowest value was recorded in Mysis I with *Grammatophora* sp. and the highest percentage was found in larvae fed with *Schizochytrium* sp. These results indicate that the latter microalgae present a high content of carbohydrates; however, there is no evidence that these were digested by *P. vannamei* larvae. As commented earlier, this might be due to the enzymatic adaptation in the late Zoea stage that is caused by changes in feeding habits (Sainz-Hernández & Cordova, 2009), or else to the fact that despite there is no evidence indicating that

valor no es relevante, pero al combinar las distintas fuentes de proteína (ya sean de origen vegetal o animal) o por la presencia de bacterias (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006), se sustenta el contenido de proteína cruda. Existen otros factores que influyen el proceso de digestión de los alimentos en las larvas, por un lado, los factores exógenos, como son la temperatura, el tránsito de los alimentos, el pH de las larvas y oxígeno disuelto, y por otro los factores endógenos, tales como el tamaño de la larva y la ubicación de los órganos digestivos, los cuales complementan la información para realizar un análisis exhaustivo del aprovechamiento del alimento en las larvas (McGaw & Curtis, 2013). Por ejemplo, al conocer los factores endógenos, nos permitirá conocer el desarrollo del tracto digestivo de la larva de camarón hasta convertirse en un camarón adulto. Sainz-Hernández & Córdoba, (2009) mencionan que los hábitos alimenticios de los camarones en estado larvario se basan en el consumo de microalgas, al llegar a su estadio juvenil estos hábitos se modifican, ya que empiezan a desarrollar enzimas digestivas como tripsina y quimotripsina (enzimas proteolíticas), lo cual se debe al consumo de animales pequeños, con lo cual se incrementa su consumo de proteína en la dieta.

En el caso de los parámetros de la calidad de agua (oxígeno disuelto, temperatura y salinidad), estos se mantuvieron dentro del rango óptimo para el cultivo de camarón, por lo que no se tuvo afectación de estas variables en los resultados aquí obtenidos. Es deseable que se conserve la calidad de agua para el desarrollo de una acuicultura sustentable en donde se pretende evitar la afectación del medio ambiente (Crab *et al.*, 2012).

El contenido total de lípidos observado en los resultados es menor en larvas alimentadas con *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. Las concentraciones más altas fueron en la dieta control con *C. muelleri* y en el tratamiento con *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. + el probiótico. De acuerdo con Pacheco-Vega *et al.* (2015b), las diatomeas *Grammatophora* sp., proporcionan una serie de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales pueden favorecer la digestibilidad de los lípidos.

El contenido de carbohidratos se presentó en un rango de 1.76 a 6.75 %. El valor más bajo se obtuvo en el estadio de Mysis I con el tratamiento de *Grammatophora* sp. y el porcentaje más alto en larvas alimentadas con *Schizochytrium* sp. Los resultados obtenidos describen que esta especie de microalga contiene un alto contenido de carbohidratos, sin embargo, no se presentó evidencia que éstos hayan podido ser digeridos por las larvas de *P. vannamei*. Lo anterior es atribuible a los camarones, como ya se ha comentado en el párrafo anterior, que presentan una adaptación enzimática de la etapa tardía Zoea, provocada por el cambio de hábitos

Table 2.
Bromatologic composition (ashes, proteins, carbohydrates and lipids) present in the digestive system of *Penaeus vannamei* larvae fed with different species of microalgae. Mean values and standard deviation are included.

Tabla 2.
Composición bromatológica (cenizas, proteínas, carbohidratos y lípidos) presentes en larvas de *Penaeus vannamei* alimentadas con diferentes especies de microalgas. Se incluyen los valores promedio y desviación estándar.

Treatment (diet)	Proteins (%)	Lipids (%)	Carbohydrates (%)	Ashes(%)
A	55.97 ± 1.81	20.45 ± 2.13	3.12 ± 0.92	19.33 ± 2.96
B	66.90 ± 4.24	16.17 ± 3.41	1.76 ± 0.04	17.67 ± 3.34
C	55.78 ± 4.36	15.73 ± 1.71	4.56 ± 0.96	20.09 ± 20.09
D	58.17 ± 1.42	17.05 ± 1.82	2.91 ± 0.25	17.34 ± 1.33
E	-	19.24 ± 0.84	-	-
F	63.26 ± 6.26	-	4.57 ± 0.64	17.02 ± 0.51
G	55.74 ± 2.88	12.51 ± 2.21	3.68 ± 0.23	18.82 ± 1.66
H	57.65 ± 2.42	21.00 ± 3.64	6.56 ± 0.77	19.09 ± 1.28

Where: *Chaetoceros muelleri* (A), *Grammatophora* sp. (B), *Grammatophora* sp.+ *Schizochytrium* sp. (C), *Grammatophora* sp.+ *Schizochytrium* sp. + Probiotic (D), *Navicula* sp. (E), *Schizochytrium* sp. (F), *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. (G), *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. + Probiotic (H).

Donde: *Chaetoceros muelleri* (A), *Grammatophora* sp. (B), *Grammatophora* sp.+ *Schizochytrium* sp. (C), *Grammatophora* sp.+ *Schizochytrium* sp. + Probiótico (D), *Navicula* sp. (E), *Schizochytrium* sp. (F), *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. (G), *Navicula* sp. + *Schizochytrium* sp. + Probiótico (H).

carbohydrates constitute a basic feeding requirement for shrimp (Jamali *et al.*, 2015), it is possible that the carbohydrate content varied given the presence of microalgae, since carbohydrates are present in cell membranes (Sørensen *et al.*, 2016).

The nutritional input supplied by microalgae and the presence of probiotic bacteria in shrimp larvae cultures enhance carbohydrate digestibility, given that once microalgae cell membranes are broken, the components become available as substrates, allowing the digestion of intracellular proteins and lipids. In this study, similar to lipids, carbohydrate digestibility might have been stimulated by the presence of probiotic bacteria in the culture environment, considering that these Bacteria belonged to the genus *Bacillus*, which contribute with exogenous enzymes that enhance nutrient digestion (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). As shrimp-digestive tract develops from larvae to juvenile stage, shrimp can process food with high-protein content, thus mixed feed (microalgae and/or lactic acid probiotic bacteria) may promote nutrient digestibility in diets. In this study, the

alimenticios (Sainz-Hernández & Cordova, 2009) y aunque no se tenga evidencia de que los carbohidratos representan una necesidad alimentaria básica para los camarones (Jamali *et al.*, 2015), es posible que el contenido de carbohidratos en larvas haya variado por la presencia de las microalgas, ya que estas contienen carbohidratos en las membranas celulares (Sørensen *et al.*, 2016).

El aporte nutricional suministrado por las microalgas y la presencia de bacterias probióticas en los cultivos de larva de camarón mejoran la actividad de los carbohidratos, ya que, al momento de romper las membranas celulares de las microalgas, quedan disponibles sus componentes en calidad de sustratos, lo que permite llevar a cabo la digestión de proteínas y lípidos intracelulares. En este estudio, es posible que, al igual que para lípidos, haya sido posible la digestión de carbohidratos por la estimulación de bacterias probióticas presentes en el ambiente del cultivo. Hay que recordar, que estas bacterias son del género *Bacillus*, las cuales contribuyen con enzimas exógenas para mejorar la digestión de los nutrientes (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). Conforme se desarrolla el tracto digestivo de los camarones desde larvas hasta juveniles, los camarones son capaces de procesar alimentos con un mayor contenido de proteína, es posible que el alimento mixto (microalgas y/o bacterias probióticas ácido lácticas)

mixed diets of native species balanced growth rates and reduced production costs when compared with the non-native *C. muelleri*.

promuevan la digestión de los nutrientes en la dieta. En este trabajo el alimento mixto de especies nativas balanceó el rendimiento del crecimiento y redujo los costos de producción, al compararlo con *C. muelleri*, especie no nativa de la región.

Conclusion

Results in this study suggest that the outdoor culture of *P. vannamei* shrimp larvae fed with mixed feed consisting of *Grammatophora* sp. and *Schizochytrium* sp., native from the Gulf of California, and the probiotic mix of the genus *Lactobacillus* spp. (Key: TD23, TD219 and R42C), isolated from adult *P. vannamei* digestive tract, present high potential for larvae culture. The combination of these mixed diets stimulates shrimp digestive enzymes, which promote the optimal use of food. Using native species in culture systems is environmentally friendly.

Conclusión

Los resultados de este trabajo sugieren que el cultivo al exterior de larvas del camarón *P. vannamei* alimentadas con alimento mixto de *Grammatophora* sp. y *Schizochytrium* sp., nativas del Golfo de California, y la mezcla de bacterias probióticas del género *Lactobacillus* spp. (Clave: TD23, TD219 y R42C) aisladas del tracto digestivo de *P. vannamei* adulto, presentan un alto potencial de cultivo de las larvas. La combinación de estos alimentos mixtos estimula a las enzimas digestivas de los camarones, lo cual permite un aprovechamiento óptimo de los alimentos. Adicionalmente, el utilizar especies nativas es amigable con el ambiente.

Referencias

- Aguirre-Guzmán, G., Lara-Flores, M., Sánchez-Martínez, J. G., Campa-Córdova, A. and Luna-González, A. (2012). The use of probiotics in aquatic organisms: A review. *African Journal of microbiology research*, 6(23): 4845-4857. http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380730221_Aguirre-Guzman%20et%20al.pdf
- Arcos Ortega, F., Sánchez León-Hng, S.J., Rodríguez Jaramillo, C., Burgos Aveces, M. A., Giffard Mena, I. and García Esequiel, Z. (2015). Biochemical and histochemical changes associated with gonad development of the Cortez Geoduck, *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California, Mexico. *J. of Shellfish Research*, 34(1):71-80.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37: 911-917. <https://doi.org/10.1139/y59-099>
- Boyd, C. E. & Tucker, C. S. (1998). *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Kluwer Academic Publishers, USA.
- Curbelo, R., Leal, S., Núñez, N., Quintana, P., Benguela, I., Muñóz, D. and Almaguer, Y. (2004). Cultivo de la microalga bentónica *Navicula* sp. para la alimentación de las primeras postlarvas de camarón blanco. *Revista de Investigaciones Marinas*, 25(2):143-150. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-de-investigaciones-marinas/articulo/cultivo-de-la-microalga-bentonica-navicula-sp-para-la-alimentacion-de-las-primeras-postlarvas-de-camaron-blanco>
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P. and Verstraet, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* (356-357): 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>
- Darley, W.M., Porter D. and Fuller, M. S. (1973). Cell wall composition and synthesis via Golgi-directed scale formation in the marine eucaryote, *Schizochytrium aggregatum*, with a note on *Thraustochytrium* sp. *Archiv für Mikrobiologie*, 90(2): 89-106. <https://doi.org/10.1007/BF00414512>
- De-Bashan, L. E. & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Biore-source Technol*, 101(6): 1611-1627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- Fusetani, N. (2000). *Drugs from the sea*. Karger, Basel, Japon.
- Gozlan, R. E. (2010). The cost of non-native aquatic species introductions in Spain: fact or fiction?. *Aquatic Invasions*, 5(3): 231-238. <https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.3.02>

- Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture of marine invertebrate animals. 29-66 pp. Humason, G. L. (1979). Animal Tissue Techniques. Fourth edition. San Francisco, USA. W.H. Freeman and Company.
- Jagadeesan, K., Kannan, D. and Shettun, N. (2015). Influence of diatom with different densities on survival rate of pre and post larval stages of *Litopenaeus vannamei*. *Revista Internacional de Investigación en Ciencias del Mar*, 4(2): 15-19.
- Jamali, H., Ahmadifard, N. and Abdollahi, D. (2015). Evaluation of growth, survival and body composition of larval white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the combination of three types of algae. *International Aquatic Research*, 7(2): 115-122. <https://doi.org/10.1007/s40071-015-0095-9>
- Leal, S., Miranda A., Curbelo, R. and Hernández, J. (2010). Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. En: CruzSuarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607- 433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 598-619.
- Kitani. H. (1986). Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 52:1131-1139.
- McGaw, I. J. & Curtis, D. L. (2013). A review of gastric processing in decapod crustaceans. *Journal of Comparative Physiology B*, 183(4): 443-465. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0730-3>
- Natrah, F. M., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, F. M. and Defoirdt, T. (2013). Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1): 48-61. <https://doi.org/10.1111/raq.12024>
- Pacheco-Vega, J. M., Cadena-Roa, M. A., Ascencio, F., Rangel-Dávalos and C., Rojas-Contreras, M. (2015a). Assessment of endemic microalgae as potential food for *Artemia franciscana* cultura. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1): 23-32. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-3>
- Pacheco-Vega, J. M., Sánchez-Saavedra, M. P., Cadena-Roa, M. A. and Tovar-Ramírez D., (2015b). Lipid digestibility and performance index of *Litopenaeus vannamei* fed with *Chaetoceros muelleri* cultured in two different enriched media. *Journal of Applied Phycology*, 28(4): 2379-2385. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0750-y>
- Pedroza-Islas, R. (2002). Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. September 3-6, 2002. Cancún, Quintana Roo, México. 438-447.
- Reyes-Becerril, M., Guardiola, F., Rojas, M., Ascencio-Valle, F. and Esteban, M.A. (2013). Dietary administration of microalgae *Navicula* sp. affects immune status and gene expression of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immun*, 35(3): 883-889. Doi: [org/10.1016/j.fsi.2013.06.026](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.026)
- Riquelme, C.E. and Avendano-Herrera, R.E. (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, (76):4:725-736. DOI: [org/10.4067/S0716-078X2003000400014](https://doi.org/10.4067/S0716-078X2003000400014)
- Roy, S.S. and Pal, R. (2015). Microalgae in aquaculture: a review with special references to nutritional value and fish dietetics. In: Proceedings of the Zoological Society, Vol. 68, No. 1, 1-8. Springer India. DOI: [10.1007/s12595-013-0089-9](https://doi.org/10.1007/s12595-013-0089-9)
- Sainz-Hernández, J. C. & Cordova-Mureta, J. H. (2009). Activity of trypsin in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 290(3-4): 190-195. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.034>
- Simões, N., Jones, D., Soto-Rodríguez, S., Roque, A. and Gómez-Gil, B. (2002). Las Bacterias en el Inicio de la Alimentación Exógena en Larvas de Camarones Peneidos: Efectos de la Calidad del Agua, Tasas de Ingestión y Rutas de Colonización del Tracto Digestivo. En: Mememorias VI.Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, Q. Roo, México.
- Sørensen, N., Daugbjerg, N., Richardson, K., Nørregaard, R. D., Espersen, L., Møhl, M. and Nielsen, T., (2016). Succession of picophytoplankton during the spring bloom 2012in Disko Bay (West Greenland)—an unexpectedly low abundanceof green algae. *Polar Biol*. Doi: [10.1007/s00300-016-1952-8](https://doi.org/10.1007/s00300-016-1952-8)
- Whyte, J.N.C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60: 231-241. Doi: [org/10.1016/0044-8486\(87\)90290-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90290-0)
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R. and Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252(2): 516-524. Doi: [org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021)
- Zhou, X., Wang, Y. and Li, W. (2009). Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*. 287: 349-353. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.046>