

Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos

Sylvia Leal ¹, Anselmo Miranda ², Rafael Curbelo ³ y Joicye Hernández ¹

¹ Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16 No. 114, Playa, CP 11300, Ciudad Habana, Cuba

² Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora (CESUES), Unidad Académica Navojoa, Carretera a Huatabampo y Periférico Sur, Navojoa, Sonora, México, 85800

³ Empresa Yaguacam, Grupo Empresarial para el Desarrollo del Cultivo de Camarón, Ministerio de la Industria Alimenticia, Km. 36½ Cienfuegos-Trinidad, Cienfuegos, Cuba.

Email: sylvia@uh.cu y sleallorenzo@yahoo.es

Resumen

La utilización de diatomeas bentónicas en la alimentación de moluscos es amplia sin embargo su empleo en la larvicultura de camarón es incipiente. Su importancia radica en que, además de que disminuye el costo operacional, produce postlarvas de excelente calidad. Se probó el cultivo de *Navicula* sp. y *Amphora* sp. hasta volúmenes masivos, con diferentes fertilizantes y formulaciones del medio Guillard. Se logró sustituir, total o parcialmente, el alimento artificial en postlarvas de *Litopenaeus schmitti* y *L. vannamei*. Las producciones algales en medio Guillard h resultaron muy buenas, así como con zeolitas. Para facilitar el cálculo de la concentración celular en centros productivos se probaron diferentes productos químicos para lograr desintegrar los grumos que forman, resultando el mejor el n-pentano a cualquiera de las proporciones ensayadas. La composición proximal de *Amphora* sp. cultivada en medio h muestra una especie de alto valor nutricional, que aporta un contenido lipídico significativamente superior de las otras formulaciones del medio Guillard y similar en cuanto a proteínas y carbohidratos. La microbiota bacteriana no tuvo diferencias para los diferentes volúmenes. Los productos exocelulares de las diatomeas bentónicas constituyen un potencial probiótico en estos cultivos.

Palabras clave: diatomeas bentónicas, cultivo, zeolitas, camarones, alimentación, bacterias

La posibilidad de cultivar microalgas con fines económicos se investiga desde hace varias décadas. En los años 40 del pasado siglo se iniciaron los estudios para la producción industrial de lípidos y desde los 50 con toda una serie de finalidades, que van desde la producción de proteínas hasta el tratamiento de aguas residuales. Muy recientemente se estudian las condiciones óptimas de cultivo para obtener sustancias antioxidantes (Affan *et al.* 2007). Sin duda alguna, uno de los campos donde ha cobrado mayor auge es el de la acuicultura.

Las diatomeas bentónicas se consideran un grupo poco estudiado y muy rico en diversas formas, géneros y especies, con un alto potencial para ser usado como fuente de alimento vivo para los organismos que se cultivan con interés comercial y que presenten hábitos bentónicos, al menos, en alguna fase de su ciclo de vida. Las especies más estudiadas están representadas por los géneros *Navicula* y *Nitzschia*, seguidas de *Amphora* (Siqueiros, 1994).

Las primeras investigaciones sobre alimentación con diatomeas bentónicas refieren su empleo en abulones en cultivo (Ebert & Houk, 1984; Hahn, 1989; Mazón-Suastegui *et al.* 1992), donde encontraron que las etapas tempranas de desarrollo del abulón *Haliotis* sp. dependen, imprescindiblemente, de diatomeas bentónicas. Estas microalgas están consideradas un elemento crítico para la primera alimentación de las postlarvas de los abulones y su ausencia puede causar hasta un 90% de mortalidad en las mismas (Searcy-Bernal *et al.* 1992a). Estas especies no sólo constituyen un alimento importante en los estadios juveniles tempranos del abulón, sino que también inducen el asentamiento larval en condiciones de cultivo (Searcy-Bernal *et al.* 1992b; Kawamura *et al.* 1995).

En la actualidad son numerosos los trabajos reportados sobre las especies empleadas y las técnicas de cultivo para moluscos, debido a que éstos se adhieren al sustrato y ahí desarrollan parte de su ciclo de vida (Roberts, 2001; Simental & Sánchez-Saavedra, 2003; Carbajal-Miranda *et al.* 2005; Avendaño-Herrera & Riquelme, 2007; Silva-Aciaras & Riquelme, 2008), no siendo así para las postlarvas tempranas de camarón que, al iniciar en

esa etapa sus hábitos bentónicos, comienzan a alimentarse de estos organismos, pero mantienen a su vez una gran capacidad natatoria y capturan alimentos suspendidos en el agua.

Es habitual en el cultivo a gran escala de camarones peneidos iniciar la larvicultura con el suministro directo de microalgas planctónicas o la creación directa de “bloom” de ellas mismas en los tanques de cría. Alfonso y Coelho (1996) recomiendan que, en las etapas finales del ciclo larvario, cuando los organismos alcanzan los hábitos bentónicos, se puede inducir un “bloom”, en este caso, de diatomeas bentónicas. De esta manera, las postlarvas tendrían una mejor disponibilidad de alimento vivo de alta calidad.

Una característica interesante de las diatomeas bentónicas es que tienen la capacidad de colonizar toda la superficie del reservorio donde habite, en las que forman biopelículas o pequeños grumos que pueden mantenerse adheridos al sustrato o en colonias de células suspendidas en el agua, brindando así partículas de diferentes tamaños, asequibles para la alimentación de los estadios postlarvales de camarón. Además, según Griffith *et al.* (1992), el valor nutricional más importante de estas diatomeas es el alto contenido de lípidos que poseen.

Numerosos empresarios de laboratorios de cría de larvas de Ecuador han comentado que existe una mejoría en el crecimiento de las postlarvas y en su aspecto físico general cuando se alimentan con diatomeas bentónicas. A pesar de esto no se han hecho esfuerzos por usar activamente y de forma generalizada los cultivos de *Navicula*, *Cymbella* y *Amphora*, sustituyendo el uso de alimentos artificiales (Griffith *et al.* 1992).

En Cuba se aislaron especies de diatomeas bentónicas, extraídas de los estanques de reproductores o de tanques de precría (Curbelo *et al.* 2004; Almaguer *et al.* 2004) las que se ubicaron taxonómicamente dentro de los géneros *Navicula* y *Amphora*. En el 2006 *Navicula* sp. fue utilizada con éxito en la alimentación de las primeras postlarvas del

camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, donde se obtuvo incrementos en la supervivencia y en la talla y se logró sustituir hasta en un 100% el alimento artificial (Curbelo *et al.* 2006).

Cultivos masivos

Las prácticas más usuales para cultivos masivos de estas especies es colocar superficies de adhesión en diferentes tipos de reservorios.

La forma de medir la concentración de estos cultivos ofrece algunos problemas cuando intentamos hacerlo en las cámaras que se utilizan para el conteo de microalgas planctónicas, ya que la formación de grumos o biopelículas no permiten obtener una cantidad real. Para experimentos de laboratorio es usual hacer los conteos sometiendo las muestras, previamente, a baños de ultrasonido de baja frecuencia, que destruyen estas biopelículas y dan una medida más acertada de la concentración.

No todas las especies tienen la misma adhesión al sustrato (Roberts *et al.* 2000). Se ha encontrado que, por ejemplo, *Navicula* sp., ante un burbujeo fuerte en el momento de tomar la muestra, logra desprenderse de las paredes del recipiente y además se separan entre sí; sin embargo, *Amphora* sp. no se comporta del mismo modo. Esto parte de nuestras observaciones, que no coinciden con las de Tanaka (1986), donde este autor forma cuatro grupos de diatomeas epífitas de macroalgas, según su grado de adhesión y considera *Amphora* spp. menos fuertemente adherida que especies de *Navicula* de pequeño tamaño.

Con fines comerciales y con la premura que muchas veces requieren estos conteos en el proceso productivo, la utilización del desintegrador ultrasónico, lejos de agilizar el proceso, interfiere el flujo de producción. Es por ello que nos propusimos buscar algún componente químico que lograra destruir el mucílago que mantiene unidas las células de *Amphora* sp.

Se ensayaron diferentes productos: etanol, n-hexano, n-pentano, diclorometano y acetona a concentraciones de 5, 10 y 15% cada uno, formalina al 0.5, 0.75, 1, 2, 4 y 6%, además de la sal disódica del ácido etilendiamino tetra-acético ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 20, 30 y 40 ppm, sobre un cultivo de la diatomea bentónica *Amphora* sp en fase exponencial. Los resultados

se analizaron según un ANOVA anidado, para un nivel de significación de 0.05, que nos permitió escoger el producto mejor que nos permitiera agilizar el proceso de conteo en el laboratorio, en un sistema productivo.

Las diferentes sustancias químicas, empleadas como posibles solventes, revelaron que el n-pentano al 5% obtuvo la mayor desintegración, donde se logró una concentración máxima de $739 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, diferente significativamente ($F=2.0$, $P=0,048$) del etanol y el diclorometano, ambos al 15%, así como del testigo (sin solvente) y similar al resto. La densidad mínima se logró para el etanol al 15% donde se alcanzó una concentración de $510 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$

Fertilizantes

La práctica más generalizada es cultivar en medio Guillard f/2 (Guillard, 1975), sin embargo se han ensayado diferentes variantes de este medio y otros alternativos cuando ya se trata de cultivos masivos, con vista a abaratar los costos de producción. Se sabe que la composición bioquímica depende de muchos factores entre los que destacan los nutrientes, la iluminación, la salinidad y la temperatura, entre otros. Por tal motivo el estudio de estos factores permiten manipular la calidad nutricional de las microalgas a suministrar como alimento. Los ensayos con fertilizantes agrícolas han permitido obtener altas cantidades de biomasa microalgal de una adecuada calidad nutricional. Las formulaciones basadas en fertilizantes agrícolas han sido ensayadas en especies planctónicas y más recientemente en especies bentónicas. Este es el caso de los ensayos realizados con las diatomeas bentónicas *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *N. laevis* y *Navicula incerta*, utilizadas para el cultivo de abulón, crecidas en dos medios de cultivo: el Guillard f/2 y uno no convencional basado en un fertilizante agrícola líquido enriquecido con metales trazas y vitaminas en las mismas proporciones que se usan para el medio Guillard f/2 (Simental-Trinidad *et al.* 2001). Ellos obtuvieron que la composición química de las cepas de diatomeas ensayadas fue similar cuando comparaban los dos medios de cultivo e incluso similares también a otras especies como *Amphora catenula*, *Navicula cincta*, *Nitzschia closterium* y otras especies de *Nitzschia* cultivadas en medio Guillard f, según describe Guillard y Ryther (1962) (citado

Sylvia Leal, *et al.* 2010. Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. En: Cruz-Suarez, 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 en trámite. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 598-619.

por Simental-Trinidad *et al.*, 2001). Estos autores concluyen que es posible la utilización de fertilizantes agrícolas en cultivos masivos de microalgas bentónicas porque las especies tienen una composición bioquímica y una tasa de crecimiento similar a los obtenidos con el medio Guillard f/2, con la ventaja de que los costos de producción son sustancialmente reducidos.

Uno de nuestros primeros trabajos (Almaguer *et al.* 2004), con vista a lograr cultivos de diatomeas bentónicas para alimentar postlarvas de camarón, incluyó a dos especies de *Amphora* hasta volúmenes de 5 litros. En este estudio, se determinaron las concentraciones de clorofilas a y c en la fase exponencial del cultivo y se compararon dos medios de cultivo: Guillard f/2 y A-M, donde este último es una formulación más económica para los cultivos en pequeños volúmenes de diatomeas planctónicas, en los centros productivos de camarón en Cuba (Alfonso y Martínez, 1988). Los resultados obtenidos con *Amphora* spp. reflejan un aumento inmediato de la clorofila a en los primeros días de cultivo con el medio Guillard f/2, sin embargo, al aumentar los días de cultivo se incrementó la concentración de este pigmento con el medio A-M. Estos autores, antes citados, concluyen, de forma general, que si bien estos estudios sirven para tener una idea de la composición de estas microalgas, el método de extracción de clorofila, así como el de desintegrador ultrasónico de baja frecuencia, propuesto por Voltolina (1991), no constituyen métodos prácticos para medir la concentración celular en centros productivos.

Con respecto a las clorofilas, estudios posteriores (Leal *et al.* 2008) muestran los contenidos de clorofila a en *Amphora* sp. y comparan varias formulaciones del medio Guillard y dos métodos de determinación: extracción con acetona y mediante fluorímetro. El mayor contenido de clorofila a se obtuvo con el medio Guillard h (F=6.16, P= 0.01) y los métodos empleados estuvieron altamente correlacionados (r = 0.86).

Esta misma especie fue estudiada con diferentes formulaciones del medio Guillard (f, f/2, h y h/2) y con simple y doble proporción de silicatos. Los cultivos se realizaron en volúmenes de 1 l, en condiciones de aireación e iluminación continua y temperatura de 28°C ± 1°C.

Las muestras, tomadas diariamente, fueron sometidas a baño ultrasónico para individualizar las células agrupadas en grumos. La concentración celular se determinó por conteo directo. Las determinaciones de carbohidratos, proteínas y lípidos, peso seco y orgánico fueron realizadas según las técnicas descritas por Arredondo y Voltolina (2007), en la fase exponencial del cultivo.

Entre los resultados obtenidos se encontró que las mayores concentraciones celulares para esta especie se produjeron con el medio Guillard h a partir del cuarto día de cultivo, obteniendo concentraciones muy cercanas a 1×10^6 cel·mL⁻¹ por lo que la incorporación del cloruro de amonio que contiene este medio (al igual que el Guillard h/2) favoreció significativamente su crecimiento (F=4.97; P<0.03). La composición proximal fue similar para los medios ensayados.

En estos estudios se concluyó que la diatomea bentónica *Amphora* sp. puede ser un buen alimento para las primeras postlarvas de camarón *L. vannamei*, debido a las concentraciones que alcanza y al valor nutricional que obtiene cuando se cultiva en el medio Guillard h.

Zeolitas

La utilización de las zeolitas en procesos acuícolas fue propuesta inicialmente con el fin de aprovechar su propiedad de intercambio iónico para el control de la concentración de amonio (Mumpton, 1977). La adición de zeolitas al agua permite, además, disminuir la toxicidad de metales pesados (Jain *et al.* 1996; Gómez-Villa *et al.* 2002).

Las zeolitas se han utilizado con buenos resultados también para el cultivo de microalgas planctónicas marinas (López-Ruiz *et al.* 1995; Voltolina *et al.* 1997; Leal *et al.* 2003a), aunque el motivo de este efecto positivo no es todavía conocido. Inicialmente se sugirió que el mejor crecimiento de las diatomeas pudiera ser debido a una disolución de los silicatos presentes en estos productos (Nieves *et al.* 2000), pero posteriormente se

comprobó que las zeolitas no son solubles en agua o que su disolución es insuficiente para mejorar la producción de los cultivos (Nieves *et al.* 2002). Además, este tipo de enriquecimiento no explicaría el mejor crecimiento de otras microalgas que no requieren silicatos en el medio (Nieves, 2000).

Se investigó la posibilidad de cultivar la microalga bentónica *Amphora cf. marina* con dos formulaciones del medio Guillard (f/2 y h), a las que se les incorporó diferentes cantidades de una zeolita natural cubana enriquecida con fertilizantes. Además se verificó el crecimiento de esta misma especie con diferentes porcentajes de dilución de uno de los medios, utilizando para la dilución un volumen similar de agua de mar adicionada solamente con la misma zeolita (Plasencia *et al.* 2004).

El efecto de la zeolita se verificó adicionando en cada caso 10, 25, 50 y 100 mg·l⁻¹ del producto, además de un control sin zeolita, tanto al medio f/2 como al h. La zeolita sometida a estudios, químicamente tiene el 62% de SiO₂, el 11.2% de Al₂O₃ y el remanente son óxidos de Ca, Na, Mg, Ti y Fe. Este mineral es tratado con una solución de (NH₄)₂HPO₄.

Una de las variables medidas fue la concentración celular, que se cuantificó diariamente. Para la toma de muestras se sometieron los cultivos a agitación continua por burbujeo profuso y la manual efectuada antes de la toma de muestras, con vista a obtener una distribución aproximadamente homogénea y minimizar o eliminar la adhesión de las células a las paredes y al fondo de los recipientes. También se midió la tasa de crecimiento poblacional (K) durante las fases de crecimiento activo (exponencial y lento), hasta alcanzar el valor máximo de la concentración celular, el tiempo medio de duplicación (TD en divisiones/día) y la producción media diaria (P en células producidas/día).

El experimento con el medio Guillard f/2 y las diferentes proporciones de zeolitas duró un total de seis días a diferencia con el medio Guillard h que su duración se extendió a los 9 días. Las concentraciones máximas se alcanzaron entre el tercero y el cuarto día con el

medio Guillard f/2 con 25 y 50 mg·l⁻¹ de zeolitas, resultados similares a los obtenidos con el medio Guillard h, pero durante los días 6 y 5 respectivamente. Con Guillard f/2 los valores medios de K resultaron ser 0.64 en ambos casos, equivalente a 0.92 duplicaciones celulares diarias, en comparación con los valores de 0.54, 0.58 y 0.51 calculados en esa misma fecha para los tratamientos de 10, 100 mg·l⁻¹ y control con f/2, que equivalen a 0.78, 0.83 y 0.74 divisiones/día respectivamente. Esto indicó un efecto positivo de la zeolita, que consistió en una mayor tasa de duplicación en la fase inicial del crecimiento lento, lo cual coincide con los resultados encontrados con *Nannochloropsis gaditana* por Leal *et al.* (2003b) y con varias especies de microalgas marinas por Nieves (2000).

Los parámetros poblacionales registrados con medio Guillard h mostraron una K entre 2.12 y 2.70 y una TD entre 0.327 y 0.256. De acuerdo a Abalde *et al.* (1994), el amonio puede inhibir el crecimiento de algunas microalgas, aún en bajas concentraciones. Por otra parte, su toxicidad ha sido demostrada solamente para pocas especies y además la concentración utilizada es similar al límite inferior de toxicidad indicado por estos autores. Considerando que en la mayoría de los casos el efecto principal del amonio consiste solamente en una inhibición temporal de la utilización de nitratos debida a la absorción preferencial del amonio (Becker, 1994), es concebible que el crecimiento rápido de los cultivos, con entre 3.0 y 3.9 divisiones celulares durante las primeras 24 horas, sea más bien un reflejo de un efecto positivo de la presencia de amonio en este medio.

El experimento que probó las diferentes diluciones del medio Guillard h duró ocho días, al final de los cuales todos los tratamientos se encontraban en fase estacionaria o de muerte y las menores concentraciones fueron las registradas con el 75 y 100% de sustitución del medio con agua de mar adicionada solamente con zeolita.

La tendencia general demuestra una mayor producción con el medio completo hasta el sexto día, pero, con la excepción del tercer día, la sustitución de hasta el 50% del medio con agua no enriquecida y adicionada solamente con zeolita no causó diferencias significativas en producción. Con el 25% de sustitución, no solamente fue posible obtener una

producción similar que con el medio completo, sino que con este porcentaje se obtuvo la mayor concentración alcanzable en las condiciones de este experimento y además, en este caso, la variabilidad fue notablemente menor que con todos los demás tratamientos.

El análisis de los parámetros poblacionales demostró la falta de diferencias significativas entre el crecimiento de esta especie cultivada con el medio completo o con el diluido con el 25% de agua de mar con zeolita, con valores medios de K de 0.61 y 0.56, equivalentes a 0.88 y 0.81 divisiones celulares diarias en el primero y en el segundo caso, y con tasas y tiempos de duplicación significativamente diferentes para las diluciones mayores, lo cual confirma que hasta el 25% del medio Guillard h puede ser sustituido con agua adicionada con $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de este producto, sin modificar la producción diaria de los cultivos de esta microalga.

Las conclusiones que se obtuvieron en estos experimentos indican que el producto zeolítico que se usó tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de la diatomea bentónica *Amphora* cf. *marina*, tanto en el medio Guillard f/2 como en el medio h y la concentración óptima, para obtener el mayor efecto, es $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Con el medio Guillard h se obtienen concentraciones mayores que con el f/2, que indica que la menor concentración de nutrientes del segundo es limitante para la microalga usada en este estudio. En general, el efecto de la zeolita consiste en aumentar la viabilidad de los cultivos y la tasa de división durante la fase de crecimiento lento, que resulta en una producción un 50% superior a la que se obtiene en el medio Guillard h sin zeolita. Es posible obtener la misma producción, medida como concentración celular, sustituyendo el 25% del medio Guillard h con agua de mar adicionada con $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de la zeolita cubana probada.

Microbiota asociada

En la producción de cultivos masivos de microalgas es imposible trabajar con cultivos axénicos debido a las condiciones en que hay que desarrollarlos y a que las células de microalgas secretan sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano (Riquelme &

Avendaño-Herrera, 2003). De esta forma el alimento utilizado en los sistemas de cultivo es mixto y está compuesto, generalmente, por una especie de microalga y una o varias bacterias asociadas. Hay autores que atribuyen a las bacterias efectos beneficiosos sobre las microalgas porque ofrecen sustancias promotoras del crecimiento (Hainse & Guillard, 1974) y otros, como Baker y Herson (1978), que plantearon que cultivos masivos de *Thalassiosira pseudonana* decae a los pocos días debido a que las bacterias producen compuestos nocivos. En 1996, Suminto e Hirayama (citado por Fukami *et al.* 1997) aislaron 12 cepas de bacterias de tanques de cultivo de camarones e investigaron el efecto sobre la microalga planctónica *Chaetoceros gracilis*. De las cepas probadas, 7 produjeron inhibición, 4 no tuvieron efecto y sólo una (*Flavobacterium* sp.) tuvo efecto estimulante.

Con el propósito de identificar la microbiota asociada a los cultivos de microalgas en el escalado progresivo hacia la producción masiva se monitorearon los cultivos de *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira* sp, *Amphora* sp, *Navicula* sp y *Tetraselmis suecica* a diferentes volúmenes (200 ml, 2 l, 15 l y 200 l). Fueron aisladas 100 cepas de bacterias en el medio de Agar Nutriente suplementados con un 2% de NaCl y tomando como criterio de selección las cinco bacterias más frecuentes de cada cultivo en el volumen en estudio.

Los organismos fueron clasificados según sus características macroscópicas y microscópicas, evidenciándose su diversidad por las características de cultivo y morfotintoriales, con gran variedad en cuanto a su morfología colonial de acuerdo a su forma, cromogénesis, opacidad, bordes, consistencia, tamaño, superficie y elevación. Las características morfotintoriales de los aislados en las microalgas fueron clasificadas como: bacterias gram positivas el 68% y el 32% gram negativas. En el estudio de la morfología celular se encontró que el 56% correspondió a bacilos positivos esporulados (con potencial probiótico), el 32% a bacilos negativos asporógenos (asociados a enfermedades en organismos acuáticos) y el 12% a cocos positivos. De las 40 especies más frecuentes aisladas en las microalgas planctónicas, 4 fueron bacilos esporulados positivos, 28 bacilos gram negativos y 8 cocos positivos. Sin embargo, las 40 especies aisladas de los cultivos de diatomeas bentónicas resultaron bacilos esporulados positivos, que nos indican un fuerte potencial probiótico en los productos exocelulares de estas microalgas.

A los 100 aislados se les realizaron las pruebas de motilidad, catalasa, oxidasa y oxidación/fermentación de la glucosa, además de tenerse en cuenta las características morfoculturales y morfotintoriales. Observándose que muchas de las cepas eran iguales se disminuyó a una cifra de 25 los aislados microbianos.

Se procedió a la identificación, hasta el nivel de especie, según la metodología de API 20 NE (bioMérieux, France) para bacterias gram negativas, de API 50 CHB (bioMérieux, France) para bacilos gram positivos esporulados e ID 32 STAPH (bioMérieux, France) para la identificación de cocos positivos, conjuntamente con el software de identificación bacteriana APILAB Plus que consta de una base de datos con diferentes taxa e interpreta los perfiles bioquímicos obtenidos en las galerías de identificación, dando respuesta acerca de los microorganismos en estudio (APILAB Plus, 2001). Después de identificados, se procedió a la determinación de la actividad antimicrobiana, ante cepas de referencias (*Vibrio nereis*, *V. harveyi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*), con la finalidad de determinar su potencial ante diferentes patógenos, empleando el método de difusión en agar.

Como resultados de este ensayo se pudo apreciar que las cepas presentes en los cultivos de diatomeas bentónicas presentaron mayor actividad frente a las cepas de referencias, destacándose las cepas de *Bacillus megaterium*, *B. firmus*, *B. lentus* y *B. licheniformes* ante las cepa de *Pseudomonas aeruginosa* CIP, que es patógena de peces y las cepas de *B. cereus* y *B. smithii* frente a *Vibrio harveyi*.

Estos estudios resumen que la composición de la microbiota bacteriana fue característica de cada tipo de cultivo de microalgas y no tuvo variaciones durante el proceso de escalado. Además, las cepas presentes en los cultivos de diatomeas bentónicas presentaron mayor actividad antimicrobiana que las presentes en las diatomeas planctónicas y el flagelado.

Alimentación en postlarvas tempranas

En Cuba se han realizado diferentes experimentos probando las diatomeas bentónicas aisladas de nuestros estanques como alimento de las primeras postlarvas (PL) de los camarones *Litopenaeus schmitti* y *L. vannamei*. Estos ensayos se realizaron manteniendo la rutina de atención y alimentación que se sigue normalmente en el área de larvicultura de nuestros Centros de Desove.

Uso de *Navicula* sp.

Con *Navicula* sp. se ensayaron diferentes concentraciones de la microalga y distintas proporciones para sustituir el alimento artificial (Curbelo *et al.*, 2006) en las primeras postlarvas (de PL3 a PL10) de *L. schmitti*. Las concentraciones probadas fueron 10, 20 y 30 x 10³ cél·ml⁻¹. El mejor tratamiento resultó al suministrar la diatomea bentónica a concentraciones de 20 x 10³ cél·ml⁻¹, donde se alcanzó un porcentaje de supervivencia de 60% que fue diferente significativamente del resto de los tratamientos.

Las postlarvas alimentadas con 20 x 10³ cél·ml⁻¹ de *Navicula* sp tienen un comportamiento similar, sin diferencias significativas entre los tratamientos, en cuanto a la talla alcanzada que fue de 6.32 mm (para un incremento de 1.60 mm) y en cuanto al peso donde se obtuvo 1.10 mg (para un incremento en 0.63 mg). La calidad de las postlarvas, evaluada por el número de espinas rostrales (4) y pares de ramificaciones branquiales (5), resultó ser diferente en el caso de este mismo tratamiento ya que se observó mayor cantidad de estas últimas. Las ramificaciones branquiales además de jugar un papel importante en el intercambio de oxígeno de la larva con el medio, es un indicador de la adaptabilidad del animal a los cambios abióticos por lo que mientras mayor sea el número de pares de ramificaciones branquiales, más fuerte y resistente es la PL para adaptarse a las condiciones de cultivo. También se observó que el porcentaje de lípidos en el hepatopáncreas fue adecuado, aunque esta característica no fue cuantificada pero nos permite inferir el buen aprovechamiento del alimento suministrado.

Se pudieron comparar estos resultados con los parámetros registrados en el tanque de cría de donde procedían las PL para el experimento, que a su cosecha en PL10 se obtuvo el 59.7% de supervivencia, 3 espinas rostrales, de 5 a 6 pares de ramificaciones branquiales, 6.2 mm de talla y un peso promedio de 1.75 mg.

La baja supervivencia obtenida al utilizar concentraciones de 10×10^3 cél·ml⁻¹ se atribuyó a la carencia del alimento disponible en el medio. Griffith *et al.* (1992) proponen para el uso de *Amphora* sp. esta misma concentración, obteniendo buenos resultados. Para este caso el uso de *Navicula* sp. condiciona los resultados, diferentes al de estos autores, debido al pequeño tamaño de esta especie. La alta concentración probada afectó la supervivencia porque empeoró la calidad del agua debido al exceso de alimento.

Cuando comparamos las diferentes proporciones en la sustitución del alimento artificial (AA) por diatomeas bentónicas (db) los tratamientos fueron: 1: 100% de AA; 2: 100% AA + db; 3: 50% de AA + db; 4: db. La concentración utilizada de la microalga fue la de 20×10^3 cel·ml⁻¹, probada anteriormente como la mejor. En este experimento el intercambio de agua fue menor para el caso de los tratamientos 3 y 4, en que se realizó 150 y 100% respectivamente, debido a que las unidades experimentales mantuvieron siempre una mejor calidad del agua, por el poco o nulo suministro del alimento artificial.

Los tratamientos no difirieron significativamente entre sí aunque los resultados más elevados se obtuvieron con el uso de la diatomea bentónica y *Artemia*, sin AA, en que se tuvo 68% de supervivencia, 1.40 mg de peso, 6.8 mm de talla, 4 espinas rostrales y 5 pares de ramificaciones branquiales.

Al igual que en el bioensayo anterior, cuando se comparan estos resultados con los que se obtuvieron en el tanque de cría, de donde provenían las PL, se observó que el uso de *Navicula* sp. es una variante a tener en cuenta para posibles esquemas de alimentación. El tanque se cosechó en PL13 y se obtuvo 63% de supervivencia, talla promedio de 6.5 mm,

peso promedio de 1.2 mg, 4 espinas rostrales y 5 pares de ramificaciones branquiales. En este trabajo, haciendo el cierre con 3 días de antelación, o sea en PL 10, se obtiene mayor supervivencia, peso y talla.

La calidad de las PL que se obtuvo en estos bioensayos fue buena si se tiene en cuenta que los parámetros de calidad considerados en el país para la venta de PL10 del camarón blanco *L. schmitti* eran: talla mayor de 6.5 mm, peso mayor de 0.6 mg, más de 3 espinas rostrales, 3 pares de ramificaciones branquiales y tracto digestivo lleno o medio lleno.

Se coincidió plenamente con Griffith *et al.* (1992) cuando plantean que el uso de diatomeas bentónicas pennales vivas no impide el proceso de cría larval y puede ser una base precedente importante para la alimentación ecológica de las PL y juveniles de camarón en los estanques de engorde. La aplicación de estas diatomeas proporciona un sustrato continuo para los hábitos bentónicos de las PL que reducen el canibalismo y elimina el costo y la nocividad potencial del alimento artificial.

Se pudo apreciar que son muy escasos los trabajos que refieren el cultivo de diatomeas bentónicas y su uso en la camaronicultura. Los países que actualmente trabajan en este aspecto lo utilizan en sus laboratorios de producción de forma cualitativa y no han publicado sus resultados, excepto los de Griffith *et al.* (1992) y Peterson y Curiel (2002), que se refieren a su aplicación para PL de *L. vannamei*.

En general, el uso de *Navicula* sp. en la alimentación de las primeras postlarvas del camarón blanco *L. schmitti* es una variante muy adecuada para el esquema de alimentación de estos organismos ya que aumenta discretamente la supervivencia, el tamaño, el peso y la calidad de la postlarva. Además es una fuente de alimento alternativo estable muy importante, ya que con el empleo de esta especie se puede sustituir el uso de microparticulados como alimento a PL de camarón blanco, trayendo consigo mejorías en la calidad del cultivo y también un ahorro considerable en la sustitución de importaciones.

Uso de *Amphora* sp.

Esta especie fue utilizada en un ensayo de alimentación con PL (de PL3 a PL10) de *L. vannamei*. Las PL que se utilizaron para cada unidad experimental tenían un número promedio de espinas rostrales de 2.4, 1.6 pares de ramificaciones branquiales, peso promedio de 0.54 mg y talla de 4.8 mm. Se probó la sustitución parcial o total del AA, estableciéndose los siguientes tratamientos: 1: AA (100%); 2: 50% AA + 2% db; 3: 5% db. En este caso la adición de la microalga se hizo de forma volumétrica debido a que esta especie forma grumos que enmascaran el conteo directo en cámara, no como el caso anterior referido con *Navicula* sp. que si eran confiables los valores de concentración que se obtenían debido a que la mayor parte de las células están desprendidas del sustrato e individualizadas, debido a la aireación.

Para las PL de *L. vannamei* resultaron siempre mejor los tratamientos donde se adicionaba AA, aunque en cuanto a la supervivencia no existieron diferencias significativas entre los tratamientos (74.1, 72.7 y 73.9% respectivamente).

El número de espinas rostrales de la PL apta para la comercialización en *L. vannamei* es de 3 y todos los tratamientos estuvieron por encima de este valor. Fueron diferentes significativamente el número de espinas obtenidas cuando se suministra AA, lo mismo al 100% (3.54) que al 50% (3.53), que difirieron del obtenido cuando no se adiciona AA y se sustituye por el 5% de db (3.28). Las ramificaciones branquiales deben estar por encima de 3 pares lo que fue superado en las PL cuando fueron alimentadas con las tres dietas empleadas en este experimento, sin diferencias significativas entre ellas (5.2, 4.8 y 5.1).

El peso mayor se obtuvo en el tratamiento con 100% de AA (1.87 mg) que no difirió del que tenía 50% de AA y 2% de db (1.72 mg). El tratamiento con 5% de db sin AA arrojó diferencias con los otros, obteniéndose en el mismo un peso final de 1.58 mg. La mayor talla se obtuvo con 50% de AA y 2% de db donde las PL alcanzaron 7.14 mm, diferente de

la que mostró el tratamiento con 100% de AA (6.85 mg) y del tratamiento con 5% de db (6.47 mg).

El trabajo que refiere el uso de *Amphora* sp. en PL de *L. vannamei* (Griffith *et al* 1992), en condiciones experimentales, plantea que estas PL tienen porcentajes de supervivencia de 86.7% y talla de 6.05 mm, diferente del control (5.93 mm), alcanzada en PL8. Ellos refieren que cuando promedian el uso de la diatomea bentónica en los tanques de precría durante 6 meses de producción, la supervivencia es de 60%.

De forma muy general, Peterson y Curiel (2002), plantean el cultivo de diatomeas bentónicas usando sustratos artificiales en los tanques de la precría, donde hacen el “bloom” basado en *Amphora* sp. y afirman que han tenido mejoras tanto en eficiencia operacional como en la calidad de las postlarvas, donde hay mejores tasas de supervivencia, crecimiento más rápido, mejor talla promedio, mejores resultados al estrés y una mayor producción, aspectos planteados de forma cualitativa sin brindar datos específicos al respecto.

Los resultados presentados indican que las diatomeas bentónicas tienen un alto potencial en la nutrición de postlarvas tempranas de camarón, sin embargo se deben realizar más estudios que expliquen los beneficios observados desde el punto de vista de la nutrición y la fisiología de los organismos y los mecanismos que posibilitan el efecto probiótico de los cultivos de estas microalgas, entre otros.

Conclusión

Se concluye que el uso de diatomeas bentónicas en la nutrición de postlarvas de camarón puede ser una alternativa viable que permita disminuir los costos de producción, sin afectar el crecimiento y la supervivencia de los organismos.

Agradecimientos

Gran parte de la información generada se obtuvo con el apoyo logístico del Centro de Producción de Postlarvas de camarón “YAGUACAM” del Ministerio de la Industria Alimenticia en Cuba donde se realizaron los cultivos de microalgas y los bioensayos con postlarvas y del Centro de Bioproductos Marinos de Cuba donde se realizaron parte de los estudios de identificación bacteriológica. Se agradece al Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora (CESUES) por el apoyo financiero para la estancia del primer autor en el laboratorio de investigación de la Unidad Navjoa, donde se realizaron algunos bioensayos con *Amphora* sp.

Referencias

- Abalde, J., A. Cid, P. Hidalgo, E. Torres & C. Herrero (1994). Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidad de La Coruña, *Monografías*, No. 26, 210 pp.
- Affan, A., R. Karawita, Y-J Jeon & J-B Lee (2007). Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (Bacillariophyceae) from Jeju island, Korea. *J. Phycol.* 43: 823-832.
- Alfonso, E. & M. Coelho (1996). Manejo da Larvicultura. En: *Manual do Curso Internacional "Produção de Pós-larvas de Camarão Marinho*, (T.C.V. Gesteira e A.J.P. Nunes, eds.), CYTED – UFSC, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Florianópolis, Brasil, pp:132-152.
- Alfonso, E. & L. Martínez (1988). Medio de cultivo para microalgas marinas. *Rev. Invest. Mar.* 9(1):69-76.
- Almaguer, Y.R., E. Alfonso & S. Leal (2004). Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Rev. Invest. Mar.* 25(1): 57-64.
- Arredondo, B.O. & D. Voltolina, ed. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México, B.C.S., pp. 97.
- APILAB Plus (2001). Manual del usuario. Biomieux S.A., Versión C, 04-2001, Ref. 34002.
- Avendaño-Herrera, R. & C.E. Riquelme (2007). Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications. *Aquacult. Eng.* 36: 97-104.
- Backer, K.H. & D.S. Herson (1978). Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonana* and an associated Pseudomonad in a mariculture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:791-796.
- Becker, E.W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 293 pp.
- Carbajal-Miranda, M., M.P. Sánchez-Saavedra & J.A. Simental (2005). Effect of monospecific and mixed benthic diatom cultures on the growth of red abalone *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). *Journal Shellfish Research* 24(2):401-405.
- Curbelo, R., S. Leal, N. Núñez, P. Quintana, I. Benguela, D. Muñoz & Y. Almaguer (2004). Cultivo de la microalga bentónica *Navicula* sp. para la alimentación de las primeras postlarvas de camarón blanco. *Rev. Invest. Mar.* 25(2):143-150.
- Curbelo, R., S. Leal, N. Núñez & Y. Almaguer (2006). Alimentación de las primeras postlarvas de camarón *Litopenaeus schmitti* con una especie de diatomea bentónica. *Rev. Invest. Mar.* 27(3):231-236.
- Ebert, E.E. & J.L. Houk (1984). Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* 39, 375– 392.
- Fukami, K., T. Nishijima & Y. Ishida (1997). Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hidrobiologia* 358:185-191.
- Gómez-Villa, H., D. Voltolina, M. Nieves, P. Piña & J. López-Ruiz (2002). Reduction of copper toxicity for two microalgae using artificial zeolites. *J. World Aquaculture Soc.* 33: 214-219.
- Sylvia Leal, et al. 2010. Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. En: Cruz-Suarez, 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 Acuicola*, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN en trámite. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 598-619.

- Griffith, D.R.W., E. Laborde V. & J.M. Wigglesworth (1992). Biological and economic of penaeid larval rearing using benthic diatoms. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, pp: 101 – 105.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals* (W.L. Smith y M.H. Chanley, eds), Plenum Publishing, N.Y. pp: 29-60.
- Guillard, R.L.L. & J.H. Ryther (1962). Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239. (citado por Simental-Trinidad *et al.* 2001)
- Hahn, K. (1989). Nutrition and growth of abalone. *En: Handbook of culture of abalone and other marine gastropods* (K.O. Hahn, ed.), pp: 135-156.
- Hainse, K.C. & R.R.L. Guillard (1974). Growth of vitamin B₁₂-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B₁₂-producing marine bacteria. *J. Phycol.* 10:245-252.
- Jain, S.K., A.K. Rainzada, S. Shrivastava & K. Jain (1996). Protective action of zeolite on lead toxicity in freshwater fish. *Fresenius Environm. Bull.* 5: 466-468.
- Kawamura, T., T. Saido, H. Takami & Y. Yamashita (1995). Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194: 189–199.
- Leal, S., G. Delgado, G. Rodríguez, J. López-Ruiz, E. Alfonso & E. Nodas (2003a). Crecimiento de microalgas marinas con diferentes productos zeolíticos. *Rev. Invest. Mar.* 24(1): 57-62.
- Leal, S., R. Nodar, G. Delgado & Y. Almaguer (2003b): Efecto de cinco tipos de productos zeolíticos sobre el crecimiento de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana*. *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2003*, <http://www.civa2003.org>.
- Leal, S., A. Miranda, M.E. Rivas, J.A. López-Elías, S.E. Ayala y R. Curbelo (2008). Cultivo de la diatomea bentónica *Amphora* sp. son diferentes formulaciones del medio Guillard. México, Ensenada, *IX Simposium de Nutrición Acuícola*.
- López-Ruiz, J.L., R. García García & M.S. Ferreiro Almeida (1995). Marine microalgae culture: *Chaetoceros gracilis* with zeolitic product ZESTEC-56 and a commercial fertilizer as a nutrient. *Aquacult. Eng.* 4: 367-372.
- Mazón Suástegui, J.M., L. Bazua Sicre, G.L. Lucero Martínez and R. Rodríguez Ramos (1992). Producción de semilla de abulón en el laboratorio: el método de Bahía Tortugas, B.C.S. México. *In: Abalone of the world; biology, fisheries and culture* (S.A. Sheperd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Proo, eds.), Fishing News Books, Oxford, pp: 561-569.
- Mumpton, F.A. (1977). Natural Zeolites. In: *Natural Zeolites* (L.B. Sand y F.A. Mumpton, eds.), Pergamon Press, N.Y., 463 pp.
- Nieves, M. (2000). Efecto de productos de naturaleza zeolítica sobre el crecimiento y la calidad dietética de microalgas para la acuicultura. México, Universidad de Colima, *Tesis de Doctorado*, 177 pp.

- Nieves, M., D. Voltolina, J.L. López-Ruiz, M.A. Cisneros & P. Piña (2000). Cultivo de microalgas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica. *Hidrobiológica* 10(1): 1-6.
- Nieves, M., D. Voltolina, A. Medina, P. Piña & J. López Ruiz (2002). Zeolites and diatom growth. *Aquac. Res.* 33:75-79.
- Peterson, J.J. & J.I. Curiel (2002). Larvicultura de camarão aprimorada com o uso de diatomáceas. *Revista da ABCC* Año 4(2):40-42.
- Plasencia, A.H., S. Leal, D. Voltolina & R. Curbelo (2004). Cultivo de una diatomea bentónica Amphora cf. Marina con una zeolita natural enriquecida. *Rev. Invest. Mar.* 25(2): 151- 158.
- Riquelme, C.E. & R.E. Avendaño-Herrera (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista chilena de Historia Natural* 76(4):725-736.
- Roberts R. (2001). A review of settlement cues for larval abalone (*Haliotis* sp.). *Journal of Shellfish Research* 20(2): 571-586.
- Roberts, R., T. Kawamura & H. Tanaki (2000). Diatoms for abalone culture: a workshop foe abalone farmers. New Zeland, 4th *International Abalone Symposium*, Cawthron Reort No. 547, Cawthron Institute, p.28.
- Searcy-Bernal, R., A. Salas-Garza, R. Flores-Aguilar & P. Hinojosa-Rivera (1992a). Simultaneous comparison of methods for settlement and metamorphosis induction in the red abalone (*Haliotis rufescence*). *Aquaculture* 105: 241-250.
- Searcy-Bernal, R., A. Salaz Garza & R. Flores Aguilar (1992b). Investigaciones en México sobre la etapa crítica de la producción de semilla de abulón (*Haliotis* spp.). In: *Abalone of the worl, biology, fisheries and culture* (S.A. Sheperd, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Proo, eds.), Fishing News Books, Oxford, pp: 547-560.
- Silva-Aciaras, F.R. & C.E. Riquelme (2008). Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. *Aquacult. Eng.* 38: 26-35.
- Simental-Trinidad, J.A., M.P. Sánchez-Saavedra & J.G. Correa-Reyes (2001): Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. *Journal of Shellfish Research* 20(2): 611-617.
- Simental, J.A. & M.P. Sánchez-Saavedra (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacult. Eng.* 27: 265-272.
- Siqueiros, D. (1994). Asociaciones de Diatomeas Bentónicas Marinas; Análisis de su estructura y aplicación. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Tópicos Selectos sobre Microalgas, *Serie Científica* 2(1): 59-71.
- Suminto & K. Hirayama (1996). Effects of bacterial coexistence on the growth of a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Fish. Sci.* 62: 40-43 (citado por Fukami *et al.*, 1997).
- Tanaka, N. (1986). Adhesive strength of epiphytic diatoms on various seaweeds. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52(5): 817-821.

- Voltolina, D. (1991). A comparison of methods for the dispersion of cultures of benthic diatoms. *Cryptogamie, Algol.* 12(3):183-187.
- Voltolina, D., M. Nieves & J. López Ruiz (1997). Zeolitic products as enrichment for culture of marine microalgae. *Aquacult. Eng.* 16: 1-6.