

El metabolismo de los carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*¹

Carlos Rosas¹, Gerard Cuzon², Gabriela Gaxiola¹, Cristina Pascual¹, Roberto Brito¹, Ma. Eugenia Chimal¹ y Alain Van Worhoudt³

1. **Laboratorio de Biología Marina Experimental, Fac. de Ciencias UNAM, Apdo. Post. 69, Cd. del Carmen, Campeche, México**
2. **Aquacop IFEMER, BP 7004, Taravao, Tahití, Polynesie Francaise.**
3. **Station de Biologie Marine du Museum National d'Histoire Naturelle et du Collège de France, BP 225, 29900, Concarneau, France.**

RESÚMEN: Tomando en cuenta la necesidad de explorar a mayor profundidad el metabolismo de carbohidratos (CBH) de los camarones peneidos, en el presente estudio se reportan los resultados de los últimos 3 años de una serie de experimentos en los que se integran algunos de los principales mecanismos enzimáticos y fisiológicos relacionados con el metabolismo de los CBH de *L. vannamei*, *L. setiferus* y *L. stylirostris*. Durante esta investigación se utilizaron juveniles de *L. setiferus* (N = 600 ; 0.2 - 1.8 g de peso vivo inicial) , *L. vannamei* (N = 840 ; 0.2 - 2.0 g de peso vivo inicial) y *L. stylirostris* (N= 128 ; 9.5 g de peso vivo inicial) provenientes de larvas cultivadas en condiciones controladas de laboratorio. En todos los experimentos los juveniles fueron alimentados con dietas semi-purificadas preparadas con diferentes niveles de carbohidratos dentro del intervalo de entre 0 y 63% y en 15 y 35o/oo. La tasa de crecimiento relativa (TCR) fué máxima en *L. vannamei* alimentados con dietas con entre 1 y 25% de CBH mientras que en *L. setiferus* el mayor crecimiento fué observado en los camarones alimentados con 40% de CBH. La limitada capacidad de degradación por la α -amilasa y la interferencia que podría ejercer el Glucógeno de la DG durante la absorción de otros nutrientes podrían ser las principales causas de la limitada substitución de proteínas por CBH dietéticos. La capacidad de los camarones para sintetizar CBH ha sido ampliamente demostrada. Un aumento de la actividad de la PECPK en camarones alimentados on dietas con 0% de CBH durante el presente estudio han puesto en evidencia la independencia metabólica de los CBH que presentan estas especies.

PALABRAS CLAVE: metabolismo, carbohidratos, requerimientos, camarón

INTRODUCCIÓN

La forma inapropiada en que se ha manejado el cultivo de camarón ha dañado severamente las zonas estuarinas tropicales en diversas partes del mundo (Ahmed, 1997; Folke, 1992; Primavera, 1997). Por esta razón diversos autores han propuesto diferentes estrategias para minimizar los efectos contaminantes de las descargas en beneficio de los ecosistemas estuarinos y costeros adyacentes a los sistemas de producción. Dietas con bajos niveles de proteína (Molina-Poveda, 1998), la optimización del perfil de amino ácidos (Velasco, 1998), una razón proteína/energía óptima (Pedrazzoli, 1998), el mejoramiento de la calidad de las proteínas utilizadas en la elaboración de piensos (Ricque-Marie, 1998) y una estrategia óptima para el manejo del alimento (Cortés-Jacinto E., 1998) han sido mencionadas como las principales. En este sentido Ceccaldi (1998) ha señalado que un profundo conocimiento de los aspectos fisiológicos y bioquímicos de la nutrición serán necesario para comprender

¹ Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M. and Van Wormhoudt, A. 2000. El Metabolismo de los Carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

la mejor forma de satisfacer los requerimientos nutricionales de los camarones en cultivo y así poder diseñar dietas que sean adecuadas para los camarones y reduzcan su efecto contaminante.

Recientemente se ha explorado la posibilidad de reducir las proteínas de la dieta sustituyéndolas por CBH. Los estudios realizados en este sentido han demostrado que la utilización que pueden hacer los camarones de los CBH es limitada tanto por la falta de sitios para el almacenamiento como por la capacidad de procesamiento enzimático que presentan. Aunque a la fecha el metabolismo de CBH ha sido ampliamente estudiado en crustáceos, aún existen numerosas interrogantes relacionadas con sus limitaciones y la forma en que estas afectan los mecanismos de uso y aprovechamiento de la materia y la energía y sus consecuencias en el crecimiento.

Estudios previos han demostrado que la forma en que los carbohidratos son mejor asimilados es cuando se incluyen en la dieta en forma de almidón. En este sentido Abdel-Rahman, (1979) demostró que la velocidad con que se asimila la glucosa es mucho más rápida que cuando se utiliza al almidón como fuente de carbohidratos (CBH). Esto se debe a que la glucosa puede interferir en la absorción de otros nutrientes debido a que ésta puede saturar rápidamente los sitios de absorción, inhibiendo la captación de amino ácidos y afectando el crecimiento (Shiau, 1998) . Así mismo se ha observado que los carbohidratos en exceso producen daños en la glándula digestiva y en las branquias, principalmente por la limitación física que presentan las células para almacenar este nutriente (Pascual, 1983).

Aunque la actividad de la α -Amilasa de 40 especies de crustáceos incluyendo 7 especies de peneidos ha sido recientemente reportada (Van Wormhoudt, 1995) a la fecha únicamente se conoce la relación entre la actividad de esta enzima y los niveles de los carbohidratos de la dieta en *L. stylirostris* (Rosas, 2000a).

El metabolismo de proteínas ha sido reconocido como la clave para el entendimiento de los requerimientos de energía de los camarones pues el crecimiento depende casi estrictamente de las proteínas (Deshimaru, 1978 #1640; Deshimaru, 1972; Lemos, 1998). El alto requerimiento de proteínas y la limitada capacidad de los camarones para almacenar reservas tales como lípidos y carbohidratos (Dall and Smith, 1986) pudieran estar relacionadas con la capacidad de los camarones para usar las proteínas como fuente de energía para el crecimiento.

Los resultados de otros estudios han demostrado que los camarones pueden cambiar el sustrato metabólico de acuerdo con los requerimientos fisiológicos o nutricionales pasando de una mezcla de proteínas, lípidos y carbohidratos a estrictamente proteínas, indicando que los camarones están bien adaptados para el uso de las proteínas como fuente de energía (Rosas, *et al.* 1996; Rosas, *et al.* 1995, Rosas, *et al.* 1995; Taboada, *et al.* 1998). De esta forma, la limitada capacidad de los camarones para usar los carbohidratos de la dieta pudiera ser una consecuencia de la adaptación metabólica para el uso de las proteínas como una fuente primaria de energía, debido principalmente a que las proteínas son el mayor sustrato de reserva en estos organismos. De acuerdo con Campbell (1991), además las proteínas pueden ser convertidas en CBH, ya que los camarones contienen la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la gluconeogénesis.

Tomando en cuenta toda esta información es evidente que la capacidad de los camarones para el uso de los CBH pudiera estar asociada tanto con lo limitado del espacio de almacenamiento y absorción, como con la capacidad adaptativa para el uso de las proteínas como fuente de energía y amino ácidos para el crecimiento así como para la formación de CBH a partir de las vías gluconeogénicas.

Tomando en cuenta la necesidad de explorar a mayor profundidad el metabolismo de CBH en los últimos 3 años el grupo formado por investigadores de la Fac. de Ciencias de la UNAM, de IFREMER Tahití y de la Estación de Biología Marina del Colegio de Francia, hemos desarrollado una serie de investigaciones con el fin de profundizar en los mecanismos involucrados en el metabolismo de los CBH en tres especies de camarones peneidos cultivados en el continente Americano. De esta forma el presente estudio intenta integrar algunos de los principales mecanismos enzimáticos y fisiológicos relacionados con el manejo tanto de los CBH como de las proteínas dietéticas haciendo un esfuerzo por explicar las razones de las limitaciones y las consecuencias que estas tienen en el crecimiento. Para lograr esto se llevaron a cabo 8 experimentos en los cuales se probaron 16 diferentes tipos de dietas con 12 diferentes niveles de CBH. Los detalles de los métodos utilizados y de los resultados obtenidos se encuentran en (Rosas, 2000^a; Rosas, 2000^b; Rosas, 2000^c; Rosas, *et al.* 2000, Taboada, *et al.* 1998).

Origen de los animales

Durante esta investigación se utilizaron juveniles de *L. setiferus* (N = 600 ; 0.2 - 1.8 g de peso vivo inicial), *L. vannamei* (N = 840 ; 0.2 - 2.0 g de peso vivo inicial) y *L. stylirostris* (N= 128 ; 9.5 g de peso vivo inicial) provenientes de larvas cultivadas en condiciones controladas del Laboratorio de Biología Marina Experimental de la UNAM, en Cd. del Carmen Campeche, México, de Industrias Pecis SA de CV y de IFREMER-Tahití, respectivamente. Los experimentos de crecimiento y fisiología con *L. setiferus* y *L. vannamei* se llevaron a cabo en las instalaciones de la UNAM , y los que se llevaron a cabo con *L. stylirostris* en las instalaciones de IFREMER. Los estudios bioquímicos de las tres especies fueron conducidos en el Laboratorio de Biología Marina del Colegio de Francia, Concarneau, Francia.

Condiciones experimentales

En todos los casos los juveniles de camarón fueron mantenidos en condiciones similares de cultivo, tomando en cuenta un diseño básico de tanque experimental como el que ha sido utilizado en IFREMER Tahití desde hace más de 20 años. Este diseño ha sido adoptado en la UNAM para la realización de este tipo de ensayos (Fig. 1).

Con este tipo de tanque se tiene la ventaja de que el sistema de “air lift” distribuye homogéneamente la aireación sin producir corrientes de convección que contribuyan a la lixiviación del alimento reduciendo su disponibilidad. Así mismo se pudo observar que con este sistema se evita también que los camarones sean perturbados por la corriente que produce comúnmente la piedra de aireación en un tanque convencional.

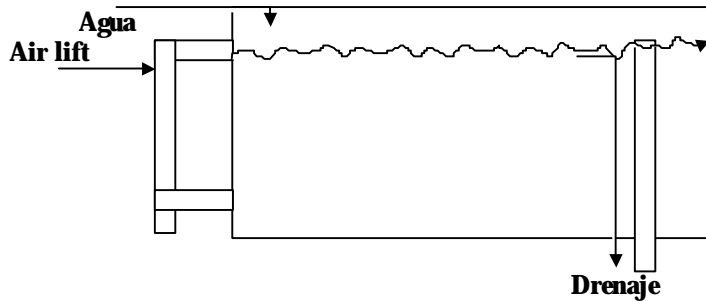


Fig. 1. Esquema del tanque básico utilizado para el mantenimiento de camarones en condiciones experimentales.

En la UNAM se utilizaron tanques de plástico de 90 l mientras que en IFREMER se usaron tanques de 100L de capacidad. En ambos casos los tanques se abastecieron de un flujo continuo de agua de mar natural filtrada por filtro de arena (20 μ m) permitiendo un recambio de 200% por día. En el caso de *L. vannamei* y *L. setiferus* se mantuvo una densidad de 10 camarones/tanque mientras que con *L. stylirostris* se mantuvo una densidad de 8 camarones/tanque. En todos los casos el fotoperiodo se estandarizó en 12h luz-12 h oscuridad, y la temperatura en $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Con *L. setiferus* y *L. vannamei*, algunos experimentos fueron desarrollados con animales aclimatados tanto a 35 como a 15‰. Los juveniles de *L. stylirostris* se mantuvieron únicamente en 35‰. La alimentación fue proporcionada 3 veces al día a intervalos de 8 h en el caso de *L. setiferus* y *L. vannamei* y de 4 horas en el caso de *L. stylirostris*. El alimento no consumido fue removido regularmente junto con las mudas y las heces producidas. En el caso de *L. setiferus* y *L. vannamei* tres tanques fueron asignados al azar a cada tratamiento experimental, mientras que en el caso de *L. stylirostris* se utilizaron 4 tanques por cada nivel de CBH dietéticos.

Dietas

En todos los experimentos los juveniles fueron alimentados con dietas semi-purificadas preparadas con diferentes niveles de carbohidratos intentando cubrir un intervalo de entre 0 y 63% : 0, 1, 5, 6, 15, 22, 23, 28, 32, 33, 39, 40 y 63% (Tabla 1). La forma en que se elaboraron las dietas se encuentra detallada en (Rosas, 2000^a; Rosas, 2000^b; Rosas, 2000^c).

Efecto de los CBH de la dieta sobre el Crecimiento.

Se utilizó la tasa de crecimiento relativo (%) pues esta forma de expresar el crecimiento permite hacer comparaciones entre grupos de organismos independientemente del peso inicial entre estos:

$$\text{TCR} = \left[\frac{\text{Pf} - \text{Pi}}{\text{Pi}} \right] * 100$$

Para hacer esto se tomó en cuenta que no en todos los casos fue posible iniciar los ensayos con animales de tallas similares, aunque los organismos experimentales estuvieron dentro de un intervalo de peso en el cual pueden ser considerados como juveniles tempranos.

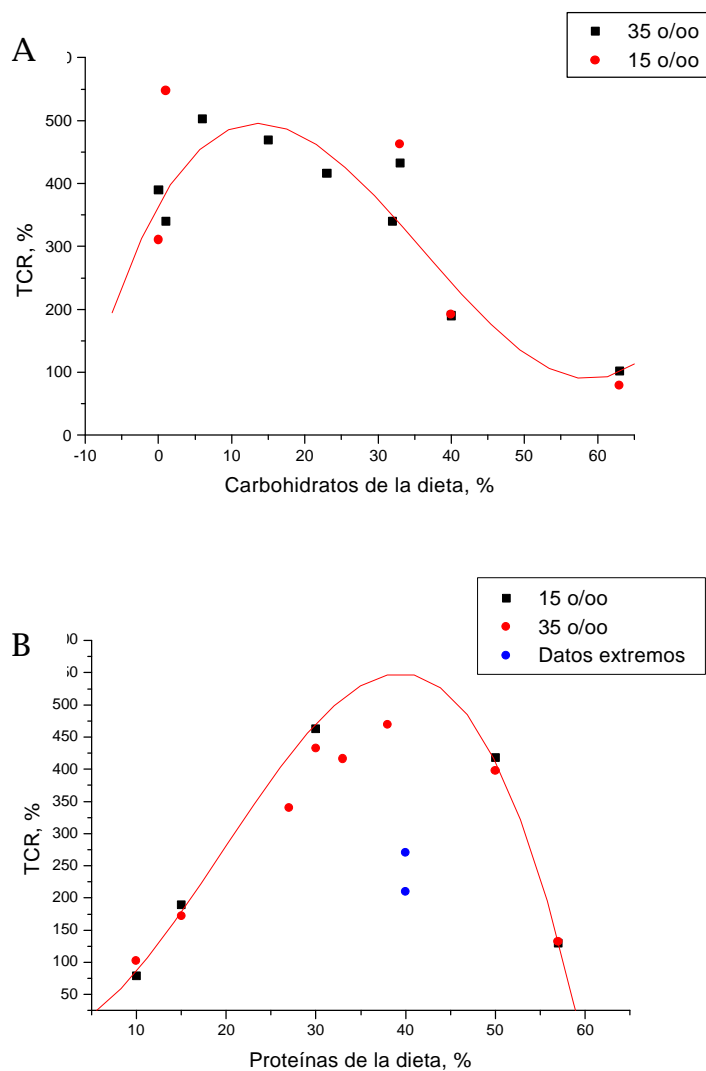
Crecimiento : *L. vannamei*

Fig. 2. Tasa de crecimiento relativa (%) de juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes dietas. TCR promedio de 3 repeticiones por tratamiento. La línea roja indica el patrón observado. A = TCR en relación a los niveles de CBH, B = TCR en relación a los niveles de proteínas de la misma dieta.

Tabla 1. Ingredientes que fueron utilizados en la elaboración de las dietas experimentales probadas.

INGREDIENTS	CARBOHYDRATE LEVEL, (% en peso seco)																
	0**	0*	1*	1***	5*	6**	10***	15**	21***	23**	32**	33***	33	40**	40*	63*	
Krill paste				2		48	2	40	2	37	30	2					
Fish meal			40	30			30		30			30	30				
Squid meal	28	15			50										28	15	10
High quality fish protein concentrated ^a	22		10	10	5		10		5			5	10	22			2.8
Yeast						34		25		20	11						
Casein		40			20											5	
Pre cooked corn starch		10				2		2		2	2					10	
Soy bean meal			20	38.5			33.5		18.5				10				
Gluten			15	5													
Native wheat starch	0			5	5	7.3	15	25.6	35	34.6	51	53.5	40	40			63
Cellulose			5			5.4		3.5		2.3	1						
Rovimix ^b (vitamins)	4		2	1	10	2	1	2	1	2	2	1	2	4			10
Vitamins ^c		2															2
Soy bean Lecithin		3	3	2	10	0.1	2	0.3	2	0.4	0.6	2	3		3	3	
Sun flower oil																	
Cod oil	5	3	3			0.2	3	0.6	3	0.7	1.1	3	3	5		3	
Cholesterol		0.6															0.6
Na ₂ HPO ₄	5		1		1	0.4		0.4		0.4	0.4		1	5			1
KH ₂ PO ₄	5		1		1	0.2		0.2		0.2	0.2		1	5			1
Filled	1.2	22.4													1.2	22.4	
Minerals		1		1			1		1			1					1
Vitamin C		1															1
CaCO ₃						0.1		0.1		0.1	0.1						
MgCl ₂						0.3		0.3		0.3	0.3						
Alginate Na				2.5			2.5		2.5			2.5					
Carbohydrate, (%)	0	0	1	1	5	6	10	15	21	23	32	33	33	40	40		63
Protein, (%)	39.4	47.7	50	48	56.5	44	43	38	34	33	27	26	30	39.4	14.65		10.2
Lipids			7	7		10	7	9	7	8.5	7	7					
MJ/Kg ^c	10.4	14	13	13	16.9	12.1	14		14.5	12.5	16.5	15	15	17.4	13.6		17.2

a. Soluble Fish Protein Concentrate: 90% protein (Sopropêche, Boulogne s/mer, France)

b. Robimix from Hoffman La Roche. # 1720 Retynil Palmitate (Vitamin A): 8,000,000 UI; Cholecalciferol (Vitamin D₃): 196,000 UI; α-tocopherol Acetate (Vitamin E): 10,000 mg/kg; Vitamin K₃: 800 mg/kg; Ascorbyl Phosphate (Vitamin C): 15,000 mg/kg; Thiamin (Vitamin B₁): 700 mg/kg; Rivo flavin (Vitamin B₂): 2,000 mg/kg; Pyridoxin (Vitamin B₆): 1,000 mg/kg; Niacine (Vitamin PP): 10,000 mg/kg; Calcium Pantothenate: 5,000 mg/kg; Cyanocobalamine (Vitamin B₁₂): 50 mg/kg; Folic Acid: 250 mg/kg; Biotin: 30 mg/kg; Inositol: 30,000 mg/kg (Hofmann La Roche, Bâle, Suisse). Coefficient for energy concentration: 21/39/17 KJ for protein, lipid and carbohydrate, respectively (Cousin, 1995).

c. Disodium phosphate and monopotassium phosphate in equal amount.

*Dietas utilizadas en los experimentos con *L. vannamei*

** Dietas utilizadas en los experimentos con *L. vannamei* y *L. setiferus*

*** Dietas utilizadas en los experimentos con *L. stylirostris*.

La relación entre la TCR (%) y los niveles de CBH de la dieta mostró que para los juveniles de *L. vannamei* las mayores TCR se obtuvieron en un intervalo entre 1 y 15% de CBH (Fig 2a), el cual correspondió con un nivel de entre 33 y 40% de proteínas (Fig. 2b). Estos resultados indican que *L. vannamei* puede crecer adecuadamente en un amplio intervalo de CBH dietéticos, los cuales de acuerdo con lo obtenido en este estudio favorecen el crecimiento cuando son adicionados en bajas concentraciones. Así el intervalo de CBH dietéticos con máximo crecimiento obtenido ahora amplía el intervalo propuesto en trabajos previos para la misma especie (20 a 40%) (Cousin, 1995; Cruz-Suarez, *et al.* 1994) y establece que *L. vannamei* crece mejor en ambientes diluidos.

L. setiferus

Un aumento significativo de la tasa de crecimiento (TCR%) de *L. setiferus* fue observado cuando los camarones fueron alimentados con dietas que contenían 0% CBH (Fig. 3a), los cuales correspondieron con 40% de proteínas (Fig. 3b). Al igual que con *L. vannamei* fue posible observar que los mejores crecimientos pueden ser observados en camarones aclimatados a 15o/oo.

Los resultados obtenidos ahora ponen en evidencia que el requerimiento de CBH dietéticos de *L. setiferus* esta localizado alrededor de 40% en una dieta formulada con 30% de proteínas. En estudios previos (Taboada, *et al.* 1998; Rosas *et al.* 1996; Rosas *et al.* 1995) señalaron que *L. setiferus*, tanto en el estadio de postlarvas como de juveniles, tiene un requerimiento proteico menor al observado en otras especies pues es la más herbívora de las especies de camarones de América.

Diferencias entre especies.

Razones fisiológicas

El crecimiento es una respuesta integradora en la cual se resumen las adaptaciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares de los organismos por lo que ha sido de gran utilidad en los ensayos nutricionales para determinar el tipo de dieta que es óptima para el cultivo de una especie.

Los resultados obtenidos en el presente estudio ponen en evidencia que los requerimientos de CBH dietéticos son específicos indicando que la capacidad de uso y aprovechamiento de estos responde a las condiciones particulares en las que cada especie ha evolucionado. Por esta razón en el presente estudio, además del crecimiento hemos integrado otros indicadores, los cuales en conjunto nos ayudarán a comprender los mecanismos adaptativos que operan en cada especie.

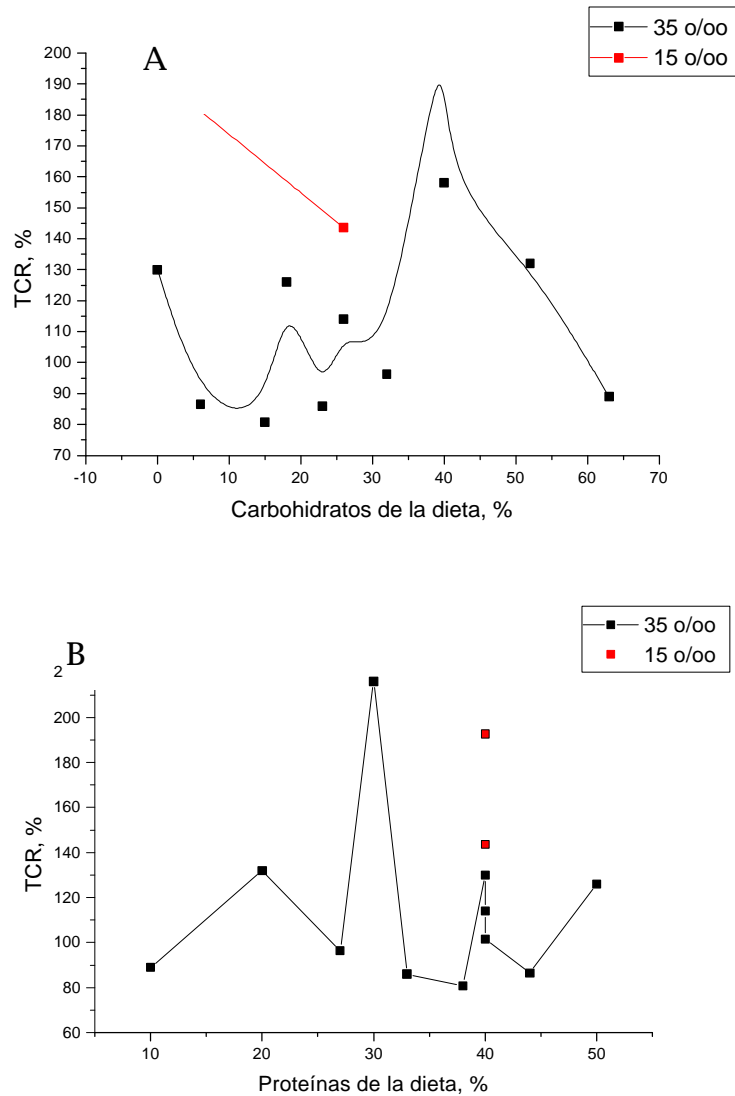


Fig. 3. Tasa de crecimiento relativa (%) de juveniles de *L. setiferus* alimentados con diferentes dietas. TCR promedio de 3 repeticiones por tratamiento. La línea roja indica el patrón observado. A = TCR en relación a los niveles de CBH, B = TCR en relación a los niveles de proteínas de la misma dieta.

La habilidad de los camarones para utilizar diferentes sustratos energéticos esta estrechamente relacionada con las necesidades de materia y energía, la capacidad de almacenamiento y la capacidad adaptativa de las enzimas digestivas (Dall and Smith, 1986; Lovett, 1990; Quetin, 1980; van Wormhoudt, 1995). La regulación endocrina y genética de las capacidades fisiológicas y bioquímicas son las que en última instancia establecen la capacidad adaptativa de las especies al manejo de los nutrientes del alimento. Estos indicadores serán utilizados ahora para explicar las diferencias entre especies.

Relación entre los CBH dietéticos y el uso de los sustratos energéticos : razón O:N.

Una forma de conocer la relación entre el tipo de alimento y el uso de los diferentes sustratos energéticos es a través de la evaluación de la razón O:N, pues en este indicador se integran las

necesidades de energía (Mayzaud, 1988; Nelson, 1977). En la figura 4 se presenta el efecto de los CBH de la dieta sobre la razón O:N de juveniles de *L. setiferus* y *L. vannamei*.

De acuerdo con Mayzaud (1988) una razón O:N de entre 3 y 16 indican que las proteínas se están usando en un 100% como fuente de energía metabólica. Conforme el uso de CBH y lípidos aumenta, aumenta también la razón O:N. Cuando el uso de CBH-Lípidos y proteínas alcanza un equilibrio en el cual ambos sustratos son utilizados en un 50% los valores de O:N se corresponden con niveles de entre 50 y 60. Valores mayores indican un aumento progresivo en el uso de CBH-Lípidos con la consecuente disminución en el uso de las proteínas como fuente de energía.

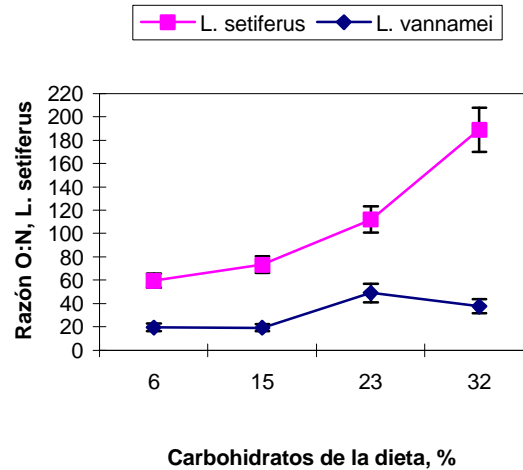


Fig. 4. Variaciones de la razón O:N en relación con los CBH de la dieta. Valores dados como Promedio \pm E.S.

De los resultados presentados ahora es evidente que *L. setiferus* utiliza con mucha mayor intensidad los CBH dietéticos que *L. vannamei*. Mientras que en *L. setiferus* hay un aumento en los valores O:N conforme aumentan los CBH de la dieta, en *L. vannamei* es posible observar una curva de saturación la cual indica que esta especie podría estar utilizando los CBH hasta un límite después del cual su metabolismo ya no aumenta en relación con el aumento de CBH dietéticos.

Al hacer una comparación entre 4 especies de camarones del Atlántico Americano Rosas *et al.* (1995) observaron que las postlarvas *L. setiferus* y *L. schmitti* son menos dependientes de las proteínas dietéticas que *Farfantepenaeus notialis* y *F. duorarum*, lo cual, se propuso, esta relacionado con los diferentes hábitos alimenticios de cada una de ellas. En este contexto es evidente que *L. vannamei*, al igual que *F. notialis* y *F. duorarum*, es una especie con limitaciones en el uso de los CBH pues utiliza a este nutriente con menor eficiencia que otras especies.

Relación entre los CBH de la dieta y la capacidad de almacenamiento de Glucógeno de la Glándula Digestiva (GGD) y de la glucosa sanguínea

El glucógeno es la molécula de almacenamiento de carbohidratos en los crustáceos decápodos, y es la glándula digestiva el sitio donde principalmente se acumula (Gibson, 1979; Loret, 1993). Por esa razón en el presente estudio hemos considerado al GGD como un indicador de la capacidad de los camarones para almacenar esta molécula. De acuerdo con numerosos autores el glucógeno en crustáceos es utilizado principalmente como materia prima para la formación de la quitina, la cual

puede llegar a ser hasta el 35% del peso seco de los camarones (Abdel-Rahman, 1979; Loret, 1993, Omondi and Stark, 1996; Rosas, *et al.*, 1995; Sanchez A., 1991; van Handel, 1965; Shiau, 1992).

Después de la ingestión el almidón del alimento es degradado hasta glucosa, una parte de la cual es fosforilada y pasada al torrente sanguíneo y la otra es utilizada en la síntesis de glucógeno. La elevación de los niveles de glucosa sanguínea después de las primeras horas de alimentación y la elevación del GGD 4 horas después de alimentar así lo han demostrado (Cousin, 1995., Rosas, *et al.*, 1995).

En el presente estudio las mediciones del glucógeno de la glándula digestiva se llevaron a cabo entre 2 y 3 horas después de alimentar, con el fin de registrar los valores máximos de concentración como consecuencia de la síntesis producida por la ingestión del alimento. En la figura 5 se muestran las variaciones de la concentración del glucógeno de la glándula digestiva en relación con los CBH de la dieta en juveniles de *L. setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*.

Como se puede apreciar en las tres especies el GGD sigue una curva de saturación indicando que la concentración máxima de glucógeno alcanza valores máximos a partir de dietas con 22% de CBH en *L. vannamei* (17 mg/g) y *L. stylirostris* (7 mg/g) y de 33% de CBH en *L. setiferus* (15.8 mg/g). Es interesante notar que *L. setiferus* tolera un mayor nivel de CBH dietético antes de que el GGD alcance sus niveles de saturación. Estos resultados muestran nuevamente que *L. setiferus* esta mejor adaptada para el aprovechamiento y el almacenamiento de dietas con altos niveles de CBH.

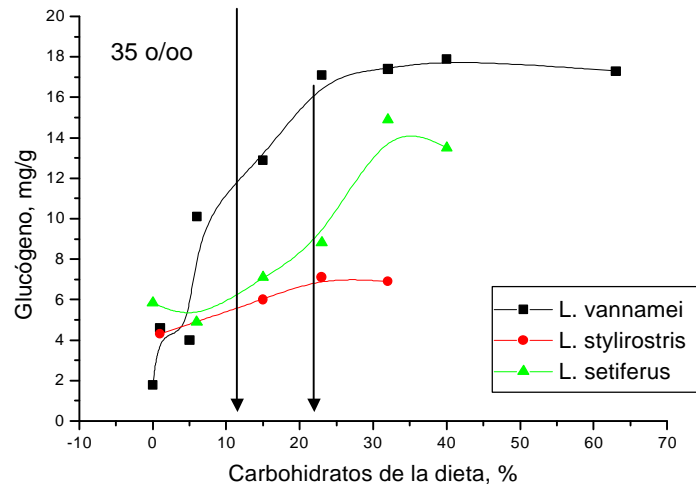


Fig. 5. Variaciones del glucógeno de la glándula digestiva de juveniles de *L. setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris* en relación al nivel de CBH dietético. Valores promedio de un mínimo de 15 individuos por dieta y especie. Las flechas indican el nivel de CBH dietéticos que marca el inicio de la saturación del GGD.

Esta información puede ser utilizada para explicar por que la saturación con glucógeno de la GD podría estar relacionada con el crecimiento. De acuerdo con Al-Mohana, (1987) y Gibson (1979), las células B y R de la GD son el sitio de degradación y almacenamiento de los nutrientes consumidos en el alimento. Durante la digestión los nutrientes son absorbidos desde el lumen y acumulados para ser transportados al hemocele o son almacenados para la síntesis de otras

moléculas, pues como se ha demostrado la GD también es el sitio de la síntesis de hemocianina, entre otras (Gellissen, 1991). En este proceso el paso de los diferentes nutrientes a través de las células B y R debe ser eficiente y rápido pues de otra manera los nutrientes no absorbidos serán conducidos por los túbulos del lumen hacia el intestino formando parte de las heces. Tomando en cuenta lo anterior es adecuado pensar que si las células B y R son saturadas de glucógeno este nutriente podría interferir con la absorción de otras moléculas, provocando la pérdida de nutrientes en las heces, reduciendo la síntesis de moléculas fisiológicamente útiles como la hemocianina o afectando la concentración de nutrientes que serán usados en el crecimiento.

Para probar esta hipótesis es necesario observar los resultados presentados en las figuras 2 y 3 y compararlos con las curvas de acumulación de glucógeno de la figura 5. Como se puede notar existe concordancia entre los niveles de saturación de GGD y el crecimiento pues en ambas especies la TCR más alta se obtuvo en los animales alimentados con los niveles de CBH dietéticos que marcan el inicio de la saturación de la GD. Estas observaciones comprueban la hipótesis indicando que efectivamente un exceso de CBH dietéticos produce una saturación de la GD afectando la absorción de otros nutrientes.

Los mecanismos involucrados en la saturación de GGD están relacionados tanto con el espacio físico necesario para el almacenamiento de glucógeno como con la capacidad de las enzimas involucradas en la degradación de los CBH de la dieta. En un estudio reciente Rosas (2000a) se observó que la actividad de la α -amilasa de la glándula digestiva de juveniles de *L. stylirostris* presentó una curva de saturación en relación con el aumento de la concentración de CBH dietético. La máxima actividad enzimática fue observada en los animales alimentados con 22% de CBH (Fig. 6), demostrando que esta enzima es saturable dentro de intervalos relativamente estrechos de CBH dietéticos.

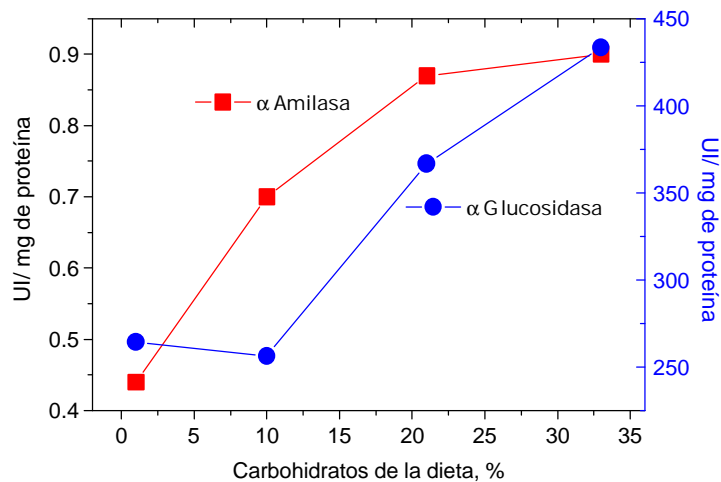


Fig. 6. Actividad de la α -amilasa y de la α -glucosidasa de la glándula digestiva de juveniles de *L. stylirostris* alimentados con diferentes niveles de CBH dietéticos. Valores promedio de mediciones individuales de 5 camarones por dieta.

En las células B de la GD la α -amilasa inicia el rompimiento de los CBH dietéticos produciendo maltosa y oligosacáridos los cuales son posteriormente degradados por la α -glucosidasa (Le Chevalier and Van Wormhoudt, 1998). La mayor función de la α -glucosidasa es la de completar el

rompimiento de la maltosa y los oligosacáridos liberados por la amilo-hidrólisis (α - 1-4-malto-oligosacáridos) después de la acción de la α -amilasa, siendo la glucosa el producto final de este proceso (Fig. 9). Como consecuencia de este proceso la producción de glucosa en la GD debería estar ligada a la actividad de la α -amilasa, pues esta enzima es la que inicia la degradación de los CBH de la dieta. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la producción de glucosa de la GD está efectivamente ligada con la actividad de la α -amilasa pues también presentó una curva de saturación (Fig. 7) indicando que la α -amilasa es la enzima que controla la capacidad de los camarones para procesar los carbohidratos de la dieta, la cual tiene característica de cada especie.

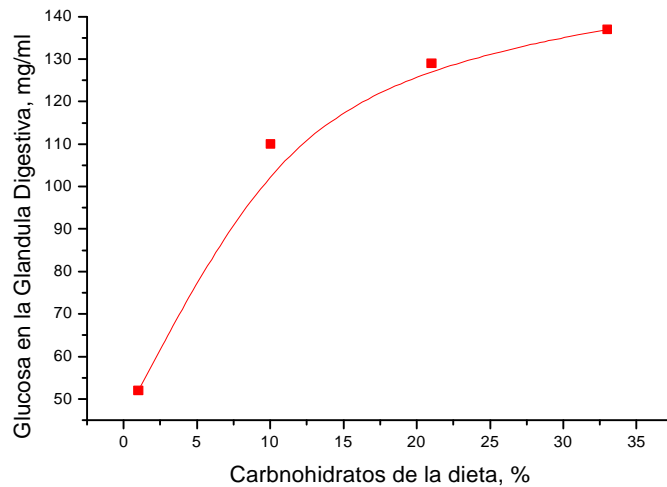


Fig. 7. Variaciones de la glucosa de la glándula digestiva de juveniles de *L. stylirostris* alimentados con diferentes niveles de CBH dietéticos. Valores promedio de mediciones individuales de 5 camarones por dieta.

Una vez que la glucosa está disponible en la GD es fosforilada por la hexoquinasa lo cual le permite pasar a través de las células y entrar al torrente sanguíneo (Loret, 1990) (Fig. 9).

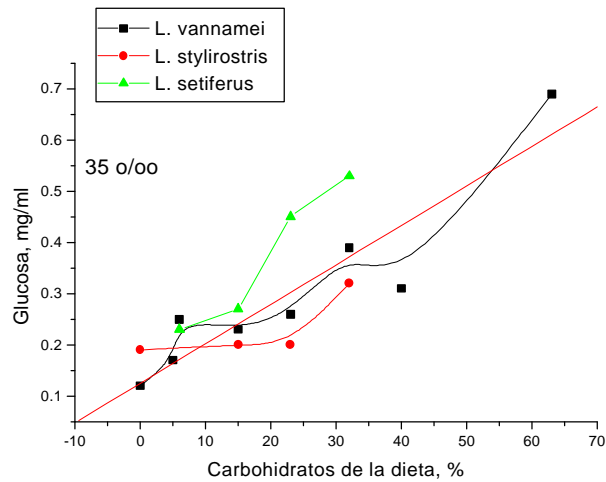


Fig. 8. Variaciones de la glucosa sanguínea en juveniles de *L. vannamei*, *L. setiferus* y *L. stylirostris* alimentadas con diferentes niveles de CBH dietéticos. Valores promedio de un mínimo de 15 individuos por especie y nivel de CBH dietéticos. La línea indica la correlación entre los niveles de la glucosa sanguínea de las tres especies y el nivel de CBH de la dieta. $Y = 0.13 + 0.007X$; $R = 0.93$.

De acuerdo con los resultados presentados ahora la glucosa sanguínea (GS) de las tres especies estudiadas aumentó en relación directa con el aumento de los CBH dietéticos (Fig. 8). Aunque un modelo lineal puede describir muy bien el comportamiento general de las tres especies ($Y = 0.13 + 0.007X$; $R = 0.93$), es evidente que los mayores niveles de CBH sanguíneos fueron obtenidos en *L. setiferus* , y los menores en *L. stylirostris*.

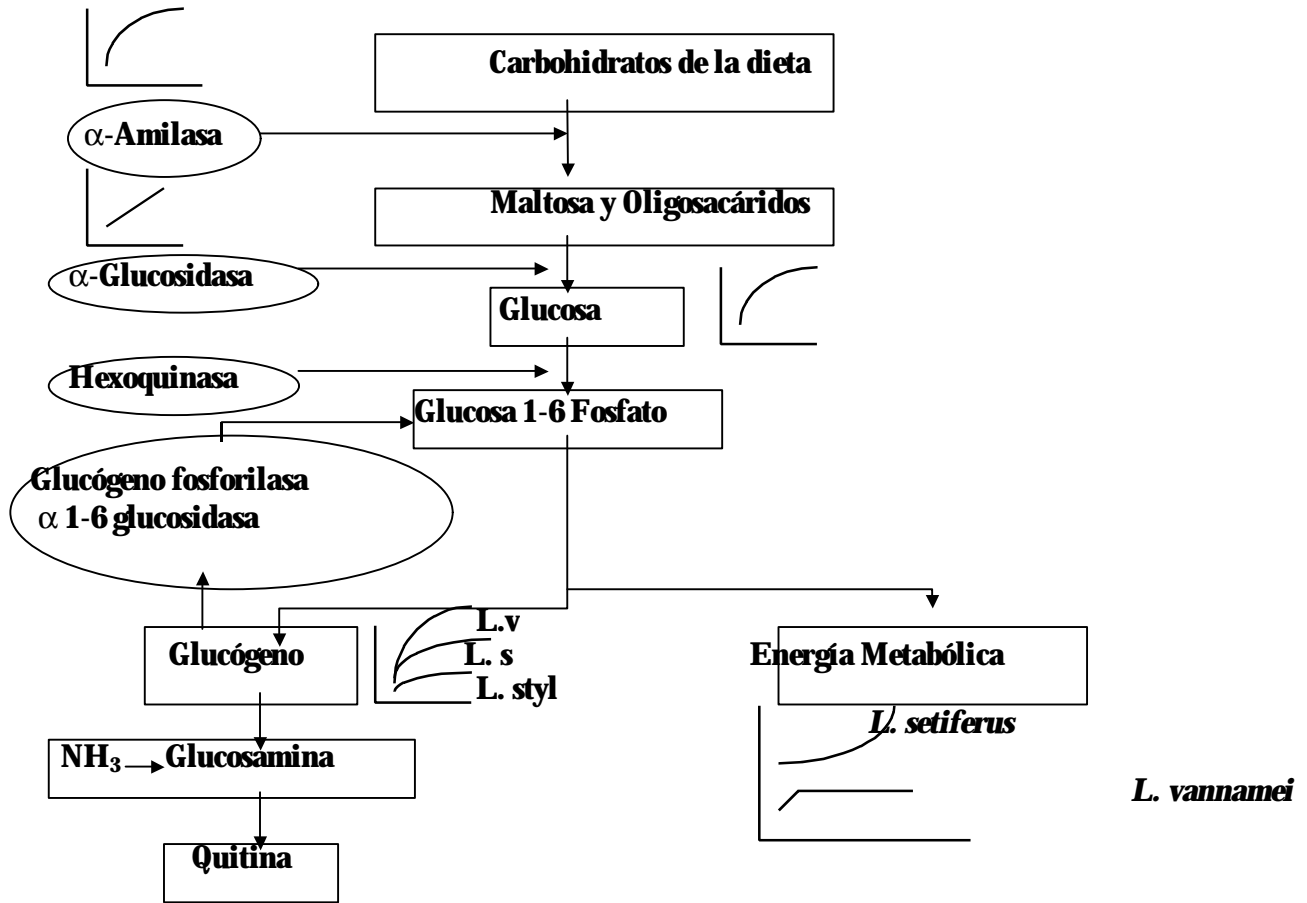


Fig. 9. Diagrama de flujo que representa las rutas que siguen los CBH dietéticos durante la digestión y asimilación. Si la disponibilidad de glucosa 1-6 Fosfato depende de la α -Amilasa y esta es saturable entonces la relación entre enzima y sustrato controlará al final la formación del exoesqueleto y el metabolismo energético. Aparentemente la capacidad de saturación de la α -Amilasa es característica de cada especie, lo cual podría ser usado para explicar las diferencias observadas en los niveles de GS y GGD entre las especies de camarón ahora estudiadas.

L.s = *L. setiferus* ; L.V. = *L. vannamei* y L. styl = *L. stylirostris*.

Estos resultados sugieren que los niveles de GS podrían estar controlados por la actividad de la α -amilasa de cada especie, reflejándose en niveles diferentes de esta en sangre y en el uso que cada especie le puede dar a los CBH como sustrato energético. Un diagrama de flujo puede ser utilizado para representar la cadena de eventos que rigen el aprovechamiento de los CBH de la dieta en los camarones estudiados y la forma en que están controlados (Fig. 9).

En ese diagrama se han incluido esquemáticamente los resultados obtenidos en las tres especies de camarón e indican de que manera *L. setiferus* aparece como la especie que está mejor adaptada para el uso de los CBH dietéticos pues presenta los mayores valores de GS. En contraste, *L. vannamei* presentó los valores mayores de GGD, indicando una mayor actividad gluconeogénica. Estas diferencias podrían estar relacionadas por un lado con la capacidad de cada especie para el uso de los CBH de la dieta como fuente de energía, y por el otro, en la capacidad adaptativa que tiene cada una para la formación de quitina en preparación para el crecimiento (Cuzon, 2000).

Relación entre los CBH de la dieta y el metabolismo de las proteínas.

El metabolismo de los CBH de los camarones peneidos esta estrechamente ligado al metabolismo de las proteínas, pues los camarones han demostrado una muy amplia capacidad para utilizar a este sustrato como fuente básica para la obtención de energía y para el crecimiento (Dall, 1975; Dall and Smith, 1986; Rosas, 2000b).

Simultáneamente a las mediciones realizadas del metabolismo de CBH de la dieta se realizaron una serie de evaluaciones tendientes a comprender con mayor profundidad la relación que guardan los CBH de la dieta con el metabolismo de las proteínas. Para hacer esto se midió la actividad de la fosfoenol piruvato carboquinasa (PECPK), de la glutamato des-hidrogenasa (GDH), las proteínas de la hemolinfa (PH) incluyendo a la hemocianina (HEMO), y las variaciones de los niveles de amonio en sangre (AS). Los detalles de los métodos aplicados se encuentran en (Racotta, 2000; Rosas, 2000^a ; Rosas, 2000b; Rosas, 2000c).

De los resultados presentados ahora es evidente que los juveniles de camarón de las tres especies están bien adaptados para producir CBH por vía gluconeogénica aún cuando los niveles de CBH dietéticos son cercanos a 0%. En todos los casos, un nivel mínimo de GGD (Fig. 5), glucosa de la glándula digestiva (Fig. 7), y GS fueron observados. La PECPK es la enzima clave en la regulación de la gluconeogénesis pues esta cataliza la conversión del oxalo acetato a fosfoenol piruvato el cual da inicio a la cadena de reacciones que terminarán con la formación de glucosa :

fosfoenol piruvato ~~*~~ ácido fosfoglicérico ~~ácido di~~ fosfoglicérico gliceraldehido
 dihidroxiacetona ~~fosfato~~ frutuosa 1 , 6 difosfato frutuosa 6 fosfato ~~*~~ glucosa 6 fosfato
 glucosa ~~*~~ ~~*~~

Esta enzima ha sido reportada en la glándula digestiva de diferentes especies y fue recientemente secuenciada en peneidos (Lallier, 1991). Los ajustes en la actividad de la PECPK producidos por dietas con diferentes niveles de proteínas y CBH fue demostrada en el cangrejo *Chasmagnathus granulata* (Oliveira, 1997). En este cangrejo se observó que el mantenimiento de la presión osmótica compite con la síntesis de glucosa por el uso del pool de amino ácidos libres (Moon, 1988). Esto demuestra que la fuente que abastece a las vías gluconeogénicas es precisamente el pool de amino ácidos libres el cual esta principalmente compuesto de los AA no esenciales (Da Silva, 1992).

Como se puede apreciar, la actividad de la PECPK en juveniles de *L. vannamei* aumentó significativamente en relación con la falta de los CBH en la dieta, indicando la inducción de las vías gluconeogénicas.

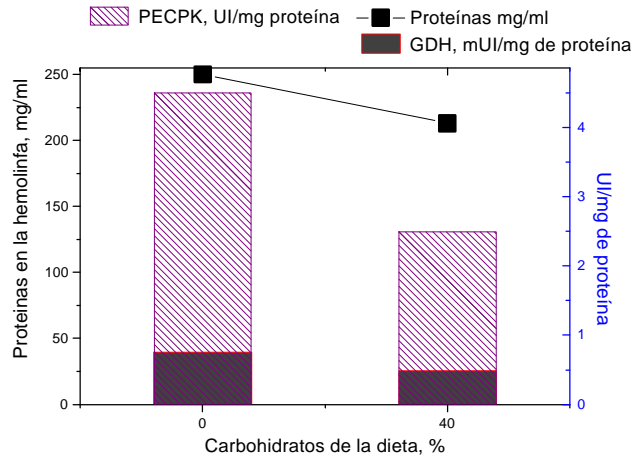


Fig. 10. Variaciones de la actividad de la PECPK, la GDH y los niveles de proteína de la hemolinfa en juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de CBH dietéticos. Valores promedio de 15 mediciones por tratamiento.

La síntesis de CBH a partir de proteínas demuestra que los camarones están bien adaptados a la falta de CBH dietéticos lo cual refleja que los camarones han evolucionado ingiriendo dietas con un fuerte componente proteico. Estudios recientes (Donaldson, 1976) han demostrado que las proteínas son el principal componente de los ecosistemas bentónicos donde habitan los camarones peneidos.

La gluconogénesis requiere de la utilización del pool de AA libres, a través del mecanismo de deaminación y transaminación. La transaminación es la conversión de los AA en α -cetoglutarato, utilizando al glutarato como sustrato. Uno de los productos finales de esta reacción es el amonio. Esta reacción está mediada por la participación de la Glutamato deshidrogenasa (GDH). La GDH ha sido estudiada en cangrejos y hasta muy recientemente en camarones peneidos (Regnault, 1981, Regnault, 1993; Rosas, 2000c).

Los resultados presentados en la figura 10 ponen en evidencia que la actividad de la GDH fue estimulada por una disminución de los CBH dietéticos, siguiendo el mismo patrón de comportamiento que el presentado por la PECPK. Al mismo tiempo, en esa figura es posible observar que los incrementos de ambas actividades coincidieron con un aumento de las proteínas de la hemolinfa. Estos resultados demuestran que, en ausencia de CBH dietéticos existe un aumento de las proteínas en circulación posiblemente en como una respuesta a la demanda de proteínas en diversos tejidos las cuales son necesarias para satisfacer la síntesis de glucógeno.

Una evidencia más de que este proceso pudiera estar activando la síntesis del glucógeno es el aumento observado del amonio en la hemolinfa. El amonio producido en la deaminación es eliminado a través de la excreción en branquias y es transportado por vía sanguínea para su excreción (Fig. 11).

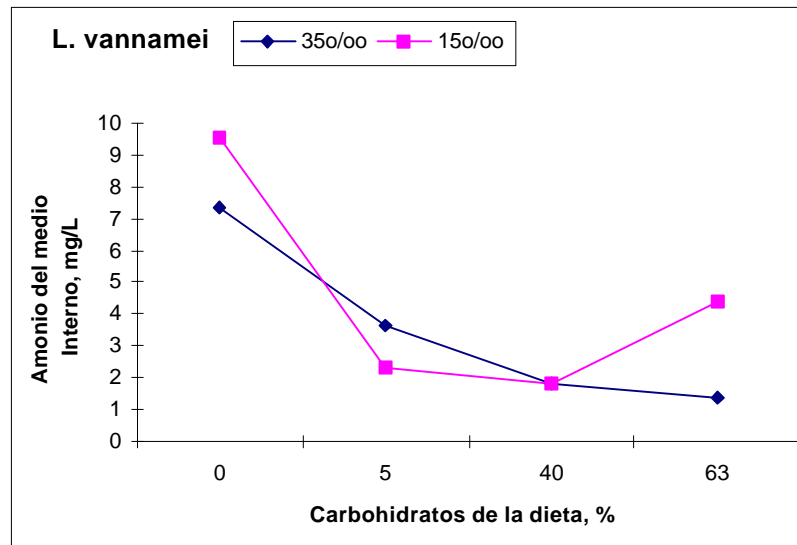


Fig. 11. Variaciones del amonio en sangre en juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de CBH de la dieta. Valores promedio de 15 mediciones por tratamiento.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. Los resultados del presente estudio demuestran que el metabolismo de los CBH en *L. vannamei*, *L. setiferus* y *L. stylirostris* están limitados. *L. setiferus* tolera niveles mayores de CBH que *L. vannamei* y *L. stylirostris* indicando que la adaptación nutricional entre estas especies es distinta. Estas diferencias podrían explicar por que a la fecha el crecimiento de *L. vannamei* en cultivo es mayor que la de *L. setiferus*: ambas especies no deberían ser cultivados siguiendo los mismos esquemas nutricionales ni alimentarios.
2. Las limitaciones metabólicas proceden al parecer, de la limitada capacidad de la α -amilasa para la degradación de altas concentraciones de CBH.
3. La acumulación de glucógeno en la GD mostró una curva de saturación en relación con la concentración de CBH dietéticos con valores de saturación equivalentes a 20% de CBH dietéticos para *L. vannamei* y *L. stylirostris* y de 30% para *L. setiferus*. Si el glucógeno satura las células de la GD podría limitar los sitios de absorción de otros nutrientes importantes para el crecimiento.
4. El papel de la hexoquinasa y otras enzimas digestivas involucradas en el metabolismo de CBH debieran ser estudiados con el fin de comprender mejor el funcionamiento de la maquinaria enzimática asociada con este proceso.
5. Los efectos de las variables ambientales y en particular de la salinidad deberán ser estudiados. Es necesario considerar que el metabolismo de los CBH está estrechamente ligado al metabolismo de proteínas, sobre todo a la hora en que se requieren AA para compensar los ajustes del volumen celular en ambientes diluidos.

REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, S. H., Kanazawa A., Teshima S. 1979. Effects of dietary carbohydrate on the growth and the level of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 45: 1491-1494
- Ahmed, F. 1997. In defense of land and livelihood. Sierra Club of Canada., Pp 31.

- Al-Mohanna, S. Y., and Nott, J.A. 1987. R cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea Decapoda). *Mar. Biol.* 95: 129-137.
- Campbell, J. W. 1991. Excretory nitrogen metabolism. In: (ed Prosser, C.L.) *Comparative Animal Physiology*. Pp. 277-324. Wiley-liss, New York.
- Ceccaldi, H. J. 1998. A synopsis of morphology and physiology of digestive system of some crustacean species studied in France. *Reviews in Fisheries Science*. 6: 13-19.
- Cortés-Jacinto E., V. H., and Portillo C.G., 1998. Frecuencia y distribución alimenticia en el cultivo intensivo de juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei*. In IV simposium Internacional de Nutrición Acuícola vol. 2 . (Roberto Civera Cerecedo, Claudia J. Pérez Estrada, L. Denis Ricque Marie y L.Elizabeth Cruz Suárez) La Paz B.C.S., México: centro de Investigaciones Biológicas del Noreste.
- Cousin, M. 1995. Contribution à l'étude de l'utilisation des glucides et du rapport protéine/énergie chez *P.vannamei* et *P.stylirostris*. Thèse INA/PG. Paris. Pp. 201.
- Cruz-Suarez, L. E., D. Ricque-Marie, J. D. Pinal-Mansilla and P. Wesche-Ebelling. 1994. Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*: Economical impact. *Aquaculture*. 123: 349-360
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G., and A., Van Wormhoudt. 2000. Utilization of carbohydrate by shrimp. In *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Eds. Cruz-Suarez, E., Olvera-Novoa, M.A., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., y Civera-Cerecedo, R.). Mérida Yucatán: CINVESTAV-Mérida.
- Da Silva, R. S. M., and Kucharski, L.C. 1992. Effect of hypo osmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate diets. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 101A: 631-634.
- Dall, W. 1975. The role of ninhydrin-positive substances in osmoregulation in the western rock lobster *Panulirus longipes* (Milne Edwards). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 19: 43-58.
- Dall, W. and D. M. Smith. 1986. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture*. 55: 23-33.
- Deshimaru, O., and Shigeno, K. 1972. Introduction to artificial diet for prawn, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*. 1: 115-133.
- Donaldson, H. A. 1976. Chemical composition of sergestid shrimp (Decapoda: Natantia) collected near Bermuda. *Marine Biology*. 38: 51-58.
- Folke, C., and N. Kautsky. 1992. *Aquaculture with its environmental: prospects for sustainability*. --Ocean and Coastal Management. 17: 5-24.
- Gellissen, G., Hennecke and Spindler, K.D. 1991. The site of synthesis of hemocyanin in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Experientia*. 47: 194-195.
- Gibson, R., and Barker, P.L. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17: 285-346
- Lallier, F. H. a., Walsh, P.J. 1991. Metabolic potential in tissue of the blue crab, *Callinectes sapidus*. --*Bull. mar. Sci.* 48: 665-669.
- Le Chevalier, P. and A. Van Wormhoudt. 1998. Alpha-Glucosidase From the Hepatopancreas of the Shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea-Decapoda). *Journal of Experimental Zoology*. 280: 384-394.
- Lemos, D. a. R., A. 1998. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. --*Aquaculture*. 160: 103-116.
- Loret, S. 1990. Evaluation de l'importance relative des hemocytes et des cellules de la glande digestive d'un crustacé décapode, dans la mise en réserve et la libération du glucose. *Namur, Fr.* Pp. 124
- Loret, S. M. 1993. Hemocyte differentiation in the shore crab (*Carcinus maenas*) could be accompanied by a loss of glycogenosynthesis capability. *The journal of experimental zoology*. 267: 548-555.
- Lovett, D. L. a. F., D.L. 1990. Ontogenetic changes in the digestive activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biological Bulletin*. 178: 144-159.
- Mayzaud, P., Conover R.J. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45: 289-302.
- Molina-Poveda, C., R., Civera, 1998. Disminución de la proteína en el alimento del camarón como una estrategia para reducir el impacto ambiental. In IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola vol. 2 (Eds. Roberto Civera Cerecedo, Claudia J. Pérez Estrada, L. Denis Ricque Marie y L.Elizabeth Cruz Suárez). La Paz B.C.S. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste.
- Moon, T. W. 1988. Adaptation, constraint and the function of gluconeogenic pathway. --*Canadian Journal of Zoology*. 66: 1059-1068.

- Nelson, S. G., Simmons, M.A., Knight, A.W., and Li, H.W. 1977. The effect of temperature and salinity on the metabolic rate of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 56A: 533-537.
- Oliveira, G. T. a. Da Silva, R. S. 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A: 1429-1435.
- Omondi, J. G. and J. R. Stark. 1996. *In vitro* carbohydrate digestibility tests in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*. 139: 315-328.
- Pascual, P. F., Coloso, R.M., Tamse, C.T., 1983. Survival and some histological changes in *Penaeus monodon* Fabricius juveniles fed various carbohydrates. *Aquaculture*. 31: 169-180.
- Pedrazzoli, A., Molina C., Montoya N., Townsend S., León-Hing A., Paredes Y., and Calderón J. 1998. Recent advances on nutrition research of *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Reviews in Fisheries Science*. 61: 143-151.
- Primavera, J. H. 1997. Socio-economic impacts of shrimp culture. *Aquaculture Research*. 28: 815-827.
- Quetin, L. B., Ross, R.M., and Uchio, K. 1980. Metabolic characteristics of midwater zooplankton: ammonia excretion, O:N ratios, and the effect of starvation. *Marine Biology*. 59: 201-209.
- Racotta, I. S., and R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic response of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A: 437-443.
- Regnault, M. 1981. Respiration and ammonia excretion of the shrimp *Crangon crangon* L. metabolic response to prolonged starvation. *Journal Comparative Physiology*. 141: 549-555
- Regnault, M. 1993. Effect of severe hypoxia on some aspects of nitrogen metabolism in the crab *Cancer pagurus*. *Mar. Behav. Physiol.* 22: 131-140
- Ricque-Marie, D., Abdo-de La Parra M. I., Cruz Suárez E., Cuzon G., Cousin M., Aquacop, Pike I.H. 1998. Raw material freshness, a quality criterion for fish meal fed to shrimp. *Aquaculture*. 165: 85-109
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C., and A. Van Wormhoudt. 2000a. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal experimental marine biology and ecology*. 249: 181-198
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., and Van Wormhoudt, A. 2000b. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda ; Penaeidae). *Aquaculture Research*. in press.
- Rosas, C., Sanchez, A., Díaz E., Soto, L.A., Gaxiola, G. and Brito, R. 1996. Effect of dietary protein level on apparent heat increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae. *Journal of The World aquaculture Society*. 27: 92-102.
- Rosas, C., Bolongaro-Crvenna, A., Sánchez, A., Gaxiola, G., Soto, L. and Escobar, E. 1995. Role of the digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biol. Bull.* 189: 168-174.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le Priol, Y., Rossignol, P.C.J., Contreras, F., Sánchez, A. and van Wormhoudt, A. 2000. Effect of dietary carbohydrate levels and salinity on metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. in press.
- Rosas, C., Sánchez, A., Díaz, E., Soto, L., Gaxiola, G., Brito, R., Baes, M.I. and Pedroza, R. 1995. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae fed purified test diets: effects of protein level on substrate metabolism. *Aquatic Living Resources*. 8: 161-169.
- Rosas, C., Sánchez, A., Gallardo, P., Quiroz, J., Gaxiola, G., Díaz-Iglesia, E. and Soto, L.A. 1995. Oxygen consumption and ingestion rate of *Penaeus setiferus* larvae fed *Chaetoceros ceratosporum*, *Tetraselmis chuii* and *Artemia* nauplii. *Aquaculture Nutrition*. 1: 13-20.
- Sanchez A., Rosas, C., Escobar, E., and Soto, L.A. 1991. Skeleton weight free oxygen consumption related to adaptation to environment and habits of six crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 100A: 69-73.
- Shiau, S.-Y., and Peng C-Y. 1992. Utilization of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn, *Penaeus monodon*, reared in seawater. --*Aquaculture*. 101: 241-250.
- Shiau, S.-Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 164: 77-93.
- Taboada, G., Gaxiola G., García T., Pedroza R., Sanchez A., Soto L. and R. C. 1998. Oxygen consumption and ammonia-N excretion related to protein requirements for growth of withe shrimp *Penaeus setiferus*. -- *Aquaculture Research*. 29: 1-11.
- van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical biochemistry*. 11: 256-265.
- van Wormhoudt, A., Bourreau, G., and Le Moullac, G. 1995. Amylase polymorphism in Crustacea Decapoda: electrophoretic and immunological studies. *Biochemistry, Systematics and Ecology*. 23: 139-149.

Velasco, M., Lawrence A.L., and Neill W.H. 1998. Effect of dietary phosphorous level and inorganic source on survival and growth of *Penaeus vannamei* postlarvae in zero water exchange culture tanks. Aquatic Living Resources. 11: 29-33.