



Eficiencia de absorción en postlarvas de camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con una dieta de levadura marina de marismas de manglar

Absorption efficiency in post-larvae of the shrimp *Litopenaeus vannamei* fed a diet of marine yeast from mangrove mudflats

Fulvia Solorzano-Reyes¹ y Patricio C. Velásquez-López^{2*}

0000-0001-9233-9818

0000-0002-3044-920X

1. BioMar Alimentos Ecuador SA., Tambo, Guayaquil, Ecuador. fulso@biomar.com*

2. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala, Machala. Ecuador. colon.velasquez@gmail.com

* Autor de correspondencia

RESUMEN

El presente estudio investigó la levadura marina como fuente de alimento en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Se determinó la eficiencia de absorción de levaduras midiendo la proporción de materia orgánica asimilada por las postlarvas de camarón. La levadura marina se aisló y se propagó en laboratorio a partir de una muestra de sedimento obtenida en una marisma de manglar. Seis etapas de desarrollo de postlarvas de camarón, desde PL-5 días hasta PL-35 días fueron alimentadas exclusivamente con tres concentraciones de levaduras ($1,5 \times 10^5$, 3×10^5 , 5×10^5 cel/mL). El promedio general de la absorción de levadura fue de $65,85 \pm 11,42$ %. El análisis de varianza de dos vías ANOVA ($p < 0,05$) mostró que la eficiencia de absorción de levadura en post-larvas de camarón no se vio afectada por las concentraciones de levaduras; tampoco las concentraciones de levaduras interactuaron con la edad de las postlarvas. La eficiencia de absorción de 67,30 % registrada en postlarvas jóvenes (PL-5 a PL-15) fue significativamente diferente a la absorción registrada en post-larvas de mayor edad (PL-20 a PL-35) con un promedio de 60,21 % ($p < 0,05$). La eficiencia de absorción relativamente alta de levadura en postlarvas de *L. vannamei* contribuye a una mejor comprensión del rol de los microorganismos como complemento nutricional en la acuicultura costera.

PALABRAS CLAVE: Absorción de alimento, acuicultura estuarina, manglares, microorganismos, camarón blanco del Pacífico.

ABSTRACT

The present study investigated marine yeast as a food source in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Yeast absorption efficiency was determined by measuring the proportion of organic matter assimilated by shrimp post-larvae (PLs). The yeast was isolated and propagated in the laboratory from a sediment sample obtained from a mangrove mudflat. Shrimp post-larvae at six stages, from PL-5-days-old to PL-35-days-old were fed exclusively with yeasts, at three concentrations (1.5×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 cell/mL). The overall average of yeast absorption was around 65.85 ± 11.42 %. The two-way analysis of variance ANOVA ($p < 0.05$) showed that the efficiency of yeast absorption was not affected by the concentrations of yeasts as a food source: none of the yeast concentrations interacted with the age of the post-larvae. The absorption efficiency of 67.30 % registered in young post-larvae (PL 5-days-old to PL15-days old) was significantly different than the efficiency registered for older post-larvae (PL 20 days old to PL 35 days-old) with an average of 60.21 % ($p < 0.05$). The relatively high absorption efficiency of yeast in *L. vannamei* post-larvae contributes to a better understanding of the potential role of microorganisms as complementary feedstuffs in coastal aquaculture.

KEYWORDS: Estuarine aquaculture, food absorption, mangroves, microorganisms, Pacific white shrimp.

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, es una de las principales especies acuáticas empleadas en la acuicultura costera. Su cultivo corresponde a cerca de 15 % de la producción pesquera mundial y tiene un valor en el mercado global de casi US \$18 mil millones (FAO, 2017). El camarón *L. vannamei* tiene varias etapas de desarrollo: larva, postlarva, prejuvenil, juvenil y etapa adulta final. La etapa de postlarva ocurre después de las fases larvales de nauplio, zoea y mysis. En las etapas de zoea y mysis los camarones blancos del Pacífico son organismos planctónicos que se alimentan de restos de materia orgánica, algas y pequeños invertebrados. En las operaciones comerciales de acuicultura, el alimento para las larvas de camarón consiste en una o dos especies de diatomeas, tales como *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira weissflogii* (Kiatmetha *et al.*, 2011), cuya concentración en el tanque de cría fluctúa alrededor de 1×10^5 cel/mL (Müller-Feuga *et al.*, 2003). Las fases mysis y postlarva se alimentan con microcrustáceos *Artemia salina*; sin embargo, muchas operaciones de criadero reemplazan el alimento vivo con alternativas artificiales. Las postlarvas producidas en criaderos se transportan a instalaciones de cultivo bajo condiciones semicontroladas, bien sea en estanques invernaderos o en piscinas terrestres preengorde.

Por lo general, el cultivo de camarón se realiza en o cerca de ecosistemas de manglares. Por ejemplo, Ecuador, el principal productor de camarón de las Américas, tiene aproximadamente 2.200 km de costa, y alrededor de 75 % del cultivo de camarón se realiza cerca de bosques de manglares. Las levaduras se encuentran en la zona costera marina como parte de una gran comunidad microbiana (Chi *et al.*, 2012). Varios investigadores han revisado el uso de microorganismos como potencial fuente de alimento en sistemas de acuicultura, estos autores han explorado la importancia de bacterias, levaduras, hongos y microalgas para el mantenimiento de diferentes animales acuáticos. La composición de las levaduras sugiere que podrían ser una fuente de alimento alternativa y confiable para los organismos marinos, pues contienen polímeros, ácidos grasos poliinsaturados, y grandes concentraciones de vitaminas y minerales (Shelby *et al.*, 2019). La pared celular de la levadura consta de 57 % de β -glucano, 6,6 % de oligosacáridos y 22 % de glucoproteína Sahlmann *et al.* (2009), Chi *et al.* (2010) y Kupetz *et al.* (2015) registran que la levadura tiene un alto valor nutricional para peces y camarones en condiciones de cultivo. Así mismo, Lara-Flores (2003) sostiene que la levadura puede reemplazar de manera efectiva otras fuentes de proteína y lograr un mejor

INTRODUCTION

The Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is one of the main aquatic species used in coastal aquaculture. This crustacean's cultivation accounts for about 15 % of the total fishery production and has a global market value of nearly 18 billion USD (FAO, 2017). The Pacific white shrimp has several development stages: larval, post-larval (PL), pre-juvenile, juvenile, and the final adult stage. The PL stage occurs after the larval stages of nauplii, zoea, and mysis. In the zoea and mysis stages, white shrimps are planktonic organisms that eat dead organic matter, algae, and small invertebrates. In commercial aquaculture operations, the food for larval shrimp consists of one or two diatom species, such as *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira weissflogii* (Kiatmetha *et al.*, 2011), and the concentration of these microalgae in the rearing tank fluctuates around 1×10^5 cell/mL (Müller-Feuga *et al.*, 2003). The mysis and post-larval phases are fed with the microcrustacean *Artemia salina*; however, many hatchery operations replace the live food with artificial food. The PLs produced in hatcheries are transported to rearing facilities under semi-controlled conditions, either in greenhouse ponds or in pre-growth-out ground pools.

Typically, shrimp farming occurs in, or near a mangrove ecosystem. For example, Ecuador, the major shrimp production country of America, has approximately 2,200 km of coastline, with about 75 % of shrimp farming located near a mangroves forest. Yeasts occur in the marine shoreline as a part of a large microbial community (Chi *et al.*, 2012). The use of microorganisms as a potential food source in aquaculture systems has been reviewed by several researchers, who explored the importance of bacteria, yeasts, fungi, and microalgae for maintaining different aquatic animals. The composition of yeast suggests that it can be a reliable alternative food source for marine organisms due to the presence of polymers, polyunsaturated fatty acids, and large amounts of vitamins and minerals (Shelby *et al.*, 2019). The yeast cell wall consists of 57 % β -glucan, 6.6 % oligosaccharides, and 22 % glycoprotein (Meena *et al.*, 2013). Sahlmann *et al.* (2009), Chi *et al.* (2010), and Kupetz *et al.* (2015) reported that yeast has a high nutritional value for fish and shrimp in cultivation conditions. Similarly, Lara-Flores (2003) stated that yeast can effectively replace other source of protein, achieving better fish growth and development. Farzanfar (2006), Sukumaran *et al.* (2010), and Zheng (2017) reported that feeding yeast to fish and shellfish

crecimiento y desarrollo de los peces. Por su parte, Farzanfar (2006), Sukumaran *et al.* (2010) y Zheng (2017) registraron que alimentar con levadura a los peces y mariscos reduce las enfermedades al disminuir la presencia de bacterias patógenas en el tracto intestinal. El valor nutricional de las levaduras hace que sean apropiadas como alimento complementario para peces y crustáceos (Pathissery, 2016; Sarlin *et al.*, 2016). Por ejemplo, Zhao *et al.* (2017) proporcionaron extracto de levadura, mezclado con aceite de pescado, fósforo y calcio, como un reemplazo de proteína para la harina de pescado utilizada para alimentar al camarón *L. vannamei*. Una cantidad considerable de los inmunoestimulantes comerciales utilizados en la acuicultura se derivan de levadura, lo que refleja la importancia de estos microorganismos para la industria (Villamil-Díaz y Martínez-Silva, 2009). Además, debido al tamaño y a la composición de nutrientes de las levaduras, varios investigadores han propuesto el uso de levadura viva para bioenriquecer organismos de presa como los rotíferos y el camarón de salmuera (Lavens *et al.*, 1996; Patra y Mohamed, 2003), aunque esta práctica apenas se está empezando a usar en sistemas de acuicultura.

A pesar de todos los efectos positivos de las levaduras, se han realizado pocos estudios sobre su utilidad como alimento vivo para el cultivo de camarón (Villamil-Díaz y Martínez-Silva, 2009). No se han realizado estudios para evaluar la ingestión, colonización o digestibilidad de la levadura marina en el camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*. Adicionalmente, el conocimiento sobre la eficiencia de absorción de alimentos de las larvas de camarón se limita a la ingestión de microalgas (Urabe, 1991; Evjemo, 2000). La información sobre el rendimiento de las postlarvas de camarón alimentadas exclusivamente con una dieta de levadura es escasa. El objetivo de este estudio fue obtener levadura de las marismas de manglares y probarla como fuente dietética para las postlarvas de camarón blanco del Pacífico. Se investigó el uso de la levadura marina como fuente de alimento midiendo la eficiencia de absorción de la levadura por parte de *L. vannamei* en etapas de postlarva, y empleando diferentes concentraciones de levadura. La eficiencia de absorción de los alimentos, también conocida como eficiencia digestiva o digestibilidad de los alimentos, es la proporción de materia orgánica asimilada por un organismo (Lucas y Watson, 2002). Por lo tanto, para que la levadura sea un alimento eficaz para los camarones, esta debe ser asimilada y sus compuestos orgánicos deben degradarse. Debido a que el alimento disponible para los camarones se presenta como materia orgánica, su absorción indica la capacidad del camarón de absorber sus compuestos naturales. Este estudio

reduced disease by diminishing the presence of pathogenic bacteria in the intestinal tract. The nutritional value of yeasts makes them appropriate as supplemental food for fish and crustaceans (Pathissery, 2016; Sarlin *et al.*, 2016). For example, Zhao *et al.* (2017) provided yeast extract mixed with fish oil, phosphorus, and calcium as a protein replacement for fishmeal for *L. vannamei*. A considerable number of commercial immunostimulant products used in aquaculture are derived from yeasts, which reflects the importance of these microorganisms to this industry (Villamil-Díaz and Martínez-Silva, 2009). Furthermore, due to yeast's size and nutrient composition, several researchers have proposed using live yeast to bio-enrich prey organisms such as rotifers and brine shrimp (Lavens *et al.*, 1996; Patra and Mohamed, 2003), but this practice is only beginning to be used in aquaculture systems.

Notwithstanding all the positive effects of yeasts, there has been little research on their utility as live food for shrimp cultivation (Villamil-Díaz and Martínez-Silva, 2009). No studies have been conducted to evaluate the ingestion, colonisation, or digestibility of marine yeast in the white shrimp *L. vannamei*. Moreover, the knowledge about food absorption efficiency in shrimp larvae is restricted to ingestion of microalgae (Urabe, 1991; Evjemo, 2000). Little information is available concerning the performance of shrimp post-larvae sustained exclusively on a yeast diet. The objective of this study was to obtain yeast from mangrove mudflats and test it as a dietary source for the marine white shrimp post-larvae. The use of marine yeast as a food source was investigated by measuring the absorption efficiency of yeast in *L. vannamei* post-larval stages at different yeast concentrations. The food absorption efficiency, also known as food digestive efficiency or digestibility, is the proportion of organic matter assimilated by an organism (Lucas and Watson, 2002). Hence, for the yeast to be usable for shrimp, it must be assimilated, degrading its organic compounds. Because the food available to shrimp occurs as organic matter, its absorption indicates the shrimp's ability to absorb its natural compounds. This study evaluates the absorption efficiency of marine yeast by measuring the proportion of organic matter in the yeast (food) and the faeces of the shrimp, where the organic component of the food ingested is assimilated by the process of digestion (Conover, 1966).

evalúa la eficiencia de la absorción de la levadura marina mediante la proporción de materia orgánica presente en la levadura (alimento) y en las heces del camarón, en la cual el componente orgánico del alimento ingerido es asimilado a través del proceso de digestión (Conover, 1966).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación incluyó una etapa de toma de muestras (en el área de manglar-camarón) y una experimental (propagación de levaduras y alimentación de postlarvas). Para obtener la levadura se tomó una sola muestra de sedimento de una marisma de manglar en el área costera de cultivo de camarón cerca de Machala, provincia de El Oro, Ecuador (longitud 9636225, latitud 620861). Las fases de tratamiento de sedimentos, mantenimiento de postlarvas y establecimiento de las pruebas experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio de acuicultura de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, ubicada aproximadamente a 45 km del lugar donde se tomaron las muestras.

Muestreo de sedimentos; aislamiento y cultivo de levadura

Utilizando una espátula estéril se recolectaron asépticamente muestras de 500 g tomadas a 10 cm de la capa superior de sedimento del bosque de manglar. La muestra de sedimento se colocó en recipientes plásticos esterilizados herméticamente cerrados, se mantuvo en condiciones frías de entre 4 y 10 °C y se transportó al laboratorio inmediatamente después de la recolección. Bajo condiciones de laboratorio, se suspendió 1g de sedimento en 10 mL de solución de peptona. Posteriormente, se colocó 1 mL de solución fresca en placas de cultivo de agar Saboraud y se incubó a 30° C durante dos días. Tras el período de incubación, después de que aparecieron colonias de microorganismos, algunas de las unidades formadoras de colonias se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía una solución concentrada de peptona. De esta manera, obtuvimos un caldo de levadura primario. La propagación de la levadura procedió de los 250 mL de cultivo madre a etapas intermedias de 1 y 3 L. Las levaduras se cultivaron en un medio compuesto por una solución preparada con agua de mar filtrada a través de una microfibra de borosilicato (0,47 µm). El agua se enriqueció con 0,65 g/L de fosfato de sodio, 1,0 g/L de nitrato de sodio y 10 ml/L de melaza. El medio de cultivo de levadura se acidificó con ácido muriático hasta un pH de 4,5, condición recomendada para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (Vieira

MATERIALS AND METHODS

This work includes a sampling stage (mangrove-shrimp area) and an experimental stage (yeast propagation and feeding of PLs). To obtain the yeast, a single sediment sample was taken from a mangrove mudflat in the coastal shrimp farming area near Machala, El Oro province, Ecuador (longitude 9636225 and latitude 620861). The phases of sediment treatment, the maintenance of post-larvae, and the set-up of the experimental tests took place in the aquaculture laboratory of the Agricultural Sciences Faculty of the Technical University of Machala, located approximately 45 km from the sampling point.

Sampling sediments; yeast isolation and culture

Using a sterile spatula, 500 g samples were collected aseptically taken 10 cm from the upper sediment layer of the mangrove forest. The sediment sample was placed in hermetically sealed sterilised plastic containers, kept in cold conditions between 4 to 10 °C, and transported to the laboratory immediately after collection. Under fixed conditions in the laboratory, 1 g of sediment was suspended in 10 mL of peptone solution. After that, 1 mL of fresh solution was placed into Saboraud agar culture plates and incubated at 30 °C for two days. After the incubation period, when colonies of microorganisms appeared, some of the colony-forming spots were transferred to a test tube containing a concentrated peptone solution. In this way, we obtained a primary yeast stock. The propagation of the yeast proceeded from the 250 mL of stock culture to intermediate stages of 1 and 3 L. The yeasts were cultured in a medium consisting of a solution prepared with seawater filtered through a borosilicate microfibre (0.47 µm). The water was enriched with 0.65 g/L sodium phosphate, 1.0 g/L sodium nitrate, and 10 mL/L molasses. The yeast culture medium was acidified with muriatic acid to a pH of 4.5, the recommended condition for the *Saccharomyces cerevisiae* strain (Vieira *et al.*, 2013). The culture was ready for use when the 5 L of culture reached the exponential growth phase. To ensure the purity of the molasses, the sugarcane was obtained directly from a farm located in the upper lands of the province of El Oro, Ecuador.

A portion of the yeast mass was collected and transferred to a glass fibre filter. Then the yeasts were rinsed with distilled water in a vacuum filtering system. Six samples of the yeast stock were preserved for further organic matter analysis.

et al., 2013). El cultivo estuvo listo para su uso cuando los 5 L de cultivo resultantes alcanzaron la fase de crecimiento exponencial. Para asegurar la pureza de la melaza, ésta se obtuvo directamente de una finca de caña de azúcar ubicada en tierras altas de la provincia de El Oro, Ecuador.

Se recolectó una porción de la masa de levadura y se transfirió a un filtro de fibra de vidrio. Luego, se enjuagaron las levaduras con agua destilada en un sistema de filtrado al vacío. Se conservaron seis muestras del caldo de levadura para posterior análisis de materia orgánica.

Mantenimiento de postlarvas de *L. vannamei* y diseño experimental

Las postlarvas de *L. vannamei* (de tres a cuatro días de edad) se obtuvieron de un laboratorio comercial ubicado cerca del laboratorio de experimentos en la Universidad Técnica de Machala. Durante la operación del cultivo de larvas, los organismos fueron alimentados con fitoplancton durante la fase zoea y con una combinación de *Artemia salina* y dieta microparticulada durante la de mysis (Figura 1).

Maintenance of *Litopenaeus vannamei* PLs and experimental design

The *L. vannamei* post-larvae (3–4 days old) were obtained from a local commercial laboratory located nearby the testing laboratory at the Technical University of Machala. During the larvae culture operation, the organisms were fed phytoplankton during the zoea phase and a combination of *Artemia salina* and microparticulate diets during the mysis phase (Figure 1).

During the post-larval stages, the food regime consisted exclusively of formulated food. When 3–4 days old, the PLs were transported to the testing laboratory's bioassay area at the Faculty of Agricultural Sciences at the Technical University of Machala for the experimental phase. The PLs were acclimatised and maintained in a 500 L culture tank. Following the feeding protocol of commercial laboratory, the PLs were fed ad libitum a diet composed of 100 % formulated food (52 % protein). The PLs were maintained in natural seawater filtered

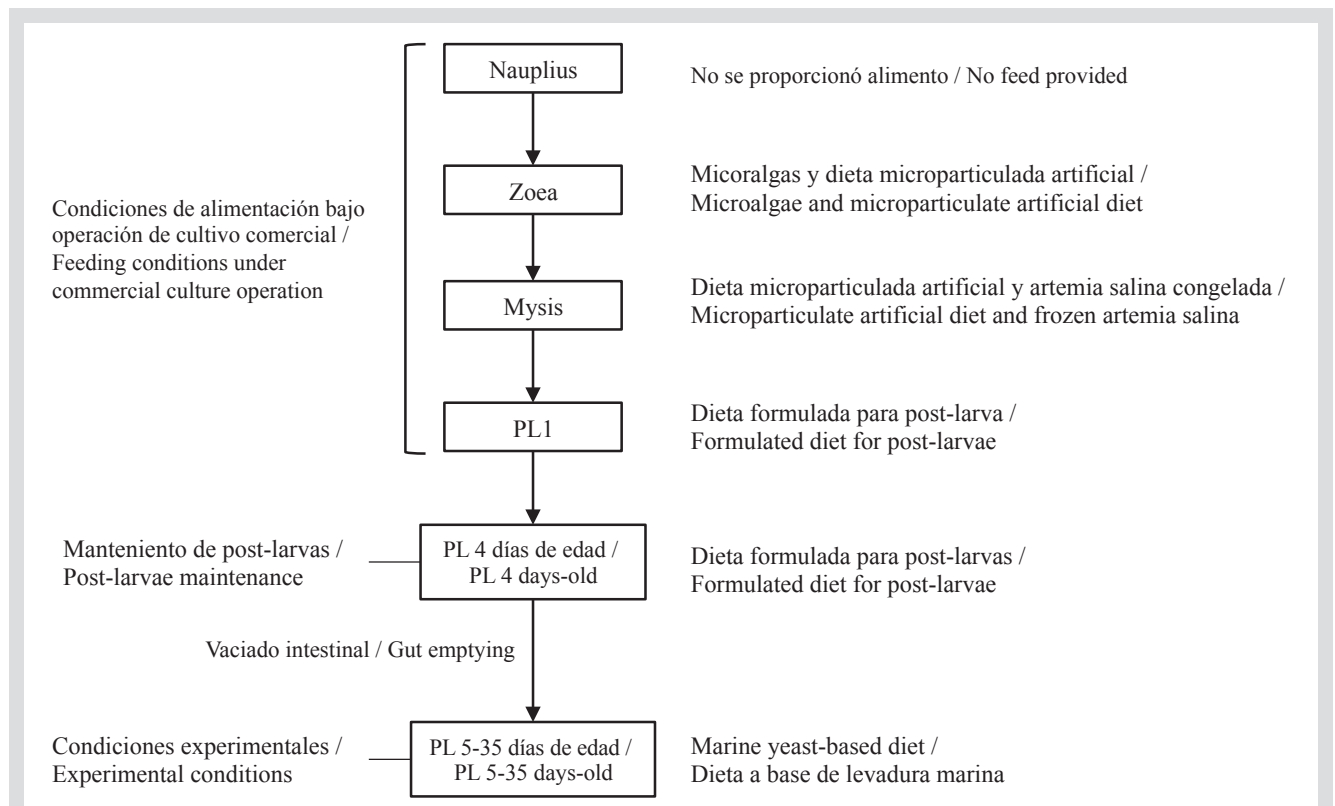


Figure 1. Diagrama de flujo de larvicultura de camarón adoptado en operaciones de cultivo comercial y mantenimiento de postlarvas para experimentos de alimentación con levadura marina.

Figure 1. Flowchart of shrimp larviculture adopted in commercial culture operation and maintenance of post-larvae for marine yeast feeding experiments.

Durante las etapas de postlarva, el régimen nutricional consistió exclusivamente en alimentos formulados. A los tres o cuatro días de edad, las postlarvas fueron transportadas al área de bioensayos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala. Las postlarvas se aclimataron y se mantuvieron en un tanque de cultivo de 500 L. Siguiendo el protocolo de alimentación del laboratorio comercial, las postlarvas fueron alimentadas con una dieta *ad libitum* compuesta por alimento 100 % formulado (52 % proteína). Las postlarvas se mantuvieron en agua de mar natural filtrada y conservada a temperatura ambiente. La salinidad del agua fue de 26 y la temperatura fluctuó entre 26 y 28° C. Las postlarvas se mantuvieron bajo estas condiciones hasta 35 días.

La Figura 2 muestra el diseño experimental del estudio. Para cada etapa de postlarva, a partir de los cinco días de edad, se seleccionaron al azar aproximadamente 5.000 postlarvas del tanque de cría y se depositaron en acuarios de fibra de vidrio con 60 L de agua de mar esterilizada. Antes de introducir el alimento (levaduras) en los acuarios, las postlarvas se mantuvieron en reposo (sin alimentación) en agua 100 % pura durante 12 h para permitir la evacuación

and maintained at an ambient temperature. The water salinity was 26 parts per thousand, and the temperature fluctuated between 26 and 28 °C. The PLs were kept at these conditions until 35 days old.

Figure 2 shows the experimental design of this study. At each PL, stage starting from fivedays old, approximately 5,000 PLs were randomly selected from the rearing tank and stocked in a fibreglass aquarium with 60 L sterilised seawater. Before food (yeasts) was placed into the fibreglass aquariums, the post-larvae were kept at rest (no feeding) in 100 % pure water for 12 hours to allow for the total evacuation of the food they had consumed in the maintenance tank. During the rest period, the water was replaced at 100 %, ensuring faecal material removal in the aquariums. Each group of post-larvae was fed differently, according to the design. At each post-larval stage (5, 10, 15, 20, and 35 days old), the organisms were placed in the aquariums for 24 h for yeast feeding exposure, starting with the 5-day-old PLs and repeating at each stage.

The PLs were fed three different concentrations of yeast: 1.5×10^5 , 3×10^5 , and 5×10^5 cells/mL. The yeast

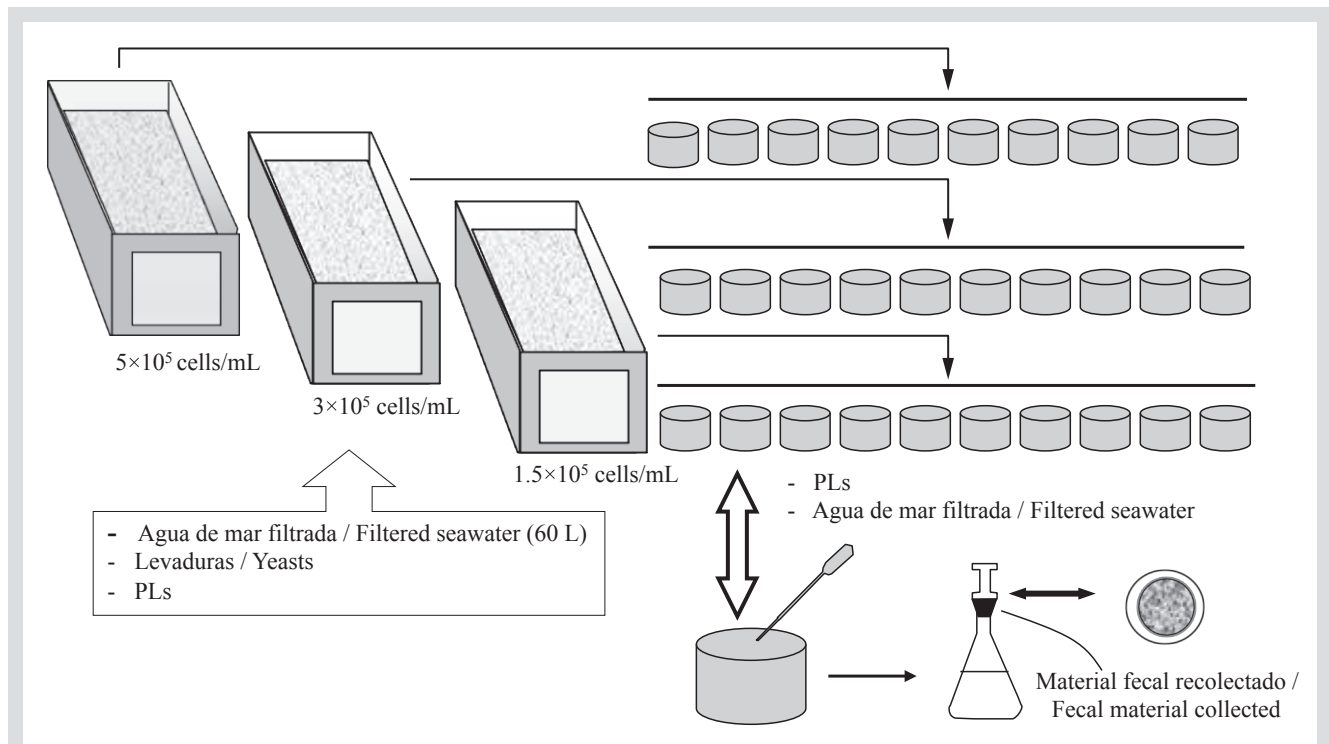


Figura 2. Diagrama esquemático del diseño experimental, que muestra los tres acuarios experimentales para sembrar postlarvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas durante 24 h marinas con una dieta a base de levaduras, los 10 recipientes para la excreción de las post-larvas y el procedimiento de recolección de la materia fecal.

Figure 2. Schematic diagram of the experimental design, showing the three experimental aquariums to stock the *Litopenaeus vannamei* postlarvae fed for 24 h marine with a yeast-based diet, the 10 containers for the excretion of the post-larvae and the procedure for collecting the fecal material.



total de los alimentos que habían consumido en el tanque de mantenimiento. Durante el período de descanso, el agua se reemplazó en un 100 %, para asegurar la eliminación de la materia fecal de los acuarios. En cada etapa de postlarva (5, 10, 15, 20 y 35 días) los organismos fueron colocados en los acuarios durante 24 h para la exposición a la alimentación con levadura. Cada grupo de postlarvas se alimentó de forma diferente, según el diseño.

Las postlarvas se alimentaron con tres concentraciones diferentes de levadura: $1,5 \times 10^5$, 3×10^5 y 5×10^5 cel/mL. La densidad de la levadura se calculó usando un hemocitómetro y un microscopio Nikon Optiphot. La densidad de la levadura se determinó cada tres horas tanto en los acuarios experimentales como en los matraces de propagación de levadura. Todos los acuarios tenían aireación permanentemente para mantener las levaduras en suspensión en la columna de agua.

Las levaduras se adicionaron utilizando el método recomendado por el Northeastern Regional Aquaculture Center (1993), y ajustando la siguiente fórmula:

$$VI = (Va \times Dy)/Dm$$

VI: volumen de levaduras para alimentar postlarvas

Va: volumen del acuario con postlarvas

Dy: densidad objetivo de levaduras en el acuario con postlarvas

Dm: densidad de levaduras en el cultivo masivo de levaduras

Las postlarvas se revisaron durante cada fase para examinar el contenido intestinal y el comportamiento general. Las levaduras se introdujeron en los recipientes de forma continua mediante inyección por goteo, utilizando un kit de suero fisiológico y ajustando la cantidad de la solución del cultivo de levadura para mantener la concentración deseada en cada fase experimental. Para determinar la eficiencia de absorción de la levadura en cada etapa, se recolectaron 10 grupos de postlarvas luego de las 24 h de alimentación, y se transfirieron a recipientes llenos de agua de mar esterilizada. Durante la hora siguiente, las postlarvas evacuaron sus heces y se retiraron de los matraces con una micropipeta de plástico. La materia fecal se colocó en pequeñas cápsulas de aluminio y se almacenaron para su posterior análisis.

Determinación de la eficiencia de absorción de la levadura

La eficiencia de absorción de la levadura se evaluó midiendo la proporción de materia orgánica en la levadura (alimento) y en las heces del camarón, en la cual

density was calculated using a hemocytometer and the Nikon Optiphot microscope. The yeast density was measured every three hours in both the experimental aquaria and the yeast propagation flasks. Constant aeration was provided in each aquarium to maintain the yeasts in suspension in the aquarium's water column.

The yeasts were added according to the method recommended by the Northeastern Regional Aquaculture Center (1993), adjusting the following formula:

$$VI = (Va \times Dy)/Dm$$

VI: volume of yeast culture to for feeding post-larvae

Va: volume of the postlarvae aquarium

Dy: target yeast density in the aquarium postlarvae

Dm: density of yeasts in the massive yeast culture

At each phase, the PLs were checked to examine gut content and overall behaviour. The yeasts were continuously fed into the containers by drip injection using a serum physiological kit and adjusting the quantity of yeast culture solution to maintain yeasts' desired concentration in each experimental phase. For the determination of yeast absorption efficiency at each stage, 10 PL groups were collected after 24 h of feeding. The PLs were collected and transferred to the vessels filled with sterilised seawater. Within approximately one hour, the PLs evacuated their faeces. The faeces were removed from the flasks using a plastic micropipette. The faecal material was placed in small aluminium caps and stored for further analysis.

Determination of yeast absorption efficiency

The absorption efficiency was evaluated by measuring the proportion of organic matter in the yeast (food) and in the shrimp faeces, where the organic component of the food ingested is assimilated (Conover, 1966). The faecal material and the yeast previously collected were separately filtered in a GF/C Whatman fibreglass filter (previously calcinated). The fibreglass filter was rinsed with distilled water while maintaining a vacuum pump filtering system. After filtration, the filters were placed into pre-weighed aluminium caps. The dry weight was determined using a Denver Instrument analytical scale (model X-100), and once the yeast and faecal products were dried in an oven at 60 °C for 48 hours and until constant weight was achieved. After that, the product was transferred to a desiccator to cool for 15 min. The dry matter resulted from the difference between the weight of the filter plus dry product (yeast or faeces)

el componente orgánico del alimento ingerido es asimilado (Conover, 1966). La materia fecal y las levaduras recolectadas se filtraron por separado en un filtro de fibra de vidrio GF/C Whatman (previamente calcinado). El filtro de fibra de vidrio se enjuagó con agua destilada, y se mantuvo un sistema de filtrado al vacío. Después del proceso de filtración, los filtros se colocaron en cápsulas de aluminio previamente pesadas. Se determinó el peso seco usando una balanza analítica Denver Instrument (modelo X-100). La levadura y los productos fecales se secaron en un horno a 60 °C durante 48 h hasta que se alcanzó un peso constante. A continuación, se transfirió el producto a un desecador para enfriarlo durante 15 min. El peso de la materia seca se calculó midiendo la diferencia entre el peso del filtro más el producto seco (levadura o heces) y el peso del filtro. El peso de los componentes inorgánicos (cenizas) se obtuvo colocando los filtros más el material seco en capsulas de aluminio e incinerándolos en una mufla a 450 °C durante cuatro horas. Luego, el material se colocó en el desecador antes de volverlo a pesar. Finalmente, se estimó la proporción de materia orgánica midiendo el peso seco y el contenido orgánico del alimento (levadura) y las heces. La eficiencia de absorción se calculó utilizando el método propuesto por Conover (1966) según la fórmula:

$$\text{Eficiencia de Absorción} = \frac{[(\text{Alimento}-\text{Heces}) / (\text{1}-\text{Alimento}) * \text{Heces}] * 100}{}$$

donde “Alimento” representa la proporción de materia orgánica y cenizas en el alimento, y “Heces” representa la proporción de materia orgánica y cenizas en las heces.

Captura y procesamiento de imágenes

Se obtuvieron imágenes de las células de levadura, el intestino de las postlarva y las heces usando un microscopio Nikon Optiphot equipado con una cámara Plumix modelo TMC-7. Las imágenes se digitalizaron utilizando una tarjeta de captura de imágenes (ATI All-in-Wonder). Las fotos digitalizadas se procesaron utilizando el software Scion Image 3.0b. La levadura se midió siguiendo las instrucciones incluidas con el programa.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS para Windows. Se utilizó el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con arreglo factorial para determinar si existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes concentraciones de levadura ($1,5 \times 10^5$, 3×10^5 y 5×10^5 cel/mL) y la edad de los grupos de postlarvas. Se utilizaron múltiples rangos de la prueba de Tukey ($p < 0,05$) para identificar tratamientos que podrían ser significativamente diferentes.

and the weight of the filter. The weight of the inorganic constituents (ashes) was obtained by placing the filters plus the dry material in aluminium caps and burning in a muffle furnace at 450 °C for 4 h. The material was then placed in the desiccator before re-weighing. Finally, the proportion of organic matter was estimated, taking into account the dry weight and the organic content of the food (yeast) and the faeces. The absorption efficiency was calculated using the method of Conover (1966) according to the formula:

$$\text{Absorption Efficiency} = \frac{[(\text{Food}-\text{Faeces}) / (\text{1}-\text{Food}) * \text{Faeces}] * 100}{}$$

where ‘Food’ represents the ratio of organic matter to ash in the food, and ‘Faeces’ represents the ratio of organic matter to ash in the faeces.

Capture and processing of images

Images of the yeast cell, postlarva gut, and faeces were obtained using a Nikon Optiphot microscope fitted with a Plumix Model TMC-7 camera. The images were digitised using an image capture card (ATI All-in-Wonder). The digitised photos were processed using Scion Image 3.0b software. The yeast was measured following the instructions in the program.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS for Windows. Two-way analysis of variance (ANOVA) with a factorial arrangement was used to determine whether there were significant differences ($p < 0.05$) between the different concentrations of yeast (1.5×10^5 , 3×10^5 , and 5×10^5 cells/mL) and between the PL age groups. Multiple ranges of Tukey’s test ($p < 0.05$) were used to identify treatments that could be significantly different.

RESULTS

Yeasts were extracted from the mangrove mudflats around a shrimp farm located in southern Ecuador’s marine coastal zone. Under laboratory conditions the yeast cells were purified in about 10 days. The yeast colonies were recognized by their ivory colour and rounded morphology (Figure 3).

The yeast cells were proliferated using a molasses (by-product of sugar cane) as the primary growth substrate until reaching an exponential growth phase with a concentration of over 70×10^6 cells/mL. The average size of the yeast was about $3.56 \mu\text{m}$ with 0.87 ± 0.04 % organic matter content.

RESULTADOS

Levaduras marinas fueron obtenidas del sedimento de una marisma de manglares localizada en los alrededores de una granja camaronera de la zona costera del sur de Ecuador. Bajo condiciones de laboratorio, las células de levadura se purificaron en aproximadamente 10 días. Las colonias de levadura fueron reconocidas por su color marfil y su morfología redondeada (Figura 3).

During the trials, the microbial colonisation was observed in the gut of the post-larvae, demonstrating that yeast had been ingested and had adhered to the intestinal mucosa of the *L. vannamei*. It was observed that yeast cells were destroyed by shrimp PLs, suggesting an efficient enzymatic process during the digestion. Importantly, no cannibalism was observed during the yeast feeding experiments.

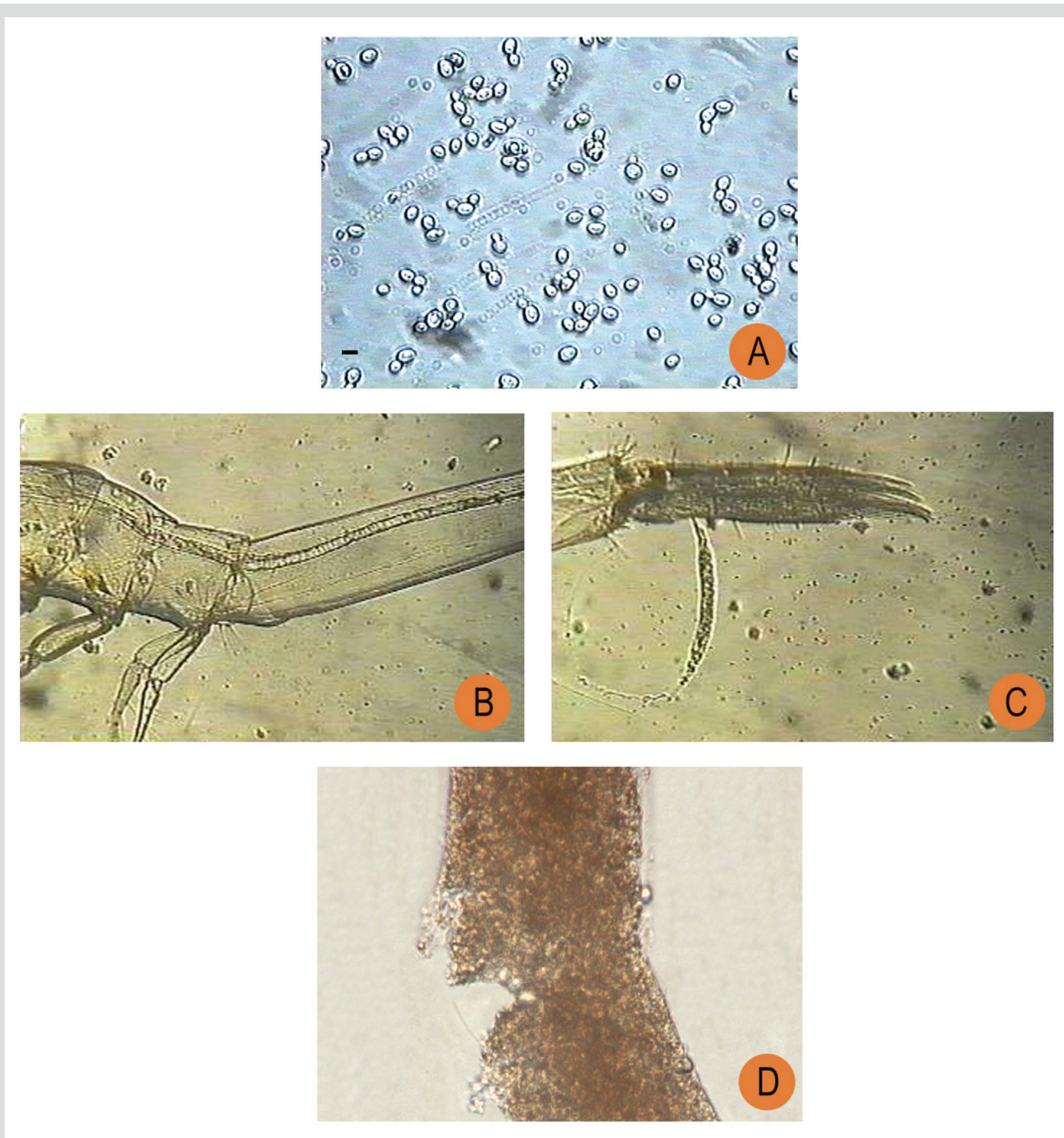


Figura 3. Microfotografías que muestran la absorción de levadura por las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* durante los experimentos de alimentación. (A) Células de levadura; (B) el intestino de una postlarva de *Litopenaeus vannamei* llena de levadura; (C) la excreción de levadura; y (D) el producto o las heces (Fuente: colección de los autores).

Figure 3. Photomicrographs showing yeast absorption by *Litopenaeus vannamei* post-larvae during the feeding experiments. (A) Yeast cells; (B) gut of a *Litopenaeus vannamei* post-larva filled with yeast; (C) the yeast excretion; and (D) the product or faeces (Source: authors collection.)

Las células de levadura aisladas se propagaron utilizando melaza (subproducto de la caña de azúcar) como sustrato de crecimiento primario hasta que se alcanzó una fase de crecimiento exponencial, con una concentración superior a 70×10^6 cel/mL. El tamaño medio de las levaduras fue de $3,56 \mu\text{m}$ con un contenido de materia orgánica de $0,87 \pm 0,04 \%$.

Durante los ensayos, se observó una colonización microbiana en el intestino de las postlarvas, lo que demostró que la levadura había sido ingerida y se había adherido a la mucosa intestinal. Se observó que las células de levadura fueron destruidas por las postlarvas de camarón, lo que sugiere un proceso enzimático eficiente durante la digestión. Es importante destacar que no se observó canibalismo durante los experimentos de alimentación con levadura.

Después del período de alimentación de 24 h en cada tratamiento, se recolectó el material fecal que consistía en levaduras digeridas por las postlarvas. En total, se obtuvieron 180 muestras de materia fecal de postlarvas de *L. vannamei* para determinar el contenido de materia orgánica. La Figura 4 muestra la eficiencia de absorción para diferentes etapas de postlarvas y las tres concentraciones de levadura. En general, la eficiencia de absorción de levadura de las postlarvas de *L. vannamei* fue de $63,71 \pm 2,56 \%$.

El análisis de varianza ($p < 0,05$) mostró que la eficiencia de absorción de la levadura en diferentes

After the 24-hour feeding period in each treatment, the fecal material consisting of yeasts digested by the postlarvae was collected. In total, 180 samples of faecal material were obtained from *L. vannamei* PLs to determine the content of organic matter. Figure 4 shows the absorption efficiency of the six different PL stages at the three different yeast concentrations. Overall, the effectiveness of yeast absorption in *L. vannamei* PLs was $63.71 \pm 2.56 \%$.

The analysis of variance ($p < 0.05$) showed that the yeast absorption efficiency between different concentrations was not significantly different. Similarly, the PL age and yeast concentration level did not have a significant interactive effect on absorption efficiency. The ANOVA test showed that absorption efficiency depended on the PL age. The statistical analysis (Tukey's test, $p < 0.05$) identified two distinct groups. The first group consisted of 5-day-old ($67.85 \pm 10.31 \%$), 10-day-old ($67.22 \pm 11.25 \%$), and 15-day-old PLs ($66.84 \pm 9.05 \%$). The second group consisted of 20-day-old ($55.29 \pm 9.44 \%$), 30-day-old ($63.71 \pm 10.65 \%$), and 35-day-old PLs ($61.63 \pm 11.43 \%$). The young post-larvae (5 to 15 days old) had an average absorption efficiency of 67.30% , which was significantly different from the average of 60.21% for older post-larvae (20 to 35 days old).

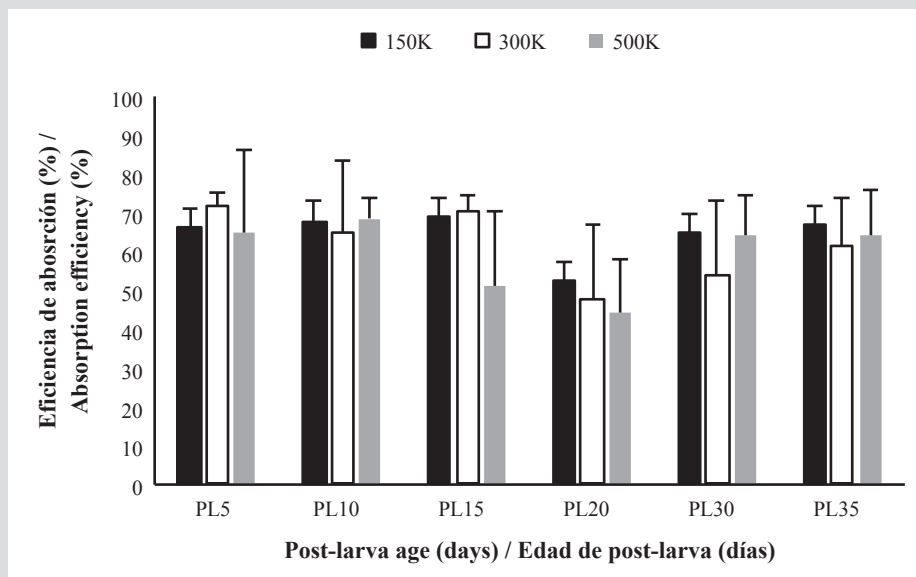


Figure 4. Eficiencia de absorción de levadura (% media \pm DE) en seis etapas de vida de postlarvas de *L. vannamei* de camarón alimentadas con tres concentraciones de levadura marina. El eje X representa el porcentaje de eficiencia de absorción y el eje Y muestra la edad postlarva.

Figure 4. Yeast absorption efficiency (% mean \pm SD) in six life stages of the shrimp *L. vannamei* post-larvae fed with three concentrations of marine yeast. The X axis represent the percentage of absorption efficiency and the Y axis show the post-larvae age.

concentraciones no varió significativamente. De manera similar, los niveles de concentración de levadura y la edad de las postlarvas no tuvieron un efecto interactivo significativo sobre la eficiencia de absorción. La prueba ANOVA mostró que la eficiencia de absorción dependía de la edad de las postlarvas. El análisis estadístico (prueba de Tukey, $p < 0,05$) identificó dos grupos distintos. El primer grupo estuvo conformado por postlarvas de 5 días ($67,85 \pm 10,31$ %), 10 días ($67,22 \pm 11,25$ %) y 15 días ($66,84 \pm 9,05$ %). El segundo grupo estuvo conformado por postlarvas de 20 días ($55,29 \pm 9,44$ %), 30 días ($63,7 \pm 10,65$ %) y 35 días ($61,63 \pm 11,43$ %). Las postlarvas jóvenes (de 5 a 15 días) tuvieron una eficiencia de absorción promedio de 67,30 %, significativamente diferente al promedio de 60,21 % registrado para las postlarvas de mayor edad (de 20 a 35 días).

DISCUSIÓN

Las levaduras marinas son un componente esencial de la comunidad microbiana de los ambientes costeros, y contribuyen significativamente al equilibrio de los ecosistemas de manglares y a las dietas naturales de peces, crustáceos y moluscos. En los ecosistemas de manglar existen varias especies de levaduras de los géneros *Candida*, *Devaryomyces*, *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces* (Ahmed *et al.*, 2019). Los peces que habitan en ecosistemas marinos absorben partículas y microorganismos, incluyendo bacterias, fitoplancton y levaduras, que se encuentran en suspensión o adheridas a sustratos (Wasielecky *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2007). Por lo tanto, las marismas de manglar que rodean las áreas de cultivo de camarón son una fuente vital de alimento vivo para las postlarvas de *L. vannamei*.

En el sur de Ecuador, la mayoría de los productores de camarón usan melaza, siguiendo diferentes protocolos para activar compuestos biológicamente activos que contienen levadura y otras cepas bacterianas como lactobacillus. Esta tendencia del uso de microorganismos en el cultivo del camarón se ha incrementado durante la última década. A la hora de producir levadura, los productores de camarón aprovechan la disponibilidad de melaza –un subproducto obtenido de la caña de azúcar en los países tropicales– como fuente de carbono (Martínez *et al.*, 2015). El uso de microorganismos comerciales y sustancias añadidas al alimento exógeno en todas las fases del sistema de cultivo estimula el crecimiento de microorganismos benéficos e inhibe la colonización de bacterias patógenas (Villamil-Díaz y Martínez-Silva, 2009). En el presente estudio, no se identificó la especie de levadura extraída y utilizada para los experimentos; sin embargo, los

DISCUSSION

Marine yeasts are an essential component of the microbial community in coastal environments, contributing significantly to the balance of mangrove ecosystems and constituting a part of the natural diet of fish, crustaceans, and molluscs. Several yeast species of the genera *Candida*, *Devaryomyces*, *Saccharomyces*, and *Schizosaccharomyces* exist in mangrove ecosystems (Ahmed *et al.*, 2019). Fish living in marine ecosystems absorb suspended particles and microorganisms, including bacteria, phytoplankton and yeasts, either in suspension or adhered to substrates (Wasielecky *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2007). Therefore, the mangrove mudflats surrounding the tropical shrimp farming area are a vital source of live food for *Litopenaeus vannamei* post-larvae.

In southern Ecuador, most shrimp farmers use molasses, following different protocols for the activation of bioactive compounds containing yeast and other bacterial strains such as lactobacillus; the use of molasses has increased over the last decade. When producing yeast, shrimp farmers take advantage of using cheap molasses (Martínez *et al.*, 2015), a by-product obtained from sugar cane in tropical countries, as a carbon source. The use of commercial microorganisms and substances added to exogenous feed in all phases of the culture system stimulates beneficial microbial growth and inhibits colonisation by pathogen bacteria (Villamil-Díaz and Martínez-Silva, 2009). In the present study, the yeast species used for the experiments was not identified; however, the acidic environments, the glucose saturation, and the fully aerobic conditions are ideal for the massification of *Saccharomyces cerevisiae* (Vieira *et al.*, 2011). The 5-, 10-, 15-, 20-, and 35-day-old PLs showed efficient handling and ingestion behaviour during the short-term exposure of yeast feeding. This study demonstrates that shrimp PL are able to absorb the organic components of marine yeast cells, which implies that all biological constituents, such as proteins, organic acids, carbohydrates, fatty acids, and vitamins, are incorporated by the shrimp. When shrimp process and assimilate the yeast's organic matter, the absorption efficiency measures the organic component of the food assimilated by the organism. Although the method has some limitations, it was practical for the short-term exposure experiments maintaining constant yeast concentration to estimate the absorption efficiency. Measuring absorption efficiency in combination with microscopic observation revealed

ambientes ácidos, los niveles de saturación de glucosa y las condiciones totalmente aeróbicas que se emplearon son ideales para la masificación de *Saccharomyces cerevisiae* (Vieira *et al.*, 2011).

Las postlarvas de 5, 10, 15, 20 y 35 días de edad demostraron un comportamiento eficiente en el manejo e ingestión durante la exposición a corto plazo de la alimentación con levadura. Este estudio demostró que las postlarvas de camarón son capaces de absorber componentes orgánicos de las células de levadura marina, lo que implica que todos sus constituyentes biológicos, como proteínas, ácidos orgánicos, carbohidratos y vitaminas, son incorporados por los camarones marinos. Cuando los camarones procesaron y asimilaron la materia orgánica de levaduras, la eficiencia de absorción permitió medir el componente orgánico del alimento asimilado. Si bien el método tiene algunas limitaciones, resultó práctico para experimentos de exposición a corto plazo con niveles constantes de levaduras para estimar la eficiencia de absorción. La medición de la eficiencia de absorción junto con la observación microscópica reveló las interacciones de las postlarvas de camarón y el papel de la levadura marina como componente alimenticio. En experimentos similares, Conover (1996) ha sugerido que la digestión de los alimentos en organismos acuáticos acarrea la producción de heces ricas en nutrientes que pueden volver a ser ingeridas como parte del comportamiento alimenticio de la especie. En el presente estudio, otras sustancias, como excrementos y mucosidades, pudieron estar presentes en el acuario experimental durante el período de alimentación a corto plazo. Por lo tanto, las postlarvas pudieron haber vuelto a ingerir materia orgánica, incluyendo levadura muerta o digerida.

En relación con la concentración de levadura, este estudio encontró que, en el rango analizado (1.5×10^5 , 3×10^5 y 5×10^5 cel/mL), la eficiencia de asimilación de la levadura no dependía de la concentración. Piña *et al.* (2005) evaluaron el desarrollo y crecimiento del estadio larvario zoea de *L. vannamei* alimentados con *Chaetoceros muelleri*, y encontraron que el porcentaje de ingestión no variaba con las raciones suministradas ni con la edad de las larvas de zoea, este oscilaba entre 74 % y 86 %. Sin embargo, llegaron a la conclusión de que la ingestión de alimento depende del suministro continuo de alimento. En el presente estudio, al alimentar con levadura a las postlarvas de *L. vannamei*, la intención fue simular la estrategia de alimentación utilizada en los criaderos comerciales, donde las larvas de camarón se alimentan con fitoplancton como *Chaetoceros* sp. o *Thalassiosira* sp. Los resultados sugieren

the interactions of shrimp post-larvae and the role of marine yeast as a food component. In similar experiments, Conover (1996) has suggested that the digestion of food in aquatic organisms lead to the production of nutrient-rich faeces that can be re-ingested by the organism as part of its feeding behaviour. In the present study, other substances, such as excreta and mucus, can be present in the experimental aquarium throughout the short-term feeding. Therefore, the organic matter, including dead or digested yeast, can be re-ingested by the post-larvae.

Concerning yeast concentration, this study found that the yeast assimilation efficiency did not depend on concentration in the range tested (1.5×10^5 , 3×10^5 , and 5×10^5 cells/mL). Piña *et al.* (2005) evaluated the development and growth of the zoea larval stage of *L. vannamei* fed with *Chaetoceros muelleri* and found that the ingestion percentage did not vary with the rations supplied or with the age of the zoea larvae, ranging from 74 % to 86 %. However, they concluded that food ingestion depends on continued food supply. In the present study, when feeding yeast to *L. vannamei* post-larvae, the intention was to simulate the feeding strategy used in commercial hatcheries, where shrimp larvae are fed phytoplankton such as *Chaetoceros* sp. or *Thalassiosira* sp. The results suggest that keeping a minimum yeast density of 1.5×10^5 would be advantageous for shrimp post-larvae, even if yeasts are provided only as a complement to other natural or artificial food. Additional research in related crustaceans indicates that food assimilation efficiency decreases as food concentration increases. For example, Evjemo (2000), measuring the carbon content in the food, demonstrated a decrease in assimilation efficiency in several larval stages of *A. rtemia franciscana* when the concentration of *Isochrysis galvana* increased. Earlier, Urabe (1991) reported a decline in the assimilation efficiency for *Bosmia longistris* when the concentration of *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. increased. In shrimp larvae culture, the concentration of microalgae provided as food fluctuates around 1.0×10^5 cell/mL. Using artificial diets and diatoms, Condrey *et al.* (1972) reported a range of food absorption efficiency from 55 % to 87 % for *Penaeus aztecus* and *P. setiferus*.

Regarding the absorption efficiency and PL age, early post-larval stages of *L. vannamei* assimilated the marine yeast more efficiently than older post-larval stages. The absorption efficiency in young *L. vannamei* post-larvae (5 to 15 days old) was about 7 % higher than that of older

que mantener una densidad de levadura mínima de $1,5 \times 10^5$ resultaría ventajoso para las postlarvas de camarón, incluso si las levaduras se proporcionan solo o como complemento de otros alimentos naturales o artificiales. Investigaciones adicionales sobre crustáceos afines indican que la eficiencia de asimilación de alimentos disminuye a medida que aumenta la concentración de alimentos. Por ejemplo, Evjemo (2000), al medir el contenido de carbono de los alimentos, demostró una disminución en la eficiencia de asimilación de varios estadios larvarios de *Artemia franciscana* cuando aumentaba la concentración de *Isochrysis galvana*. Antes de esto, Urabe (1991) registró una disminución en la eficiencia de asimilación de *Bosmia longistris* cuando aumentaban las concentraciones de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. Utilizando dietas artificiales y diatomeas, Condrey *et al.* (1972) registraron un rango de eficiencia de absorción de alimentos del 55 al 87 % para *Penaeus aztecus* y *P. setiferus*.

Con respecto a la eficiencia de absorción y la edad de las postlarvas, los estadios postlarvarios tempranos de *L. vannamei* asimilaron la levadura marina de manera más eficiente que los estadios postlarvarios de mayor edad. La eficiencia de absorción de las postlarvas jóvenes de *L. vannamei* (de 5 a 15 días) fue aproximadamente 7% mayor que en las etapas de mayor edad (de 20 a 35 días), y las postlarvas de 20 días de edad mostraron la menor eficiencia. Aunque se sugiere que 5,23 μm es el tamaño mínimo para las postlarvas de camarón (Gelabert y Pacheco, 2011), el comportamiento del camarón blanco de alimentarse por filtración parece ser un mecanismo eficiente para la absorción de levaduras. Las etapas tempranas de postlarvas parecen ser más eficientes para digerir la levadura que las etapas posteriores de postlarvas. Esta disminución en la eficiencia de absorción de postlarvas de 20 a 35 días de edad podría atribuirse a un cambio en el comportamiento alimentario, lo que lleva a una menor ingesta de levadura durante las etapas posteriores.

Los resultados de eficiencia de absorción de levadura para las postlarvas de *L. vannamei* de $63,71 \pm 2,56$ % concuerdan con los resultados anteriores reportados para otras especies de crustáceos y peces. El uso de levadura como fuente de proteína para *L. vannamei* fue examinado por McLean *et al.* (2006), quienes registraron un desempeño de desarrollo exitoso. Zhenming *et al.* (2006) y Rumsey *et al.* (2009) encontraron que la digestión, por parte de peces, de proteínas unicelulares provenientes de levaduras marinas generalmente es superior a 80 %. En comparación con otros productos nutricionales, varios investigadores confirmaron que para *L. vannamei* la digestibilidad de la proteína de la

stages (20 to 35 days old) with 20-day-old PLs having the lowest efficiency. Early PL stages appear to be more efficient at digesting yeast than later PL stages. Although it is suggested that 5.23 μm is the minimal size for shrimp post-larvae (Gelabert and Pacheco, 2011), the filter-feeding behaviour of the white shrimp appears to be an efficient mechanism for yeasts uptake. The reason for the decrease in absorption efficiency in 20 to 35 days-old PLs could be attributed to a change in feeding behaviour, leading to decreased yeast intake during older stages.

The results, 63.71 ± 2.56 % yeast absorption efficiency for *L. vannamei* post-larvae agree with previous results reported for other crustaceans and fish species. The use of yeast as a protein source for *L. vannamei* was examined by McLean *et al.* (2006), who reported successful developmental performance. Rumsey *et al.* (2009) and Zhenming *et al.* (2006) found that fish digestion of single-cell proteins from marine yeast is generally above 80 %. In comparison with other nutritional products, several researchers confirmed that the protein digestibility of soybean meal for *L. vannamei* fluctuates from about 80 % to 98 % (Zhou *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2016). In other studies, Qui and Davis (2016) examined the use of flash-dried yeast as a supplemental feed and its effects on the growth and digestive capacity of *L. vannamei*. Their results show that the apparent dry matter digestibility of soybean meal, fish meal, and flash-dried yeast fluctuated around 75 %, 68 %, and 58 %, respectively. Athitahn and Ramadhas (2000) investigated the food conversion efficiency in the white shrimp *Penaeus indicus* fed with decomposed mangrove leaves. The authors perceived that the shrimps consumed decomposed leaves and found 87.96 % of assimilation efficiency. The assimilation efficiency was attributed to the high protein content of mangrove leaves. The protein digestibility of flash-dried yeast was significantly lower than that of fish meal and soybean meal. Terrazas and Fierro (2010) also reported that the protein digestibility of fish meal for *L. vannamei* ranged from 62 % to 84 %. Likewise, Brunson *et al.* (1997) indicated that the protein digestibility of fish meal for *Penaeus setiferus* is around 75 %. Furthermore, the nutritional value of yeast has been tested by mechanical lipolysed cells or disrupted cells, showing favourable feeding efficiency in fish and shrimp. For example, Shalman *et al.* (2019) used heat-inactivated *Candida subtilis* and investigated its use as a complement for food in Atlantic salmon smolts. Their results showed that fish fed an exclusively yeast-based diet had an efficient

harina de soja fluctúa aproximadamente entre 80 % y 98 % (Zhou *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2016). En otros estudios, Qui y Davis (2016) examinaron el uso de levadura seca instantánea como alimento complementario para *L.vannamei*, así como sus efectos sobre el crecimiento y la capacidad digestiva. Sus resultados demostraron que la aparente digestibilidad de la materia seca de la harina de soja, la harina de pescado y la levadura seca instantánea fluctuaba alrededor de 75 %, 68 % y 58 %, respectivamente. La digestibilidad de la proteína de la levadura seca instantánea fue significativamente menor que la de la harina de pescado y la de la harina de soja. Terrazas y Fierro (2010) también registraron que la digestibilidad por parte de *L. vannamei* de las proteínas de la harina de pescado osciló entre 62 % y 84 %. Así mismo, Brunson *et al.* (1997) indicaron que la digestibilidad de las proteínas de la harina de pescado, por parte de *Penaeus setiferus*, es de alrededor de 75 %. Athitahn y Ramadhas (2000) investigaron la eficiencia de conversión alimenticia del camarón blanco de la India, *Fenneropenaeus indicus*, alimentado con hojas de manglares descompuestas. Los investigadores observaron que los camarones consumían hojas descompuestas y encontraron una eficiencia de asimilación de 87,96 %, lo cual fue atribuido al alto contenido proteico de las hojas de manglar. Adicionalmente, se ha probado el valor nutricional de la levadura mediante células que han sufrido inactivación y disrupción celular, y se ha demostrado una eficiencia de alimentación favorable en peces y camarones. Por ejemplo, Shalman *et al.* (2019) utilizaron *Candida subtilis* inactivada por calor e investigaron su uso como alimento complementario para los smolts de salmón del Atlántico. Sus resultados mostraron que los peces alimentados con una dieta basada exclusivamente en levadura tenían una tasa de crecimiento y una ingesta de alimento eficientes. En los sistemas de cultivo de camarón, comúnmente se agregan levaduras al alimento o se inocula biomasa de levadura en el sistema de cultivo. Rivera *et al.* (2018) extrajeron la levadura *Saccharomyces cerevisiae* del lodo de un estanque de camarones, y unieron las células de levadura a un portador. Sus resultados demostraron fortalecimiento del sistema inmunológico en *L. vannamei* jóvenes. Por su parte, Sarlin y Philip (2016) probaron el uso de levadura de biomasa en *F. indicus* y reportaron una mejora significativa en las tasas de crecimiento. Y descubrieron que *Candida sake*, *C. utilis* y *Debaryomyces hansenii* strains tuvieron los mejores resultados.

Los resultados del presente estudio apoyan el uso de levadura como parte de la dieta del camarón en estanques de cultivo, esencialmente su uso en criaderos y la etapa de vivero

growth rate and feed intake. In shrimp culture systems, yeasts are added to the feedstuff, or yeast biomass is inoculated into the culture system. Rivera *et al.* (2018) extracted the yeast *Saccharomyces cerevisiae* from the mud of a shrimp pond, binding the yeast cells to a carrier. Their results showed that the shrimp strengthened the immune systems of juvenile shrimp *L. vannamei*. Sarlin and Philip (2016) tested the use of biomass yeast in *Fenneropenaeus indicus* and reported a significant improvement in shrimp growth rate. They found that *Candida sake*, *C. utilis*, and *Debaryomyces hansenii* strains yielded the best results.

The outcomes of the present study support the use of yeast as part of the shrimp diet in the culture ponds, primarily in hatcheries and nursery stage. The shrimp PLs can ingest and digest the yeasts if these microorganisms are present in sufficient quantities in the water column. Although this study does not confirm that post-larvae can be fed exclusively on yeast, it shows that yeast can be used as a portion of the live food for shrimp post-larvae. For example, Liao (1985) recommended the use of live food for convenient and efficient shipping and transportation of post-larvae. Live yeast can be used as feed during PL transportation and acclimation before placement into the breeding system (Lavens *et al.*, 2000). Furthermore, in systems with high organic matter production, such as shrimp nursery culture systems, a microbial feeding approach is necessary to create organic detritus of high nutritional value (Martínez *et al.*, 2015). While yeast becomes a feasible food source for the early stages of shrimp, its use to improve digestion of exogenous food may benefit the food metabolism, enhancing productivity and decreasing adverse effects on coastal ecosystems (Bender and Philips, 2004). Yeast production as part of an integrated mangrove-shrimp farming method can help make aquaculture in tropical countries sustainable by setting standards for ecological interactions (Bush *et al.*, 2013).

Although the present study's conclusions are limited to the digestion efficiency during the organic assimilation of yeast by the *L. vannamei* post-larva, this confirms current knowledge about the benefits of marine yeast extracted from mangrove ecosystems. The assimilation of marine yeast by shrimp postlarvae, demonstrated in this study, suggests its use as a potential food alternative to maintain the early stages of shrimp life, contributing to their development and growth. More research is needed to understand other practical advantages of live yeasts and their interactions with the

es prometedor. Las postlarvas de camarón ingieren y digieren levaduras cuando estos microorganismos están presentes en cantidades suficientes en la columna de agua. Aunque este estudio no confirma que las postlarvas puedan mantenerse exclusivamente con levadura por largos periodos de tiempo, sí demuestra que la levadura puede usarse como parte del alimento vivo que se les pone a disposición. Por ejemplo, Liao (1985) recomendó el uso de alimentos vivos para el envío y transporte conveniente y eficiente de postlarvas. Por tanto, la levadura viva se puede utilizar como alimento durante el transporte y la aclimatación de las postlarvas antes de colocarlas en el sistema de cría (Lavens *et al.*, 2000). Adicionalmente, en sistemas con alta producción de materia orgánica, como los de cultivo de camarón en viveros, es necesario establecer un protocolo de alimentación microbiana para formar detrito orgánico de alto valor nutricional (Martínez *et al.*, 2015). Si bien la levadura es una fuente de alimento viable para las primeras etapas del camarón, su uso para mejorar la digestión de alimentos exógenos también puede beneficiar la metabolización de los alimentos, aumentando la productividad y disminuyendo los efectos adversos en los ecosistemas costeros (Bender y Philips, 2004). Finalmente, la producción de levadura como parte de un método integrado asociando el cultivo de camarón y el bosque de manglar, puede ayudar a establecer estándares para las interacciones ecológicas y la sostenibilidad de la acuicultura costera en los países tropicales (Bush, 2013).

Si bien las conclusiones del presente estudio se limitaron a la eficiencia de digestión de las postlarvas de *L. vannamei* durante la asimilación orgánica de la levadura, este trabajo confirmó lo que se sabe en la actualidad sobre los beneficios de la levadura marina extraída de los ecosistemas de manglar. La asimilación de la levadura marina por las postlarvas del camarón, demostrada en este estudio, sugiere su uso como una posible alternativa alimenticia para mantener las primeras etapas de la vida del camarón, contribuyendo a su desarrollo y crecimiento. Es preciso realizar más estudios para comprender otras ventajas prácticas de las levaduras vivas y sus interacciones con el medio ambiente costero cuando se utilizan como parte de la dieta en las operaciones de acuicultura.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de Ecuador, bajo el auspicio del proyecto de investigación PFN-190. Los autores expresan su agradecimiento al Dr.

coastal environment when used as a portion of the diet in aquaculture operations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Ecuadorian National Science and Technology Secretariat through the PFN-190 research project. The authors express their appreciation to Dr. Oscar Chaparro Navarro, professor at the Austral University of Chile, for the support provided and the knowledge shared to carry out this research work. Likewise, the commercial shrimp hatchery technicians and owners are acknowledged and thanked for the support provided in the study.

Oscar Chaparro Navarro, profesor de la Universidad Austral de Chile, por su apoyo y generosidad con su conocimiento, que benefició enormemente este trabajo de investigación. Así mismo, se reconoce y agradece a los técnicos y propietarios de los criaderos comerciales de camarón por el apoyo brindado durante la preparación del estudio.

BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Ahmed, I., A. Haroon, M.N. Khan, H.S. Asadullah, H. Sahah, A. Nadeem, F. Saeed, S. Rehmat, U. Sahah, M. A. Abassi and M. A. Buzdar. 2019. Occurrence and biodiversity of marine yeast in mangrove ecosystem of Shabi Creek, Gwadar-Pakistan. *Pure App. Biol.*, 8(1): 680-687. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2019.80008>
- Athitahn, S. and V. Ramadhas. 2000. Bioconversion efficiency and growth in the white shrimp, *Penaeus indicus* (Milne Edwards) fed with decomposed mangroves leaves. *ICLARM Quart.*, 23(1): 17-18.
- Bender, J. and P. Phillips. 2004. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Biores. Technol.*, 94(3): 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.016>
- Breteler, W.K. 1975. Food consumption, growth and energy metabolism of juvenile shore crabs, *Carcinus maenas*. *Netherl. J. Sea Res.*, 9(3-4): 255-272. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(75\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0077-7579(75)90002-2)
- Brunson, J. F., R.P. Romaire and R.C. Reigh. 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquacult. Nutr.*, 3(1): 9-16.
- Bush, S. R., B. Belton, D. Hall, P. Vandergeest, F. J. Murray, S. Ponte and P. Oosterveer. 2013. Certify Sustainable Aquaculture? *Science*, 341 (6150): 1067-1068. DOI: 10.1126/science.1237314
- Chi, Z., G. Liu, S. Zhao, J. Li and Y. Peng. 2010. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86(5): 1227-1241.
- Chi, Z., T. Liu, Z. Chi, G. Liu and Z. Wang. 2012. Occurrence and diversity of yeasts in the mangrove ecosystems in Fujian, Guangdong and Hainan provinces of China. *Ind. J. Microbiol.*, 52(3): 346-353. doi:10.1007/s12088-012-0251-5
- Condrey, R. E., J. G. Gosselink and H.J. Bennett. 1972. Comprison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus*. *Fish. Bull.*, 70: 1281-1291
- Conover, R. J. 1966. Factors affecting the assimilation of organic matter by zooplankton and the question of superfluous feeding. *Limnol. Oceanogr.*, 11(3): 346-354. <https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.3.0346>
- DOI: 10.1007/s00253-010-2483-9.
- Evjemo, J. O., O. Vadstein and Y. Olsen. 2000. Feeding and assimilation kinetics of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis galbana* (clone T. Iso). *Mar. Biol.*, 136(6): 1099-1109. <https://doi.org/10.1007/s002270000306>
- Fang, X., D. Yu, A. Buentello, P. Zeng and D. A. Davis. (2016). Evaluation of new non-genetically modified soybean varieties as ingredients in practical diets for *Litopenaeus vannamei*. Farzanfar A. 2006. The use of probiotics in aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* Blackwell Pub, 48(2): 149-58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2019. FAO yearbook. *Fish. Aquacult. Stat. 2017/FAO*. Rome. 80 p.
- Gatesoupe, F. J. 2007. Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*, 267(1): 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.005>
- Gelabert, R. and A. Pacheco. 2011. Selectivity of particle size by the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) larvae. *Aquacult. Nutr.*, 17(3): 244-247.
- Kiatmetha, P., W. Siangdang, B. Bunnag, S. Senapin and B. Withyachumnarnkul. 2011. Enhancement of survival and metamorphosis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Aquacult. Internat.*, 19(4): 599-609. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9375-y>
- Kupetz, M., S. Procopio, B. Sacher and T. Becker. 2015. Critical review of the methods of β -glucan analysis and its significance in the beer filtration process. *Eur. Food Res. Technol.*, 241: 725. doi:10.1007/s00217-015-2498-7
- Lara-Flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzmán-Méndez and W. López-Madrid. 2002. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216: 193-201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6)
- Lavens, P. and P. Sorgeloos. 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. *Aquaculture*, 191(1-3): 169-176. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00426-9)



- Liao, I. 1985. A brief review of the larval rearing techniques of penaeid prawns. In First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps, 4-7 December 1984, Iloilo City, Philippines. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center. 65-78 p.
- Liu, X. H., J. D. Ye, J. H. Kong, K. Wang and A. L. Wang. 2013. Apparent digestibility of 12 protein-origin ingredients for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. NA J. Aquacult., 75(1): 90-98.
- Lucas, A. and J. J. Watson. 2002. Bioenergetics of aquatic animals. CRC Press. 169 p.
- Martínez-Córdova, L. R., M. Emerenciano, A. Miranda-Baeza and M. Martínez-Porchas. 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. Rev. Aquacult., 7: 131-148. doi:10.1111/raq.12058.
- McLean, E., B. Reid, D. Fegan, D. Kuhn and S. Craig. 2006. Total replacement of fishmeal with an organically certified yeast-based protein in pacific white shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) diets: laboratory and field trials. Croatian J. Fish., 64(2): 47-58.
- Meena, D. K., P. Das, S. Kumar, S. C. Mandal, A. K. Prusty, S. K. Singh, M.S. Akhtar, B. K. Behera, K. Kumar, A.K. Pal and S. C. Mukherjee. 2013. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). Fish Physiol. Biochem., 39(3): 431-457. doi:10.1007/s10695-012-9710-5
- Muller-Feuga, A., R. Robert, C. Cahu, J. Robin and P. Divanach. 2003. Uses of microalgae in aquaculture. Live Feeds in Marine Aquaculture. 1: 253-299.
- Northeastern Regional Aquaculture Center NRAC. 1993. Growing microalgae to feed bivalve larvae. Univ. Massachusetts. Norht Darmouth. NRAC Fact Sheet. No. 160. 8 p.
- Pathissery J. S. and P. Rosamma. 2016. Marine yeasts as feed supplement for Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*: screening and testing the efficacy. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 5(1): 55-70. doi:http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.501.005
- Patra, S. and K. Mohamed. 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. Aquacult. Internat., 11: 505. doi:10.1023/B:AQUI.0000004193.40039.54
- Piña, P., M. Nieves, L. Ramos-Brito, C.O. Chavira-Ortega and D. Voltolina. 2005. Survival, growth and feeding efficiency of *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae fed different rations of the diatom *Chaetoceros muelleri*. Aquaculture, 249(1-4): 431-437.
- Qiu, X. and D.A. Davis. 2017. Evaluation of flash dried yeast as a nutritional supplement in plant-based practical diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquacul. Nutr., 23(6): 1244-1253.
- Rivera, L. M., L. E. Trujillo, J. M. Pais-Chanfau, J. Nunez, J. Pineda, H. Romero, O. Tinoco, C. Cabrera and V. Dimitrov. 2018. Functional foods as stimulators of the immune sSystem of *Litopenaeus vannamei* cultivated in Machala, Province of El Oro, Ecuador. It. J. Food Sci., SI: 227-232.
- Rosas, C. and C. Vanegas. 1993. Energy balance of *Callinectes ratbunae* in floating cages in a tropical coastal lagoon. J. World Aquacult. Soc., 21: 257-262
- Rumsey, G. L., S. G. Hughes, R. R. Smith, J. E. Kinsella and K. J. Shetty. 1991. Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). An. Feed Sci. Technol., 33(3): 185-193. doi:10.1016/0377-8401(91)90059-2
- Sahlmann, C., B. Djordjevic, L. Lagos, L. T. Mydland, B. Morales-Lange, J. Hansen, R. Anestad, L. Mercado, M. Bjalonovic, C. McLean and M. Øverland. 2019. Yeast as a protein source during smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar*), enhances performance and modulates health. Aquaculture, 513: 734396. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734396
- Sarlin, P. J. and R. Philip. 2016. Marine yeasts as feed supplement for Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*: screening and testing the efficacy. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 5(1): 55-70. doi: http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.501.005
- Shelby, R. A., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy, T. L. Welker and P. H. Klesius. 2009. Effects of yeast oligosaccharide diet supplements on growth and disease resistance in juvenile nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. App. Aquacult., 21(1): 61-71. doi:10.1080/10454430802694728
- Sorgeloos, P., P. Dhert and P. Candreva. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. Aquaculture, 200(1): 147-159. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00698-6
- Sukumaran, V., D. W. Lowman, T. P. Sajeevan and R. Philip. 2010. Marine yeast glucans confer better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. Aquacult. Res., 41(12): 1799. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02520.x
- Terrazas-Fierro, M., R. Civera-Cerecedo, L. Ibarra-Martínez, E. Goytortúa-Bores, M. Herrera-Andrade and A. Reyes-Becerra. 2010. Apparent digestibility of dry matter, protein, and essential amino acid in marine feedstuffs for juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 308(3-4): 166-173.
- Urabe, J. 1991. Effect of food concentration on the carbon balance of *Bosmina longirostris*. Freshwat. Biol., 26: 57-68.
- Vieira, É. D., M. D. G. S. Andrietta and S. R. Andrietta. 2013. Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. Braz. J. Microbiol., 44(2): 551-558. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000200035
- Villamil-Díaz, L., and M. A. Martínez-Silva. 2009. Probiotics as a biotechnological tool in shrimp culture: a review. Bol. Invest. Mar- Cost., 38(2): 165-187.
- Wasielesky, W., H. Atwood, A. Stokes and C. L. Browdy. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 258(1): 396-403. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.04.030
- Zhao, L., W. Wang, X. Huang, T. Guo, W. Wen, L. Feng and L. Wei. 2017. The effect of replacement of fish meal by yeast extract on the digestibility, growth and muscle composition of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquacult. Res., 48(1): 311-320. doi:10.1111/are.12883

- Zheng, C. N. and W. Wang. 2017. Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquac. Res.*, 48: 2767–2777. doi:10.1111/are.13110
- Zhenming, C., L. Zhiqiang, G. Lingmei, G. Fang, M. A. Chunling, W. Xianghong and L. I. Haifeng. 2006. Marine yeasts and their applications in mariculture. *J. Oc. Univ. China*, 5(3): 251-256. <https://doi.org/10.1007/s11802-006-0010-5>
- Zhou, Y. G., D. A. Davis and A. Buentello. 2015. Use of new soybean varieties in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Nutr.*, 21(5): 635-643.

RECIBIDO/RECEIVED: 29/05/2020

ACEPTADO/ACCEPTED: 17/06/2021