



Universidad Estatal de Sonora

Unidad Académica Navojoa

**Efecto del uso de probióticos sobre las comunidades de bacterias heterótrofas, nitrificantes y *Vibrio*, compuestos nitrogenados y parámetros productivos de *Litopenaeus vannamei* en un sistema hiper intensivo durante la fase de maternización**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Presenta**

**LUIS GABRIEL ESPINOZA BARRÓN**

**Navojoa, Sonora, México.**

**Julio del 2016**

## ACTA DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada **Efecto del uso de probióticos sobre las comunidades de bacterias heterótrofas, nitrificantes y *Vibrio*, compuestos nitrogenados y parámetros productivos de *Litopenaeus vannamei* en un sistema hiper intensivo durante la fase de maternización**, presentada por **LUIS GABRIEL ESPINOZA BARRÓN**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Sistemas de Producción Biosustentables.



Dr. Anselmo Miranda Baeza  
Director Interno



Dr. Joe Luis Arias Moscoso  
Director externo



Dra. Martha Elisa Rivas vega  
Sinodal

## **DEDICATORIA**

A mis padres Xavier Espinoza Ruiz y Norah Minerva Barrón Kinejara, con cariño va dedicado este logro por haberme apoyado en todo momento de mi vida, por haberme llevado por el buen camino inculcándome valores en mi formación personal y por la oportunidad de haberme ofrecido una buena educación.

A la memoria de abuela Guadalupe Kinejara Maldonado, siempre confió en que lograría mis propósitos.

A toda mi familia y seres queridos, por sus buenos deseos, apoyo emocional y ser parte importante de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme salud e integridad en mi vida.

A la Universidad Estatal de Sonora, por permitirme realizar mis estudios de posgrado y por apoyarme con su beca, agradezco también a todo su personal por las atenciones recibidas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por el financiamiento a través del proyecto: 246529 “Evaluación de la dinámica poblacional de bacterias heterótrofas, nitrificantes y tipo *Vibrio*, en un cultivo híper-intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*”. Del mismo modo se agradece por su beca otorgada para cursar el posgrado (571553)

A los miembros de mi comité de tesis: A los directores Dr. Anselmo Miranda Baeza y Joe Luis Arias Moscoso y sinodal Dra. Martha Elisa Rivas Vega, gracias por su gran apoyo.

A mis profesores del posgrado les agradezco por haber puesto su dedicación y empeño para transmitirme sus conocimientos.

A la empresa Provedora de larvas S.A. de C.V. Por permitirme realizar la etapa experimental de mi estudio en sus instalaciones, de igual manera agradezco a los compañeros Wilfrido Guzmán Ponce, Jesús García Plata, German Javier Velarde Montes y Andrés García García por el apoyo brindado en el trabajo experimental.

Al Laboratorio de investigación de la UES por el uso de sus equipos, igualmente al M. en C. Jesús Lizárraga Armenta y L.A. José Alberto Huerta Rábago por el apoyo en el trabajo de laboratorio y de campo.

## RESUMEN

La dinámica de las bacterias heterótrofas y compuestos nitrogenados son factores importantes en los cultivos en biofloc. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos grupos de probióticos sobre la abundancia de bacterias heterótrofas cultivables, nitrificantes, y tipo *Vibrio*, además de compuestos nitrogenados y parámetros productivos de postlarvas de camarón blanco *L.vannamei* en un cultivo hiper-intensivo. El estudio se realizó en la empresa Proveedora de larvas S.A de C.V. Se utilizó un diseño al azar simple con dos tratamientos y un control, cada uno por triplicado. En los tratamientos se evaluaron dos grupos de probióticos (PB1 y PB2) y un control (PBN) sin probiótico ni fuente de carbono adicional. Se sembraron postlarvas de camarón blanco a densidades de 500 ind/m<sup>2</sup> con un peso de 0.0073g. Al inicio de cultivo la abundancia de bacterias heterótrofas fue menor en el tratamiento PBN, en el resto del tiempo experimental las densidades fueron similares. Las bacterias *Vibrio* amarillas presentaron mayor densidad al final del experimento en el tratamiento PBN y menor en el PB2. Al inicio del experimento el tratamiento PBN presentó concentración de bacterias *Vibrio* verdes. La cantidad de bacterias nitrificantes fue similar en todos los tratamientos. Los compuestos nitrogenados no presentaron diferencias entre los tratamientos. La ganancia de peso y sobrevivencia de los camarones, fue igual en todos los tratamientos. El menor factor de conversión alimenticia se obtuvo en el tratamiento PBN. Se concluye que en sistemas hiperintensivos, la proliferación de microorganismos benéficos que habitan naturalmente en el agua del cultivo de camarón, favorecen el desempeño de los parámetros productivos del camarón.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
CARTA DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.1. Antecedentes	4
I.2. Hipótesis	6
I. 3. Objetivos	7
<b>II. METODOLOGIA</b>	<b>9</b>
II.1. Diseño experimental	9
II.2. Medición de variables básicas del agua	10
II.3. Comunidades bacterianas	10
II.4. Sólidos Sedimentables	11
II.5. Determinación de nutrientes (N-NH <sub>3</sub> , N-NO <sub>2</sub> , N-NO <sub>3</sub> )	11
II.6. Crecimiento y sobrevivencia del camarón	11
II.7. Análisis de información	11
<b>III RESULTADOS</b>	<b>13</b>
III.1. Variables básicas del agua y SS	13
III.2. Variación de comunidades de bacterias heterótrofas, <i>Vibrio</i> y nitrificantes	18
III.2.1. Bacterias heterótrofas	18
III.2.2. Bacterias <i>Vibrio</i> amarillas	19
III.2.3. Bacterias <i>Vibrio</i> verdes	20
III.2.4. Bacterias nitrificantes	21
III.3. Compuestos nitrogenados	23
III.3.1. Amonio (N-NH <sub>3</sub> )	23
III.3.2. Nitritos (N-NO <sub>2</sub> )	24

III.3.3. Nitratos (N-NO <sub>3</sub> )	25
III.3. Crecimiento, sobrevivencia y FCA del camarón	27
<b>IV DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	29
IV.1. Variables básicas del agua y solidos sedimentables	29
IV.2. Comunidades de bacterias heterótrofas, <i>Vibrio</i> y nitrificantes	31
IV.3. Compuestos nitrogenados (NAT, N-NO <sub>2</sub> , N-NO <sub>3</sub> )	35
IV.4. Crecimiento, sobrevivencia y FCA del camarón	37
<b>V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	39
V.1. Conclusiones	38
V.2. Recomendaciones	40
<b>VI LITERATURA CITADA</b>	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Promedios (+ desviaciones estándar) de oxígeno disuelto registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.	14
2	Promedios (+ desviaciones estándar) de temperatura registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.	14
3	Valores de pH mínimos y máximos registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.	16
4	Promedios (+ desviaciones estándar) de sólidos sedimentables registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.	17
5	Promedios (+ desviaciones estándar) de salinidad registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.	17
6	UFC promedios de bacterias heterótrofas registradas en los tres tratamientos durante el experimento.	19
7	UFC promedios de bacterias <i>Vibrio</i> amarillas registradas en los tres tratamientos durante el experimento.	20
8	UFC promedios de bacterias <i>Vibrio</i> verdes registradas en los tres tratamientos durante el experimento.	21
9	Medias y desviaciones estándar de las bacterias nitrificantes al día 12 y 30 del estudio.	22
10	Promedios (+ desviaciones estándar) de N-NH <sub>3</sub> registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.	24
11	Promedios (+ desviaciones estándar) de N-NO <sub>2</sub> registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.	25
12	Promedios (+ desviaciones estándar) de N-NO <sub>3</sub> registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.	26
13	Promedios (+ desviaciones estándar) del peso individual de <i>Litopenaeus vannamei</i> durante el periodo de cultivo.	27



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	VARIABLES BÁSICAS DEL AGUA (MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR) EN LOS TRATAMIENTOS.	18
2	CANTIDAD DE BACTERIAS (MEDIA Y D.E.) REGISTRADAS DURANTE LOS DÍAS 1(INICIO), 12 (MEDIO) Y 30 (FINAL) DEL EXPERIMENTO.	23
3	MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	26
4	PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE <i>Litopenaeus vannamei</i> (MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR).	28

## I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la acuicultura representa una fuente importante de alimento de alto valor nutricional. En el periodo 2011–2012 se registró una producción creciente (promedio anual de 6.2%) y para el año 2012 se obtuvo una producción de 66.6 millones de toneladas de diferentes tipos de productos acuícolas (FAO, 2014).

En México, el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, es la especie más cultivada a lo largo de las zonas costeras del territorio nacional, por lo tanto tiene una gran importancia en el desarrollo social y económico. La producción nacional de camarón de origen acuícola reportada el 2013 fue de 60,292 toneladas, mientras que la de camarón por captura alcanzó 67,224 toneladas. Por lo tanto, en dicho periodo, la camaronicultura tuvo un 47.28% de participación en la producción nacional de camarón (CONAPESCA, 2013). En 2012 en el estado de Sonora se obtuvo una producción de 40,697.3 toneladas, para el 2013 la producción bajó a 35,305.5 toneladas (COSAES, 2014), esta disminución se atribuye a la presencia de varias patologías que causaron fuertes mortalidades en los cultivos. La eventualidad de enfermedades por brotes virales o bacterianos, ha causado grandes pérdidas económicas.

La mayoría de los sistemas de cultivo implementados por productores locales son del tipo semi-intensivos, estos sistemas generan una gran cantidad de efluentes ricos en compuestos nitrogenados proveniente de alimento no consumido y metabolitos excretados por los organismos en cultivo. Estos efluentes son descargados a diferentes ecosistemas receptores, generando impactos ambientales como eutrofización y nitrificación (Páez-Osuna, 2001).

En respuesta a la creciente problemática que se ha generado en la acuicultura por efecto de enfermedades virales y bacterianas en los últimos años así como a la creciente contaminación

de las áreas naturales, la industria acuícola ha tenido que fijar su atención en sistemas de cultivo más controlados. Entre las posibles alternativas se encuentran los sistemas cerrados o de mínimo recambio de agua, estos sistemas en su manejo incluyen el uso de bacterias, para la intensificación del cultivo (Crab *et al.*, 2012).

En los sistemas de mínimo recambio de agua, se promueve el desarrollo de microorganismos que dan origen a la formación de conglomerados, capaces de remover desperdicios orgánicos e inorgánicos los cuales son aprovechados para crear biomasa, que a su vez sirve como fuente de alimento para los organismos cultivados (Azim *et al.*, 2002; Avnimelech, 2005).

Los bioflóculos son un conglomerado de bacterias, microalgas, hongos, ciliados protozoarios, cianobacterias y sólidos suspendidos en la columna de agua (Avnimelech, 2007). Dentro de las comunidades de bacterias que conviven en los bioflóculos, se encuentran las bacterias heterótrofas, las cuales se caracterizan por utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono. Bajo condiciones adecuadas (temperatura y fuente de carbono) asimilan compuestos nitrogenados excretados por los organismos en cultivo y eliminan amonio y nitritos (Poleo *et al.*, 2011). Otro tipo de bacterias que se pueden encontrar en el cultivo son las bacterias nitrificantes o quimio-autótrofas, estas utilizan amonio y nitritos como fuente de energía para su desarrollo, el proceso se le conoce como amonificación y nitrificación (Burford y Williams, 2001; Burford *et al.*, 2003). La función de estas bacterias es de gran relevancia en un cultivo, debido a su capacidad para mantener la calidad del agua.

Las microalgas son también colonizadores presentes en el cultivo, siendo las clorofitas dominantes en este tipo de sistemas (Ray *et al.*, 2010). Las diatomeas se consideran benéficas por ser fuente de alimento para varios organismos acuáticos (Boyd 1989). Las cianofitas,

pueden ocasionar sabor indeseado en los organismos cultivados, también son capaces de producir compuestos tóxicos para algunos organismos acuáticos (Paerl y Tucker 1995). La relación entre microalgas y bacterias son determinantes en los grupos que se desarrollan dentro del sistema. Riquelme y Avendaño-Herrera (2003), mostraron que el aumento de bacterias heterótrofas facilita el crecimiento de diatomeas y restringe a las cianobacterias.

### *Probióticos.*

Los probióticos son una mezcla de microorganismos, que al ser aplicados tienen un efecto benéfico en el huésped, debido a que poseen propiedades de la microflora endémica (Harvennar y Huis In't Veld, 1992), actualmente existen varios productos comerciales basados en el uso de bacterias nitrificantes y heterótrofas del género *Bacillus sp.* como biorremediadores, pero principalmente se enfocan a beneficiar la salud de los organismos cultivados.

La mayoría de los intentos para producir probióticos se han llevado a cabo, aislando y seleccionando cepas de ambientes acuáticos (Gastesoupe, 1999). Estos microorganismos pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Pseudomona*, bacterias del ácido láctico, *Bacillus* y levaduras. Los probióticos en sus inicios debían tener tres características principales: 1) mostrar antagonismo a patógenos in vitro; 2) tener potencial de colonización, 3) y que las pruebas realizadas confirmaran que algunas cepas podían aumentar la resistencia a enfermedades de su huésped (Gastesoupe, 1999). La mayoría de los probióticos usados en acuicultura y que actualmente se encuentran en el mercado son importados, por lo cual se deduce que son cepas provenientes de ambientes distintos a los que serán introducidos.

Investigaciones recientes sugieren que los probióticos deben ser específicos para los hospederos en los cuales se van a utilizar, ya que de esta manera se minimizan los efectos provocados por las amplias diferencias entre los ambientes, en los que se desarrollan los organismos (Duwat *et al.*, 2000).

Actualmente en el campo de biorremediación y bioseguridad acuícola, se encuentran varios productos comerciales, los cuales se usan de manera empírica, aun no se ha establecido un protocolo de manejo validado que permita un manejo estandarizado de sistemas de cultivo con mínimo recambio de agua.

En el estado de Sonora debido a los eventos de mortalidades masivas ocurridos desde el 2009, las granjas realizan una fase de maternización para disminuir los periodos de cultivo en estanquería tradicional. La maternización tiene una duración de 20 a 30 días. A pesar de sus beneficios, se carece de estudios detallados relacionados con la dinámica de las bacterias heterótrofas y de los compuestos nitrogenados, que son los factores importantes en los cultivos en biofloc. El propósito de este estudio fue evaluar el desempeño de dos grupos de probióticos sobre las bacterias heterótrofas y tipo *Vibrio*, así como sobre los sólidos sedimentables, compuestos nitrogenados y parámetros productivos en un cultivo hiper-intensivo de camarón blanco, *L. vannamei*

## **I.1 Antecedentes**

### Bacterias heterótrofas

Las bacterias heterótrofas utilizan fuentes de carbono como principal insumo metabólico. La materia orgánica de desecho en los cultivos, es la fuente de carbono y de nitrógeno, la cual es convertida en biomasa bacteriana de alto valor nutricional, ésta biomasa a su vez sirve como

fuente potencial de alimento para los detritívoros (McGraw, 2002). Se ha reportado que las bacterias heterótrofas son capaces de metabolizar iones inorgánicos derivados del nitrógeno ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ), es por tal razón que la adición de carbono puede reducir el amonio tóxico en el agua en el tiempo, mientras la población de bacterias crece exponencialmente. Sin embargo no mantienen totalmente la nitrificación en un sistema de cultivo debido a que la materia orgánica es su mayor fuente de energía (Prosser, 2007). Algunos autores como Ootshi *et al.* (2009) han reportado niveles puntuales de bacterias heterótrofas de hasta  $3.9 \times 10^8$  cel/mL en cultivos super-intensivos de *L. vannamei*.

### Bacterias nitrificantes

Las bacterias nitrificantes tienen una función importante en los sistemas de cultivos acuícolas, son las que convierten el amonio a nitrato (Sinha y Annachhatre, 2007). Estas bacterias incluyen dos grupos con un alto nivel de especialización, las oxidantes de amonio (BOA) y las oxidantes de nitrito (Sinha y Annachhatre, 2007). Las bacterias oxidantes de amonio obtienen su energía catabolizando amoniaco no ionizado a nitrito e incluyen bacterias de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*; las bacterias oxidantes de nitrito oxidan el nitrito a nitrato, e incluyen bacterias de los géneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* (Timmons *et al.*, 2002; Huerta Aldaz *et al.*, 2012).

Por cada molécula de dióxido de carbono asimilado, aproximadamente 30 moléculas del ion amonio o 100 moléculas de nitrito deben ser oxidadas. Debido a la gran cantidad de iones amonio y nitrito que son necesarios para asimilar el dióxido de carbono, tienen muy baja tasa de crecimiento (Gerardi, 2002). Del mismo modo, McGraw (2002) menciona que la aparición de bacterias nitrificantes en los biofiltros puede requerir más de una semana. Huerta- Aldaz *et*

*al.* (2012) realizaron una evaluación de las bacterias nitrificantes en una granja de camarón blanco *L. vannamei* en el Noroeste de México y encontraron que las bacterias oxidantes de amonio *Nitrosomonas spp.*, mostraron la mayor abundancia en los canales de descarga con niveles de hasta  $50.2 \times 10^6$  cel/ml.

### Bacterias del género *Vibrio*

Algunas bacterias del género *Vibrio* han sido reconocidos como los principales patógenos relacionados con la acuicultura, ya que son responsables de generar varias enfermedades en moluscos, peces y crustáceos, desde los cultivos larvarios hasta las fases de crecimiento final (Thompson *et al.*, 2004). Las bacterias *Vibrio* se convierten en patógenos oportunistas cuando se rompe el equilibrio en las comunidades bacterianas presentes en los cultivos acuícolas (Aguilera-Rivera *et al.*, 2014). Las especies del género *Vibrio* que causan las mayores pérdidas económicas en los cultivos marinos a nivel mundial son *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. vulnificus* biotipo 2 y *V. salmonicida*. Se sabe que *V. anguillarum*, es el agente causal de la vibriosis clásica, y presenta una amplia distribución geográfica, causando una septicémica hemorrágica típica en aproximadamente 50 variedades de peces tanto de aguas cálidas como frías (Actis *et al.*, 1999; Austin y Austin 1999; Toranzo *et al.*, 2005). En camarones, las especies de *Vibrio* más peligrosas son *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, y *V. splendidus*. Estas especies son capaces de colonizar el hepatopáncreas de los camarones, lo que resulta en bajas tasas de crecimiento, altos factores de conversión de alimento y mortalidad de los organismos (Vieira *et al.*, 2009).

### **I.2. Hipótesis**

Los consorcios de bacterias de origen comercial o nativo, presentarán mayor abundancia de bacterias heterótrofas y nitrificantes, así mismo las concentraciones de compuestos nitrogenados en el agua serán menores, en comparación con el tratamiento control, sin la aplicación de bacterias, lo cual influirá positivamente en los parámetros productivos de *L. vannamei*.

### **I. 3. Objetivos.**

#### *Objetivo General*

Evaluar el efecto de dos grupos de probióticos sobre la abundancia de bacterias heterótrofas cultivables, bacterias nitrificantes, bacterias *Vibrio*, compuestos nitrogenados y parámetros productivos de postlarvas de camarón blanco *L. vannamei* en un cultivo hiper-intensivo.

#### *Objetivos Particulares*

1. Determinar las variaciones poblacionales de las bacterias heterótrofas cultivables y nitrificantes en los dos grupos de probióticos y en el control, para determinar si presentan diferencias en función del tiempo.
2. Determinar las variaciones poblacionales de las bacterias del género *Vibrio* en los dos grupos de probióticos y en el control, para determinar si presentan diferencias en función del tiempo.
3. Evaluar el efecto de los dos consorcios microbianos sobre la presencia de sólidos suspendidos totales y de la materia orgánica particulada, para determinar si hubo diferencias significativas entre ambos.
4. Determinar los niveles de compuestos nitrogenados (N-NAT, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub>) en función del tiempo de cultivo, para evaluar si existen diferencias significativas.



5. Determinar los parámetros productivos de camarón blanco (crecimiento, sobrevivencia y factor de conversión alimenticia) en los diferentes tratamientos, para determinar si existe diferencias significativas.

## II. METODOLOGÍA

### II.1 Diseño experimental

El estudio se realizó en las instalaciones de la empresa Provedora de larvas S.A. de C.V. Ubicada en la localidad de La Guásima en el municipio de El Rosario, Sinaloa, se utilizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos y un control, cada tratamiento se realizó por triplicado. En los tratamientos se evaluó el desempeño de dos grupos de probióticos y la adición de fuente de carbono (PB1 y PB2), el tratamiento control (PBN) sin aplicación de probióticos, ni fuente de carbono.

Se utilizaron postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con un peso promedio inicial aproximado de 0.0073g. Los organismos fueron sembrados a una densidad de 500 ind/m<sup>2</sup> en tres tanques con un volumen de 2,000 m<sup>3</sup> y seis tanques con volumen de 70 m<sup>3</sup>. Se utilizó alimento comercial para camarón con 35% de proteína.

Los tanques se localizaron dentro de invernaderos y el fondo estuvo recubierto con plástico de alta densidad. La aireación fue provista con aireadores de 10 Hp con una capacidad de 150 Hp/Ha. La conducción del aire se produjo a través de tubería de pvc de 4”, para generar la oxigenación y turbulencia de agua se dispuso de baterías de parrillas de aireación con líneas de manguera porosa “aerotubo” en cada tanque.

Los bioaumentos de bacterias se realizaron en tanques de plásticos de 2 m<sup>3</sup> de capacidad y se agregaron cada tres días partiendo de seis días previos a la siembra de las postlarvas. Diariamente se adicionó melaza como fuente de carbono para mantener una relación C:N de 13:1. En el caso del tratamiento control no se hicieron aplicaciones de bioaumentos bacterianos ni de fuente de carbono.

## **II.2 Medición de variables básicas del agua.**

Cada 6 horas se midieron las variables básicas del agua. El oxígeno disuelto y la temperatura con un oxímetro (YSI 55), el pH con un potenciómetro (Hoaus ST 20). La salinidad se midió una vez por semana con un refractómetro manual (Atago).

## **II.3 Comunidades bacterianas.**

Se realizaron muestreos cada tres días utilizando recipientes plásticos previamente esterilizados. Se tomaron muestras de agua en tres puntos de cada estanque, las cuales se homogenizaron en una sola y se trasladaron inmediatamente al laboratorio. Se usó la técnica de siembra en superficie (APHA, 1992), a partir de diluciones seriadas y dependiendo de la carga bacteriana esperada del punto de muestreo. Se sembraron por triplicado 0.1 ml de la dilución correspondiente para cada muestra.

Las bacterias heterótrofas viables (BHV) se monitorearon cada tres días, del día 1 al día 30 y fueron cultivadas en agar marino ( $30\pm 2$  °C por  $24\pm 2$  h). Las bacterias *Vibrio* (BTV) se monitorearon cada tres días, del día 1 al día 39, su cultivo se realizó en agar Tiosulfato-citrato-sales biliares (TCBS) ( $30\pm 2$  °C por  $24\pm 2$  h). Las bacterias del género *Nitrosomonas* (bacterias oxidantes de amonio; BOA) se monitorearon los días 12 y 13 del experimento, y fueron cultivadas en el medio 221 de la American Type Culture Collection (ATCC) (Wilhelm *et al.*, 1998; León y Roy, 2003) y el periodo de incubación duró de 7 a 10 días a  $30\pm 2$  °C para permitir la formación de colonias debido su lento crecimiento. Al término de la incubación las colonias fueron contabilizadas y se realizarán los cálculos correspondientes, los cuales se expresaron en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). Para el caso del agar TCBS se contarán por separado las colonias amarillas y verdes.

#### **II.4 Sólidos Sedimentables.**

En cada estanque, cada tres días, se realizaron mediciones de sólidos sedimentables (SS) mediante el cono de Himhoff, con un tiempo de sedimentación estandarizado de 20 min.

#### **II.5 Determinación de nutrientes (N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub>).**

La toma de muestra de agua se realizó cada tres días, las muestras se almacenaron en frascos de 200 mL y se trasladaron inmediatamente al laboratorio de la empresa, donde se sedimentaron por 20 min a una temperatura estándar de  $25 \pm 2$  °C. Se tomaron 10 mL de sobrenadante y se determinaron los compuestos nitrogenados (N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub>) mediante colorimetría, siguiendo en cada caso las indicaciones del manual de operación del fotómetro Hanna modelo HI 83203. Dicho aparato fue previamente calibrado y estandarizado con las técnicas tradicionales.

#### **II.6 Crecimiento y sobrevivencia del camarón.**

Para determinar el crecimiento específico del camarón se utilizó la ecuación sugerida por Biswas *et al.* (2007):

$$CE = \frac{[\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)}]}{\text{tiempo de cultivo}} \times 100$$

El porcentaje de sobrevivencia se obtuvo de la relación entre el número final de organismos y el número inicial x 100.

#### **II.7 Análisis de información.**

Se obtuvieron los estadísticos básicos de las variables del agua, y SS, así como de los compuestos nitrogenados y de la cantidad de bacterias presentes en los diferentes tratamientos.

Adicionalmente se elaboraron gráficas en función del tiempo y se estimaron varios coeficientes de correlación para determinar la relación entre las variables del agua, compuestos nitrogenados y abundancia de los tipos de bacterias. Con los datos finales se realizaron pruebas de análisis de varianza de una vía. En los casos en los cuales se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicaron las pruebas a posteriori de Tukey. En todos los casos  $\alpha = 0.05$ . Para el procesamiento de los datos se utilizó el software Statistica 8.5.1 para Windows, Statsoft Inc.

### **III. RESULTADOS**

#### **III.1. Variables básicas del agua y SS**

En todos los tratamientos las concentraciones de oxígeno disuelto presentaron un ligero incremento desde el inicio hasta el día 6 del cultivo. Posteriormente se observaron ligeras disminuciones conforme avanzó la edad del cultivo. El nivel más alto se registró en el tratamiento PB1 al día 9 con 6.28 mg/L y el valor más bajo en el tratamiento PB2 al día 36 con 3.99 mg/L (figura 1).

Considerando las medias globales del experimento, la prueba de ANOVA de una vía no mostró diferencias entre los tratamientos ( $F = 1.37$ ;  $P > 0.05$ ). El mayor valor se presentó en el tratamiento PBN con 5.59 mg/L y el menor en el tratamiento PB2 con 5.22 mg/L (tabla 1).

La temperatura presentó un incremento gradual desde el inicio hasta la mitad del experimento. Posteriormente se registraron ligeros descensos los cuales se mantuvieron hasta el final del cultivo. El valor más alto se registró en el tratamiento PB2 con 33.7°C y el más bajo en el tratamiento PB1 con 31.47 °C (figura 2).

Al comparar las medias globales de temperaturas, la prueba de ANOVA de una vía ( $F = 1.6$ ;  $P > 0.05$ ) no mostró diferencias significativas entre tratamientos. El promedio general para el tratamiento PB2 fue de 32.7°C mientras que en los tratamientos PBN y PB1 fue de 32.4°C (tabla 1).

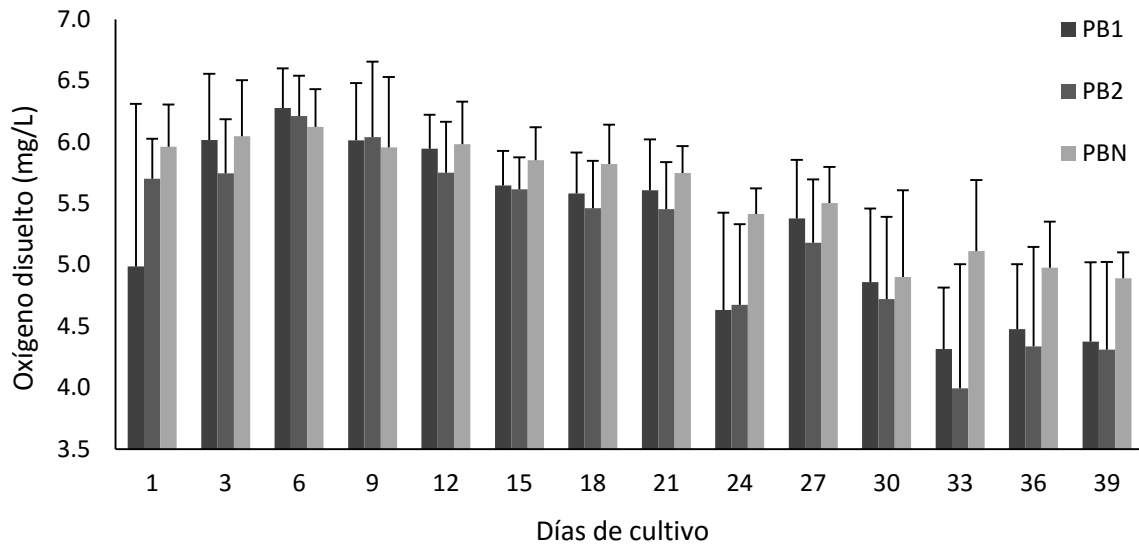


Figura 1. Promedios (+ desviaciones estándar) de oxígeno disuelto registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos (cada barra incluye mediciones de tres días).

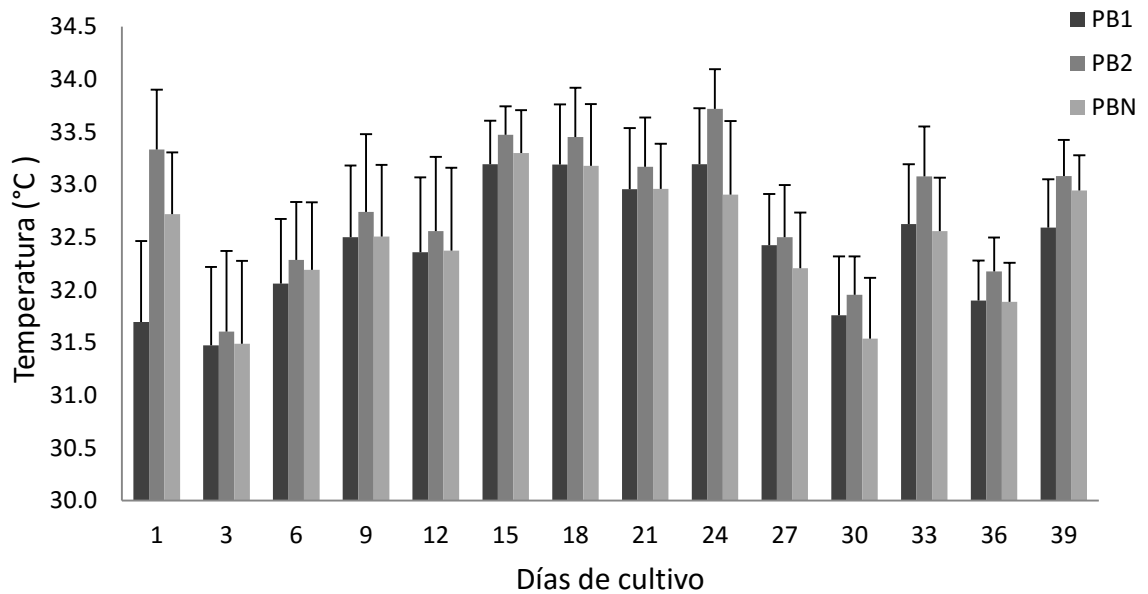


Figura 2. Promedios (+ desviaciones estándar) de temperatura registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos (cada barra incluye mediciones de tres días).

La tendencia general del pH en los tres tratamientos fue similar. Los niveles mínimos al inicio del experimento estuvieron entre 7.7 y 7.8 y los máximos entre 7.8 y 7.9. En todos los tratamientos se registró un ligero incremento hasta el día 24 y posteriormente un descenso hasta el final del experimento. El último día de cultivo los niveles mínimos estuvieron entre 6.8 y 7.0 y los máximos entre 7.3 y 7.4 (figura 3).

En cuanto a los sólidos sedimentables, al inicio del experimento se registraron valores menores a 1 mL/L en todos los tratamientos, conforme avanzó la edad del cultivo, éstos fueron incrementando, finalizando en niveles de entre 7.33 y 10.3. La concentración más alta se registró en el tratamiento PBN (figura 4).

La prueba de ANOVA de una vía ( $P > 0.05$ ) no mostró diferencias en las concentraciones globales de sólidos sedimentables entre los tratamientos. Los niveles estuvieron entre 2.53 y 3.12 ml/L (tabla 1).

La salinidad se mantuvo con incrementos ligeros desde el inicio del experimento hasta el día 26 con una tendencia similar en todos los tratamientos. La menor salinidad fue de 32.67 ‰ en el tratamiento PB2 y la mayor de 38.3 ‰ en los tratamientos PB1 y PB2 (figura 5). La prueba de ANOVA no mostró diferencias significativas entre las medias globales de los tratamientos ( $F = 0.12$ ;  $P > 0.05$ ; tabla 1).



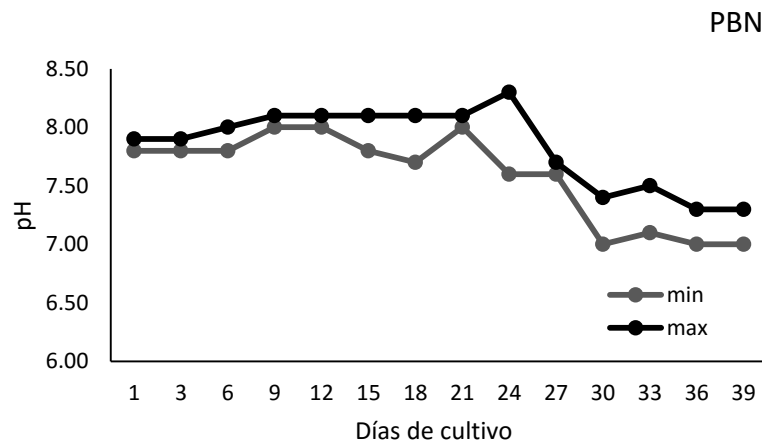
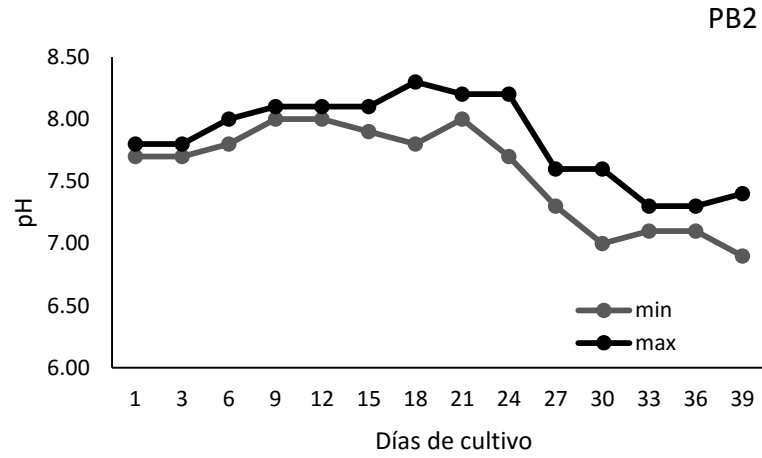
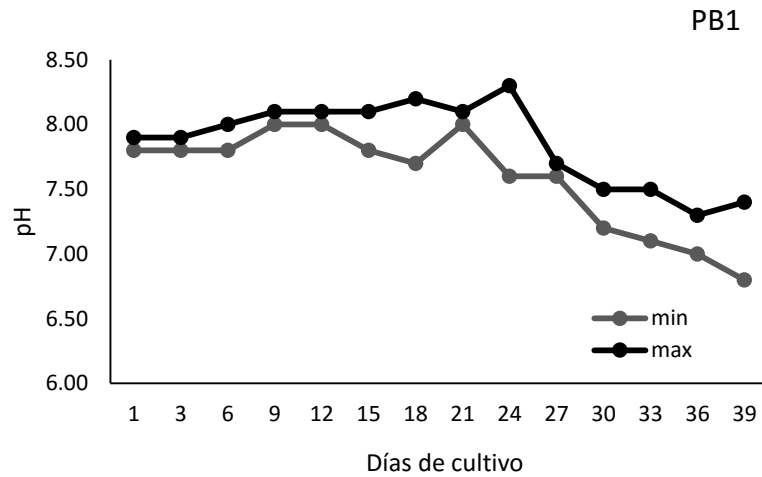


Figura 3. Valores de pH mínimos y máximos registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.

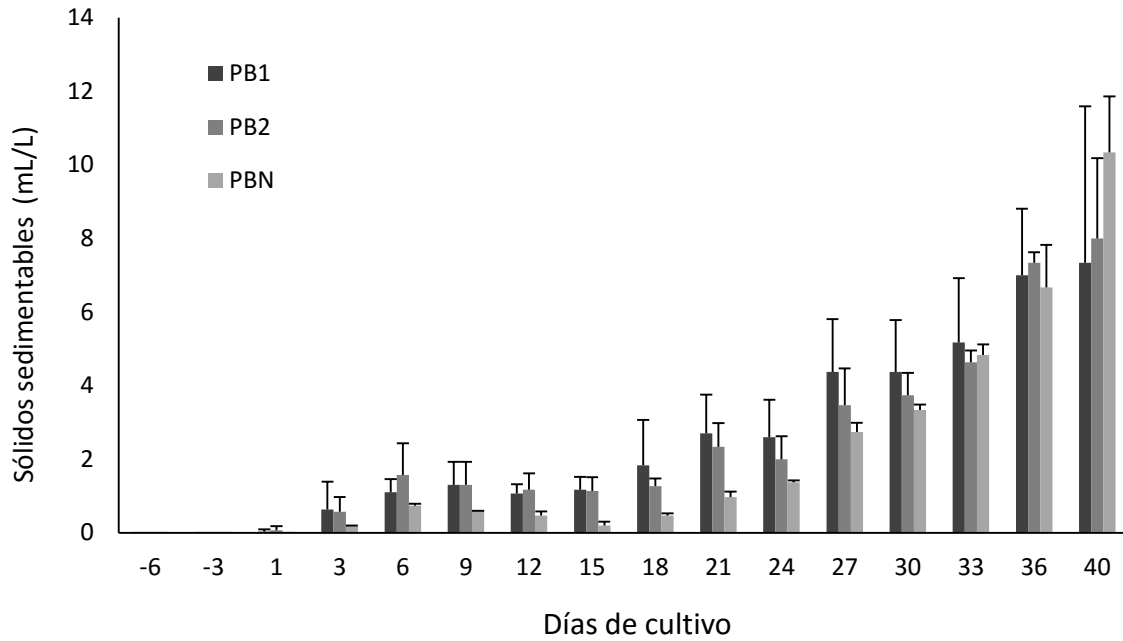


Figura 4. Promedios (+ desviaciones estándar) de sólidos sedimentables registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos (los días previos a la siembra se muestran con signo negativo).

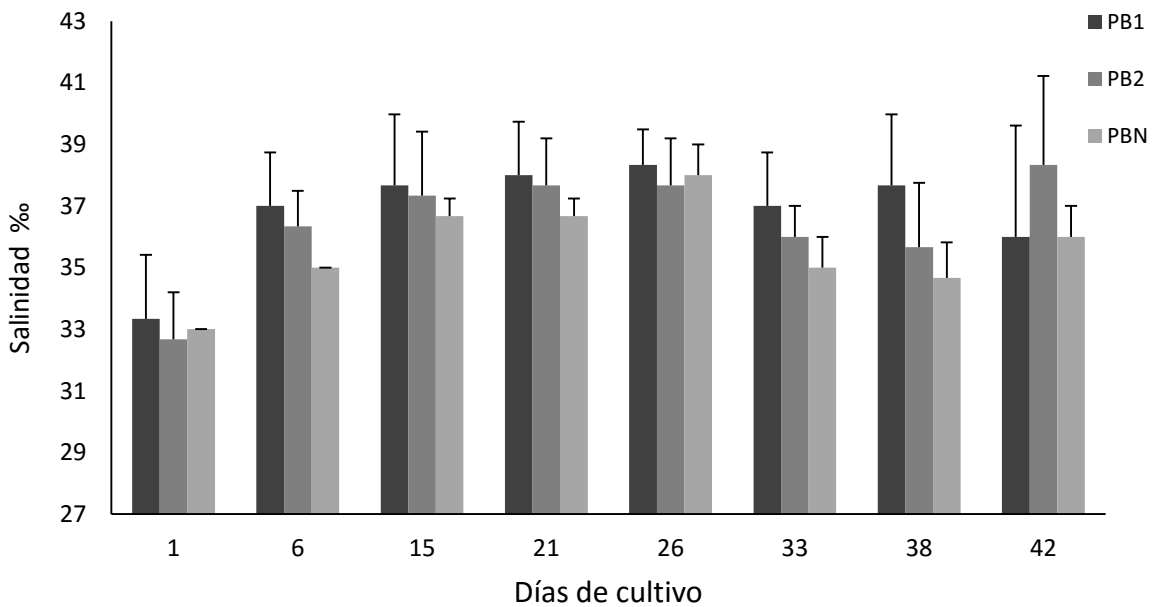


Figura 5. Promedios (+ desviaciones estándar) de salinidad registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos.

Tabla 1. Variables básicas del agua (media y desviación estándar) en los tratamientos. La ausencia de subíndices, que no hubo significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía;  $P < 0.05$ ).

	Tratamientos		
	PB1	PB2	PBN
Oxígeno (mg/L)	5.29 (0.54)	5.22 (0.54)	5.59 (0.37)
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	32.4 (0.65)	32.7 (0.57)	32.4 (0.57)
pH*	6.8 - 8.3	6.9 - 8.3	7.0-8.3
Solidos sediment. (ml/L)	3.12 (1.02)	2.96 (0.54)	2.53 (0.24)
Salinidad (‰)	36.8 (2.08)	36.4 (1.72)	35.3 (0.66)

\*Valores mínimos y máximos

### III.2. Variación de comunidades de bacterias heterótrofas, *Vibrio* y nitrificantes.

#### III.2.1 Bacterias heterótrofas.

Durante los primeros 15 días del experimento, la concentración de bacterias heterótrofas se mantuvo por debajo de  $4.3 \times 10^6$  UFC /mL en todos los tratamientos. A partir del día 18 se observaron incrementos considerables. Las concentraciones más altas se registraron al día 30 con un intervalo de  $38.2 \times 10^6$  UFC/mL (PB1) a  $65.3 \times 10^6$  UFC/mL (PB2) (figura 5).

La densidad de bacterias heterótrofas fue diferente al inicio del experimento (ANOVA de una vía;  $P > 0.05$ ), mientras que en los muestreos el día 10 y el día 30 no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos (tabla 2).

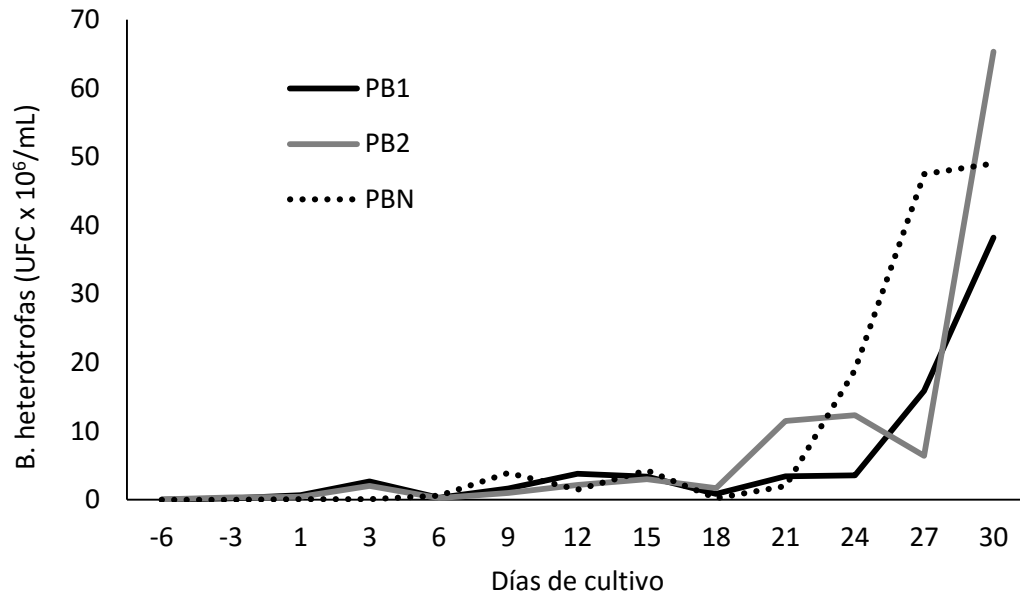


Figura 6. UFC promedios de bacterias heterótrofas registradas en los tres tratamientos durante el experimento (los días previos a la siembra se muestran con signo negativo).

### III.2.2 Bacterias *Vibrio* amarillas.

Las densidades de bacterias *Vibrio* amarillas incrementaron conforme avanzó el experimento. El tratamiento PBN presentó los valores más altos en el día 33 con  $36.2 \times 10^3$  UFC/mL, mientras que los tratamientos PB1 y PB2 alcanzaron sus valores máximos durante el día 36 con  $12.4$  y  $29.3 \times 10^3$  UFC/mL respectivamente (figura 6).

Durante los muestreos de los días 1 y 12 no se detectaron diferencias en la abundancia de las bacterias *Vibrio* amarillas (ANOVA de una vía;  $P > 0.05$ ). Mientras que en el muestreo del día 30 la abundancia mostró diferencias significativas, el valor más bajo se registró en el tratamiento PB2 con  $1.3 \times 10^3$  UFC/mL y el más alto en el  $205.1 \times 10^3$  PB2 con UFC/mL (tabla 2).

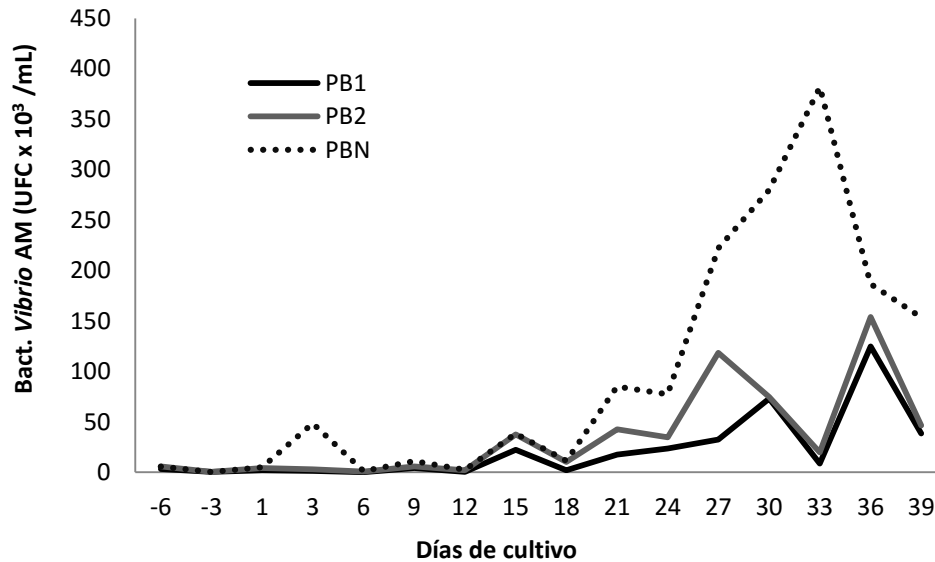


Figura 7. UFC promedios de bacterias *Vibrio* amarillas registradas en los tres tratamientos durante el experimento (los días previos a la siembra se muestran con signo negativo).

### III.2.3 Bacterias *Vibrio* verdes.

Al inicio del experimento las poblaciones de bacterias *Vibrio* verdes se mantuvieron estables en todos los tratamientos. Se observó un incremento entre los días 6 al 9, llegando a valores de  $5.91$  y  $2.25 \times 10^3$  UFC/mL en los tratamientos PB1 y PBN respectivamente. Posteriormente hacia el final del cultivo se registró un periodo de incrementos y descensos pronunciados (figura 7).

La prueba de ANOVA de una vía ( $P > 0.05$ ) mostró diferencias significativas entre los tratamientos para las poblaciones de bacterias *Vibrio* verdes al día 1 del experimento, el tratamiento PBN fue menor a los tratamientos PB1 y PB2. En los días 12 y 30 no se encontraron diferencias significativas (tabla 2).

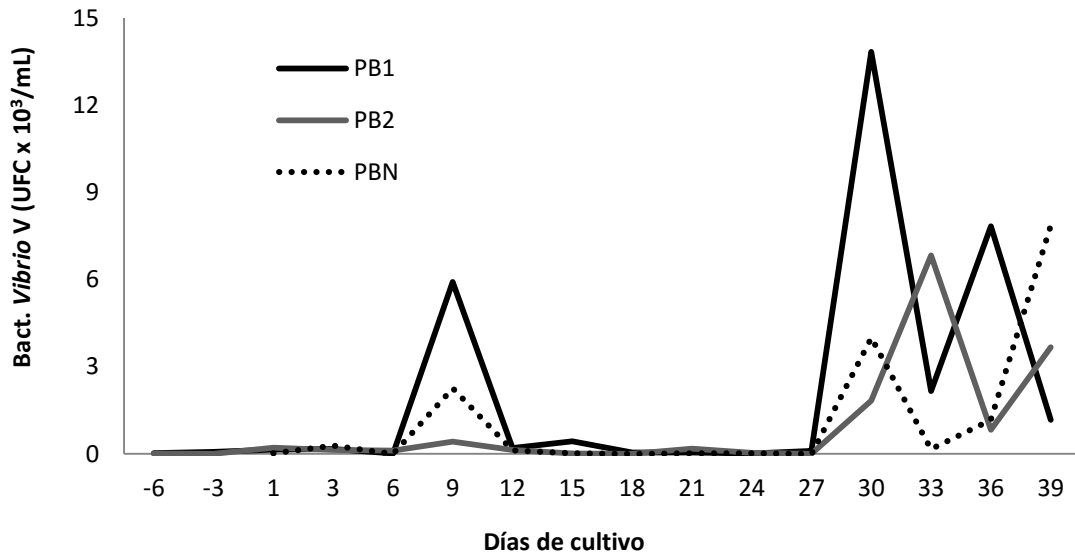


Figura 8. UFC promedios de bacterias *Vibrio* verdes registradas en los tres tratamientos durante el experimento (los días previos a la siembra se muestran con signo negativo).

### III.2.4 Bacterias nitrificantes.

La cantidad de bacterias heterótrofas aumentó conforme avanzó el periodo de cultivo. En el muestreo del día 12, las concentraciones promedio estuvieron entre  $1.1$  y  $1.6 \times 10^6$  UFC/mL, mientras que al día 30 se alcanzaron niveles entre  $58.4$  y  $78.8 \times 10^6$  UFC/mL (figura 8). La prueba de ANOVA no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (tabla 2).

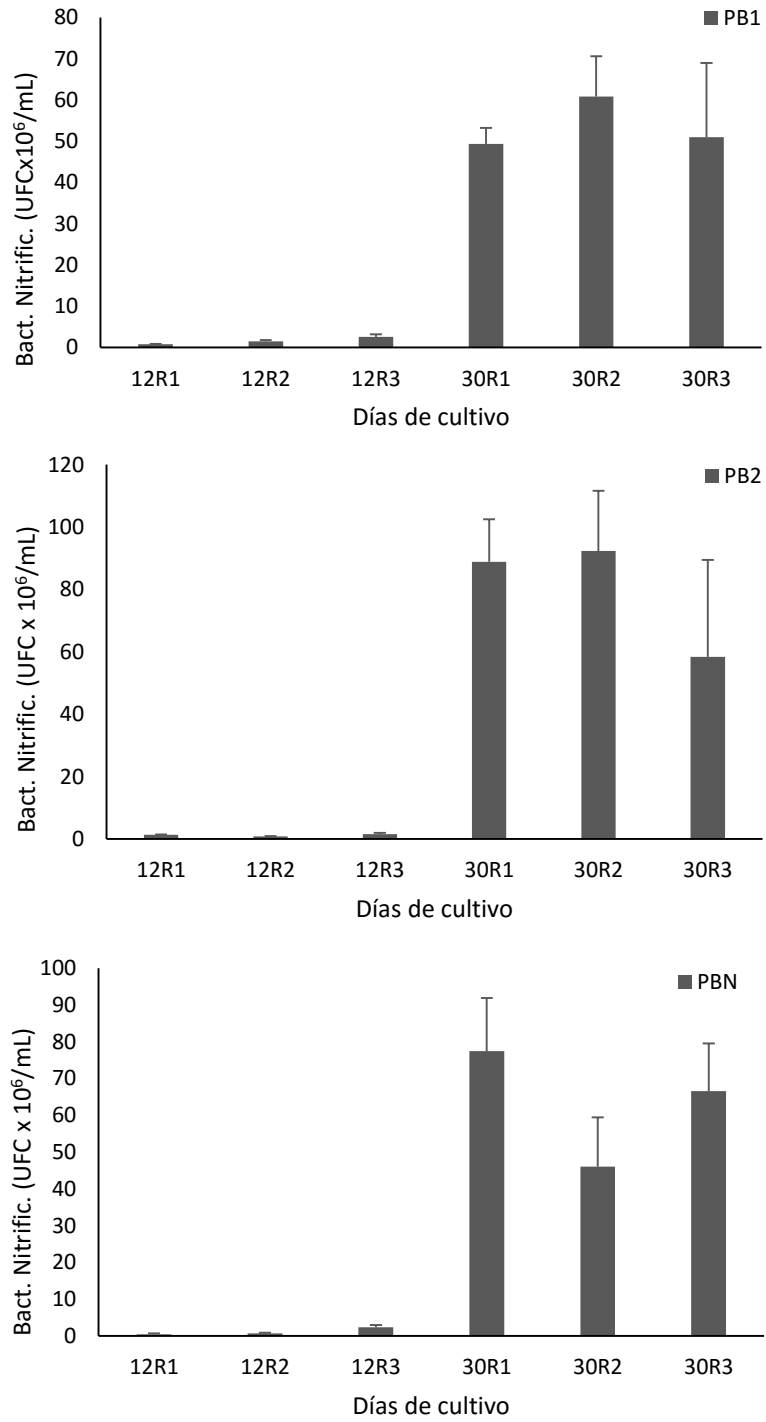


Figura 9. Medias y desviaciones estándar de las bacterias nitrificantes al día 12 y 30 del estudio (R= réplica).

Tabla 2. Cantidad de bacterias (media y D.E.) registradas durante los días 1(inicio), 12 (medio) y 30 (final) del experimento. Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas.

Variable	Tratamientos		
	PB1	PB2	PBN
Día 1			
Het (UFC x 10 <sup>6</sup> /mL)	0.7(0.2) <sup>b</sup>	0.4 (0.1) <sup>ab</sup>	0.1 (0.0) <sup>a</sup>
Nit (UFC x 10 <sup>6</sup> /mL)	-	-	-
<i>Vibrio am</i> (UFC x 10 <sup>3</sup> /mL)	1.8 (0.8)	2.4 (0.7)	0.9 (0.2)
<i>Vibrio ve</i> (UFC x mL)	150 (50) <sup>b</sup>	216 (76) <sup>b</sup>	23 (7) <sup>a</sup>
Día 12			
Het (UFC x 10 <sup>6</sup> /mL)	3.7 (1.4)	2.1 (0.5)	1.5 (0.5)
Nit (UFC x 10 <sup>6</sup> /mL)	1.6 (0.8)	1.2 (0.3)	1.1 (0.3)
<i>Vibrio am</i> (UFC x 10 <sup>3</sup> /mL)	0.5 (0.2)	1.5 (0.5)	0.5 (0.2)
<i>Vibrio ve</i> (UFC x mL)	200 (70)	133 (51)	117 (42)
Día 30			
Het (UFC x 10 <sup>6</sup> /mL)	38.2 (14.9)	65.3 (24.9)	49.0 (16.1)
Nit (UFC x 10 <sup>6</sup> /mL)	53.7 (6.2)	79.8 (18.6)	63.3 (15.9)
<i>Vibrio am</i> (UFC x 10 <sup>3</sup> /mL)	73.1 (29.2) <sup>ab</sup>	1.3 (0.4) <sup>a</sup>	205.1 (14.7) <sup>b</sup>
<i>Vibrio ve</i> (UFC x 10 <sup>3</sup> /mL)	13.8 (5.6)	1.8 (0.7)	4.0 (1.5)

### III.3. Compuestos nitrogenados

#### III.3.1 Amonio (N-NH<sub>3</sub>).

Al inicio del cultivo las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> estuvieron en un intervalo entre 0.59 y 1.14 mg/L. Los valores máximos se presentaron al día 15 en los tratamientos PBN y PB2, con 2.48 y 2.51 mg/L respectivamente. El tratamiento PB1 tuvo su valor máximo el día 12 con



2.70 mg/L (figura 4). La prueba de ANOVA ( $P>0.05$ ) no mostró diferencias significativas entre las medias globales de los tratamientos (tabla 3).

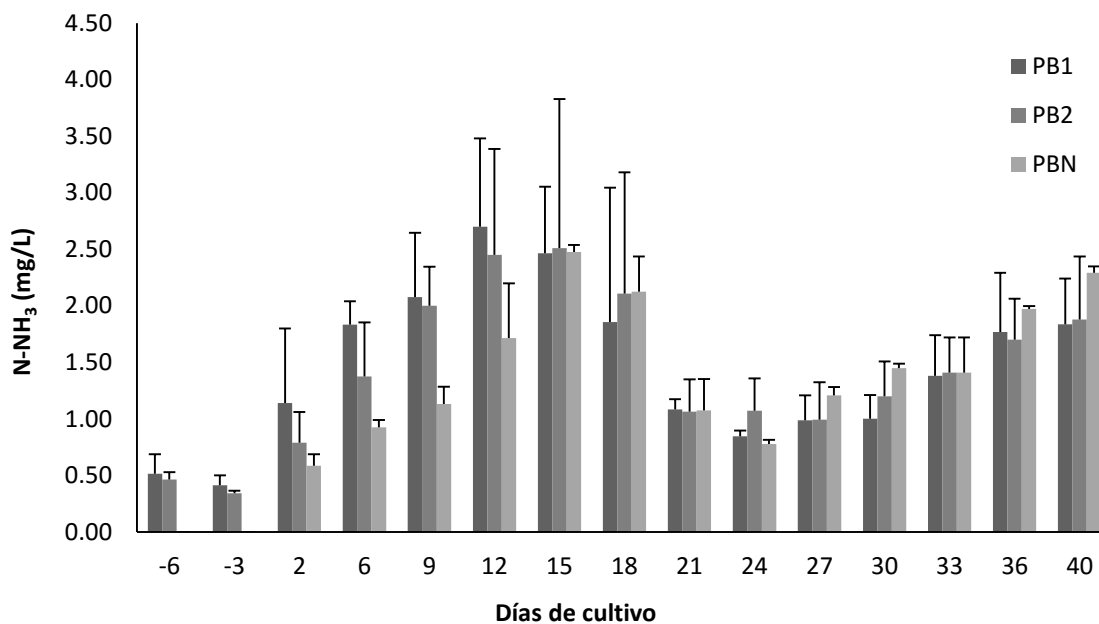


Figura 10. Promedios (+ desviaciones estándar) de N-NH<sub>3</sub> registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos (los días previos a la siembra se muestran con signo negativo).

### III.3.2 Nitritos (N-NO<sub>2</sub>).

Desde el inicio del cultivo y hasta el día 15, las concentraciones de nitritos se mantuvieron por debajo de 0.60 mg/L en todos los tratamientos. Posteriormente los niveles incrementaron hasta el final del cultivo. La concentración máxima alcanzada fue de 15.73 mg/L y correspondió al tratamiento PB1 (figura 5).

La prueba de ANOVA, no mostró diferencias significativas ( $F = 0.54$ ;  $P > 0.05$ ) entre las medias globales de los tratamientos (Tabla 3).

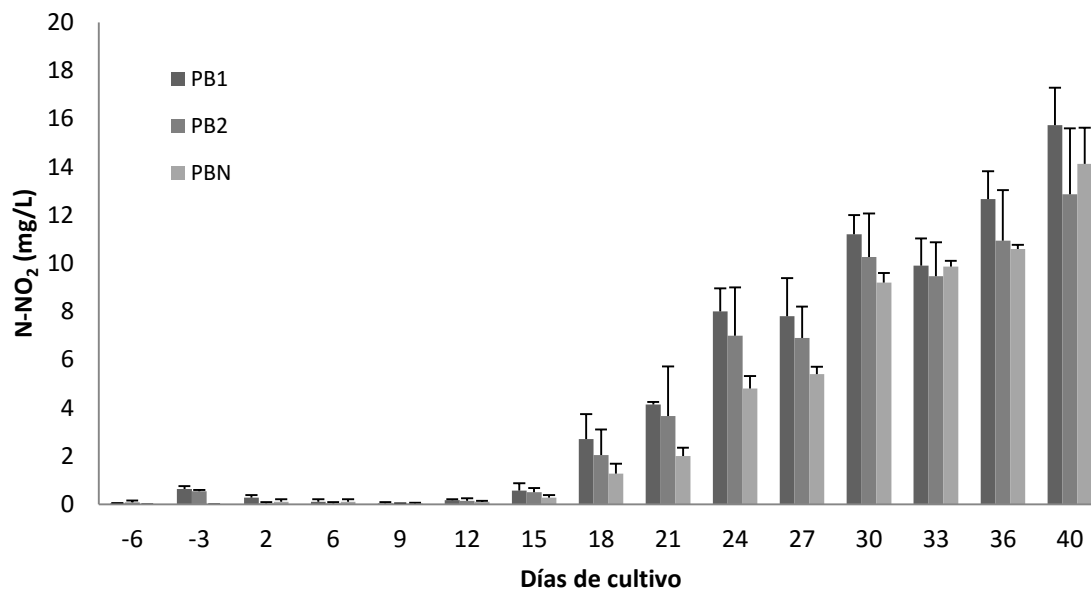


Figura 11. Promedios (+ desviaciones estándar) de N-NO<sub>2</sub> registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos (los días previos a la siembra se muestran con signo negativo).

### III.3.3 Nitratos (N-NO<sub>3</sub>).

Las concentraciones iniciales de nitratos fueron de 1.0 mg/L en todos los tratamientos y se mantuvieron con ligeros incrementos hasta el día 18 del cultivo. Posteriormente los aumentos fueron mayores. Al final del experimento se alcanzaron entre 43.8 y 52.43 mg/L (figura 6). La prueba de ANOVA ( $P > 0.05$ ) no mostró diferencias significativas los tratamientos (tabla 3).

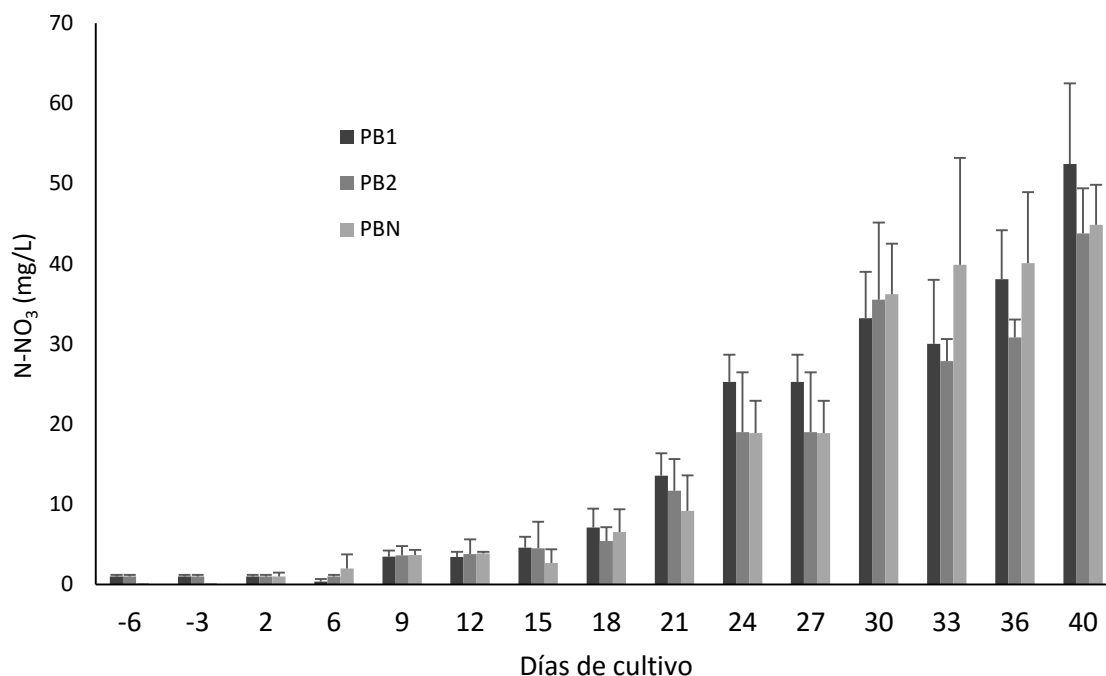


Figura 12. Promedios (+ desviaciones estándar) de N-NO<sub>3</sub> registrados durante el experimento en los diferentes tratamientos (los días previos a la siembra se muestran con signo negativo).

Tabla 3. Medias y desviaciones estándar de los compuestos nitrogenados en los diferentes tratamientos.

Variable	Tratamientos		
	PB1	PB2	PBN
N-NH <sub>3</sub> (mg/L)	1.61 (0.41)	1.58 (0.46)	1.49 (0.15)
N-NO <sub>2</sub> (mg/L)	5.63 (0.61)	4.91 (1.00)	4.45 (0.33)
N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	18.77 (5.33)	17.77 (8.78)	18.09 (3.74)

### III.3. Crecimiento, sobrevivencia y FCA del camarón

La ganancia en el peso del camarón fue similar en los tres tratamientos. El peso inicial 0.073 g/ind llegó a 2.31-2.70 g/ind después de los 42 días de cultivo (figura 7). La biomasa acumulada por individuo al final del experimento estuvo entre 2.23 y 2.62 g, el mínimo se presentó en el tratamiento PB1 y el máximo en el PB2, sin diferencias significativas entre los tratamientos. El crecimiento específico (CE) estuvo entre 14.75 y 15.16 % /día, sin diferencias significativas entre los tratamientos.

El porcentaje de sobrevivencia estuvo entre 85 y 92.3, sin diferencias significativas entre tratamientos. El factor de conversión alimenticia (FCA) estuvo entre 0.83 y 1.24 con diferencias significativas entre los tratamientos ( $F = 12.26$ ;  $P > 0.05$ ). El valor más bajo se obtuvo en el tratamiento PBN y el más alto en el PB1 (tabla 4).

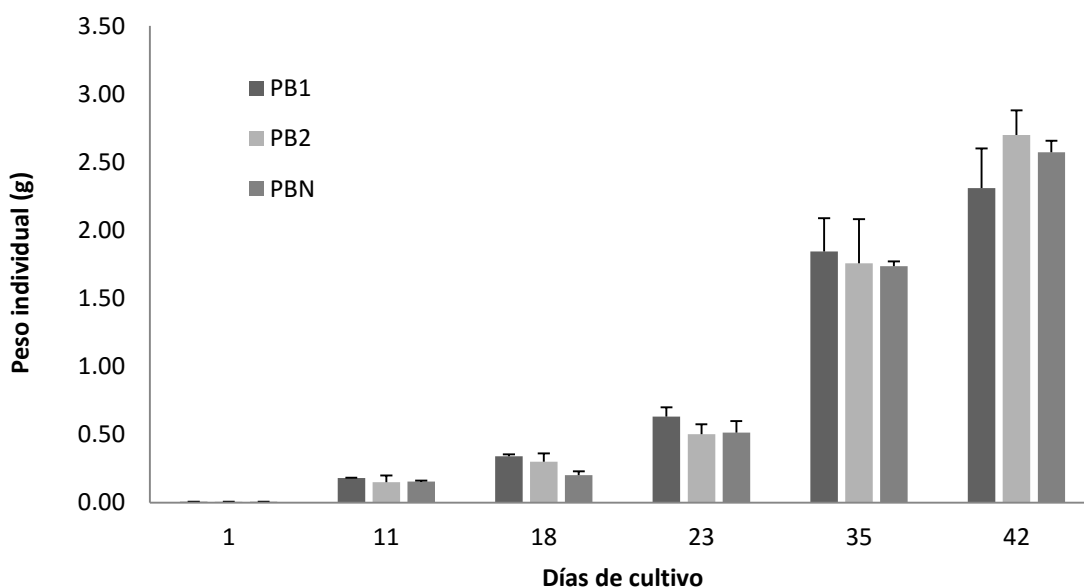


Figura 13. Promedios (+ desviaciones estándar) del peso individual de *Litopenaeus vannamei* durante el periodo de cultivo.

Tabla 4. Parámetros productivos de *Litopenaeus vannamei* (media y desviación estándar).

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (ANOVA de una vía;  $P < 0.05$ ).

Trat.	Peso ind. Inicial	Peso ind. Final	Inc. Ind.	Inc. Diario	Crec. Esp. %/día	% Sobr.	FCA
PBN	0.073 (0.00)	2.57 (0.08)	2.49 (0.08)	0.05 (0.00)	14.75 (0.33)	92.30 (6.54)	0.83 (0.05) <sup>a</sup>
PB1	0.073 (0.00)	2.31 (0.29)	2.23 (0.29)	0.04 (0.00)	15.16 (0.17)	92.00 (4.35)	1.24 (0.14) <sup>b</sup>
PB2	0.073 (0.00)	2.61 (0.12)	2.62 (0.18)	0.05 (0.00)	15.04 (0.08)	85.00 (8.66)	1.14 (0.09) <sup>b</sup>

## **IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **IV.1. Variables básicas del agua y solidos sedimentables**

#### **Temperatura**

La temperatura del agua es una variable fundamental en los cultivos acuícolas y tiene un efecto directo sobre la tasa metabólica. Wyban *et al.* (1995) indican que la temperatura óptima para el cultivo de *L. vannamei* es de 27 °C; mientras que Bardach *et al.* (1986) señalan que se puede desarrollar adecuadamente entre 28 y 32°C. En este estudio la temperatura se mantuvo entre 31.5 y 33.7°C, la cual se encuentra dentro del intervalo recomendado.

#### **Oxígeno disuelto**

Uno de los factores críticos para operar eficientemente un sistema de cultivo hiper-intensivo, es mantener concentraciones adecuadas de oxígeno disuelto en el agua. El oxígeno es un elemento esencial para el metabolismo de los microorganismos nitrificantes, heterótrofos y micro zooplancton, así como para la respiración de la especie cultivada (Avnimelech, 2012). Martínez-Córdova (1999) indica que en el cultivo de camarón es recomendable mantener concentraciones de oxígeno disuelto cercanas a los 5 mg/L. En general diversos autores coinciden en que el intervalo óptimo para el cultivo de camarones marinos se encuentra entre 3.5 y 8.1 mg/L (Boyd, 1990; Boyd y Fast 1992; Masser *et al.* 1999).

En un cultivo de *Litopenaeus vannamei* en biofloc, Emerenciano *et al.* (2013) reportaron niveles de oxígeno disuelto de 5.7 mg/L. En otro estudio Krummenauer *et al.* (2011) reportaron un intervalo más amplio (1.3 a 9.0 mg/L) en un sistema con cero recambio de agua con densidades de 150, 300 y 450 ind/m<sup>2</sup>. En el presente estudio se obtuvieron

concentraciones promedio de 5.22 a 5.29 mg/L, las cuales se encuentran dentro del rango adecuado para cultivo de camarón blanco, y son similares a los reportados por otros autores.

## **pH**

El pH es una variable muy dinámica, ya que presenta variaciones durante el ciclo diario y a lo largo del periodo de cultivo. Las variaciones se deben al efecto de la respiración y de la fotosíntesis (Pan *et al.*, 2007). Esta variable determina la forma en la que nitrógeno amoniacal se encuentra en el agua, ya sea ionizada o no ionizada, siendo esta última la más toxica para los organismos en cultivo, la cual tiende a incrementar conforme lo hace el pH.

Van Wyk *et al.* (1999) indican que el intervalo de tolerancia de pH para los camarones se encuentra entre 7 y 9. En el presente estudio se encontró dentro de éste intervalo (7.07 a 8.25). En un cultivo de camarón con cero recambio Decamp *et al.* (2007) reportaron valores de 7.63 a 8.14, los cuales son similares a los obtenidos en este experimento.

## **Sólidos sedimentables**

Los sólidos suspendidos son el segundo factor más importante después del oxígeno disuelto (Ebeling *et al.*, 2006). Algunos investigadores han enfatizado la necesidad de establecer límites de operación apropiados para sistemas biofloc. Vinatea *et al.* (2010) encontraron que los altos niveles de sólidos en el agua, se asocian a bajas tasas de crecimiento, así como baja eficiencia alimenticia en un cultivo super-intensivo de *L. vannamei*. Avnimelech (2012) indica que el intervalo de sólidos sedimentables adecuado para el cultivo de camarón en biofloc es de 2 a 40 ml/L. Aunque se han alcanzado niveles superiores, como ejemplo se tiene el estudio de Schweitzer *et al.* (2013) quienes reportaron concentraciones de sólidos sedimentables de entre

1 y 45 ml/L en un cultivo de *L. vannamei* sin recambio de agua. En el presente estudio se presentaron valores desde 0.5 hasta 10.33 ml/L, los cuales se encuentran por debajo del límite superior mencionado previamente.

### **Salinidad**

La salinidad del agua está relacionada con el equilibrio osmótico entre el organismo y el medio, cada especie tiene un intervalo para que su desarrollo sea óptimo. Cuando un organismo se encuentra fuera de este rango óptimo, el crecimiento puede disminuir, debido a que gran parte de su energía es usada para mantener su equilibrio osmótico (Bray *et al.*, 1994). Martínez-Córdova (1999) indica que el rango de tolerancia para *L. vannamei* va de 2 a 50 ‰, sin embargo el intervalo óptimo se presenta entre 15 y 30 ‰.

En un cultivo de postlarvas de camarón en sistema con biofloc Brito *et al.* (2015) reportaron niveles de salinidad de 32.1 a 32.9 ‰. Por otro lado, Serra *et al.* (2015) reportaron valores de 33.0 a 33.5 ‰ en maternidades de camarón blanco en biofloc. En el presente estudio se obtuvieron valores de 35.3 a 36.8 ‰. Los cuales son similares a los estudios previos y se encuentran dentro del intervalo de tolerancia.

### **IV.2. Comunidades de bacterias heterótrofas, *Vibrio* y nitrificantes.**

Cuando se opera un sistema de cultivo en donde el recambio de agua es nulo o limitado, la materia orgánica tiende a acumularse en la columna de agua. La materia orgánica promueve el desarrollo de la comunidad microbiana heterótrofa. Las bacterias heterótrofas degradan la materia orgánica y la usan para satisfacer sus requerimientos de energía, así como para el desarrollo de nuevas células (Avnimelech, 2012). En el presente estudio el aumento



considerable de bacterias heterótrofas se observó a partir del día 18 y siguió hasta el día 30 donde se alcanzaron las mayores concentraciones debido al mayor suministro de alimento peletizado en los estanques de cultivo.

Las concentraciones de bacterias heterótrofas reportadas por Burford *et al.* (2003) fueron de 36.4 a 50.6 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, en un estudio con *L. vannamei* con cero recambio. En otro estudio, Fernandes *et al.* (2010) encontraron concentraciones de 2.8-3.4 x 10<sup>5</sup> a 9.65 x 10<sup>6</sup> cel/mL en un cultivo con *Penaeus monodon*. Las concentraciones más altas obtenidas al final del presente estudio estuvieron entre 38.2 y 65.3 x 10<sup>6</sup> UFC/mL similares a las reportadas por (Burford *et al.*, 2003).

En los tratamientos PB1 y PB2 la relación C:N fue de 13:1, mientras que en el tratamiento PBN fue de 9:1. Por otro lado los tratamientos PB1 y PB2 recibieron suministro externo de bacterias a través de la bioaumentación de consorcios microbianos. Al inicio de este experimento se observó que la adición carbono orgánico (melaza) además del suministro externo de bacterias, influyó en el incremento de las poblaciones bacterianas en los tratamientos PB1 y PB2, sin embargo en la etapa media y final del experimento no se registraron diferencias significativas respecto al tratamiento PBN. En éste caso la acumulación de materia orgánica favoreció el desarrollo de bacterias heterótrofas que habitan naturalmente en el ambiente del agua de suministro.

Los resultados obtenidos son consistentes con el estudio de Yuniasari y Ekasari (2010) quienes reportaron que no hubo diferencias significativas sobre la densidad de bacterias heterótrofas en tratamientos con y sin la adición de probióticos (ambos sin fuente de carbono orgánico adicional) en un cultivo de *L. vannamei*.

Las bacterias nitrificantes tienen una gran importancia ecológica en los sistemas acuáticos, debido a que son capaces de reducir el amonio a través de la oxidación a nitrito y posteriormente a nitrato (Spieck y Bock 2005). En estas bacterias se incluyen dos grupos de microorganismos especializados en el proceso de nitrificación, las oxidantes de amonio y las bacterias oxidantes de nitrito (Sinha y Annachhatre 2007).

En el presente estudio, las máximas concentraciones de bacterias oxidantes de amonio estuvieron entre 53.7 a 79.8 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. Mientras que Huerta-Aldaz *et al.* (2012) evaluaron la abundancia de bacterias oxidantes de amonio en los efluentes en una granja de camarón blanco *L. vannamei* y reportaron valores de hasta 50.2 x 10<sup>6</sup> cel/mL. Por otro lado, Abraham *et al.* (2004) en evaluaciones realizadas en el agua de estanques de *L. vannamei* reportaron 9.2 x 10<sup>2</sup> NMP/mL de bacterias oxidantes de amonio. Los valores encontrados en este estudio son similares a los reportados por Huerta-Aldaz *et al.* (2012), sin embargo cabe mencionar que Huerta-Aldaz *et al.* (2012) utilizó el conteo de células mediante microscopía de epifluorescencia, mientras que en el presente trabajo se utilizó la siembra en superficie (APHA, 1992). Es probable que existan variaciones entre ambas técnicas debido a que la siembra en superficie solo permite contabilizar las bacterias viables en el medio de cultivo utilizado, el cual es específico para bacterias oxidantes de amonio (Atlas, 2010).

Las bacterias del género *Vibrio* son habitantes comunes y ampliamente distribuidas en el medio marino natural, y forman parte de la microbiota presente en los cultivos de camarón (Gopal *et al.*, 2005). Este género está asociado a diversas enfermedades en organismos acuáticos y puede afectar desde los estadios larvales hasta los adultos (Thompson *et al.*, 2004).

En el presente estudio las concentraciones de bacterias *Vibrio* incrementaron hacia el final del cultivo. Lo anterior se puede atribuir al incremento de materia orgánica, que es característico de un sistema con limitado recambio de agua (Avnimelech, 2012). Altas concentraciones de bacterias *Vibrio*, han sido relacionadas a altas cargas de materia orgánica en la columna de agua (Ferreira *et al.*, 2011).

Luis-Villaseñor *et al.* (2015) reportaron concentraciones de  $1.57 \times 10^4$  UFC/mL de bacterias *Vibrio* en un estudio con juveniles de *L. vannamei* cultivados en biofloc. En otro estudio Brito *et al.* (2014) encontraron valores de 0.4 a  $2.20 \times 10^3$  UFC/mL, en un cultivo de *L. vannamei* de biofloc integrado con *Gracilaria birdiae*. En el presente estudio se encontraron concentraciones de 12.4 a  $36.2 \times 10^3$  UFC/mL, valores ligeramente superiores a los reportados por Luis-Villaseñor *et al.* (2015), sin embargo cabe mencionar que éste estudio se realizó en condiciones de una granja comercial en volúmenes de 70 m<sup>3</sup> de agua a diferencia de los experimentos en laboratorio que emplean volúmenes reducidos.

Monroy-Dosta *et al.* (2013) en un cultivo de tilapia en biofloc, observaron que las bacterias del género *Vibrio* y *Aeromonas* fueron las primeras en colonizar los flóculos, sin embargo, el incremento de microorganismos heterótrofos impidió la proliferación de estas. En el presente estudio las bacterias *Vibrio* se registraron durante todo el periodo de cultivo. Sin embargo, no se presentaron eventos de mortalidad. Lo anterior se puede relacionar como un efecto de inhibición en los microorganismos patógenos, gracias a la alta presencia de bacterias heterótrofas en los bioflóculos (Martínez-Córdova *et al.*, 2015).

Se ha reportado que, cuando se altera el equilibrio entre las comunidades bacterianas, las bacterias del género *Vibrio* se convierten en patógenos oportunistas (Aguilera-Rivera *et al.*,

2014). La mínima o nula incidencia de eventos patológicos, puede ser posible por interacciones (competencia por sustrato y nutrientes) entre bacterias patógenas y microorganismos formadores del biofloc (Crab *et al.*, 2010; Emerenciano *et al.*, 2013). Los resultados encontrados en este estudio, muestran que mientras las bacterias heterótrofas se encontraban en el rango de  $10^6$  UFC/mL, las bacterias *Vibrio* estuvieron en niveles de  $10^3$  UFC/mL. Lo cual es consistente el efecto de inhibición antes mencionado.

### **IV.3. Compuestos nitrogenados (N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub>)**

El nitrógeno amoniacal total (NAT) es la suma de las dos formas de nitrógeno contenido en amonio: N-NH<sub>4</sub> (nitrógeno amoniacal ionizado) y N-NH<sub>3</sub> (nitrógeno amoniacal no ionizado). El amonio no ionizado es la forma más tóxica, por lo tanto la toxicidad del NAT es en relación a la concentración de N-NH<sub>3</sub> contenida en él. La concentración relativa de amonio ionizado y no ionizado del NAT, está en función del pH, la temperatura y salinidad del agua (Timmons *et al.*, 2002). Lin y Chen (2001) reportaron que el límite seguro para juveniles de *L. vannamei* llega a niveles de 3.95 mg/L de NAT.

Yuniasari y Ekasari (2010) evaluaron el desempeño de un cultivo de maternización de postlarvas de *L. vannamei* en biofloc bajo condiciones de laboratorio, y reportaron valores máximos de 0.67 a 1.14 mg/L de NAT y 0.18 a 0.36 mg/L de N-NH<sub>3</sub>, en un intervalo de pH de 7.32 a 7.92. En otro estudio con juveniles de *L. vannamei* cultivados sin recambio de agua, Krummenauer *et al.* (2014) reportaron niveles de NAT de 0.04 a 0.52 mg/L, con un intervalo de pH de 7.58 a 7.67. En el presente estudio los niveles más altos de N-NH<sub>3</sub> estuvieron entre 2.48 y 2.70 mg/L, con pH de 6.8 a 8.3, sin que se registraran eventos de mortalidad en dichos periodos.

En cuanto al N-NO<sub>2</sub>, Lin y Chen (2003) reportaron que las concentraciones seguras para *L. vannamei*, pueden llegar hasta 25.7 mg/L en agua con 35 ‰. En el presente estudio las concentraciones máximas de N-NO<sub>2</sub> estuvieron entre 12.87 a 15.73 mg/L, y se mantuvieron por debajo del límite máximo señalado anteriormente; estos valores son semejantes a los reportados por Serra *et al.* (2015) quienes registraron niveles máximos de entre 20 y 25 mg/L en un cultivo hiper-intensivo de *L. vannamei* en biofloc. Por otro lado en un estudio con juveniles de *L. vannamei* cultivados en biofloc, Luis-Villaseñor *et al.* (2015) reportaron valores promedio de 0.15 mg/L de N-NO<sub>2</sub>, tales concentraciones fueron menores a las encontradas en el presente estudio. Las variaciones de nitrito pueden variar en función de la edad del cultivo, de la densidad de siembra, salinidad y tipo de alimento presentes en cada situación experimental.

Los nitratos son el producto final en el proceso de nitrificación y es el menos tóxico de los compuestos nitrogenados (Timmons *et al.*, 2002). En el presente estudio los nitratos se acumularon gradualmente conforme avanzó el tiempo del cultivo y alcanzaron valores de entre 43.8 y 52.43 mg/L. El incremento gradual de N-NO<sub>3</sub> en sistemas de cultivos con limitado recambio, ha sido documentado por diferentes autores, y se han reportado valores superiores a 400 mg/L (Samocha *et al.*, 2010; Krummenauer *et al.*, 2011). Los niveles similares a los alcanzados al final del presente experimento fueron reportados por Krummenauer *et al.* (2014) con un intervalo de 13.25 a 55.64 mg/L en un estudio con *L. vannamei* en biofloc.

#### **IV.4. Crecimiento y sobrevivencia y FCA del camarón**

El crecimiento específico (CE) del camarón en el presente trabajo (14.75-15.16 % por día) y la sobrevivencia (85.0 a 92.3%) son comparables con los resultados de Yuniasari y Ekasari

(2010) quienes realizaron un estudio de maternización de camarón blanco en biofloc al final de su experimento reportaron: un peso individual de entre 0.59 a 1.26 g en 25 días de cultivo con 15 mg de peso inicial por individuo, lo que es equivalente a un CE de 14 a 17 % diario y sobrevivencia de 86 a 94%. Aunque los parámetros son ligeramente mayores a los evaluados en el presente estudio, cabe mencionar que la densidad de siembra fue de 160 ind/m<sup>2</sup> y el estudio se realizó bajo condiciones de laboratorio. En otro experimento de maternización de camarón en biofloc, Serra *et al.* (2015) reportaron crecimientos específicos de 11.1 a 11.4% diario y sobrevivencias de 97.4 a 99.5% en un periodo de 35 días y densidad de 1,200 ind/m<sup>2</sup>, el CE fue menor al del presente trabajo (500 ind/m<sup>2</sup>), la diferencia se puede atribuir principalmente a las densidades de siembra. En cuanto al factor de conversión de alimento en el estudio antes mencionado Serra *et al.* (2015) informaron valores de 0.89 a 1.12. En otro estudio con juveniles de *L. vannamei* cultivados en biofloc Luis – Villaseñor *et al* (2015) reportaron un factor de conversión de alimento de 1.41 a densidades de 500 ind/m<sup>2</sup>. En el presente estudio los valores de FCA se encontraron de 0.83 a 1.24, dichos valores son comparables a los reportados en los dos estudios mencionados anteriormente. Por otra parte, en el presente estudio los tratamientos PB1 y PB2 alcanzaron factor de conversión mayor respecto al PBN, esto se debió a la adición extra de alimento molido para promover sustrato de bacterias heterótrofas en los tratamientos PB1 y PB2.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### V.1. Conclusiones

1. La adición de bioaumentos y la relación C:N 13:1, promovieron una mayor abundancia de bacterias heterótrofas al inicio del experimento en los tratamientos PB1 y PB2, sin embargo en las etapas media y final no hubo diferencias significativas respecto al PBN que no recibió inóculos externos.
2. La cantidad de bacterias nitrificantes incrementó conforme avanzó la edad del cultivo y se mantuvo sin diferencias significativas entre los tratamientos.
3. Las densidades de las bacterias *Vibrio* amarillas aumentaron en función del tiempo del experimento, mientras que las poblaciones *Vibrio* verdes se mantuvieron estables. Al final del experimento la abundancia de las bacterias *Vibrio* amarillas fue mayor en el tratamiento PBN, al inicio del experimento la abundancia de bacterias *Vibrio* verdes fue menor en el tratamiento PBN.
4. Los sólidos sedimentables incrementaron en función del tiempo del cultivo, el uso de los consorcios bacterianos no mostró un efecto significativo en la cantidad de los sólidos sedimentables respecto al control (PBN).
5. Los niveles de N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub>, se encontraron dentro del rango recomendado para el cultivo de camarón blanco. Se presentaron variaciones en el tiempo del experimento sin diferencias entre los tratamientos. El desarrollo de bacterias heterótrofas y nitrificantes, permitió mantener niveles adecuados de N-NH<sub>3</sub> y N-NO<sub>2</sub> en condiciones de mínimo recambio de agua.
6. El crecimiento específico y la sobrevivencia fueron similares en todos los tratamientos, el factor de conversión alimenticia fue menor en el tratamiento PBN.

## **V.2. Recomendaciones**

1. Se recomienda promover el desarrollo de bacterias benéficas presentes en los cuerpos de agua adyacentes a los cultivos hiperintensivos.
2. Se recomienda utilizar relaciones C:N bajas para evitar el gasto excesivo en el suministro de fuentes de carbono.
3. Se recomienda utilizar técnicas de metagenómica para identificar las especies de bacterias presentes en los sistemas de biofloc.
4. Se recomienda estudiar los efectos del aporte de enzimas, inmunoestimulantes, y otros compuestos presentes en los bioflóculos sobre la salud y nutrición del camarón.



## VI. LITERATURA CITADA

- Abraham, T. J., Ghosh, S., Nagesh, T. S., y Sasmal, D. 2004. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. *Aquaculture*, 239(1), 275-288.
- Actis L.A., Tolmasky, M.e. y Crosa, J.h. 1999. Vibriosis. In "Fish Diseases and Disorders" Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections (Eds P.t.k. Woo and D.w. Bruno). Pp: 523- 557, Cab International, London, Uk.
- Aguilera-Rivera D., Prieto-Davó A., Escalante K., Chávez C., Cuzone G. y Gaxiola G. 2014. Probiotic effect of FLOC on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *Aquaculture* 424-425: 215-219.
- APHA, 1992. Standard Methods for the examination of water and wastewaters. Clescer, L., Greenberg, A.E. y Trussell, R.R. (Eds). 17va edition. Washington, D.C. p.9-61.
- Atlas R.M. 2010. Handbook of microbiological media. 4rt. Ed. CRC Press. FL, USA, 2036 p.
- Austin B. y Austin D.A. 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, 3rd Ed. Springer-verlag Kg, Berlin, Germany.
- Avnimelech, Y. 2012. Biofloc technology. A practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Avnimelech Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264:140-147.
- Avnimelech, Y. 2005. Tilapia harvest microbial flocs in active suspension research pond. *Glob. Aquacult. Advocate*, 8: 57-58.
- Azim, M.E., M.A.Wahab, M.C.J. Verdegem, A.A.Van Dam, J.M. van Rooij y M.C.M. Beveridge. 2002. The effects of artificial substrates on freshwater pond productivity and water quality and the implications for periphyton-based aquaculture. *Aquat. Living Resour.*, 15: 231-241.
- Bardach, J. E., Ryther, J. H., Mclarney, W. O., Jiménez, J. A. C., y Calderón, J. L. G. 1986. Acuacultura: crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. Agt.
- Biswas, P., Pal, A. K., Sahu, N. P., Reddy, A. K., Prusty, A. K., y Misra, S. 2007. Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: effect on growth, body composition and lipid profile. *Aquaculture*, 265(1), 253-260.

- Boyd, C. E. 1989. Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and allied aquacultures Department series No. 2, Alabama Exp. Station, Auburn University, AL. February 1989, 83pp.
- Boyd, C. E. 1990. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University.
- Boyd, C. E., y Fast, A. W. 1992. Pond monitoring and management. Developments in aquaculture and fisheries science, 23, 497-513.
- Bray, W. A., Lawrence, A. L., y Leung-Trujillo, J. R. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. Aquaculture, 122(2), 133-146.
- Brito, L. O., Chagas, A. M., Silva, E. P. D., Soares, R. B., Severi, W., y Gálvez, A. O. 2014. Water quality, *Vibrio* density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). Aquaculture Research.
- Brito, L. O., Santos, I. G. S., Abreu, J. L., Araújo, M. T., Severi, W., y Gálvez, A. O. 2015. Effect of the addition of diatoms (*Navicula spp.*) and rotifers (*Brachionus plicatilis*) on water quality and growth of the *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in a biofloc system. Aquaculture Research.
- Burford, M.A. y K.C. Williams 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. Aquaculture 198, 79-93.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., y D.C. Pearson 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. Aquaculture 219, 393-411.
- CONAPESCA. 2013. Anuario estadístico de acuacultura y pesca, [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_anuario\\_estadistico\\_de\\_pesca](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca)
- COSAES. 2014. Informe final ciclo 2014 camarón, [www.cosaes.com](http://www.cosaes.com).
- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., y Verstraete, W. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. Journal of applied microbiology, 109(5), 1643-1649.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., y Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture. p. 351-356.
- Decamp, O., Conquest, L., Cody, J., Forster, I., y Tacon, A. G. 2007. Effect of Shrimp Stocking Density on Size-fractionated Phytoplankton and Ecological Groups of Ciliated

- Protozoa within Zero-water Exchange Shrimp Culture Systems. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(3), 395-406.
- Duwat, P., Cesselin, B., Sourice, S., y Gruss, A. 2000. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *International Journal of Food Microbiology* 55, 83-86.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., y Bisogni, J. J. 2006. An engineering analysis of the stoichiometry of autotrophic, heterotrophic bacterial control of ammonia–nitrogen in zero-exchange production. In *Proceedings of the 6th International Conference on Recirculation Aquaculture*. Roanoke, VA (pp. 28-37).
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Paredes, A., y Gaxiola, G. (2013). Evaluation of biofloc technology in pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* culture: growth performance, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc. *Aquaculture international*, 21(6), 1381-1394.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Miquelajauregui, M. M., y Gaxiola, G. 2013. Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. *Aquaculture international*, 21(5), 987-1007.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., y Cuzon, G. 2013. Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. *Biomass now: cultivation and utilization*. InTech, Rijeka, Croatia, 301-328.
- FAO. 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*. Rome. 223 pp.
- Fernandes, S. O., Kulkarni, S. S., Shirodkar, R. R., Karekar, S. V., Kumar, R. P., Sreepada, R. A., ... y Bharathi, P. L. 2010. Water quality and bacteriology in an aquaculture facility equipped with a new aeration system. *Environmental monitoring and assessment*, 164(1-4), 81-92.
- Ferreira, N. C., Bonetti, C., y Seiffert, W. Q. 2011. Hydrological and water quality indices as management tools in marine shrimp culture. *Aquaculture*, 318(3), 425-433.
- Gastesoupe, F. J. 1999. The use of probiotic in aquaculture. *Aquaculture*. Vol. 180. 147-165.
- Gerardi M. 2002. *Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. Wiley-interscience. Nueva York. Estados Unidos.
- Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., y Karunasagar, I. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International journal of food microbiology*, 102(2), 151-159.

- Harvennar, R. y Huis, In't Veld. J.H.J. 1992. Probiotics: A general review. In Lactic Acid bacteria in Health and Disease . Vol. 1, ed. By Wood. J B. J. Elsevier applied Science Publishers Amsterdam.
- Huerta-Aldaz N., López-Torres M.A., Valdez-Holguín J.E. y Barraza-Guardado R.H. 2012. Evaluation of culturable nitrifying ammonium-oxidizing, and metabolically active bacteria in shrimp farm effluents of Kino Bay, Sonora, México. Archives Biological Science Belgrade, 64: 895-909.
- Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., y Wasielesky, W. 2014. The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT System. Journal of the World Aquaculture Society, 45(1), 3-14.
- Krummenauer, D., Peixoto, S., Cavalli, R. O., Poersch, L. H., y Wasielesky, W. 2011. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern Brazil at different stocking densities. Journal of the World Aquaculture Society, 42(5), 726-733.
- León y Roy P.H. 2003. Excision and Integration of Cassettes by an Integron Integrase of *Nitrosomonas europaea*. Journal of Bacteriology 185(6): 2036-2041.
- Lin, Y. C., y Chen, J. C. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture, 224(1), 193-201.
- Lin, Y. C., y Chen, J. C. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 259(1), 109-119.
- Luis-Villaseñor, I. E., Voltolina, D., Audelo-Naranjo, J. M., Pacheco-Marges, M. R., Herrera-Espericueta, V. E., y Romero-Beltrán, E. 2015. Effects of biofloc promotion on water quality, growth, biomass yield and heterotrophic community in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) experimental intensive cultures. Italian Journal of Animal Science, 14(3).
- Martínez - Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda - Baeza, A., y Martínez - Porchas, M. 2015. Microbial - based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. Reviews in Aquaculture, 7(2), 131-148.
- Martínez-Córdova, L. R. 1999. Cultivo de camarones peneidos: principios y prácticas. AGT Editor. 283pp.
- Masser, M. P., Rakocy, J., y Losordo, T. M. 1999. Recirculating aquaculture tank production systems. Management of recirculating systems. SRAC Publication, 452.

- McGraw W., 2002. Utilization of Heterotrophic and Autotrophic Bacteria in Aquaculture. *Global Aquaculture*. pp.82-83.
- Monroy-Dosta, M. D. C., Lara-Andrade, D., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., y Coelho-Emerenciano, M. G. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de biología marina y oceanografía*, 48(3), 511-520.
- Otoshi, C. A., Tang, L. R., Moss, D. R., Arce, S. M., Holl, C. M., y Moss, S. 2009. Performance of Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, cultured in biosecure, super-intensive, recirculating aquaculture systems. Browdy, CL; Jory DE (Eds). In: *The rising tide - proceedings of the special session on sustainable shrimp farming*. Baton Rouge: World Aquaculture Society.
- Páez-Osuna, F. 2001. Eutrofización y Camaronicultura. In: *Camaronicultura y Medio Ambiente*, 159-172. Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Autónoma de México Mazatlán, Sinaloa. México.
- Pan, L. Q., Zhang, L. J., y Liu, H. Y. 2007. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*, 273(4), 711-720.
- Paerl, H. W., y Tucker, C. S. 1995. Ecology of blue - green algae in aquaculture ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 26(2), 109-131.
- Poleo, G., Aranbarrio, J. V., Mendoza, L., y Romero, O. 2011. High-density rearing of red-bellied pacu in two closed systems. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(4), 429-437.
- Prosser J.I. 2007. The Ecology of Nitrifying Bacteria. En: Bothe H, Ferguson H.S. y Newton W. (Ed.) *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, Netherlands. pp. 223-244.
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., y Leffler, J. W. 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299(1), 89-98.
- Riquelme C y H Avendaño. 2003. Interacción bacteria- microalga en el ambiente marino y su potencial uso en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 725-736.
- Samocha, T. M., Wilkenfeld, J. S., Morris, T. C., Correia, E. S., y Hanson, T. 2010. Intensive raceways without water exchange analyzed for white shrimp culture. *Global Aquaculture Advocate*, 13, 22-24.

- Serra, F. P., Gaona, C. A., Furtado, P. S., Poersch, L. H., y Wasielesky Jr, W. 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 1-15.
- Sinha, B., y Annachhatre, A. P. 2007. Partial nitrification—operational parameters and microorganisms involved. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6(4), 285-313.
- Spieck, E., y Bock, E. 2005. The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 149-153). Springer US.
- Schveitzer, R., Arantes, R., Costódio, P. F. S., do Espírito Santo, C. M., Arana, L. V., Seiffert, W. Q., y Andreatta, E. R. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural engineering*, 56, 59-70.
- Thompson F.L., Iida T. y Swings J. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 403–431.
- Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerlefti S.T. y Vinci B.J. 2002. *Recirculating aquaculture systems*, 2nd edition. pp 205-206.
- Toranzo, A. E., Magariños, B. y Romalde, J. L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246: 37-61.
- Van Wyk, P. 1999. Principles of recirculating system design. *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*, 59-98.
- Vieira, R. D. F., Lima, A. D. S., de Menezes, F. G. R., Costa, R. A., de Sousa, O. V., y Barreto, N. S. E. 2009. Vibrioses on farmed shrimps. *Arquivos de Ciências do Mar (Brazil)*.
- Vinatea, L., Gálvez, A. O., Browdy, C. L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., ... y Leffler, J. W. 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*, 42(1), 17-24.
- Wyban, J., Walsh, W. A., y Godin, D. M. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138(1), 267-279.
- Wilhelm, R., A. Abeliovich, y A. Nejidat. 1998. Effect of Long-Term Ammonia Starvation on the Oxidation of Ammonia and Hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. *The Journal of Biochem* 124 (4): 811-815.

Yuniasari, D., y Ekasari, J. 2010. Nursery culture performance of *Litopenaeus vannamei* with Probiotics Addition and Different C/N ratio under laboratory condition. HAYATI Journal of Biosciences, 17(3), 115.