



**Evaluación del efecto de un consorcio de bacterias endémico y otro de una marca comercial, en el crecimiento y la sobrevivencia de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado en biofloc con agua a baja salinidad.**

**TESIS**

**que para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCION  
BIOSUSTENTABLES**

**presenta:**

**MANUEL ANDRÉS CORTÉS DUARTE**

**Navojoa, Sonora, México. Agosto de 2015.**

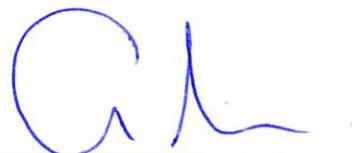
## CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada **Evaluación del efecto de un consorcio de bacterias endémico y otro de una marca comercial, en el crecimiento y la sobrevivencia de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado en biofloc con agua a baja salinidad**, presentada por **Manuel Andrés Cortés Duarte**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Sistemas de Producción Biosustentables.



---

Dr. Adolfo Sánchez Romero  
Co-Director



---

Dr. Anselmo Miranda Baeza  
Co-Director



---

Dra. Martha Elisa Rivas vega  
Sinodal

## DEDICATORIA

A mis padres Elia Duarte y Joaquin Cortez *f* por enseñarme con sus consejos y su ejemplo que vale más desgastarse que oxidarse.

A mis hermanos: Tatay, Jessy, Lola y Joaquín, por su cariño.

A mis sobrinos Esmeralda, Karla, Arath, Pepe, Enrique, Alondra, Jazmín y Margarita, con la culminación de este esfuerzo espero ser ejemplo para ustedes, y recuerden siempre que “Sobre toda cosa guardada, guarden su corazón”.

## AGRADECIMIENTOS

Al Señor mi Dios, por proveerme de todas las personas, conocimientos y cosas necesarias para que esta etapa de mi formación profesional se pudiera realizar.

Al CONACYT por el financiamiento a través de los proyectos: 246529 “Evaluación de la dinámica poblacional de bacterias heterótrofas, nitrificantes y tipo *Vibrio*, en un cultivo hiper-intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*” y 206155: “Fortalecimiento del equipamiento para el desarrollo de sistemas sustentables de producción acuícola”.

A la Universidad Estatal de Sonora, por haberme aceptado en el Posgrado, por el uso de sus instalaciones y por el apoyo recibido de todo su personal, especialmente a mis asesores Dr. Adolfo Sánchez Romero y Dr. Anselmo Miranda Baeza, a la Dra. Martha Rivas, a la Dra. Idalia Sandoval Muy y al M. C. Jesús Lizárraga.

A la empresa Gez Acuícola SPR de RL, Ing. Octavio Gutiérrez Parada, Ing. Erik Geovanni Chau Espinoza, Ing. Jesús Manuel Castro Montes y al resto del personal, por el apoyo material brindado para la realización de esta investigación.

A mis compañeros de generación en la maestría, Lic. Efrén Álvarez Bauman y M.C. Lombardo García Ríos, por su amistad en este tiempo de compartir conocimientos.

A Amparito, por el tiempo que llenaste mis días.

A todos los que por espacio no puedo mencionar pero que de alguna manera tuvieron que ver en este proceso, Muchas Gracias.

## RESUMEN

El presente estudio se realizó en convenio con la empresa Gez Acuícola SPR de RL dentro del área del Laboratorio de investigación de la Universidad Estatal de Sonora (UES) en un periodo de 40 días. Se evaluó el efecto que tiene el inocular un consorcio de bacterias benéficas al iniciar un proceso de cultivo de camarón superintensivo en biofloc. Para lo cual se utilizó un consorcio comercial y otro endémico, además de un testigo sin inóculo, los tres tratamientos se realizaron por triplicado. Las condiciones del experimento fueron: densidad de siembra de 800 org/m<sup>3</sup>, con peso inicial de 0.165 g, salinidad de 20 UPS, para el tratamiento endémico (BE) se utilizó un probiótico extraído de las inmediaciones de la granja Gez Acuícola SPR de RL, para el tratamiento comercial (BC) se utilizó el probiótico de la marca Alibio, y para el tratamiento control (BT) se trabajó con un biofloc sin inóculo inicial. Las variables del agua se mantuvieron similares entre los tratamientos, al igual que el crecimiento y la sobrevivencia. El peso promedio alcanzado, la sobrevivencia y el FCA finales fueron de: 3.09 ± 0.4 g; 73 ± 0.4 % y 1.03, para el BT; de 4.23 ± 0.15 g, 69 ± 0.20 % y 1.00 para el BE y de 3.96 ± 0.40 g, 67 ± 0.08 % y 1.10 para el BC, respectivamente. No hubo diferencia significativa en la abundancia de bacterias heterótrofas y nitrificantes entre el probiótico comercial y el endémico, pero las concentraciones de bacterias tipo *Vibrio* sp. fueron diferentes en las primeras semanas del cultivo entre ambos consorcios.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
CARTA DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.1 Antecedentes	2
I.2 Hipótesis	10
I.3 Objetivos	10
<b>II MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
<b>III RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>IV DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>39</b>
<b>VI LITERATURA CITADA</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Temperatura, oxígeno disuelto y pH (media $\pm$ DE) durante el periodo de estudio.	19
<b>Cuadro 2.</b>	Peso final, sobrevivencia y FCA al concluir la investigación. (ANOVA de una vía).	24
<b>Cuadro 3.</b>	Contenido de proteínas, lípidos, materia orgánica, ceniza y carbohidratos (g/100 g de muestra; media $\pm$ DE) en el biofloc al final del experimento.	28
<b>Cuadro 4.</b>	Coeficientes de correlación entre los SST y bacterias heterótrofas y nitrificantes, y la razón entre bacterias nitrificantes y heterótrofas.	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Concentraciones promedio de sólidos suspendidos totales registrados durante el experimento.	20
<b>Figura 2.</b>	Concentración de Clorofila <i>a</i> en los tres tratamientos durante el experimento.	21
<b>Figura 3.</b>	Concentración de nitrógeno amoniacal total durante el experimento.	22
<b>Figura 4.</b>	Concentración de nitrito durante el experimento.	22
<b>Figura 5.</b>	Concentración de nitrato durante el experimento.	23
<b>Figura 6.</b>	Evolución de las comunidades de bacterias tipo <i>Vibrio</i> sp. (UFC/mL) durante el experimento.	25
<b>Figura 7.</b>	Evolución de las comunidades de bacterias heterótrofas durante el experimento.	26
<b>Figura 8.</b>	Evolución de las comunidades de bacterias nitrificantes durante el experimento.	27
<b>Figura 9.</b>	Relación entre los grupos de bacterias heterótrofas y nitrificantes en los tratamientos: a) control, b) endémica y c) comercial.	31

## I. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de camarón basados en la tecnología de biofloc (BFT), tienen numerosas ventajas respecto al sistema semi-cerrado tradicional entre ellas: a) El consumo de agua por unidad de biomasa producida puede ser de tan solo 150 L/kg, mientras en el sistema tradicional el consumo de agua por unidad de biomasa puede llegar a ser hasta de 52 m<sup>3</sup>/kg, b) La demanda del uso del suelo por unidad de biomasa producida se reduce, ya que la producción potencial que puede ser alcanzada en una superficie de 2.5 hectáreas en sistema superintensivo en biofloc, equivale a la producción obtenida en 80 hectáreas en el sistema tradicional o semi-intensivo (Emerenciano, 2012), c) La bioseguridad incrementa al eliminar la entrada de agua cruda al sistema de cultivo, lo cual disminuye la probabilidad de ingreso de agentes patógenos al cultivo (Emerenciano, 2012), d) El sistema de biofloc propicia el desarrollo de alimento natural disponible las 24 horas del día, mismo que es consumido por los organismos del cultivo, reduciendo la adición de alimento balanceado y por consiguiente mejora el factor de conversión alimenticia (FCA) (Furtado *et al.*, 2011) consideran que los sistemas con tecnología de biofloc son amigables con el medio ambiente, dados sus muy bajos niveles de recambios de agua, reducen los riesgos de introducir patógenos del medio, optimizan el área cultivable y posibilitan la actividad en áreas lejanas a las zonas costeras protegidas por la legislación ambiental y pueden incrementar la productividad, ya que existen unidades de producción en invernadero con hasta 3.5 ciclos en un periodo de un año.

## **I.1 Antecedentes**

### **Sistemas de biofloc**

Reid y Arnold (1992) y Williams *et al.*, (1996) demostraron la viabilidad de producir camarón a altas densidades en sistemas de recirculación de agua y más recientemente se han tenido avances importantes en el área de cultivos superintensivos en sistemas conocidos como “sistemas de crecimiento suspendido” (Hargreaves, 2006) o como estanques de “suspensión activa” (Avnimelech, 2006) reforzando la idea de que es posible la producción de organismos acuáticos de manera superintensiva y con bioseguridad. La ausencia de efluentes, la reducción de los espacios utilizados y reducción de enfermedades infecciosas son los criterios principales que justifican este desarrollo.

Las primeras referencias que se tienen de la tecnología de biofloc usado en acuicultura datan de la década de 1980 y principios de la década de 1990, en sistemas también llamados estanques de suspensión activa, estanques heterotróficos, sopa verde y con otros términos más, (Avnimelech, 2007). En ese momento se deseaba encontrar una solución a los problemas de calidad de agua de los sistemas semi-intensivos e intensivos por medio del desarrollo controlado de poblaciones de bacterias heterotróficas, como resultado de esto, se logró el desarrollo de tecnologías con cero a muy bajo porcentaje en las tasas de recambio de agua nueva.

Lo anterior fue posible debido a la generación de comunidades de bacterias en concentraciones de hasta  $10^7$  unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL), en

flóculos conformados de bacterias, otros microorganismos, protozoarios y organismos propios del zooplancton.

La producción de compuestos nitrogenados tóxicos como el amonio y el nitrito, en este sistema son metabolizados por las comunidades microscópicas que producen proteínas bacterianas. Para mantener las comunidades de bacterias heterótrofas, es necesaria la adición de fuentes de carbono en relaciones C:N cercanas a 1:20, este procedimiento ha sido cuantitativamente formulado, verificado y ampliamente aplicado por muchos acuicultores en todo el mundo (Avnimelech, 2007). Las comunidades microscópicas que florecen son consumidas por los organismos en cultivo con lo que se aprovecha de manera integral la fracción del alimento balanceado que no se consume en un primer momento (Avnimelech, 2007).

Por su parte Tidwell (2012) indica que los sistemas de biofloc son una alternativa de solución para cumplir con los lineamientos de sustentabilidad identificados para la acuicultura por la FAO, (2012) como son los impactos ambientales, la tecnología apropiada y el control de las enfermedades en los cultivos.

### **Cultivos de camarón en biofloc**

El desarrollo inicial de los cultivos de camarón a nivel comercial en biofloc lo llevó a cabo McIntoch Phillips (1992) en Belice y Avnimelech (1999) en Israel y, a partir de sus informes se abrió una opción más para el cultivo de camarón.

Wasiolesky *et al.*, (2006) probaron la contribución nutricional de varios niveles de biofloc en la dieta de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, en la sobrevivencia, el crecimiento, consumo de alimento y el FCA, evaluando los resultados de tres tipos de

agua con tres niveles de alimento balanceado como dieta, estos tratamientos consistieron en: 1) Agregar 100% de agua de un sistema superintensivo en biofloc, 2) agua clara y 3) una mezcla del 50% de agua de biofloc y 50% de agua clara, además se combinaron estos tratamientos con tres diferentes niveles de inclusión de proteína en la dieta: 1) sin adición de alimento balanceado, 2) alimento comercial con 25% de proteína y 3) alimento comercial con 35% de proteína.

Los autores no encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia de los tratamientos con 25% y 35% de proteína en la dieta (100 y 98% respectivamente), pero las sobrevivencias del tratamiento sin alimento balanceado si tuvieron diferencias significativas (38% al 76%). Por otro lado concluyen que si bien los altos niveles de proteína en la dieta pueden contribuir al peso final, la sobrevivencia, el peso ganado y la biomasa ganada, también se observan beneficios asociados al consumo de alimento natural, reduciendo significativamente el consumo de alimento balanceado y por ende el FCA (siendo de 1.02 a 1.32 en los tratamientos de 100% biofloc y el agua mezclada respectivamente).

En otra investigación con poslarvas de camarón *Farfantopenus pauliensis*, cultivadas de PL10 a PL25 y sembradas a una densidad de 10 PL/L, con tres tratamientos: a) biofloc más alimento balanceado, b) biofloc sin alimento y c) control en agua clara con adición diaria de biofloc sin alimento balanceado se reportaron los mejores resultados en el tratamiento con biofloc y alimento balanceado. Estos resultados, abren la posibilidad de disminuir la demanda de alimentos comerciales y de reducir los impactos ambientales adversos con la eliminación de las descargas de agua contaminada a los cuerpos de agua natural (Emerenciano *et al.*, 2010).

En lo referente a investigaciones sobre cultivo de camarón a baja salinidad, Boyd y Thunjai (2003) mencionan que la camaronicultura continental posee gran importancia económica y tiene la ventaja que el camarón puede ser cultivado cerca de los grandes mercados y ser ofrecido verdaderamente fresco a los principales centros de consumo de muchas ciudades, tal como ocurre en China, Ecuador, Tailandia y Estados Unidos de América, llegando a producir camarón aún en salinidades tan bajas como 0.5 unidades prácticas de salinidad (UPS).

Wyban y Sweeny, (1991) y McGraw (2002) indican que el camarón *L. vannamei* posee una gran tolerancia a factores ambientales para soportar un intervalo de salinidad entre 0.5-45 UPS; particularmente crece muy bien a densidades de siembra por encima de 50 org/m<sup>2</sup> en ambientes a bajas salinidades entre los 10 y 15 UPS donde el medio acuático y la hemolinfa son isosmóticos y concluyen que tal rango de tolerancia la convierte en una especie de interés particular para el cultivo epicontinental.

Maicá *et al.*, (2011) probaron el efecto en la calidad del agua, la composición microbiana y la salud de los juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, cultivados en un sistema de biofloc por 40 días sin reposición de agua cuando se mantienen concentraciones de 0, 2, 4 y 25 UPS, los autores reportaron mortalidad total a los 26 d en el tratamiento con 0 UPS. Además concluyeron que el pH y los sólidos suspendidos totales (SST) son influenciados significativamente por la salinidad, los procesos de nitrificación incrementan con la salinidad, la concentración de grupos de ciliados disminuyen y la de flagelados incrementa con la salinidad mientras que las diatomeas predominan en el ambiente de 25 UPS, en 2 y 4 UPS las clorófitas son el

grupo de microalgas más abundante. Los mejores resultados en crecimiento se obtuvieron a 25 UPS.

A nivel nacional, en los estados de Baja California, Jalisco y Colima, se cuenta con la tecnología y la experiencia que les permite producir camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* en sistemas intensivos en agua a 0.5 UPS, alcanzando rendimientos cercanos a 10 toneladas por hectárea (Godínez *et al.*, 2011).

### **Uso de Probióticos**

En años recientes, se han utilizado microorganismos con potencial probiótico capaces de interactuar en el ambiente acuático creando barreras biológicas en el huésped para promover un adecuado crecimiento y mejorar la supervivencia de los organismos cultivados (Melgar, 2012).

El término “probiótico” nació a mediados del siglo pasado a partir de la observación de la influencia positiva de determinados microorganismos en la flora intestinal. Este término fue empleado por primera vez (Lilly y Stillwell, 1965), quienes describen a los probióticos como sustancias secretadas por un microorganismo, que estimulan el crecimiento de otro. Fuller (1992), acotó más este concepto como “aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan de forma beneficiosa al huésped”. Los probióticos son definidos por la FAO (2001), como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped”.

Actualmente, los probióticos, son considerados como microorganismos administrados por vía oral, que conducen a beneficios para la salud, se utilizan ampliamente en la acuicultura moderna para el control de enfermedades, en particular contra las bacterianas. En contraste con la producción de animales terrestres, donde predomina la producción de bacterias ácido-lácticas, en la acuicultura se considera una amplia gama de microorganismos incluyendo bacterias Gram-negativas y Gram-positivos (Newaj *et al.*, 2013).

La fuente natural de estos organismos es a menudo el tracto digestivo del huésped. El modo de acción incluye la exclusión competitiva y la inmunomodulación. Los probióticos también pueden mejorar el apetito y dar lugar a un mayor crecimiento y aumentar la conversión del alimento (Newaj *et al.*, 2013).

Newaj *et al.*, (2013), describen una larga lista de 18 géneros de bacterias Gram negativas, 19 géneros de bacterias Gram positivas y algunos géneros de bacteriófagos, microalgas y levaduras utilizadas por su efecto probiótico en sistemas de cultivo de peces, moluscos y crustáceos en general.

Entre las características que deben presentar los microorganismos para ser considerarlos probióticos, destacan las siguientes: ser habitantes normales del tracto gastrointestinal del organismo de interés, no ser patógeno, ni tóxico, tener un tiempo corto de reproducción, ser estables al contacto con bilis, ácidos, enzimas y oxígeno, tener habilidad para adherirse a la mucosa intestinal, mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal y producir sustancias antimicrobianas (Monroy *et al.*, 2012).

Una de las principales ventajas del uso de bacterias probióticas en la acuicultura, es la de mejorar las tasas de crecimiento, además reducen la incidencia de enfermedades y disminuyen la necesidad de quimioterapias (Newaj *et al.*, 2013), asimismo, mejoran la calidad del agua del cultivo (Melgar, 2012).

Los mecanismos de acción que se han reportado para los microorganismos probióticos consisten en la producción de compuestos con efecto bactericida o bacteriostático (bacteriocinas, lisozimas, antibióticos, sideróforos, proteasas, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, entre otros), así como compuestos con efecto benéfico en el huésped (enzimas digestivas, vitaminas y ácidos grasos esenciales). De igual manera, se ha evidenciado el mejoramiento de la respuesta inmune en el organismos con la influencia de los hematocritos, regulación de los niveles de colesterol total, triglicéridos, lipopolisacáridos y peptidoglicanos (Melgar, 2012).

El primer registro del uso de probióticos en acuicultura se registró en 1992 y se trató de una cepa no patógena de *Vibrio alginolyticus* que permitió mejorar sustancialmente el rendimiento en viveros de camarones en Ecuador y México (Monroy *et al.*, 2012).

El uso de probióticos en la producción comercial de camarón ha sido poco estudiada. (Aguilera *et al.*, 2014) probaron el efecto probiótico del biofloc sobre *Vibrio* sp. en cultivos de camarón blanco *L. vannamei*, además del efecto de la adición de un probiótico comercial en el alimento, tanto en sistemas de biofloc como en sistemas de agua clara, se ha encontrado un efecto de exclusión de ciertos grupos de *Vibrio* sp. en el hepatopáncreas (cortes histológicos) en ambos sistemas reportaron un efecto sinérgico entre el ambiente de biofloc y la adición de probióticos comerciales.

Algunos probióticos se comercializan bajo la forma de preparados, que contienen uno o varios microorganismos vivos, los cuales han permitido mejoras en el crecimiento, la sobrevivencia y la resistencia a enfermedades de diferentes organismos acuáticos (Himabindu *et al.*, 2004; Dotta *et al.*, 2011).

Sin embargo, la mayoría de probióticos ha sido aislada del ser humano y de otros mamíferos, por lo que últimamente se hacen estudios de caracterización de la microbiota intestinal de peces, moluscos y crustáceos, con el fin de seleccionar cepas específicas y obtener mayores beneficios que los obtenidos hasta ahora, ya que como lo señalan Monroy *et al.* (2012) los microorganismos probióticos deben ser seleccionados de manera específica de los hospederos en los que se van aplicar, lo que permite minimizar los efectos provocados por las amplias diferencias entre los ambientes en los que se desarrollan los organismos.

En el mercado de insumos de la acuicultura, se han desarrollado varias marcas de probióticos comerciales, compuestos desde una a varias decenas de especies de microbios con probado efecto benéfico, que en conjunto buscan un efecto sinérgico ya sea en la calidad del agua, el crecimiento individual, la exclusión de agentes patógenos o un incremento en la sobrevivencia. Las presentaciones al consumidor puede ser en forma líquida, liofilizada o en pastillas. En contraste, los consorcios bacterianos endémicos se producen al aislar cepas de bacterias benéficas que existen en un determinado lugar de la naturaleza, los cuales se multiplican masivamente en la misma unidad de producción, agregando fuentes de carbono y otros nutrientes.

## **1.2 HIPÓTESIS**

Los diferentes consorcios de bacterias inoculados al biofloc tienen un efecto importante en la dinámica de las comunidades microbianas que se desarrollan y por consiguiente en la composición del biofloc, por lo que se espera que el efecto de los consorcios bacterianos endémico y comercial presente diferencias significativas en la calidad del agua así como en el crecimiento y sobrevivencia del camarón.

## **I.3. OBJETIVOS**

Objetivo general

Evaluar el efecto de dos tipos de probióticos como promotores de biofloc en la calidad del agua y parámetros productivos de camarón blanco *L. vannamei*, en un sistema de cultivo intensivo en agua salobre.

Objetivos específicos

1. Evaluar las variables básicas del agua ( $O_2$ , temperatura y pH) en los diferentes tratamientos para determinar si existen diferencias significativas entre ellos.
2. Evaluar los compuestos nitrogenados (NAT, N- $NO_2$  y N- $NO_3$ ) para determinar si se mantienen dentro de los niveles de tolerancia para la especie.

3. Determinar el crecimiento y la sobrevivencia del camarón en los diferentes tratamientos y compararlo con el desarrollo obtenido en condiciones tradicionales de cultivo.
4. Evaluar el desarrollo de los grupos de bacterias heterótrofas, nitrificantes y patógenas a través del tiempo de cultivo.
5. Determinar el contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, materia orgánica y cenizas del biofloc en los diferentes tratamientos para determinar si existen diferencias significativas entre ellos.

## **II. MATERIALES Y METODOS**

### **II.1. Diseño experimental**

El experimento consistió en tres tratamientos con tres replicas cada uno, en un diseño completamente al azar. En el primer tratamiento, se realizó el cultivo del camarón en un ambiente generado a partir de un probiótico comercial (BC), como promotor de biofloc, el cual se masifico una semana antes de la siembra de los juveniles. En el segundo tratamiento se inocularon bacterias endémicas (BE), aisladas del medio natural, y replicadas masivamente por la empresa Gez Acuícola, SPR de RL, con las cuales controlan la calidad del agua de cultivo desde el 2008. El tercer tratamiento o testigo, consistió en el desarrollo de biofloc natural sin la adición de consorcios externos (BT).

### **II.2. Descripción del sistema de cultivo**

Para el cultivo se utilizaron nueve tanques de plástico con 200 L de agua. Cada uno se llenó con agua salobre a 20 UPS, para lo cual se mezclaron 103 L de agua de la red municipal y 97 L de agua marina. La aireación fue proporcionada con piedras aireadoras de 3.0 X 1.5 pulgadas, conectadas con una manguera de plástico transparente de ¼ de pulgada al sistema de aireación del laboratorio, que consta de un soplador de 1/3 de Hp de 115 volts, equipado con filtro de aire. La aireación fue proporcionada en cantidad suficiente para abastecer la demanda de oxígeno del camarón y del biofloc.

Para eliminar la introducción de cualquier agente patógeno, las tinas fueron desinfectadas con cloro a una concentración inicial de 2.0 g/L, misma que se dejó

actuar por 24 h con aireación intensa para la homogenización del cloro en todo el volumen de agua, después de ese tiempo se midió el cloro residual por el método colorimétrico con ortotolidina y se eliminó el cloro residual con tiosulfato de sodio y aireación intensa.

En la etapa de la siembra se dispusieron 160 organismos de 0.165 g de peso promedio individual, por cada tanque de 200 L, representando una densidad inicial de 800 org/m<sup>3</sup>. Los organismos necesarios para esta investigación fueron donados por el Centro Acuícola del Estado de Sonora y transferidos al laboratorio de la UES.

Los juveniles de camarón, se alimentaron durante la primera semana tres veces por día, con alimento presentación migaja de 1.8 a 2.0 mm marca VIMIFOS con 40 % de proteína y con una ración alimenticia del 3 % de la biomasa, después de la primer semana, la frecuencia de alimentación se redujo a dos veces por día, calculando la ración conforme a las tablas de consumo ajustadas de acuerdo a la observación de los remanentes.

Para promover el biofloc, una semana antes de la siembra, se añadieron 10 g de alimento balanceado y 10 g de azúcar estándar. A partir del día de la siembra, solo se proporcionó azúcar manteniendo una proporción C:N de 20:1, la proporción fue ajustada a 12:1 conforme evolucionó la concentración de amonio. Para mantener las proporciones deseadas de C:N, se tomó en cuenta el porcentaje de nitrógeno y de carbono en el alimento y la cantidad de alimento suministrado diariamente al cultivo, además del nivel de carbono del azúcar suministrada (Martínez-Córdova *et al.*, 2014).

### **II.3 Variables básicas del agua, sólidos suspendidos totales y clorofila *a***

Durante la investigación, se midieron diariamente el oxígeno disuelto y la temperatura, utilizando para ello un oxímetro marca YSI, el pH se midió a diario con un potenciómetro marca Denver. Los instrumentos fueron previamente calibrados de acuerdo a las instrucciones de los respectivos manuales de operación.

Los sólidos suspendidos totales (SST) fueron medidos por el método 8006 (HACH, 2007) para lo cual se utilizó un espectrofotómetro HACH DR/2800. La curva de calibración se realizó por el método tradicional de gravimetría, filtrando un volumen conocido de agua a través de filtros de fibra de vidrio GFC, como lo describe (Miranda-Baeza *et al.*, 2006).

La Clorofila *a* se determinó mediante un fluorímetro Aquaflour (modelo Handled). La curva de calibración se obtuvo utilizando el método tradicional, para lo cual se tomó una muestra de 10 mL en tubos de ensayo, posteriormente se concentró en una centrifuga refrigerada (10,000 revoluciones/min, por 5 min y 4 °C), se descartó el sobrenadante y al material sedimentado se le agregaron 9 mL de acetona al 90%, se cubrió con papel aluminio y se mantuvo en refrigeración durante 24 horas. La clorofila *a* se determinó mediante la lectura de la absorbancia a diferentes longitudes de onda como lo indican (Strickland y Parsons, 1972).

### **II.4 Determinación de nitrógeno amoniacal total, nitrito y nitrato**

Para medir el nitrógeno amoniacal total (NAT: N-NH<sub>3</sub> + N-NH<sub>4</sub>), nitrito N-NO<sub>2</sub>, y nitrato N-NO<sub>3</sub>, cada semana se colectaron muestras de agua en tubos de 15 mL, se

centrifugaron, se tomaron 10 mL del sobrenadante y posteriormente se midieron los compuestos nitrogenados respectivos mediante los métodos de salicilato (8155) para el nitrógeno amoniacal total, de diazotización con sulfato ferroso en medio ácido (8507) para N-NO<sub>2</sub> y de reducción con cadmio a NO<sub>2</sub> y diazotización (8171) para N-NO<sub>3</sub>, de acuerdo a los procedimientos descritos en el manual del instrumento (Hach, 2007).

## **II.5 Crecimiento, FCA y sobrevivencia del camarón**

Se realizaron muestreos de crecimiento semanal, para lo cual se registró el peso individual de 30 organismos en cada muestreo, para la realización de esta actividad se utilizó una balanza digital, marca Ohaus con precisión de 0.1 g.

Para el seguimiento de la mortalidad los tanques se revisaron diariamente, extrayendo y registrando los organismos que eventualmente fueron muriendo. Para determinar la sobrevivencia final se contaron los organismos sobrevivientes de cada unidad de cultivo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sob} = \frac{\text{Num de sobrevivientes}}{\text{numero inicial (160)}} \times 100$$

El factor de conversión alimenticia (FCA) se calculó relacionando el consumo de alimento total en el periodo de cultivo contra la biomasa ganada durante el mismo tiempo como se indica en la siguiente ecuación

$$FCA = \frac{\text{Alimento Suministrado (kg)}}{\text{Biomasa ganada (kg)}}$$

## **II.6 Evaluación de los grupos de bacterias**

Para el seguimiento de las bacterias tipo *Vibrio* se sembraron muestras semanalmente en medio de cultivo TCBS en cajas de Petri. Desde el primer muestreo se tomaron directamente de cada tina de cultivo un volumen de 0.1 mL sin diluir, la muestra fue esparcida con varilla de vidrio. Las cajas de Petri se incubaron a  $(30 \pm 2)$  °C y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó a las 24 h después de la siembra.

Para el seguimiento de bacterias heterotróficas se utilizó un medio de cultivo selectivo (Agar de recuento en placa; Atlas, 2010), realizando diluciones sucesivas de hasta 1:10,000 y tomando de esta dilución un volumen de 0.1 mL. Las cajas de Petri fueron incubadas a  $(30 \pm 2)$  °C y el conteo se realizó después de 24 h.

En el caso de las bacterias nitrificantes se utilizó un medio de cultivo enriquecido con sulfato de amonio y nitrito de potasio (medio 221; Atlas 2010). Se tomó un volumen de muestra de 0.1 mL de una dilución de 1:10,000 de cada tanque. Se dejaron reposar en la incubadora de 7 a 10 días a  $(30 \pm 2)$  °C para su conteo.

### **II.6 Análisis proximal del biofloc**

Para determinar la composición proximal, el último día de cultivo, se colectó el biofloc dejando sedimentar los flóculos suspendidos después de cerrar el suministro de aire, procediendo a la deshidratación en una estufa digital marca Shell Lab a 60 °C, para obtener el peso seco.

Para realizar los análisis, se tomaron muestras de biofloc por triplicado. El contenido de humedad, cenizas, lípidos, y fibra, se determinó siguiendo la metodología descrita por la (AOAC, 1990). La humedad se determinó por diferencia de peso y el contenido de cenizas se determinó por calcinación en una mufla a 550°C. Para la determinación de proteína fueron digeridos los filtros que contenían las submuestras de biofloc con ácido sulfúrico concentrado en un aparato de digestión (Digesdahl) siguiendo el método 8075 (NTK) del manual del espectrofotómetro HACH DR/2800 (Hach, 2007) El contenido de nitrógeno se reportó como porcentaje de proteína como lo indica (Rodier, 1981).

Los lípidos se cuantificaron utilizando un sistema SoxtecAvanti, utilizando éter de petróleo como solución extractora. El contenido en fibra cruda se determinó por hidrólisis sucesiva, ácida y básica (ácido sulfúrico e hidróxido de sodio).

Los carbohidratos se calcularon por diferencia, mediante la ecuación de carbohidratos totales, calculados por diferencia (CHOCDF) = 100 - (peso en gramos [proteína + grasa + cenizas + humedad] en 100 g de alimento).

## **II.7 Análisis estadístico**

Para el análisis se consideraron las variables de calidad del agua, el crecimiento, la sobrevivencia y el factor de conversión alimenticia de los tres tratamientos (bacterias endémicas BE, bacterias comerciales BC y los testigos BT). Se verificó el cumplimiento de la normalidad y homocedasticidad de los datos, después se aplicaron pruebas de ANOVA de una vía con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Cuando se presentaron

diferencias significativas se realizó la prueba de Tukey. El análisis estadístico se realizó mediante el software Statistica versión 8.5.

### III. RESULTADOS

#### III.1. Variables básicas del agua

La temperatura para el biofloc control (BT) fue de  $(27.08 \pm 0.76)$  °C (media  $\pm$  DE), de  $(27.04 \pm 0.74)$  °C para el biofloc inoculado con bacterias endémicas (BE) y de  $(27.09 \pm 0.83)$  °C para el biofloc inoculado con bacterias comerciales (BC). La temperatura mínima registrada fue de 25.3°C en el BT, mientras que la máxima fue de 29.2°C y se presentó en el BC. El oxígeno disuelto en el BC fue de  $(6.73 \pm 1.18)$  mg/L, en el BE fue de  $(6.30 \pm 1.28)$  mg/L y de  $(6.22 \pm 1.41)$  mg/L para el BC. El pH en el BT fue de  $(7.63 \pm 0.38)$ , de  $(7.59 \pm 0.42)$  en el tratamiento BE y de  $(7.54 \pm 0.42)$  en el tratamiento BC. Las pruebas de ANOVA indicaron que no hubo diferencia significativa entre las variables básicas del agua (Cuadro 1).

Cuadro 1. Temperatura, oxígeno disuelto y pH (media  $\pm$  DE) durante el periodo de estudio.

Variable	Tratamientos		
	Biofloc control (BT)	Biofloc endémico (BE)	Biofloc comercial (BC)
T (°C)	$27.08 \pm 0.758$	$27.04 \pm 0.736$	$27.09 \pm 0.832$
O <sub>2</sub> (mg/L)	$6.73 \pm 1.175$	$6.30 \pm 1.277$	$6.22 \pm 1.413$
pH	$7.63 \pm 0.375$	$7.59 \pm 0.415$	$7.54 \pm 0.418$

### III.2. Sólidos suspendidos totales y clorofila a:

Las concentraciones de sólidos suspendidos totales (SST) al final del cultivo fueron de  $(334.0 \pm 70.0)$  mg/L (media  $\pm$  DE) para el BT,  $(376.0 \pm 52.0)$  mg/L para el BE y de  $(330.0 \pm 67.0)$  mg/L en el BC. Las pruebas de ANOVA no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.647$ ; Figura 1).

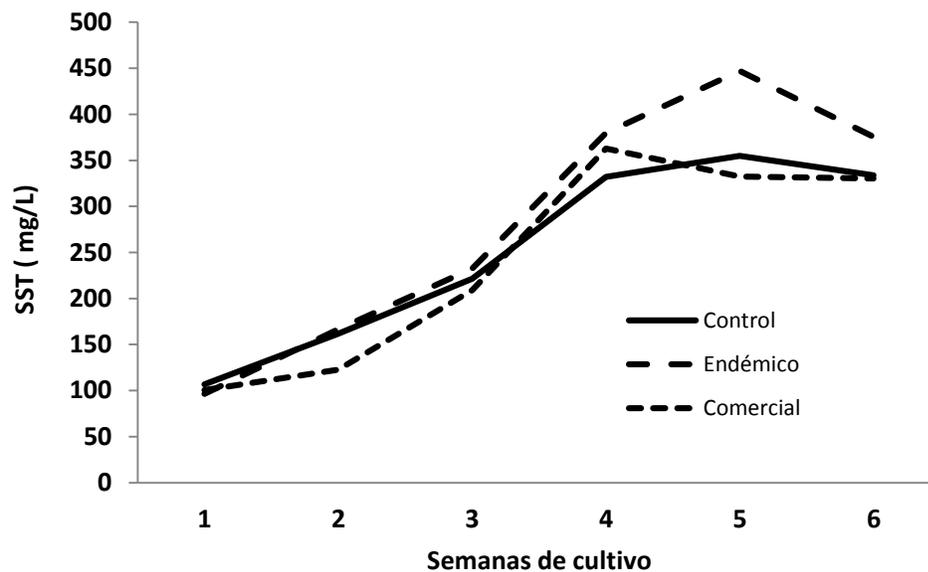


Figura 1. Concentraciones promedio de sólidos suspendidos totales registrados durante el experimento.

En cuanto a la concentración final de clorofila a en los tratamientos, estos presentaron un intervalo que oscila entre 132 y 143  $\mu\text{g/L}$ , siendo el mayor para el BE y el menor para el BT, sin embargo los análisis de varianza realizados indican que no existió diferencia significativa entre los tratamientos ( $P=0.598$ ; Figura 2).

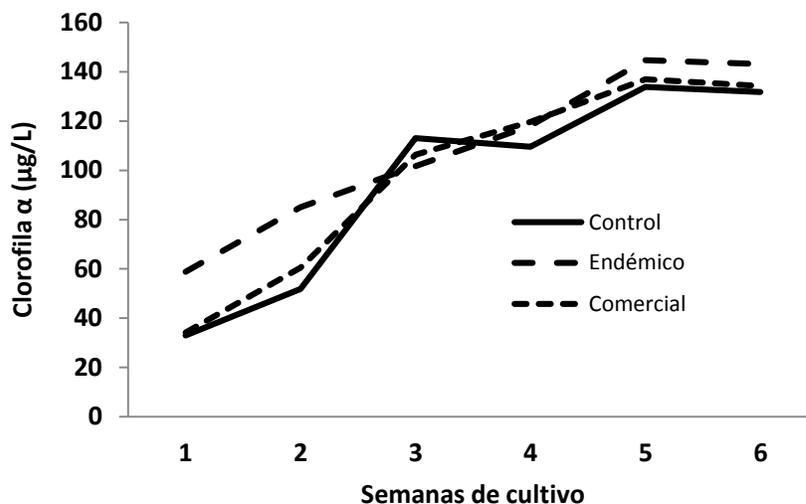


Figura 2. Concentración de Clorofila a en los tres tratamientos durante el experimento.

### III.3. Compuestos nitrogenados

La concentración promedio de NAT fue de  $(1.10 \pm 0.61)$  mg/L (media  $\pm$  DE) en el BT, de  $(1.56 \pm 1.12)$  mg/L en el BE y de  $(1.38 \pm 0.22)$  mg/L en el BC (Figura 3). La concentración de nitrito fue de  $(0.57 \pm 0.34)$  mg/L en el tratamiento BT,  $(0.46 \pm 0.13)$  mg/L en el tratamiento BE y de  $(0.71 \pm 0.15)$  mg/L en el BC (Figura 4). En lo referente al nitrato, la concentración fue de  $(126.33 \pm 5.57)$  mg/L en el BT,  $(127.33 \pm 20.2)$  mg/L para el BE y de  $(96.5 \pm 16.11)$  mg/L para el BC (Figura 5).

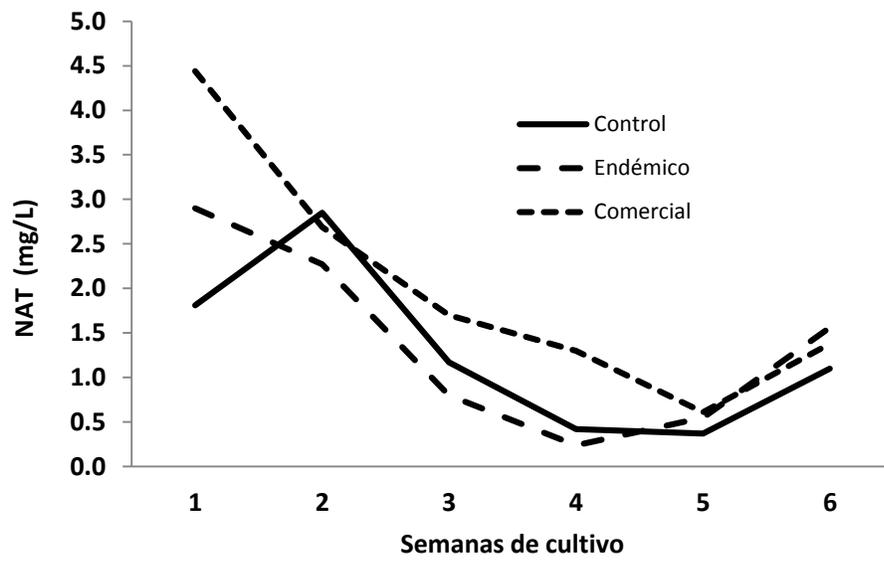


Figura 3. Concentración de nitrógeno amoniaco total durante el experimento.

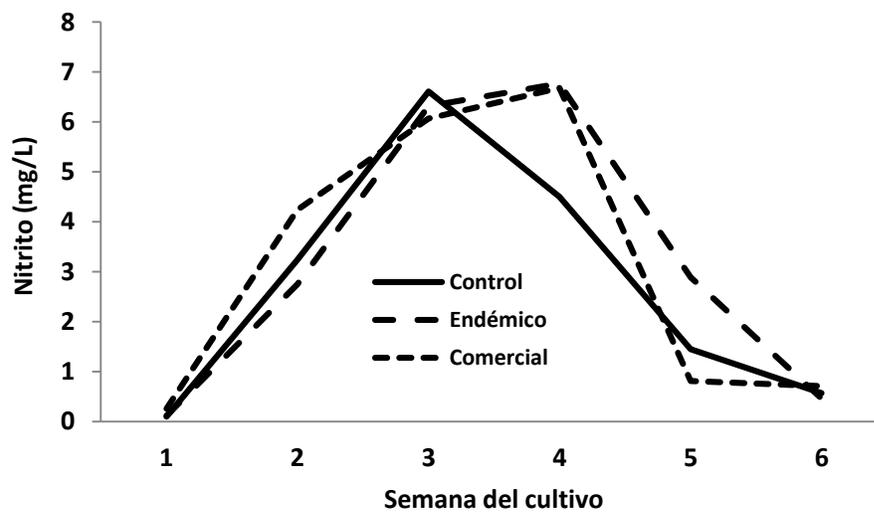


Figura 4. Concentración de nitrito durante el experimento.

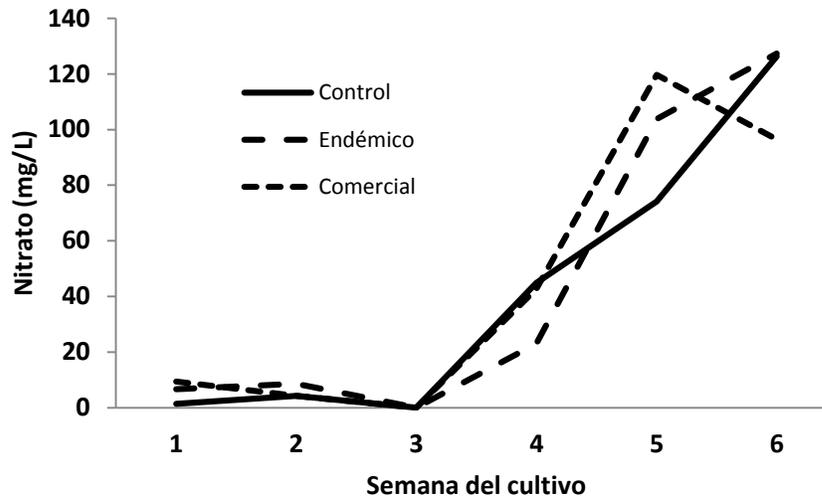


Figura 5. Concentración de nitrato durante el experimento.

Las pruebas de ANOVA, realizadas con las concentraciones de compuestos nitrogenados al final del experimento, indicaron que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos; NAT: (P=0.76); N-NO<sub>2</sub>: (P=0.476) y NO<sub>3</sub> (P=0.080).

#### III.4 Crecimiento, FCA y sobrevivencia del camarón

Los pesos finales del camarón fueron de (3.9 ± 0.40) g en el BT, en el BE fue de (4.23 ± 0.15) g y en los organismos cultivados en BC fue de (3.96 ± 0.40) g. Los análisis de varianza mostraron que no existen diferencias significativas entre tratamientos (P=0.489).

El Factor de Conversión Alimenticia para cada tratamiento al finalizar el cultivo fue de 1.03:1, 1.00:1 y 1.15:1 para BT, BE y BC respectivamente.

Referente a la sobrevivencia, se obtuvo un  $(73.0 \pm 0.40)$  % para el BT, para el BE fue del  $(69.0 \pm 0.02)$  %, mientras que en el BC fue del  $(67.0 \pm 0.08)$  %. El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.42$ ; Cuadro 2).

Cuadro 2. Peso final, sobrevivencia y FCA al concluir la investigación (ANOVA de una vía).

Variable	Tratamientos		
	Biofloc control (BT)	Biofloc endémico (BE)	Biofloc comercial (BC)
Peso final (g)	$3.9 \pm 0.40$	$4.23 \pm 0.15$	$3.96 \pm 0.40$
Sobrevivencia (%)	$73 \pm 0.40$	$69 \pm 0.02$	$67 \pm 0.08$
FCA	1.031	1.006	1.105

### III.5 Desarrollo de grupos de Bacterias

Las UFC correspondientes a *Vibrio* sp fueron más altas en el BT, comparado con los tratamientos BE y BC. A partir de la segunda semana de cultivo las colonias de *Vibrio* sp prácticamente desaparecieron de los tres tratamientos por el resto de semanas de la investigación. Los ANOVAS realizados con los conteos del último muestreo indicaron que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.46$ ; Figura 6).

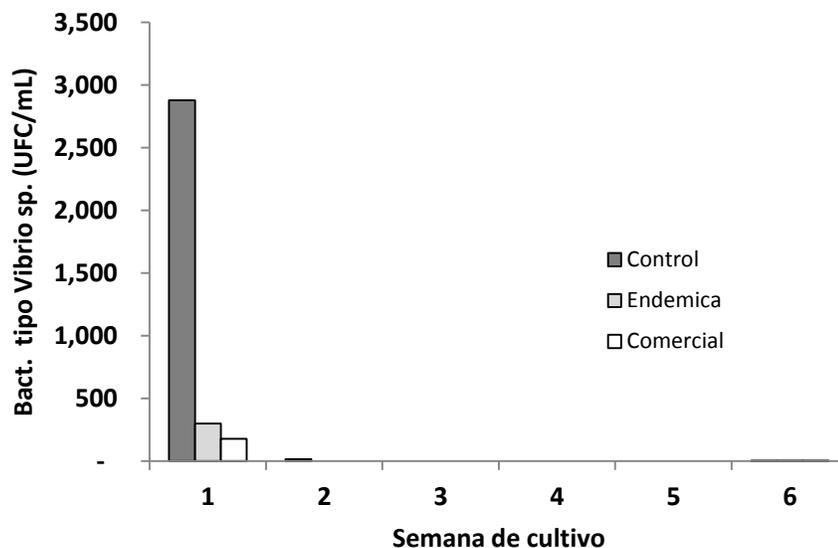


Figura 6. Evolución de las comunidades de bacterias tipo *Vibrio* sp. (UFC/mL) durante el experimento.

Las comunidades de bacterias heterótrofas incrementaron exponencialmente desde la primera hasta la última semana de cultivo. Las mayores concentraciones se registraron en el tratamiento con BC, seguido del BE y en último lugar se situaron las bacterias heterótrofas del BT, sin embargo, los ANOVA realizados a los conteos finales de los tres tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos ( $P=0.196$ ; Figura 7).

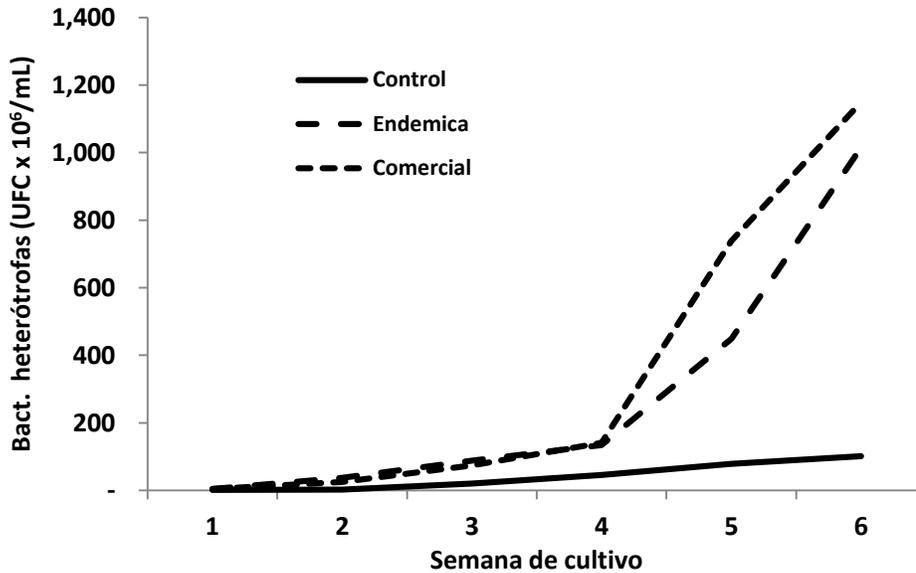


Figura 7. Evolución de las comunidades de bacterias heterótrofas durante el experimento.

En relación a las comunidades de bacterias nitrificantes, se observó un crecimiento lento las primeras cuatro semanas, pero a partir de la quinta semana el crecimiento fue exponencial en los tres tratamientos. El tratamiento con BC fue el que mostró la mayor concentración, seguido del tratamiento BE y al final se encontró el BT. Las pruebas de ANOVA realizadas con los datos del último muestreo mostraron que hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ; Figura 8).

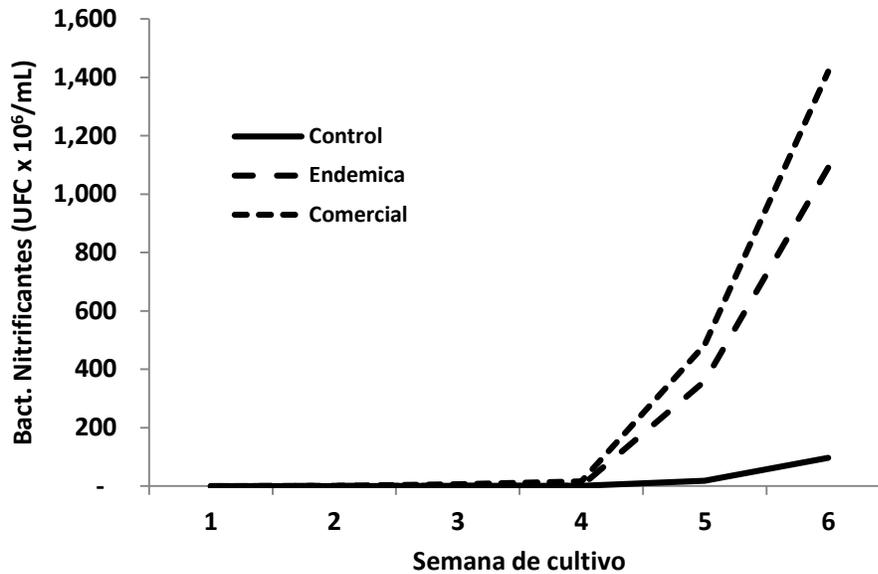


Figura 8. Evolución de las comunidades de bacterias nitrificantes durante el experimento.

### III.6 Análisis proximal del Biofloc

El menor contenido de proteínas, de  $(23 \pm 5.29)$  % correspondió al BC y el mayor de  $(27.89 \pm 2.3)$  % correspondió al BT. Los análisis de varianza de una vía indicaron que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.323$ ; Cuadro 3).

El menor contenido de lípidos  $(0.52 \pm 0.11)$  % se registró en el tratamiento BC, mientras que mayor se obtuvo en el tratamiento BT con  $(0.65 \pm 0.24)$  %. Los análisis de varianza de una vía no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.357$ ; Cuadro 3).

Los valores promedio de materia orgánica (MO) estuvieron entre  $(71.9 \pm 2.74)$  % en el BC, hasta  $(72.5 \pm 1.00)$  % en el BE. Los análisis de varianza de una vía indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.896$ ; Cuadro 3).

En lo referente a las cenizas, el valor mínimo se registró en el BE con  $(20.0 \pm 0.74)$  %, mientras que el valor más alto se observó en el BT con  $(20.5 \pm 1.84)$  %. El análisis de varianza de una vía indicó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.826$ ; cuadro 3).

Los niveles de carbohidratos (CHOS) encontrados en los diferentes tratamientos oscilan desde  $(42.6 \pm 7.19)$  % correspondiente al BE, hasta  $(48.1 \pm 4.93)$  % correspondiente al BC. Los análisis de varianza de una vía indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.164$ ; Cuadro 3).

Cuadro 3. Contenido de proteínas, lípidos, materia orgánica, ceniza y carbohidratos (g/100 g de muestra; media  $\pm$  DE) en el biofloc al final del experimento.

Variable	Tratamientos		
	Biofloc control (BT)	Biofloc endémico (BE)	Biofloc comercial (BC)
Proteína	$27.89 \pm 2.3$	$27.58 \pm 7.95$	$23.31 \pm 5.29$
Lípidos	$0.65 \pm 0.24$	$0.55 \pm 0.10$	$0.52 \pm 0.11$
MO	$72.1 \pm 2.74$	$72.5 \pm 1.0$	$71.9 \pm 2.74$
Cenizas	$20.5 \pm 1.84$	$20.0 \pm 0.74$	$20.4 \pm 1.77$
Carbohidratos	$43.3 \pm 2.08$	$42.6 \pm 7.19$	$48.1 \pm 4.93$

### **III.7 Relación entre variables**

#### **III.7.1 Relación entre los SST y los tipos de bacterias**

A medida que aumentó la concentración de SST también lo hicieron las bacterias heterótrofas. El mayor coeficiente de correlación lineal simple se presentó en el tratamiento BT ( $r=0.88$ ), mientras que en los tratamientos BE y BC se registraron valores menores ( $r=0.63$ ) y ( $r=0.65$ ) respectivamente. En el BT el coeficiente de correlación fue significativo al 95% de confianza (t-student; Cuadro 4).

Las bacterias nitrificantes mostraron menores coeficientes de correlación respecto a los SST. En el tratamiento BE se obtuvo un coeficiente de correlación, ( $r=0.53$ ), mientras que para el tratamiento con BC fue ( $r=0.51$ ) y la más baja la tuvo el BT ( $r=0.49$ ; Cuadro 4).

Por otro lado los coeficientes de correlación lineal simple indicaron que existió una relación directa entre las bacterias heterótrofas y las oxidantes de amonio. La cantidad de colonias registradas entre estos dos tipos de bacterias estuvo altamente correlacionada. El tratamiento BE mostró el coeficiente más alto, ( $r=0.99$ ), seguido del tratamiento BC con ( $r=0.96$ ) y finalmente el tratamiento BT con ( $r=0.80$ ). Los coeficientes de correlación para los tratamientos BE y BC resultaron significativos al 95% de confianza (t-student) (Cuadro 4; Figura 9).

Por último, la relación entre la concentración de bacterias nitrificantes y las bacterias heterótrofas en el último día del experimento fue de 0.96:1 para el BT, de 1.07:1 para el BE y la mayor relación entre esas dos comunidades se presentó en el BC llegando a 1.24:1 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Coeficientes de correlación entre los SST y bacterias heterótrofas, bacterias nitrificantes y heterótrofas, y razón entre bacterias nitrificantes y heterótrofas.

Variable	Tratamientos		
	Biofloc testigo (BT)	Biofloc endémico (BE)	Biofloc comercial (BC)
SST vs BH	0.88*	0.63	0.65
SST vs BN	0.49	0.53	0.51
BN vs BH	0.80*	0.99*	0.96*
BN:BH	0.96:1	1.07:1	1.24:1

\* Significativo (P<0.05)

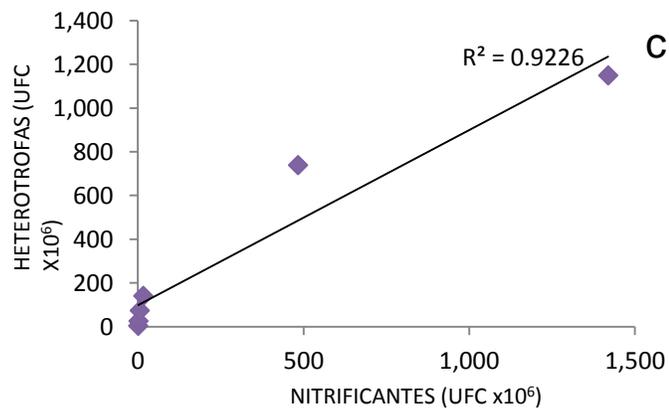
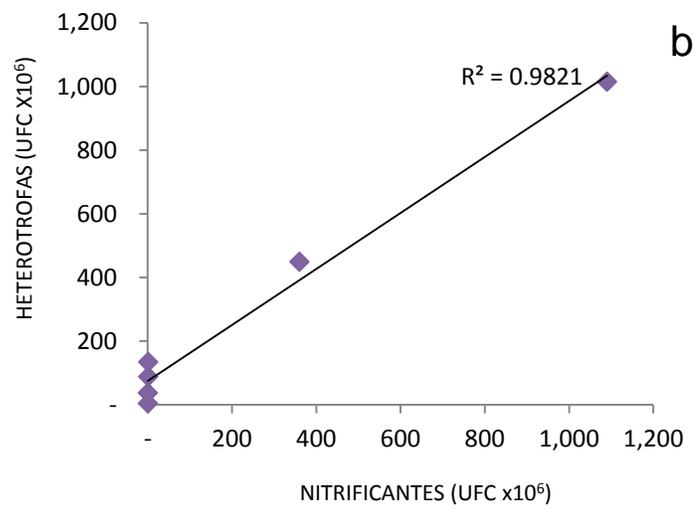
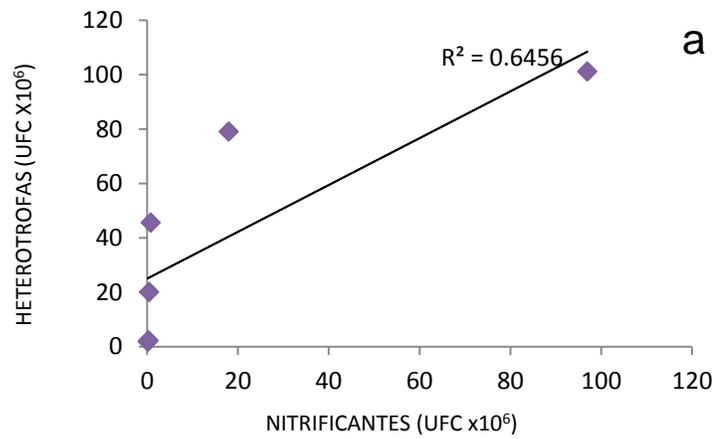


Figura 9. Relación entre los grupos de bacterias heterótrofas y nitrificantes en los tratamientos:  
a) control, b) endémica y c) comercial.

#### IV. DISCUSION DE RESULTADOS

Las concentraciones de oxígeno disuelto registradas en este trabajo, se encuentran dentro del intervalo recomendado para la especie, en todo el ciclo de cultivo, el promedio más bajo fue  $(6.22 \pm 1.41)$  mg/L. Se ha documentado que las condiciones óptimas de crecimiento están entre 5.0 y 15.0 mg/L o hasta llegar al punto de saturación del oxígeno (Zendejas, 1999; Rojas *et al.*, 2005). Por su parte, (Auró y Ocampo, 2006) mencionan que las especies de camarones peneidos del género *Litopenaeus* generalmente requieren concentraciones de oxígeno disuelto mayores a 3.0 mg/L, siendo el óptimo entre 5.0 y 6.0 mg/L.

Los valores de las temperatura documentadas en esta investigación se mantuvieron dentro del rango recomendado para el cultivo, siendo el valor mínimo registrado de 25.3°C y el máximo de 29.2°C. (Auró y Ocampo, 2006) indican que los camarones peneidos se desarrollan en ambientes tropicales, con temperaturas cercanas a 25 °C, aunque pueden tolerar temperaturas en el intervalo de 18 °C a 30°C. Zendejas (1999) menciona que el rango de temperaturas para el desarrollo óptimo del camarón en cultivo es de 23 a 30°C.

Con respecto al pH, los valores registrados en los diferentes tratamientos oscilaron entre 7.54 y 7.63, los cuales son consistentes con los recomendados (Auró y Ocampo, 2006). Mientras que otros autores mencionan que el rango óptimo de pH debe mantenerse entre 8.1 y 9.0 (Clifford, 1997; Zendejas, 1999).

El nitrógeno amoniacal total para el tratamiento control, registró el valor más alto en la semana dos (Figura 3) y posteriormente la concentración disminuyó, lo que se atribuye

al proceso de nitrificación. El proceso inicia con una fase lenta de crecimiento de las poblaciones *Nitrosomonas* sp. que degradan el amonio, seguido del establecimiento de bacterias del género *Nitrobacter* sp. que oxidan el nitrito a nitrato (Timmons *et al.*, 2002). Sin embargo, en los tratamientos inoculados con probióticos, se observó que las concentraciones de amonio disminuyeron a partir de la primer semana, sugiriendo que el amonio es degradado desde la primer semana por las comunidades de bacterias heterótrofas (bacilos y lactobacilos) que tienen la capacidad de reducir el amonio (Monroy *et al.*, 2013) además de otros géneros de bacterias Gramm positivas (Newaj *et al.*, 2013). Lo anterior es consistente con lo documentado por (Avnimelech, 2012) quien reporta que una rápida disminución en la concentración de NAT se produce para relaciones de C/N = 20, como la utilizada al inicio de este experimento. Los valores de NAT registrados en la última semana de éste estudio oscilaron entre  $(1.10 \pm 0.61)$  mg/L y  $(1.56 \pm 1.12)$  mg/L, los cuales se encuentran dentro de los límites establecidos los cuales están entre 0.6 y 2.5 mg/L (Clifford, 1997; Zendejas, 1999).

La evolución en las concentraciones de nitrito y nitrato durante el experimento muestran la forma típica del proceso de la nitrificación (Figuras 4 y 5), reportada por (Timmons, 2002). Referente a la concentración de nitrito, las recomendaciones sugieren niveles máximos de 0.5 mg/L en el sistema de cultivo (Clifford, 1997; Zendejas, 1999), mientras que los resultados observados en este trabajo al final del cultivo estuvieron entre  $(0.46 \pm 0.13)$  mg/L para el BE y de  $(0.71 \pm 0.15)$  mg/L para el BC. En el tratamiento control se rebasó el límite recomendado, pero no se observaron efectos letales en los organismos, quizá debido al tiempo corto de exposición. En relación a las concentraciones recomendadas para el nitrato, los valores registrados al

finalizar esta investigación estuvieron entre  $(96.5 \pm 16.11)$  mg/L y  $(127.33 \pm 20.2)$  mg/L, los cuales no sobrepasen los 1,000 mg/L establecido como límite superior para este compuesto (Losordo, 1999).

El sistema de cultivo en general, así como el crecimiento del camarón no fueron afectados negativamente por las concentraciones de SST, los valores observados fueron ligeramente menores que los valores de referencia. La mayor concentración de SST observada el último día de cultivo fue de  $(376 \pm 52)$  mg/L, mientras que la menor fue de  $(330 \pm 67)$  mg/L. Los valores observados fueron menores que el intervalo recomendado como óptimo (400 a 500 mg/L) para cultivos superintensivos de camarón por diversos autores (Ray *et al.*, 2004; Samocha *et al.*, 2010; Furtado *et al.*, 2011;). Sin embargo, (Schveitzer *et al.*, 2013) sugieren que la concentración de SST óptima en cultivos superintensivos de camarón debe estar en el rango de 400 a 600 mg/L. Estos autores encontraron que a niveles menores de 200 mg/L existe una tasa de residencia bacteriana muy baja, conduciendo a tasas de nitrificación muy pobres y para niveles de SST mayores que 800 mg/L la sobrevivencia disminuye por obstrucción de las branquias.

Los niveles de clorofila *a* incrementaron con el tiempo, lo que coincide con (Decamp, *et al.*, 2007). Al finalizar la investigación, la clorofila *a* alcanzó niveles en el intervalo de 132.0 y 143.0  $\mu\text{g/L}$ , mucho menores que los reportados (Decamp *et al.*, 2007), lo que se explica porque la investigación se realizó en el interior del laboratorio, con muy baja incidencia de luz.

Los probióticos inoculados no tuvieron efecto directo en el crecimiento ni en la sobrevivencia del camarón. Las tasas de crecimiento observadas en los tres tratamientos fueron similares a las obtenidas en sistemas comerciales intensivos (COSAES, 2014), el peso promedio de los camarones fue de 4.0 g al término de los 40 días de cultivo. Los porcentajes de sobrevivencia observados en los diferentes tratamientos fueron similares a los reportados en estudios previos, los cuales oscilan entre 70 y 85 %, obtenidos en un cultivo en biofloc en condiciones similares a las del experimento (Emerenciano, 2012).

El FCA para los tres tratamientos tuvo un intervalo entre 1.00 y 1.10, lo cual es esperado en un cultivo comercial de camarón superintensivo durante los primeros 40 días de cultivo (COSAES, 2014).

Respecto al desarrollo de las comunidades de microorganismos, la mayor concentración de *Vibrio* sp. se encontró en el tratamiento control en la primer semana de cultivo, lo cual se explica porque no se inocularon bacterias probióticas, a diferencia de los otros dos tratamientos. En las etapas tempranas del desarrollo de las comunidades en el biofloc, es común que las primeras bacterias que aparezcan sean los géneros *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. (Monroy *et al.*, 2013), que por lo general se relacionan con altas concentraciones de materia orgánica en el medio acuático y con patologías en los organismos, pero por el posterior establecimiento de comunidades de bacterias tipo heterótrofas se da un proceso de exclusión competitiva con el desplazamiento de las comunidades no deseables por comunidades de bacterias como *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas mendocina*, *Bacillus* sp, *Micrococcus* sp y la levadura *Rhodotorula* sp, lo cual coincide con lo

reportado por (Sotomayor y Balcázar, 2003), quienes afirman que el uso de probióticos tiene un efecto sinérgico cuando se utilizan varias cepas mezcladas en vez de un solo microorganismo en particular para prevenir o atacar las infecciones bacterianas.

Referente a la abundancia de las bacterias heterótrofas, estas iniciaron con densidades relativamente bajas en el tratamiento control ( $1.8 \times 10^6$  UFC/mL), hasta alcanzar concentraciones de  $100.0 \times 10^6$  UFC/mL. (Monroy *et al.*, 2013) presentaron un listado de bacterias heterótrofas cuantificadas a lo largo de 14 semanas de un cultivo de tilapia en biofloc, deduciendo que en las primeras semanas se llegan a contabilizar hasta  $4.9 \times 10^6$  UFC/mL, mientras que en la semana número siete se alcanzan los máximos conteos de heterótrofas de hasta  $47.0 \times 10^6$  UFC/mL, valores relativamente bajos comparados con lo reportado para el control en esta investigación, lo cual puede atribuirse a la diferencia entre especies cultivadas, a la edad de los organismos sembrados y sobre todo a la densidad de siembra, entre otros factores. Las concentraciones de colonias de bacterias heterótrofas, observadas en los tratamientos inoculados con los consorcios bacterianos se encontraron en el intervalo de  $4.6 \times 10^6$  UFC/mL y  $1.6 \times 10^9$  UFC/mL, lo cual es consistente con lo documentado por (Ruiz, 2010) quien contabilizó las UFC de tres probióticos comerciales después de activarlos, encontrando concentraciones de hasta  $2.1 \times 10^9$  UFC/mL.

Los consorcios comercial y endémico utilizados en esta investigación, no contaron con la presencia de bacterias nitrificantes (Timmons *et al.*, 2002) sugieren que el desarrollo de comunidades de bacterias quimiolitotróficas como es el caso de las nitrificantes, se inicia de manera natural dentro de la ecología del estanque, a partir de la presencia del sustrato específico para su desarrollo como el amonio y el nitrito.

El análisis proximal realizado al biofloc indicó niveles de proteína en un intervalo entre 23 y 27 %, estos valores se encuentran dentro del rango de 12 y 49 % reportados (Emerenciano, 2012).

Los niveles de lípidos encontrados en los tres tratamientos oscilaron entre 0.52 y 0.65 % valores ligeramente superiores a los determinados por (Wasiolesky *et al.*, 2006) y (Emerenciano *et al.*, 2010) quienes reportan niveles de entre 0.49 y 0.47 %.

Por otro lado (Wasiolesky *et al.*, 2006) y (Emerenciano, 2012) reportaron niveles de carbohidratos en el biofloc en un intervalo entre 23 y 36 %, estos valores se encuentran por debajo de los observados en esta investigación, que estuvieron entre 42 y 48 %. Lo cual puede explicarse debido a que el nivel de fibra en el agua se acumula a través del tiempo, disminuyendo la concentración de proteína y aumentando los carbohidratos totales (López *et al.*, 2015).

Diferentes investigadores reportan porcentajes de cenizas en biofloc, en el rango de 22 a 46 % (McIntosh, 1992; Tacon *et al.*, 2002; Emerenciano *et al.*, 2011; Wasiolesky *et al.*, 2006), mientras que el valor promedio observado en esta investigación, fue del 20 %. Al respecto, (Maicá *et al.*, 2011) observaron que el porcentaje de cenizas en un biofloc está directamente relacionado con la salinidad del cultivo, lo cual puede explicar esta pequeña diferencia entre el valor de cenizas encontrado en esta investigación.

La materia orgánica encontrada en el biofloc de los tres tratamientos osciló entre 71.9 y 72.5%, lo cual está acorde a lo reportado (Maicá *et al.*, 2011) quienes encontraron porcentajes de materia orgánica entre 57 y 79%.

Los análisis de correlación indican que al incrementar los SST incrementan las bacterias heterótrofas, el mayor coeficiente de correlación se observó en el tratamiento control, con un valor de ( $r=0.88$ ) el cual fue significativo, seguido de los tratamientos endémico y comercial. Esta tendencia podría explicarse como un efecto de la inoculación de los consorcios de bacterias probióticas en el inicio del cultivo en los tratamientos BE y BC, los cuales mostraron mayor concentración de bacterias heterótrofas que el control. La correlación entre el aumento de los SST y las comunidades heterótrofas a través del tiempo fue similar a la reportada por Huerta (2014), quien indicó que existe una correlación positiva entre estas dos variables.

Por otro lado los índices de correlación entre las comunidades de bacterias nitrificantes y heterótrofas mostraron, la interdependencia que hay entre ambas. Los coeficientes mayores se encontraron en los tratamientos endémico y comercial, los cuales fueron significativos. Lo anterior indica que estos dos grupos de comunidades bacterianas juegan un papel importante para el equilibrio entre estas variables, así como en la microecología del biofloc y se observó una correspondencia entre estos resultados con lo reportado por (Huerta, 2014).

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### V.1. Conclusiones

Las variables básicas del agua no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y se mantuvieron dentro de los intervalos recomendados para el cultivo de *L. Vannamei*.

La clorofila *a*, que depende del desarrollo de comunidades fotosintéticas, no tuvo altas concentraciones debido a la baja incidencia de luz solar en las unidades experimentales.

El tratamiento control presentó los menores niveles de bacterias heterótrofas y nitrificantes, sin embargo fueron suficientes para mantener las concentraciones de NAT y NO<sub>2</sub> en niveles similares al resto de los tratamientos. La dinámica de los compuestos nitrogenados es evidencia de que ocurrió el proceso de nitrificación en todos los tratamientos.

La inoculación de los consorcios bacterianos no tuvo efecto significativo en la composición química del biofloc.

Las bacterias tipo *Vibrio* sp. disminuyeron significativamente a partir de la segunda semana de cultivo, lo que se atribuye a la presencia de los consorcios bacterianos inoculados en los tratamientos endémico y comercial, solo en el tratamiento control se observaron concentraciones relativamente altas al inicio del cultivo.

Los SST presentaron una correlación positiva respecto a la abundancia de las bacterias heterótrofas y de las bacterias nitrificantes.

El tipo de probiótico, ya sea comercial o endémico no influyó significativamente en el crecimiento y la sobrevivencia del camarón, pero si tuvo un efecto preventivo de enfermedades infecciosas al desplazar a las comunidades de bacterias como *Vibrio* sp. desde los primeros días de cultivo.

## **VI. Recomendaciones**

Se recomienda

Inocular al inicio del biofloc con algún consorcio de bacterias probióticas de origen comercial o endémico para proveer un ambiente libre de patógenos desde momentos previos a la siembra.

Realizar más estudios que contribuyan al entendimiento del comportamiento microbiano de cultivos en biofloc, cuando son inoculados con consorcios de bacterias.

Investigar el comportamiento de comunidades bacterianas del biofloc en sistemas de cultivo de camarón propias de ambientes continentales con agua de baja salinidad (menor a 5 UPS).

## LITERATURA CITADA

- Aguilera R. D., Prieto D. A., Escalante K., Chávez C., Cuzon G y Gaxiola G., (2014). Probiotic effect of FLOC on Vibrio in the pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* (424-425), pp 215-219, Elsevier.
- AOAC INTERNATIONAL, (1990). *Official Methods of Analysis*. (15th Ed). Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. 1094 pp.
- Atlas R.M. (2010). *Handbook of microbiological media*. 4rt. Ed. CRC Press. FL, USA, 2036 p.
- Auró A. y Ocampo L. Editores, (2006). *El Libro del Camarón*.
- Avnimelech Y., (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* (176), pp 227–235.
- Avnimelech Y., (2006). Bio-filters: the need for a new comprehensive approach. *Aquacult Eng.* (34), pp172–1788.
- Avnimelech Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264; 140–147
- Avnimelech Y. (2012). *Biofloc technology -a practical guide book*, 272 pp. The World Aquaculture Society, Baton Rouge
- Boyd, C.E., Thunjai, T. (2003). Concentrations of major ions in waters of inland shrimp farms in China, Ecuador, Thailand and United States. *Journal of the World Aquaculture Society*. 34: pp. 524-532.

- Clifford C.H. (1997). *Manual de Operaciones para el Manejo de Super Shrimp en Estanques*.
- COSAES, (2014), Producción histórica del estado de Sonora, 15 agosto 2014, Comité de Sanidad Acuícola del estado de Sonora, <http://www.cosaes.com>.
- Decamp O., Conquest L., Cody J., Forester I. & Tacon A. G, J., (2007), Effect of Shrimp Stocking Density on Size-fractionated Phytoplankton and Ecological Groups of Ciliated Protozoa within Zero-water Exchange Shrimp Culture Systems. *J World Aquaculture Society*. 38(3). pp 395-406.
- Dotta G. M. Pedreira J. L., Jatob´a. A., Burgos M. R. E., Pilati C., Laterca M.M, (2011) Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. *Maring´a.*, 33( 3). pp 239-246.
- Emerenciano, M., Ballester, E., Cavalli, R., & Wasielesky, W. (2011). Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture International*, 5(19), 891-901.
- Emerenciano C. M. (2012). *Sistemas Biofloc, Principios y aplicaciones, curso-Taller*, CIBNOR, Guaymas, Sonora.
- FAO/WHO, (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including poder milk with liver lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization and World Health Organization Joint report. (34 pp.).}
- FAO (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Italia.

- Fuller, R. (1992). Probiotics: History and development of probiotics. Chapman y Hall, New York.
- Furtado P. S., Luís H. Poersch, Wilson Wasielesky Jr. (2011). Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*, 321, pp 130-135.
- Godinez S. D. E., Chavez S. M. C. & Gómez J. S., (2011), Acuicultura Epicontinental del Camarón Blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Tropical and Subtropical Agrosystems*, 14, pp 55-62.
- Hach. (2007). *Procedures manual, DR2700 Spectrophotometer*. Hach Co. E.U. 486 p.
- Hargreaves J., (2006). Photosynthetic suspended growth systems in aquaculture. *Aquacult Eng.* (34), pp 344–363.
- Himabindu K.V., Narottam P.S. & Kamal K.J. (2004). Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, grow thand survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research.*, (35), pp 501-507.
- Huerta-Rábago, J.A. (2014). *Evaluación poblacional de bacterias heterótrofas, oxidantes de amonio y tipo Vibrio en un cultivo intensive de tilapia con mínimo recambio de aguautilizando dos sustratos de fijación*, Navjoa, México, Universidad Estatal de Sonora.
- Lilly D.M. & Stillwell, (1965), Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms, *Science*. 147(3659), pp 747-748.

- López E. J. A., Moreno A. A., Miranda B. A., Martínez C. L. R., Rivas V. M. E., & Marquez Ríos E., (2015), Proximate Composition of Bioflocs in Culture Systems Containing Hybrid Red Tilapia Fed Diets with Varying Levels of Vegetable Meal Inclusion, *North American Journal of Aquaculture*, 77(1), pp 102-109.
- Losordo T. M. (1999). *Engineering considerations in closed recirculating systems*. Pp 58-69.
- Maicá P.F, De Borba M.R. & Wasielesky Jr W, (2011). *Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of Litopenaeus vannamei, juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system*.
- Martínez-Cordova L.E., Emerenciano M. Miranda-Baeza A. y Martínez-Porchas M, (2014). Microbial-based systems for aquaculture in fish and shrimp; an update Review. *Aquaculture* 6.
- McGraw W. (2002). Utilization of Heterotrophic and Autotrophic Bacteria in Aquaculture. *Global Aquaculture*. pp. 82-83.
- Mcintosh D. & Phillips M., (1992). *Environmental issues in shrimp farming*. (H. Singh, T. Eds.), INFOFISH, pp. 118–145.
- Melgar V. C.E. (2012). Evaluación de la tecnología EM en granjas acuícolas comerciales en Tabasco, México.
- Miranda-Baeza A., Voltolina D., y Cordero-Esquivel B. (2006). Filtration and clearance rates of *Anadara grandis* juveniles (*Pelecypoda*, *Arcidae*) with different temperatures and suspended matter concentrations. *International Journal of Tropical Biology*. 54(3):787-792.

- Monroy D. M.C., Castro B. T., Castro M. J., Castro M. G. & De Lara A. R. (2012). Beneficios del uso de Probióticos en la Flora Bacteriana intestinal de los Organismos Acuáticos, *Revista Contactos*, (85) pp 11-18 UAM.
- Monroy D. M.C., De Lara A. R., Castro M. J., Castro M. G. & Emerenciano C. M. (2013). Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Biología Marina y oceanografía*, 48(3) pp 511-520 UAM.
- Newaj F. A., Al H. & Austin B, (2013). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 416, Elsevier.
- Ray, A.J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C.L. (2010). Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture* 310, 130–138.
- Reid B. & Arnold C., (1992). The intensive culture of the Penaeid shrimp *Penaeus vannamei* Boone in a recirculating raceway system. *J. World Aquacult. Soc.* (23), pp. 146–153.
- Rodier J. (1981). *Análisis de las aguas*. (Omega). Barcelona. 1059 p.
- Rojas A. A., Haws M.C., y Cabanillas J.A. (2005). *Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo de Camarón*. (The David and Lucile Packard Foundation). United States Agency for international Development (Cooperative agreement No. PCE-A-00-95-0030-05) Proyecto: Prácticas de Desarrollo Sostenible en Ambientes Costeros de Prioridad de los Ecosistemas del Golfo de California, Marinas, Recreativas y Maricultura. Sección Camaronicultura.

- Ruiz C. (2010) Activación e Identificación Bioquímica de los Conglomerados de Bacterias Probióticas ABT-5, ABY-3 y BC-7 Utilizando el Kit Rápido API 50 CH. revista DELOS, en: [www.eumed.net/rev/delos/13](http://www.eumed.net/rev/delos/13).
- Samocha, T.M., Wilkenfeld, J.S., Morris, T.C., Correia, E.S., Hanson, T., (2010). Intensive raceways without water exchange analyzed for white shrimp culture. Global. *Aquaculture Advocate* 13(22) -14.
- Schveitzer R., Arantes R., Costódio P.F.S., do Espírito Santo C. M., Vinatea L. A., Walter Q W. S. & 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*) Elsevier (56) pp 59–70.
- Sotomayor M.A. & Balcázar J.L, (2003) *Inhibición de Vibrio sp patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas*. *Revista AquaTIC*, (19) pp. 9-15. Recuperado en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=156>
- Strickland J.D. y Parsons J.R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. 2nd Ed. *Fish Resource Building Canada Bulletin* 167: 185-189.
- Tacon A.G.J., Cody J.J., Conquest L.D., DivakaranS., Forster I.P. y Decamp O.E. (2002). Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8, 121 – 138.
- Tidwell, J. H. (2012), *Aquaculture Production Systems*, Wiley-BlackWell John Wiley & sons, Ltd, Publication.

- Timmons M.B., Ebeling J. M., Wheaton F. W., Summerfelt S.T & Vinci B.J. (2002).  
Recirculating Aquaculture System, (2da Ed). *Northeastern Regional Aquaculture Center*. Cayuga Aqua Ventures, EEUU, pp 208.
- Wasiolesky W. Jr., Atwood H., Stokes A., & Browdy C. L. (2006) Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* (258) pp 396
- Williams A., Davis D. & Arnold C., (1996). *Density - dependent growth and survival of Penaeus setiferus and Penaeus vannamei in a semi-closed recirculating system*. *J. WorldAquac. Soc.* (27), pp 107–112.
- Wyban, J., & Sweeney, J.N. (1991). *Intensive shrimp production technology*. *High Health Aquaculture Inc.*, Hawaii. 158 pp.
- Zendejas H. J. (1999). *Manual para la prevención de enfermedades virales en camaronicultura*, Ed Purina-aqualine.