



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**NIVELES DE NUTRIENTES RESIDUALES,
ECOEficiencia, DESEMPEÑO PRODUCTIVO Y
ESTADO FISIOLÓGICO DE *Litopenaeus vannamei* A
DIFERENTES NIVELES DE PROTEÍNA POR
EFECTO DE MICRO BIOTA EN CULTIVOS
HIPERINTENSIVOS.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Acuicultura)

P r e s e n t a

Eliza Magdalena Martínez Antonio

La Paz, Baja California Sur, Marzo 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 17 del Mes de Diciembre del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"NIVELES DE NUTRIENTES RESIDUALES, ECOEFICIENCIA, DESEMPEÑO PRODUCTIVO Y ESTADO FISIOLÓGICO DE *Litopenaeus vannamei* A DIFERENTES NIVELES DE PROTEÍNA POR EFECTO DE MICROBIOTA EN CULTIVOS HIPERINTENSIVOS"

Presentada por el alumno:

Eliza Magdalena Martínez Antonio

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **ACUICULTURA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



Ilie S. Racotta Dimitrov
DIRECTOR DE TESIS



Maria Esther Puente
CO-TUTOR



Francisco Magallón Barajas
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERRIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Director de tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.

Co-tutor

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas.

Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.

Co-tutor

Dra. María Esther Puente.

Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas.

Dra. María Esther Puente.

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas.

Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.

Dra. María Esther Puente.

Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.

Suplente

Dra. Laurence Stéphanie Mercier.

Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C.

Resumen

El reto actual de la camaronicultura sustentable es la implementación de nuevas tecnologías que mejoren el desempeño productivo en cultivo y promuevan el reciclamiento de nutrientes residuales, con el fin de aminorar los efectos ambientales mediante el manejo eficiente de los alimentos y nutrientes residuales. Sin embargo, son escasos los estudios que relacionan el efecto de estas tecnologías como bioflocs o cultivos microbióticos con indicadores de la condición fisiológica y nutricional de los camarones cultivados. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar los niveles de nutrientes residuales, la ecoeficiencia, el desempeño productivo y la condición fisiológica de *Litopenaeus vannamei* a diferentes niveles de proteína en la dieta en presencia de microorganismos que asimilan los nutrientes residuales de nitrógeno.

Se realizaron dos experimentos de cultivos hiper-intensivos de *L. vannamei* a diferentes niveles de proteína en la dieta y en presencia de microorganismos que asimilan los nutrientes residuales de nitrógeno o microbiota, bajo condiciones controladas de laboratorio (experimento 1) y bajo condiciones de granja (experimento 2). Los nutrientes residuales de nitrógeno permitieron identificar cuatro fases de transformación de nutrientes: asimilación heterotrófica del amonio, oxidación de nitritos a nitratos, nitrificación y desnitrificación. Sin embargo, la última fase no fue detectada a nivel de laboratorio y los nitritos y nitratos se incrementaron a niveles que tuvieron que ser controlados por recambio de agua. Las características de estas fases dependieron del nivel de proteína y, a nivel granja, del procedimiento de transición entre la pre-cría y la engorda. La ecoeficiencia mejoró a bajos niveles de proteína, y fue de 19.8% en el experimento 1 y 46.4% en el experimento 2. En el experimento 1, el crecimiento fue significativamente mayor en el tratamiento con bajo recambio y presencia de microbiota con respecto al control sin microbiota. Además, el desempeño en cultivo el cual relaciona el crecimiento, supervivencia y FCA, estuvo directamente relacionado con el nivel de proteína en sistemas de alto recambio, en el experimento 1, mientras que en el cultivo con bajo recambio y presencia de microbiota, el desempeño óptimo se obtuvo con el nivel intermedio de proteína en la dieta (30%), en ambos experimentos.

Los camarones cultivados en presencia de microbiota y sin recambio del experimento 1 presentaron un estado fisiológico más deteriorado en comparación con el control, debido a la acumulación de compuestos nitrogenados en el medio de cultivo, principalmente de nitritos, lo cual comprometió el estado fisiológico y nutricional de los organismos, reflejándose en altas mortalidades y bajos niveles de sustratos energéticos. Los camarones del experimento 2 presentaron un mejor estado fisiológico en comparación con los camarones cultivados en laboratorio (experimento 1), en términos de proteínas totales, triglicéridos y lípidos en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas. En particular, las reservas de lípidos totales en el hepatopáncreas de camarones del experimento 2 fueron 5 veces mayores, en comparación con camarones del experimento 1, probablemente debido a la disponibilidad de microorganismos en los estanques en granja, capaces de realizar la desnitrificación asimilatoria, tales como las microalgas.

Palabras clave: *microbiota, ecoeficiencia, bioflocs.*

Abstract

The challenge of sustainable shrimp farming is to adopt new technologies for the improvement of shrimp culture, in terms of waste nutrient recycling to reduce environmental impact through efficient food and nutrient residual management. However, few studies have analyzed the link between the use of technologies, such as bioflocs or microbiotic cultures with indicators of the physiological and nutritional status of cultured shrimp. The aim of this study was to assess the levels of residual nutrients, eco-efficiency, growth, survival, and physiological condition of *Litopenaeus vannamei* at different dietary protein levels in the presence of microorganisms that can assimilate residual nutrients, specifically nitrogen nutrients.

Two experiments, consisting of hyper-intensive cultures of *L. vannamei*, were conducted at different dietary protein levels in the presence of microorganisms (microbiota) that can assimilate nitrogen nutrients under controlled laboratory conditions (experiment 1) and under commercial farming (experiment 2). Residual nitrogen nutrients allowed us to identify four stages of nutrient processing: heterotrophic ammonium assimilation, nitrite oxidation to nitrate, nitrification, and denitrification. However, the last phase was not detected in the laboratory because nitrites and nitrates accumulated to high levels and had to be controlled with water exchange. These phases varied with protein level and, at the farm level, varied with a transition procedure between nursery and grow-out phases. Eco-efficiency improved at low protein levels, with values of 19.8% in experiment 1 and 46.4% in experiment 2. In experiment 1, growth was significantly higher in systems with low water exchange and presence of microbiota, compared to the control without microbiota. Moreover, performance in terms of growth, survival, and food conversion rate was directly related to protein levels with the high water exchange treatment in experiment 1, whereas the best performance was obtained in both experiments at an intermediate protein level (30%) in low water exchange systems and the presence of microbiota.

Cultured shrimp in the presence of microbiota and without water exchange in experiment 1 showed a more deteriorated physiological condition compared with control because of the accumulation of nitrogenous compounds in the culture medium, especially N-NO₂, that led to high mortality and low levels of the energy substrate. Shrimp in experiment 2 were in better physiological condition, compared to shrimp grown under laboratory conditions (experiment 1), in terms of the content in the hemolymph, muscle, and hepatopancreas of total proteins, triglycerides, and lipids. Total lipid reserves was five times higher in the hepatopancreas in shrimp in experiment 2, which might be a response to the availability of microorganisms able to perform denitrification assimilatory processes, such as the microalgae found in farm ponds.

Keywords: *microbiota, eco-efficiency, bioflocs.*

A mi madre, Adelina por la fortaleza y amor incondicional en todo momento.

A mi padre, Adonay por su apoyo y ejemplo de coraje.

A mis hermanas, Gaby y Alma por ser mis compañeras de vida.

Al amor de mi vida, Ulises por compartir un nuevo y extraordinario viaje.

*Sin importar que tan urbana sea nuestra vida, nosotros venimos de la Tierra y
retornaremos a ella, y es así que existimos en la agricultura y acuicultura tanto como
existimos en nuestra propia carne.*

Wendell Berr

Agradecimientos

Agradezco al centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), como institución receptora de los estudios de posgrado y por las instalaciones para la realización del presente trabajo y al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Agradezco el apoyo por parte de los proyectos:

SEP-CONACYT (No. 101733) “Evaluación del estatus energético del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, a través de distintos enfoques experimentales en tres condiciones fisiológicas: muda, reproducción y estrés”, tanto por el financiamiento para la investigación como por la beca terminal de maestría otorgada (No. 101733).

FORDECYT-CONACYT (Clave: I0014-2010-01-143117) “Bioseguridad y ecoeficiencia en el cultivo de camarón”, por el financiamiento para la investigación.

PROINNOVA-CONACYT (No. 157832) “Sistema innovador biotecnológico sustentable de cultivo hiper-intensivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en Baja California Sur”, por el financiamiento para la investigación.

Agradezco el apoyo, paciencia y por la capacitación recibida en sus respectivas competencias de laboratorio de los técnicos: Sandra De La Paz Reyes (Nutrición Acuícola), María Olivia Arjona López (Metabolismo de Lípidos y Metabolismo Energético) y Roberto Hernández Herrera (Bioquímica Fisiológica). Al grupo de trabajo: Julio Ayala, Alondra Martínez e Isela Guadalupe Solís, por el enorme apoyo en el cultivo de camarones, medición de nutrientes y análisis de la microbiota. A todos mis compañeros del laboratorio de metabolismo energético que apoyaron para la realización de este trabajo: Arlett Robles, Saúl Zamora y Miguel Regalado. A la M.C. Diana Leticia Dorantes Salas y a Ira Fogel por la traducción y observaciones en inglés. A Horacio Sandoval Gómez por su accesibilidad en el centro de cómputo. Al Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov y al Dr. Francisco Javier Magallón Barajas por su enorme apoyo, confianza, entusiasmo, constancia y paciencia en la dirección del presente trabajo, así como a la Dra. María Esther Puente por sus atinados comentarios y su apoyo para la realización del presente trabajo.

Contenido

Resumen.....	ii
Abstract.....	ii
Agradecimientos	v
Lista de figuras.....	ix

Lista de tablas

.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.
2. ANTECEDENTES	¡Error! Marcador no definido.
2.1 Requerimiento de proteína en la dieta.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2 Retención de nitrógeno como biomasa: Ecoeficiencia.	¡Error! Marcador no definido.
2.3 Ecoeficiencia y crecimiento en relación con el porcentaje de proteína en la dieta	¡Error! Marcador no definido.
2.4 Tecnologías alternativas.....	¡Error! Marcador no definido.
a) Sistemas acuícolas de recirculación (RAS).....	¡Error! Marcador no definido.
b) Tecnología de Bioflocs (BFT)	¡Error! Marcador no definido.
c) Cultivo microbiótico.....	¡Error! Marcador no definido.
2.5. Concepto de estrés.....	¡Error! Marcador no definido.
2.6 Carga energética adenílica (CEA).....	¡Error! Marcador no definido.
3. JUSTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
4. OBJETIVO GENERAL.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1 Objetivos particulares.....	¡Error! Marcador no definido.
5. HIPÓTESIS	¡Error! Marcador no definido.
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	¡Error! Marcador no definido.
6.1. Cultivo hiperintensivo.....	¡Error! Marcador no definido.
6.1.1. Experimento 1 (CIBNOR):.....	¡Error! Marcador no definido.
6.1.2. Experimento 2 (Seguimiento del cultivo hiperintensivo en Acuicultura Mahr):	¡Error! Marcador no definido.
6.2. Determinación de la concentración de nutrientes residuales. ...	¡Error! Marcador no definido.
6.3. Determinación total de sólidos suspendidos (TSS)...	¡Error! Marcador no definido.
6.4. Medición del volumen de sólidos (VS).....	¡Error! Marcador no definido.
6.5. Determinación del tamaño de partícula.....	¡Error! Marcador no definido.

6.6. Conteos celulares	¡Error! Marcador no definido.
6.7.1 Medición de variables fisiológicas en hemolinfa	28
6.7.2. Medición variables fisiológicas en camarones completos o en hepatopáncreas y músculo.....	31
6.7.3. Medición de Carga Energética Adenilica (CEA) en músculo del camarón o en el camarón completo.	34
6.7.4. Medición de Fosfato de arginina (Arg-P) en músculo	35
6.8. Desempeño en cultivo	35
6.9. Análisis químico proximal	36
6.10. Análisis estadísticos	37
7. RESULTADOS	38
7.1. Nutrientes residuales	38
7.1.1. Experimento 1: Cultivo hiperintensivo en condiciones de laboratorio (CIBNOR)	38
7.1.2. Experimento 2: Cultivo hiperintensivo bajo condiciones de granja (Acuicultura Marh):.....	44
7.2. Parámetros productivos	51
Experimento 1: Parámetros productivos del cultivo intensivo en acuarios en los laboratorios del CIBNOR	51
Experimento 2: Parámetros productivos del cultivo hiper-intensivo en Acuicultura Mahr	57
7.3. Total de sólidos suspendidos (TSS)	61
7.3. Volumen de solidos (VS).....	62
7.3.1 .Experimento 1 (CIBNOR).....	62
7.3.2. Experimento 2 (Acucultura Marh)	63
7.4. Tamaño de partícula	63
7.5. Eficiencia en el uso de N y P en cultivos hiper-intensivos en experimento 1 y 2. ...	64
7.6. Conteos celulares	67
7.7. Variables fisiológicas	68
7.7.1. Experimento 1: Cultivo hiper intensivo bajo condiciones de laboratorio (CIBNOR).	68
7.7.2. Experimento 2: Cultivo hiper-intensivo en condiciones de granja (Acuicultura Mahr).	75
7.8. Carga energética adenilica (CEA).....	82
7.8.1. Experimento 1: CIBNOR	82

7.8.2. Experimento 2: Acuacultura Mahr	84
7.9. Fosfato de arginina (Arg-P)	87
7.9.1. Experimento 1: CIBNOR	87
7.9.2. Experimento 2: Acuacultura Mahr	88
8. DISCUSIÓN	90
8.1. Nutrientes residuales	90
8.1.1. Dinámica de nutrientes en relación con el sistema de cultivo.....	90
8.1.2. Dinámica de nutrientes en relación con el nivel de proteína.....	95
8.1.4. Acumulación de compuestos nitrogenados residuales a niveles tóxicos en el medio de cultivo	99
8.2. Parámetros productivos	108
8.2.1. Sistemas de cultivo	108
8.2.2. TSS y VS	114
8.2.3. Tamaño de partícula	116
8.3. Variables fisiológicas	117
9. CONCLUSIONES	134
10. RECOMENDACIONES.....	136
11. LITERATURA CITADA	136

Lista de figuras

Figura 1. Medición del volumen de sólidos (VS).	26
Figura 2. Concentración de TAN ($N-NH_4 + N-NH_3$) en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína del cultivo en CIBNOR.	39
Figura 3. Concentración de $N-NH_3$ en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína del cultivo en CIBNOR.	40
Figura 4. Concentración de $N-NO_2$ en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.	42
Figura 5. Concentración de $N-NO_3$ en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.	42
Figura 6. Nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.	43
Figura 7. Concentración de $P-PO_4$ en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.	43
Figura 8. Observaciones generales en el cultivo en granja del experimento 2 (Acuacultura Mahr).	44
Figura 9. Concentración de nutrientes residuales de nitrógeno y fósforo en estanques 1, 2 y 3 (25% de proteína).	47
Figura 10. Concentración de nutrientes residuales de nitrógeno y fósforo en estanques 4 y 5 (30% de proteína).	48
Figura 11. Concentración de nutrientes residuales de nitrógeno y fósforo en estanques 6 y 7 (35% de proteína).	50
Figura 12. Concentración del total de Nitrógeno Inorgánico Disuelto ($NID=N-NH_3 + N-NH_4 + N-NO_2 + N-NO_3$) en los estanques a lo largo del ciclo de cultivo.	51
Figura 13. Variaciones de temperatura en cultivo en CIBNOR (experimento 1).	53
Figura 14. Incremento de peso en tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.	54
Figura 15. Incremento de biomasa en tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (P), ambos con tres niveles de proteína.	55
Figura 16. Supervivencia en tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (P), ambos con tres niveles de proteína.	55
Figura 17. Desempeño en tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (P), ambos con tres niveles de proteína.	57
Figura 18. Variación de la densidad en los estanques con diferente nivel de proteína.	60
Figura 19. Variación de la Supervivencia estimada en los estanques con diferente nivel de proteína.	61
Figura 20. Peso de los camarones a lo largo del ciclo de cultivo en los estanques con diferentes niveles de proteína en la dieta.	61
Figura 21. Total de sólidos suspendidos en el cultivo en CIBNOR.	62
Figura 22. Volumen de sólidos del cultivo en CIBNOR.	62
Figura 23. Volumen de sólidos en el cultivo en granja.	63
Figura 24. Tamaño de partícula del día 20 de septiembre (arriba) y 12 de octubre (abajo) del cultivo en CIBNOR.	64

Figura 25. Conteos celulares de la microbiota durante los cultivos en CIBNOR y granja	68
Figura 26. Análisis de proteínas totales, glucógeno, lactato, lípidos totales y triglicéridos en camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P).	69
Figura 27. Análisis de proteínas totales, triglicéridos y hemocianina en hemolinfa de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P).	71
Figura 28. Análisis de glucosa y lactato en hemolinfa en hemolinfa de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P)...	71
Figura 29. Análisis de proteínas totales, glucógeno lípidos totales y lactato en músculo de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P).	72
Figura 30. Análisis de proteínas totales, glucógeno, lípidos totales, triglicéridos y lactato en hepatopáncreas.	74
Figura 31. Análisis de proteínas totales, triglicéridos y hemocianina en hemolinfa.	76
Figura 32. Análisis de proteínas glucosa y lactato en hemolinfa.	77
Figura 33. Análisis de proteínas totales, glucógeno, lípidos totales y lactato en músculo.	79
Figura 34. Análisis de proteínas totales, glucógeno, lípidos totales, triglicéridos y lactato en hepatopáncreas.	81
Figura 35. Concentraciones de AMP, ADP, ATP, su suma y CEA en músculo de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P) del muestreo I.	83
Figura 36. Concentraciones de AMP, ADP, ATP y CEA en músculo de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P) del muestreo II.	84
Figura 37. Concentraciones de AMP, ADP, ATP, ATP y CEA en músculo de camarones cultivados en distintos estanques (E) con distintos niveles de proteínas y resiembra, y bajo distintos tratamientos de estrés (T).	87
Figura 38. Concentración de fosfato de arginina (ArgP) en músculo de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P) del muestreo I (A) y muestreo II (B).	88
Figura 39. Concentraciones de fosfato de arginina (ArgP) en músculo de camarones cultivados en distintos estanques (E) con distintos niveles de proteínas y resiembra, y bajo distintos tratamientos de estrés (T).	89

Lista de tablas

Tabla I. Requerimiento de proteína cruda en la dieta (%) reportada por diversos autores.	7
Tabla II. Recambios realizados en acuarios con microbiota y agua clara.....	21
Tabla III. Características del cultivo hiperintensivo en granja en 7 estanques. *Color verde en el estanque.....	22
Tabla IV. Parámetros del cultivo hiper-intensivo en acuarios experimentales de 50L en CIBNOR.	57
Tabla V. Parámetros fisicoquímicos promedio en el cultivo intensivo de Acuicultura Marh.....	59
Tabla VI. Características de la cosecha de los 7 estanques del cultivo en granja.....	60
Tabla VII. Análisis químico proximal de alimento comercial, utilizado en experimento 1 y 2.	65
Tabla VIII. Balance de N y P en el cultivo hiper intensivo bajo condiciones de laboratorio (experimento 1: CIBNOR).....	66
Tabla IX. Balance de N y P en los cultivos hiper intensivos bajo condiciones de granja (experimento 2: Acuicultura Marh).....	67
Tabla X. Concentración de compuestos residuales en diferentes sistemas de cultivo.	98
Tabla XI. Concentración letal media (LC ₅₀) de TAN en camarones a diferentes tiempos de exposición.	102
Tabla XII. Concentración letal media (LC ₅₀) de N-NH ₃ en camarones a diferentes tiempos de exposición.	103
Tabla XIII. Concentración letal media (LC ₅₀) de N-NO ₂ en camarones.....	107
Tabla XIV. Reportes de desempeño de <i>L. vannamei</i> en diferentes sistemas de cultivo: agua clara (AC), biofloc (BF). Tasa de crecimiento semanal (k) en g.sema ⁻¹ , supervivencia (S), factor de conversión alimenticia (FCA) y densidad (D).	110
Tabla XV. Total de sólidos suspendidos reportados por diferentes autores.	116
Tabla XVII. Respuesta a factores estresores en la concentración de total de proteína (TP), glucosa (GL), lactato (LAC), triglicéridos (TG) y hemocianina (HC) en hemolinfa, reportado por diversos autores.	119
Tabla XVII. Carga energética en distintos organismos. CEA: carga energética adenilica y ArgP: Arginin fosfato.	134

1. INTRODUCCIÓN

Las pesquerías y la acuicultura han proveído al mundo alrededor de 154 millones de toneladas de alimento en el 2011, de las cuales 63.6 millones de toneladas fueron aportadas por la acuicultura. El suministro *per cápita* se ha mantenido estable en los últimos 10 años debido al crecimiento acelerado de la acuicultura, la cual ha compensado la disminución de las pesquerías y el aumento de la población ya que la producción de esta industria en el periodo 1980-2010 incrementó 10.2% por año, lo que postuló a la acuicultura como el sector de producción de alimentos con mayor crecimiento, y además ésta industria contribuyó al aumento del suministro *per cápita* de 1.1 kg en 1980 a 8.7 kg en el 2010 (FAO, 2012).

En dicho período la producción de la acuicultura en agua marina aportó el 32.3% de la producción mundial, la cual incluyó el cultivo de diferentes especies de peces, moluscos y crustáceos. En particular, el cultivo de crustáceos aportó 9.5% del total de especies marinas cultivadas y especialmente la producción de peneidos (familia penaeidae) representó un 73.3% de la producción total de crustáceos en el 2008. (FAO, 2010).

Litopenaeus vannamei, una especie nativa del pacífico oriental tropical, encabeza la lista de los peneidos cultivados mundialmente debido a que en pocos años varias regiones incluyendo Asia, se han inclinado a la producción de esta especie, por lo cual ha presentado una rápida dispersión geográfica y un crecimiento explosivo de su cultivo. En México el cultivo de esta especie representa el 90% de la producción acuícola (FAO, 2010).

El cultivo de *L. vannamei* se ha realizado en sistemas extensivos (<700 kg.ha⁻¹) semi (<5 ton.ha⁻¹) e intensivos (<10 ton.ha⁻¹) desde hace más de 30 años. En los cultivos hiperintensivos (10- >40 ton.ha⁻¹) se aumenta por mucho la densidad de los organismos por unidad de área (>300 org/m²). Estas intensificaciones recientes en el sistema de cultivo se han asociado al aumento de la aeración, al uso de alimentos artificiales y al manejo microbiológico. A pesar de que este tipo de cultivo promete elevar las producciones, el desarrollo de estos sistemas a nivel comercial no han sido satisfactoria e incluso se

considera la producción de camarón en México como de alto riesgo e incertidumbre económica, debido principalmente a factores intrínsecos a la producción de organismos vivos y a factores externos tales como el mercado y la incidencia de enfermedades (Mishra *et al.*, 2008; Espinoza y Bermúdez, 2012).

La intensificación en los sistemas de cultivo ha conllevado al aumento del uso de alimento formulado ya que el sistema intensificado disminuye la interacción con poblaciones naturales al contrario de los sistemas de cultivo extensivos. Adicionalmente la dependencia del uso de grandes cantidades de alimento formulado con alto contenido de proteína animal es una de las causas de eutrofización y el enriquecimiento de nutrientes en los efluentes provenientes del cultivo de camarón, debido a la excreción de los organismos y a la lixiviación del alimento no consumido deterioran la calidad del agua del cultivo. Éstos problemas son magnificados con el grado de intensificación en los sistemas de cultivo (Burford y Williams, 2001; Tacon *et al.*, 2002; Tacon y Foster, 2003, Crab *et al.*, 2007).

La calidad del agua en el contexto de la acuicultura, es el conjunto de variables fisicoquímicas y biológicas que regulan y determinan el éxito del cultivo. Algunos ejemplos de estas variables son pH, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, amonio (N-NH₄), nitritos (N-NO₂), nitratos (N-NO₃), fosfatos (P-PO₄) y materia orgánica. En sistemas intensivos son necesarios grandes recambios de agua para optimizar su calidad y con éstos minimizar las altas concentraciones de metabolitos inorgánicos (N-NH₃, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻), generados a partir de la excreción de los organismos en cultivo o son el resultado de la lixiviación de alimento no consumido. Lo anterior tiene la finalidad de regular dichas variables para obtener un mayor crecimiento y supervivencia de los organismos lo cual se traduce en una buena calidad de cosecha (Páez-Osuna, 2001).

Así, los altos recambios de agua necesarios para el buen mantenimiento de la calidad del agua necesaria para el óptimo desarrollo del cultivo, aunado a la acelerada expansión de la camaronicultura intensiva, han provocado diversos problemas ambientales, tales como la eutrofización, debido a la descarga de altos niveles de nutrientes en las zonas

costeras contiguas al cultivo. Por lo tanto, el sistema de cultivo implementado está directamente relacionado con el nivel de impacto ambiental (Páez-Osuna, 2001; Espinoza y Bermúdez, 2012). Además bajo estas condiciones, el cultivo es vulnerable a organismos patógenos del medio ambiente que entran al sistema al aumentar la tasa de recambio de agua (Crab *et al.*, 2007).

Handy y Poxton desde 1993 ponen de manifiesto que la principal causa del deterioro de la calidad de agua y por lo tanto de los efluentes descargados en las zonas costeras, son los compuestos nitrogenados provenientes del alimento que no son aprovechados por los organismos cultivados y son excretados como N-NH_3 principalmente por vía branquial.

La retención de nitrógeno en la camaricultura es similar a la encontrada en peces teleósteos marinos, los cuales presentan baja retención de nitrógeno proveniente del alimento, es decir solo una pequeña fracción del total de nitrógeno suministrado (26.5%) es convertido en biomasa y por lo tanto son altas las concentraciones de nitrógeno (>70%) excretado y liberado en los efluentes, lo cual causa un deterioro significativo en la calidad de agua.

En un sistema de cultivo, así como en cualquier ecosistema acuático, existe una conversión de las diferentes formas de nitrógeno. El N-NH_3 como principal producto de excreción de los camarones, puede ser asimilado por microorganismos autotróficos o heterotróficos para convertirlo en aminoácidos, o bien convertido por oxidación a nitritos y subsecuentemente convertido por nitrificación a nitratos por las bacterias existentes en el sistema de cultivo (Madigan *et al.*, 2003). Estos procesos contribuyen a la capacidad de asimilación y transformación del amonio en un cultivo (Páez-Osuna, 2001).

Cuando existe una liberación o excreción de amonio que exceda dicha capacidad de asimilación del sistema en los estanques o en los cuerpos de agua costeros, se origina el deterioro de la calidad de agua, además de incrementar el riesgo de toxicidad del amonio en los camarones mismos, particularmente en condiciones de altos valores de pH y temperatura (Páez-Osuna, 2001).

En este contexto el amonio puede ser aprovechado siendo consumido preferentemente por el fitoplancton presente en el sistema de cultivo y éste a su vez es consumido por el zooplancton convirtiéndose estas comunidades en una fuente natural y adicional de alimento para el camarón (Quadros y Martínez-Córdoba, 2008 y Scopel *et al.*, 2011).

Se han propuesto nuevas tecnologías para aminorar el deterioro de la calidad del agua en los estanques y consecuentemente disminuir los recambios de agua en cultivos intensivos. Por ejemplo, los sistemas de flóculos microbianos, también llamados bioflocs, los cuales se basan en la inoculación de una fuente de carbón (harina de arroz, maíz, yuca o melaza) para promover el crecimiento de comunidades microbianas (bacterias, fitoplancton y zooplancton) con el objetivo de obtener un reciclamiento de nitrógeno no utilizado y liberado en el sistema, para proveer de una fuente natural de proteína disponible para el camarón y por lo tanto prevenir la acumulación de compuestos nitrogenados a niveles tóxicos (Emerenciano *et al.*, 2012; Avnimelech, 2007; Avnimelech y Kochba 2009 y Scopel *et al.*, 2011).

Recientemente se desarrolló un sistema de cultivo hiper-intensivo que utiliza la inclusión diaria de una mezcla microbiológica desarrollada en bioreactores, que contribuye a la asimilación de compuestos nitrogenados y el reciclamiento del $N-NH_4$ en proteína microbiana la cual se encuentra disponible para la alimentación de los camarones. Si se considera que el nivel de inclusión de proteína en la dieta incrementa el nivel de amonio en un sistema de cultivo y éste es reciclado por la comunidad microbiológica en forma de alimento, surgió la pregunta que motiva este protocolo de investigación; ¿En cultivos hiper-intensivos con inoculación diaria de un consorcio microbiológico orientado a la conversión de amonio en proteína, podría disminuirse el nivel de inclusión de proteína en la dieta suministrada sin afectar el estado fisiológico de los organismos y el desempeño del cultivo, con una mejoría en los niveles de nutrientes residuales y una mejor ecoeficiencia en el uso del nitrógeno?.

En cultivos hiper-intensivos con inoculación diaria de un consorcio microbiológico orientado a la conversión de amonio en proteína, se ha reportado mayor disposición de alimento natural de origen microbiológico principalmente de proteínas, vitaminas y minerales esenciales para el crecimiento y desarrollo del camarón (Páez-Osuna, 2001 y Tacon *et al.*, 2002), por lo cual se esperaría aumentar la retención de nitrógeno como biomasa al disminuir el nivel de proteína del alimento formulado sin comprometer el estado fisiológico de los organismos ya que sus requerimientos nutricionales serían complementados con el alimento dispuesto por los microorganismos que asimilan los compuestos de nitrógeno residuales en el sistema. De conformidad con la hipótesis anterior el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el estado fisiológico de los organismos en un cultivo hiper-intensivo de *Litopenaeus vannamei* a diferentes niveles de proteína en la dieta en presencia de microorganismos que asimilan los nutrientes residuales de nitrógeno.

2. ANTECEDENTES

Durante los años 80's el cultivo mundial de camarón fue realizado en sistemas extensivos, es decir, con bajas densidades de cultivo y en presencia de productividad primaria. Debido a la gran demanda de alimento y específicamente de productos atractivos como el camarón, las tecnologías fueron maximizadas para proveer de mayores producciones (Wasielesky *et al.*, 2006). Por ejemplo durante y después los 90's, la producción de *L. vannamei* se elevó a 5000 kg/ha/año en EU implementando tecnologías que aumentaron los recambios de agua (Hopkins *et al.*, 1995). En el 2003 Brasil reporta una producción de 6000 kg/ha/año (Rocha *et al.*, 2004).

Estos incrementos en la producción de camarón por medio de la intensificación del sistema de cultivo, han conllevado al aumento del uso de alimento formulado debido que el sistema intensificado disminuye la interacción con poblaciones naturales como es el caso en los sistemas extensivos, ya que una forma de suplir la falta de proteína es el uso de alimentos procesados (Fast, 1992; Mishra *et al.*, 2008; Tacon y Foster, 2003).

El uso de alimentos procesados y el aumento del número de organismos por unidad de área, aumentó la demanda de oxígeno, la cual se sumó a los insumos para el cultivo de camarón. Una vez cubierta la demanda de oxígeno por medio de aireación, el siguiente factor limitante en el sistema de cultivo intensivo son los metabolitos tóxicos, tales como, el amonio disuelto el cual está directamente relacionado con el nivel de proteína en el alimento formulado (Hopkins *et al.*, 1995; González-Félix *et al.*, 2007; Martínez-Córdoba, 2008).

2.1 Requerimiento de proteína en la dieta

La proteína en la dieta es indispensable para el crecimiento de los camarones y es una de las consideraciones más importantes para la preparación de alimentos, debido a su alto costo. La proteína es utilizada para el crecimiento, reparación de tejidos y es fuente de aminoácidos. La proteína no es utilizada como fuente de energía, debido a que otras fuentes tales como carbohidratos son mejor utilizados por el camarón y por lo tanto la proteína adquiere mayor valor para el crecimiento, en vez de proporcionar energía. Adicionalmente el contenido de proteína en el alimento contribuye a la calidad del agua debido a que el nitrógeno es excretado por parte de los organismos en cultivo (Kureshy y Davis, 2002; Shiau, 1998).

El requerimiento de proteína ha sido definido desde 1997 por Guillaume como la cantidad mínima o máxima de proteína que necesita un organismo por día para mantener sus funciones, siempre y cuando los demás nutrientes se encuentren disponibles en cantidades adecuadas. Los requerimientos dependen de la especie, talla, estado fisiológico, calidad y origen de la proteína, la relación energía-proteína, temperatura, salinidad (Molina-Poveda, 2008; Guillaume, 1997).

Entonces el requerimiento proteico cuantitativo depende de múltiples factores, por lo que su determinación es variable, sin embargo, se ha evaluado el efecto del nivel de proteína de alguna dieta en el crecimiento de los organismos en cultivo. Debido a que la proteína es uno de los nutrientes limitantes económicos, su uso eficiente ha direccionado a las investigaciones para evaluar el nivel de proteína en la dieta por medio de tasas máximas

de crecimiento y conversión alimenticia de los organismos en cultivo (Kureshy y Davis, 2002).

Las investigaciones de peneidos en la década antepasada se enfocaron a la búsqueda del nivel óptimo de proteína al cual hay mayores crecimientos, pero los experimentos en su mayoría se llevaron a cabo en condiciones controladas de laboratorio, especialmente en agua clara, alejándose de las condiciones reales de cultivo (Bringas-Alvarado *et al.*, 1999). En la tabla I se muestran los requerimientos en el nivel de proteína en la dieta reportados principalmente para *L. vannamei*, en la cual podemos observar que existe un amplio rango de porcentajes de proteína (15-45%) necesaria para obtener mayores crecimientos.

Tabla I. Requerimiento de proteína cruda en la dieta (%) reportada por diversos autores.

Año	%	Especie	Autor
1977	30%	<i>L. vannamei</i>	Colvin y Brand
1983	40-44	<i>P. monodon</i>	Alava y Lim
1985	>36	<i>P. vannamei</i>	Smith <i>et al.</i>
1988	25-35	<i>P. vannamei</i>	Teichert-Coddington y Arrue
1991	30	<i>P. vannamei</i>	Cousin <i>et al.</i>
1993	42	<i>P. japonicus</i>	Koshio <i>et al</i>
1993	15	<i>P. vannamei</i>	Aranyakananda y Lawrence
2000	21-24	<i>L. vannamei</i>	Velasco
2002	32	<i>L. vannamei</i>	Kureshy y Davis
2004	40%	<i>L. vannamei</i>	Pascual <i>et al.</i>
2005	40%	<i>L. vannamei</i>	Lui <i>et al.</i>
2006	35	<i>L. vannamei</i>	Wasielesky <i>et al.</i>
2008	34	<i>L. vannamei</i>	Hu <i>et al.</i>
2010	35	<i>F. paulensis</i>	Ballester <i>et al</i>
2010	43	<i>L. vannamei</i>	Xia <i>et al.</i>
2010	41	<i>L. vannamei</i>	Zhu <i>et al.</i>

Se ha apoyado la idea de que el crecimiento aumenta directamente proporcional al nivel de proteína en la dieta hasta un determinado nivel donde existe un decremento en el crecimiento, tal como fue observado por Kureshy y Davis (2002) quienes reportan disminución de crecimiento al alimentar con 48% de proteína. Xia y colaboradores (2010) reportan un crecimiento directamente proporcional al nivel de proteína en la dieta de 31 al 43% pero a 47% observan un decremento en el crecimiento. Recientemente las investigaciones no determinan diferencias significativas entre dietas con niveles entre 30%-43%, sin embargo cuando se analiza la eficiencia proteica se observa mayor eficiencia a bajos niveles de proteína en la dieta (Xia *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010; González-Félix *et al.*, 2007).

Posteriormente al surgir el incremento de la producción por unidad de área de cultivos intensivos, las investigaciones se direccionaron para evaluar la capacidad de crecimiento del camarón en altas densidades. Uno de los estudios que relaciona esto, con diferentes niveles de proteína en la dieta, es el caso de las investigaciones de Xia y colaboradores (2010), quienes observaron la necesidad de un alto porcentaje de proteína (43%) para crecer en altas densidades en ausencia de la productividad natural. Pero también observaron que altos porcentajes de proteína contribuyeron al aumento del estrés por parte de los organismos cultivados por una mayor acumulación de metabolitos nitrogenados.

A continuación se presentan las investigaciones enfocadas en diferentes ámbitos pero relacionadas con el nivel de proteína en la dieta y el uso de nuevas tecnologías que promueven el reciclamiento de nutrientes.

2.2 Retención de nitrógeno como biomasa: Ecoeficiencia.

El nivel de proteína en la dieta ha sido directamente relacionado con la concentración de compuestos nitrógenos excretados al medio de cultivo por parte del camarón, (González-Félix *et al.*, 2007; Wright, 1995; Yaemsooksawat *et al.*, 2009; Martínez-Córdoba, 2008) principalmente en forma de amoníaco (N-NH_3), el cual transformado a N-NH_4^+ es el producto final del metabolismo de proteínas. Por otro lado se

ha reportado que en condiciones de altos niveles de $N-NH_3$ en el agua, se intensifica el estrés por parte de los organismos cultivados (Xia *et al.*, 2010; Yaemsooksawat *et al.*, 2009).

En este contexto Handy y Poxton (1993) hacen una revisión bibliográfica acerca de la excreción de compuestos nitrogenados proveniente de peces teleósteos marinos y determinan que en promedio en condiciones de cultivo intensivo la ecoeficiencia del nitrógeno total es de 26.5%, es decir del nitrógeno total que se les proporciona en la dieta solo el 26.5% es convertido en biomasa y el resto es excretado principalmente por vía branquial, renal y fecal (>70%). Mientras que en el peor de los casos con ecoeficiencia mínima de 13% de nitrógeno, la excreción de amonio es de 91%, lo cual causa un deterioro significativo en la calidad de agua.

La retención de nitrógeno o ecoeficiencia en la camaronicultura es similar a la encontrada en peces teleósteos marinos. En el 2004 Burford y colaboradores reporta la ecoeficiencia de un cultivo de *Panaeus monodon* de 24 y 33% del nitrógeno, siendo mayor la ecoeficiencia con la presencia de sedimento, el cual promueve el crecimiento de microorganismos. Para esta misma especie se ha reportado ecoeficiencia de 22 y 23% en densidades de siembra de 35 a 25 camarones/m² respectivamente, mientras que en densidades mayores (50 camarones/m²) la ecoeficiencia incremento a 31% bajo las mismas condiciones. Los autores mencionan que el fitoplancton es capaz de reciclar el 50% de nitrógeno disponible en el medio de cultivo (Jackson *et al.*, 2003 y Thakur y Lin, 2003 En González-Félix, 2007).

2.3 Ecoeficiencia y crecimiento en relación con el porcentaje de proteína en la dieta

Existen diversos estudios que han apoyado la idea de que la ecoeficiencia disminuye en dietas de alto contenido de proteína (González-Félix *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008 y Alvarez *et al.*, 2002) y se incrementa cuando existe la disposición de alimento natural en el estanque con dietas con bajo contenido proteico (Tacon *et al.*, 2002; González-Félix, *et al.* 2007; Alvarez *et al.*, 2002 y Xia *et al.*, 2010 y Yaemsooksawat *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2010).

Tacon y colaboradores en el 2002 comparan el crecimiento y el rendimiento de diferentes dietas en sistemas con cero recambio y en sistemas con constante flujo de agua, observan un crecimiento 3 veces mayor en camarones cultivados en sistemas con cero recambio, el cual promovía la generación de una fuente natural de alimento.

En un cultivo cerrado de *L. vannamei* con baja salinidad se determinó que la mayor biomasa y por lo tanto la mejor ecoeficiencia (42.9%) fue presentada por camarones alimentados con 25% de proteína en comparación con los organismos alimentados con altos porcentajes de proteína (40%) los cuales presentaron una biomasa menor (31.5%) una de las conclusiones de los autores es que los microorganismos tienen una contribución importante en la alimentación de *L. vannamei*. (González-Félix *et al.* 2007),

Yaemsooksawat y colaboradores (2009) concluyen que es factible disminuir el porcentaje de proteína a 24-31% pero solo después de 50 días de alimentarse con 36% de proteína y observa que hay una mejor ecoeficiencia a bajos nivel de proteína en la dieta con presencia de alimento natural. Determinan una mejor asimilación de proteína y menor concentración de compuestos nitrogenados a bajo nivel de proteína cruda de la dieta formulada en un cultivo intensivo (100 camarones/m²).

Otros autores también llegan a la conclusión que la productividad natural tiene un gran beneficio para el desempeño de *L. vannamei* en cultivo y es más notable en sistemas con flóculos microbianos, en los cuales hay una relación positiva con el contenido de proteína (Wasielesky *et al.*, 2006). Estas investigaciones demuestran que la microbiota natural en un sistema de cultivo intensivo tiene un papel importante contribuyendo a la incorporación del nitrógeno en biomasa del camarón, es decir, mejora su ecoeficiencia (Gonzales-Félix *et al.*, 2007).

2.4 Tecnologías alternativas

Durante los 90's el incremento en la producción se enfrentó a diferentes barreras para desarrollo, por ejemplo la intensificación se basó en altas tasas de recambios de agua, la cuales aumentaron el riesgo de transmisión de enfermedades, así como los costos del bombeo. Altas densidades de cultivo también implican el incremento de aeración el cual

acelera la velocidad del agua y con esto aumenta la erosión del suelo del estanque. En el 2001 los productores de camarón en el oriente y occidente empezaron a reducir el recambio de agua mediante el uso de diferentes tecnologías (Chamberlain, 2010).

a) Sistemas acuícolas de recirculación (RAS)

Una de las alternativas que se han desarrollado, a partir del conocimiento de que grandes recambios de agua que ya no es una opción aceptable para el control de la calidad de agua, son los sistemas de recirculación del agua a través de biofiltros, basados en el bombeo del agua hacia un módulo de tratamiento y el retorno de la misma hacia el cultivo. Los biofiltros básicamente son superficies pobladas de bacterias y otros organismos que metabolizan los metabolitos orgánicos en el agua. Los biofiltros mantienen condiciones aerobias para facilitar el proceso de la comunidad microbiana. Este tipo de tecnología es efectiva para remover los residuos acumulados en los estanques pero incrementa los costos de producción entre 20% a 40% (Avnimelech, 2012).

b) Tecnología de Bioflocs (BFT)

La tecnología de bioflocs o flóculos bacterianos conjunta el tratamiento del agua y el reciclamiento del alimento de sistemas intensivos. La tecnología de BFT se basa en la manipulación de microorganismos mezclados y aireados en los estanques con sistemas de cultivo de cero o bajo recambio de agua. Cuando existe una tasa de recambio de agua baja, la materia orgánica en el sistema aumenta, la cual se convierte en el sustrato de comunidades microbianas, las cuales obtienen su energía al metabolizar las moléculas orgánicas, tales como el amonio ($N-NH_4$). Por lo anterior, la intensificación del cultivo, la aeración, la mezcla y el limitado recambio de agua ayudan a la dominancia de comunidades microbianas en el estanque (Avnimelech, 2012).

La tecnología de biofloc es una de las estrategias utilizadas para mantener altas densidades de comunidades de organismos que son consumidas por el camarón en el estanque y la inclusión de diferentes sustratos en suspensión como fuente de carbono promueven la proliferación de comunidades bacterianas y en consecuencia fitoplancton y zooplancton (heterotróficas) (Porchas-Cornejo *et al.*, 2011; Avnimelech y Kochba, 2009).

Además del bajo recambio, es necesaria la acumulación de sustratos orgánicos para el mantenimiento de la dominancia por parte de la población microbiana heterotrófica, los cuales como ya se mencionó sirven como sustratos para el crecimiento bacteriano, donde la descomposición de la materia orgánica conduce a la producción de nuevo material celular microbiano, la cual representa del 40-60% de la materia orgánica. Para llevar a cabo el procesamiento de la materia orgánica es necesario cierta proporción de carbono y nitrógeno con el objetivo de obtener una manipulación adecuada de la biomasa microbiana, lo cual permitiría controlar la calidad del agua principalmente a través de la conversión de las especies potencialmente tóxicas de desechos nitrogenados a proteína microbiana, la cual forma parte del alimento de los organismos en cultivo (Avnimelech, 1999; Avimelech, 2006).

Por todo lo anterior las investigaciones acerca de la BFT han apoyado la idea de que el aumento de la biota natural promovida por este tipo de tecnologías, es una fuente natural de nitrógeno disponible y asimilado por los organismos cultivados. Lo anterior, contribuye a optimizar el reciclaje de proteínas mediante la adición de una fuente de carbono en forma de melaza y trigo para el control de la relación C:N (Bosma y Verdegem, 2011; Burford *et al.*, 2004; Emerenciano *et al.*, 2012; Kuhn *et al.*, 2008) y además al mantenimiento de la calidad del agua (Ballester *et al.*, 2010).

Burford y colaboradores en el 2004 determinan por medio de isotopos estables N¹⁵ que 22 al 28% de nitrógeno derivado de la microbiota natural, principalmente del material floculado, es convertido en biomasa del camarón después de 48 horas en presencia de alimento formulado con 24% de proteína. Además, observan que el nivel de retención está relacionado con la densidad del floculado.

Ballester y colaboradores (2010) mantienen una proporción de C:N de 20:1 por medio de la adición de materia orgánica directamente en el estanque para estimular la descomposición bacteriana de los compuestos de desecho en un cultivo intensivo (40 camarones.m⁻²) de *Farfantepenaeus paulensis*, donde es determinada la contribución de estos flóculos microbianos a la biomasa del camarón a diferentes niveles de proteína (25,

30, 35, 40 y 45 %), no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual lo atribuyen a la baja densidad de microorganismos como diatomeas y nemátodos en comparación con otros trabajos. Aun así, los autores determinan una mayor contribución (40%) de proteína microbiana derivada de los bioflocs que la reportada por Burford y colaboradores (2004).

c) Cultivo microbiótico

A diferencia de las investigaciones citadas en los párrafos anteriores, donde los microorganismos fueron generados en el estanque por medio de la incorporación de una fuente de carbono, Kuhn y colaboradores (2008) cultivaron los flóculos bacterianos en bioreactores a partir de sólidos disueltos y recolectados de efluentes de un cultivo de tilapia y posteriormente son incorporados al cultivo de camarón. A este tipo de tecnología recientemente se le ha identificado como cultivo microbiótico. Los autores concluyeron que los cultivos microbióticos representaron una importante fuente de alimento y aportaron al crecimiento específico de *L. vannamei*, debido a un mayor reciclamiento de compuestos de desecho del cultivo de tilapia.

En un trabajo reciente se observó que el crecimiento en otra especie de camarón (*F. brasiliensis*) en un cultivo hiper-intensivo (1000 camarones/m³) con alimento suplementario provenientes de sistemas de bioflocs no presentó diferencias significativas entre los camarones alimentados exclusivamente con dietas formuladas. Los autores resaltan la importancia del mantenimiento de comunidades microbianas benéficas para el crecimiento debido a la gran variabilidad y la sucesión de comunidades en los estanques y por lo tanto es necesario una herramienta de control para asegurar el aporte nutricional demandado por los organismos en cultivo (Emerenciano *et al.*, 2012).

El uso de nuevas tecnologías en los sistemas hiperintensivos conlleva diversos escenarios ambientales en los cuales se cultivan los camarones, dando lugar a diferentes factores que pueden provocar alguna respuesta de estrés por parte de los camarones. Los factores estresores que se presentan en dichas tecnologías alternativas, como RAS y BFT pueden ser clasificados en factores físicos (tamaño de estanques, material del estanque,

tamaño y densidad de partículas en suspensión), fisicoquímicos (variaciones de temperatura, salinidad, pH, O.D., fotoperiodo, NH₃, NO₂, entre otros) biológicos (excreción de compuestos nitrogenados, densidad de organismos, canibalismo, muda, entre otros) y productivos (nivel de proteína en la dieta, tasa de recambio de agua, estrategias de alimentación, manejo de los camarones, entre otros). Por lo tanto, es de suma importancia conocer la respuesta de estrés por parte de los camarones bajo diferentes factores estresores debido a que estos podrían comprometer el crecimiento de los camarones así como afectar la calidad de cosecha (Xia *et al.*, 2010; Yaemsooksawat *et al.*, 2009; González-Félix *et al.*, 2007; Mugnier *et al.*, 2008; Tacon *et al.*, 2002).

2.5. Concepto de estrés

Los organismos mantienen un equilibrio dinámico, llamado homeostasis, la cual es afectada constantemente por diversos factores externos denominados factores de estrés o factores estresores. El estrés se produce como respuesta del organismo a los factores estresores, por medio de diversos cambios fisiológicos y de comportamiento, con la finalidad de restablecer la homeostasis del organismo (Chrousos, 2009).

Los factores estresores se pueden clasificar de acuerdo con el tiempo del efecto de respuesta de los organismos. Los factores estresores agudos son eventos puntuales, por ejemplo los factores que incluyen la manipulación de los organismos (captura, transporte, biometría). Los factores estresores crónicos son eventos de mayor tiempo de duración, tales como la disminución en la concentración de oxígeno, grandes variaciones de salinidad, pH, temperatura, densidad de cultivo, son ejemplos de este tipo de factores. Los factores estresores contribuyen al deterioro fisiológico de los organismos en cultivo los cuales, son más susceptibles a infecciones y enfermedades y finalmente resultan en grandes mortalidades (Giesy *et al.*, 1981)

En particular, la excreción de compuestos nitrogenados por parte del camarón y los residuos de alimento en el sistema de cultivo deterioran la calidad del agua y lo cual representa una situación de estrés ambiental que pudiera debilitar la condición fisiología de los organismos (Limsuwan y Junratchakool, 2004)

La respuesta primaria de estrés, por parte de los organismos, es de origen hormonal que desencadena una respuesta secundaria que implican principalmente, la estimulación de la captación de oxígeno, cambios en la química sanguínea debido a la movilización de sustratos de energía, balance de electrolitos y la reasignación de energía para afrontar las condiciones adversas en lugar de utilizar ésta para el crecimiento y la reproducción, debido a que estos cambios fisiológicos tienen como fin la producción de energía para mantener la condición de homeostasis. (Chrousos, 2009; Hall y Ham, 1998).

Por lo anterior, diversos grupos de investigación se han dedicado a la búsqueda de indicadores del estado fisiológico, con el propósito de obtener herramientas de diagnóstico del cultivo. Por ejemplo, Rosas y colaboradores (2002) han trabajado con la concentración de metabolitos sanguíneos (glucosa, colesterol, acilglicéridos, proteínas y lactato), glucógeno de la glándula digestiva, niveles de oxi hemocianina (OxyHc) y la presión osmótica, bajo distintas condiciones de cultivo. Las investigaciones de Palacios y colaboradores se enfocan en las relaciones bioquímicas con la fatiga reproductiva de adultos *L. vannamei*, (Palacios *et al.*, 1999). Así mismo, se tiene caracterizada la respuesta metabólica bajo diferentes factores estresores tales como, el manejo intensivo (Mercier *et al.*, 2006) hipoxia ambiental (Racotta *et al.*, 2002; Mugnier *et al.*, 2008), incremento de ammonia (Racotta y Hernández-Herrera, 2000) y nitritos (Chen *et al.*, 1990; Colt y Armstrong, 1981) y salinidades y temperaturas extremas (Vargas-Albores *et al.*, 1998).

Se han propuesto principalmente los niveles de glucosa (Hall y van Ham, 1998), lactato, (Racotta y Palacios, 1998) y la capacidad osmoreguladora (Lignot *et al.*, 1999; Lignot *et al.*, 2000) como indicadores de la condición fisiológica de los organismos en cultivo.

A pesar de la extensa información acerca de la respuesta metabólica de los organismos hacia diversos factores estresores, la aplicación a nivel granja no es directa, debido a que la mayoría de los resultados están basados en condiciones de laboratorio o controladas, mientras que los organismos en granja son cultivados en condiciones muy

diferentes y por lo tanto no ha sido esclarecida la variación normal de los parámetros fisiológicos en los camarones cultivados en granja (Rosas *et al.*, 2002).

2.6 Carga energética adenilica (CEA)

Como ya se mencionó, los organismos presentan cambios metabólicos tales como la movilización de sustratos energéticos debido a la exposición a factores estresores, con la finalidad de producir la energía necesaria para restablecer la condición de homeostasis que fue alterada. En este sentido un indicador de ésta respuesta, es el cambio del estado energético celular de los organismos, como una respuesta del organismo bajo condiciones adversas, considerando que la homeostasis energética es esencial para asegurar una buena condición fisiológica para garantizar un óptimo desarrollo productivo del cultivo (Pascual *et al.*, 2004, Lucas, 1996).

Desde 1968 se ha descrito a la CEA como una relación que describe la regulación de la transferencia de energía por medio de sistemas enzimáticos catabólicos y anabólicos. La CEA es calculada por medio de la concentración de Adenosín Trifosfato (ATP), difosfato (ADP) y monofosfato (AMP), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Ésta relación presenta valores de 0 a 1, donde 1 indica una alta energía metabólica disponible, la cual disminuye conforme el valor se acerca a 0. (Atkinson, 1968 En Giesy *et al.*, 1981).

Posteriormente en 1980 Ivanovici propone el uso de la CEA como un índice que refleja la respuesta del estrés ambiental al cual son sometidos los organismos. Por lo anterior, se han realizado diferentes experimentos donde diversos organismos son sometidos a diferentes condiciones de cultivo en laboratorio o en condiciones naturales (Marazza *et al.*, 1996).

Por ejemplo Din y Brooks (1986) evalúan el uso de CEA como índice de la respuesta de estrés del fitoplancton a las condiciones tóxicas de su ambiente. Moal y colaboradores (1989) evalúan la utilización de ATP del ostión *Crassostrea gigas* por medio

de la CEA debido a la exposición al aire. Marazza *et al.* (1996) estudiaron el efecto de los niveles de amonio en la CEA y la sobrevivencia de un cultivo de camarón.

Otros componentes que definen la condición energética han sido tomados en cuenta debido a que la energía aportada por la hidrólisis aeróbica del ATP es sobrepasada por la demanda de energía en situaciones de extremo ejercicio, por ejemplo, el movimiento rápido de escape característico de algunos crustáceos (“tail-flip”). Bajo estas condiciones la producción de ATP es anaeróbica y su origen son fosfatos de alta energía aportados por los fosfágenos musculares, en crustáceos es el fosfato de arginina (ArgP). Por lo anterior el ArgP actúa principalmente como un buffer de ATP para que la demanda de energía sea cubierta rápidamente (England y Baldwin, 1983; Ellington, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento acelerado de la camaricultura intensiva para atender a la gran demanda de alimento conlleva grandes impactos en los ecosistemas donde se realizan este tipo de prácticas. Por ello, las investigaciones han redireccionado su enfoque para proponer estrategias que optimicen la respuesta productiva de los organismos cultivados, reflejándose en producciones mayores, supervivencias altas, y crecimientos más acelerados y mejores tasas de conversión alimenticia, con especial cuidado de aminorar los efectos ambientales mediante el manejo eficiente de los sistemas de cultivo implementados (Martínez-Cordova, 2008; Bosma y Verdegem, 2011).

La bibliografía concuerda en que para alcanzar un manejo eficiente en los sistemas de cultivo hiper e intensivos es necesario el desarrollo y mantenimiento de cadenas tróficas que ayuden al equilibrio de nutrientes, las cuales son llamadas comunidades de microorganismos (Páez-Osuna, 200; Martínez-Córdova, 2008, 2002). Al maximizar las comunidades de microorganismos en este tipo de cultivos se contribuye al reciclamiento de compuestos nitrogenados excretados por los camarones, y por lo tanto es posible aumentar la calidad del agua y disminuir la contaminación de efluentes descargados en zonas costeras y con esto evitar problemas ambientales como la eutrofización (Crab *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que el aprovechamiento de las comunidades de microorganismos en los sistemas de cultivo hiperintensivos e intensivos también permite minimizar la necesidad de alimento formulado, debido a que el alimento natural puede contribuir como alimento disponible para el camarón (Martínez-Córdova, 2002 y Crab *et al.*, 2007).

A pesar de la importancia de la implementación de nuevas tecnologías como sistemas amigables con el ambiente por medio de la utilización de comunidades de microorganismos en estos sistemas, son escasos los estudios que relacionan el efecto de estas tecnologías como bioflocs o cultivos microbóticos en bioreactores, con algunos indicadores de la condición fisiológica y nutricional de los camarones cultivados, que apoyen la hipótesis de que el alimento natural aporta suficientes nutrientes esenciales para el óptimo desempeño en cultivo y esto tiene lugar debido a la importancia de obtener cosechas de buena calidad y así conocer la factibilidad de la disminución del nivel de proteína en la dieta sin comprometer la condición fisiológica y nutricional de los camarones (Ballester *et al.*, 2010 y Martínez-Córdova, 2002, 2008).

4. OBJETIVO GENERAL

Conocer los niveles de nutrientes residuales, la ecoeficiencia, el desempeño productivo y la condición fisiológica de *Litopenaeus vannamei* con diferentes niveles de proteína en la dieta por el efecto de la micro biota en cultivos hiperintensivos.

4.1 Objetivos particulares

- Determinar la variación de los niveles de nutrientes residuales y la ecoeficiencia que generan los camarones cultivados con dietas con diferentes niveles de proteína y en presencia de microorganismos que asimilan estos nutrientes
- Evaluar el desempeño productivo en relación con el nivel de proteína en la dieta en presencia de microorganismos que asimilan los nutrientes residuales de nitrógeno.
- Analizar la condición fisiológica y nutricional de los camarones cultivados con diferentes niveles de proteína en la dieta en presencia de microorganismos que asimilan los nutrientes residuales de nitrógeno.

5. HIPÓTESIS

El aumento del nivel de proteína en la dieta aumenta la concentración de los nutrientes residuales de nitrógeno y fósforo en el medio. Entonces, en presencia de microorganismos que asimilan los nutrientes residuales, la disminución en el nivel de proteína en la dieta mejorará la ecoeficiencia y no afectará el desempeño productivo y la condición fisiológica de los organismos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Cultivo hiperintensivo

6.1.1. Experimento 1 (CIBNOR)

En el laboratorio de nutrición experimental del CIBNOR se realizó un cultivo hiperintensivo (300 organismos/m³) de *L. vannamei* con tres niveles de proteína en la dieta (25, 30, y 35%) de dietas comerciales, en presencia y ausencia de microorganismos capaces de asimilar el nitrógeno residual (microbiota) a lo largo de 69 días. Con lo anterior, se tuvieron 6 tratamientos con 6 réplicas cada uno, un total de 36 acuarios o unidades experimentales.

Los acuarios de 60 L de capacidad fueron llenados con aproximadamente 50 L de agua marina a una temperatura de 28±0.2 °C. En cada acuario se instaló un sistema de recirculación de agua, con el fin de mantener la suspensión de materia orgánica durante el experimento. El sistema consistió en un tubo de PVC con tapones en los extremos, colocado en el fondo y a lo largo del acuario. El tubo contaba con perforaciones para la inyección del aire en el fondo del acuario para mantener la suspensión de la materia orgánica. Adicionalmente se colocó un pedazo de manguera multiporo cerca de la superficie para lograr una mejor floculación de la materia orgánica.

Los acuarios con microbiota fueron “madurados” durante 11 días antes, con un inóculo inicial de 20 ml en cada acuario (20 ml 50L⁻¹), con inoculación posterior de 2 ml 50L⁻¹ cada tercer día durante todo el experimento. Un día antes de inocular los acuarios

correspondientes con microbiota, ésta fue mezclada con melaza (1.2 ml) con el fin de aumentar el número de células.

El cultivo microbiano o microbiota fue preparado cada tercer día a partir de un inóculo crecido abundantemente en biorreactor con ácidos orgánicos, urea y melaza bajo condiciones ambientales en la granja Acuicultura Mahr.

Los camarones fueron donados por la empresa Acuicultura Mahr y fueron aclimatados a condiciones de laboratorio durante dos días a una temperatura de 28 ± 0.2 °C en el laboratorio de nutrición experimental en tinas de 2000 L de capacidad.

El día 18 de agosto del 2012 se sembraron al azar 15 organismos de 0.5 a 0.8 g en cada acuario, los cuales fueron aclimatados a las unidades experimentales durante 7 días con seis alimentaciones (cada 4 horas) por 24 horas con alimento PURINA de 35% de proteína. Posteriormente, se inició el experimento (25 de agosto del 2012) con las dietas comerciales de 25, 30 y 35% de proteína (Natural Force® VIMIFOS). La tasa de alimentación fue alrededor del 5% de su biomasa al día. Se realizaron biometrías semanales para ajustar la tasa de alimentación de acuerdo al incremento de peso semanal.

Durante el cultivo se realizaron cuatro muestreos en los cuales se sacrificaron al menos 10 camarones por tratamiento. Debido a que la concentración de amonio subió rápidamente, el primer muestreo se llevó a cabo el día 9 de septiembre del 2012 cuando se registraron altas concentraciones de amonio. El cuarto muestreo fue realizado en la cosecha del cultivo (26 de octubre del 2012), con bajas concentraciones de amonio y con altas concentraciones de nitritos y nitratos. Los organismos fueron guardados a -70 °C para los análisis bioquímicos y de carga energética. Solamente en el último muestreo fue posible la toma de hemolinfa, la cual se analizó el mismo día.

En la tabla II se muestran los recambios de agua realizados en los acuarios con microbiota y en general fueron de 0-10% con algunas excepciones cuando se alcanzaron altos niveles de N-NO₂. Mientras que en acuarios de agua clara los recambios fueron de 50% al 90% diarios. Se midieron los parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto,

temperatura, salinidad y pH) en cada acuario dos veces al día (mañana y tarde). Cada tercer día se tomaron muestras de agua de cada acuario para el análisis de amonio, nitritos y nitratos.

Tabla II. Recambios realizados en acuarios con microbiota y agua clara.

Semana (días)	Recambios diarios (%)	
	Microbiota	Agua clara
1-5 (18-ago-12 a 22-sep-12)	0	50
5 (23-sep-12 a 29 sep-12)	5	50
6 (30 sep-12 al 01-oct-12)	5	0
6 (02-oct-12)	5	90
6-9 (03-oct-12 a 19-oct-12)	5	50
10 (20-oct-12)	50	50
10 (21,22-oct-12)	30	50
10 (23,24-oct-12)	0	50
10 (25,26-oct-12)	10	50

6.1.2. Experimento 2 (Seguimiento del cultivo hiperintensivo en Acuicultura Mahr)

Por otro lado, se realizó un seguimiento del cultivo hiperintensivo en granja bajo condiciones comerciales con los mismos niveles de proteína en la dieta y con presencia de microbiota integrada por microorganismos capaces de asimilar el nitrógeno residual.

Siete estanques a cielo abierto de 2500 m² de fondo y 1-1.1 m de profundidad fueron sembrados con densidad en promedio de 400-700 org m⁻³. En los primeros tres estanques se alimentó con 25% de proteína en la dieta, los siguientes dos con 30% y últimos dos con 35%. Los alimentos utilizados fueron Natural Force® VIMIFOS, mismo

alimento que fueron utilizados en el experimento 1. Previo a este experimento se realizó una maternidad en los siete estanques con la misma densidad y con el mismo alimento balanceado (40% de proteína), una vez concluida la maternización, los estanques fueron ajustados a las densidades de engorda descritas previamente. En el caso de los estanques 1, 2, 3 y 4 se llevó a cabo el paro total del cultivo entre la maternidad y la engorda, el cual dio fin a la etapa de maternidad. Los estanques 5, 6 y 7 continuaron directamente con la etapa de engorda, tal y como se observa en la tabla II, para ello se realizó un ajuste de la densidad por estimación de la población residual de la etapa previa de maternidad.

En la etapa de engorda, la alimentación fue ajustada diariamente con ayuda de charolas de alimentación y semanalmente por medio de biometrías con la finalidad de bajar el porcentaje de alimentación de 6% al 2% de la biomasa al final del cultivo. La alimentación se realizó cada 4 horas por 24 horas.

En cada estanque se contó con un sistema de microburbuja para asegurar la aireación, circulación, floculación, suspensión de la materia orgánica y mezcla con el agua de cultivo. Los recambios de agua fueron de 3-5% cada tercer día. Los estanques fueron monitoreados durante las 24 horas por medio de la medición de oxígeno disuelto, temperatura y salinidad. La temperatura y el oxígeno disuelto se midieron cada dos horas y la salinidad y pH cada dos días. Todos los estanques fueron inoculados con microbiota generada en bio-reactores con melaza (40-50 L/estanque) cada 4 días, la cual como ya se mencionó fue preparada en la empresa cada tercer día.

Tabla III. Características del cultivo hiperintensivo en granja en 7 estanques. *Color verde en el estanque.

Estanque	Nivel de proteína (%)	Siembra	Cosecha	días de cultivo		Reseteo	Observaciones
				Maternidad	Engorda		
1	25	25-jul	05-nov	46	54	SI	Muestreado
2	25	25-jul	18-nov	53	60	SI	No muestreado
3	25	29-jul	05-dic	51	75	SI	No muestreado
4*	30	03-ago	01-dic	46	62	SI	Muestreado.

5	30	07-ago	03-dic	66	NO	Muestreado.
6*	35	13-ago	18-nov	49	NO	Recambios 7% cada tercer día en 03-oct-12 al 18-nov-12.
7*	35	13-ago	02-dic	61	NO	

Para evaluar los parámetros fisiológicos se realizó un muestreo único el día 01-nov-12, en el cual se congelaron 30 camarones divididos en 3 grupos de 10 camarones en cada estanque. Solamente los estanques 1, 4, 5 y 6 fueron muestreados (tabla III). El primer grupo consistió en camarones que fueron congelados directamente en nitrógeno líquido, a este grupo se le nombro como “grupo basal sin toma de hemolinfa”. Al segundo grupo de camarones se les extrajo hemolinfa de la misma forma que los camarones cultivados en laboratorio y fue nombrado como “grupo basal con toma de hemolinfa”. Los camarones que conformaron el tercer grupo fueron colocados en una tina con agua del estanque pero sin aeración, durante 28 a 37 min, por lo que este grupo fue nombrado “grupo estrés”.

6.2. Determinación de la concentración de nutrientes residuales.

La concentración de nutrientes residuales que generó el cultivo, tales como, N-NH₃, N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃, P-PO₄, fueron monitoreados a lo largo del desarrollo del cultivo en presencia y ausencia de microorganismos que asimilan dichos nutrientes.

La metodología fue establecida en el laboratorio de análisis químico del agua del CIBNOR basada en técnicas colorimétricas, las cuales requieren la construcción de curvas de calibración para cada tipo de nutriente, con el objetivo de estandarizar las concentraciones y por último medir la absorbancia en un espectrofotómetro (Quikchen 8000 lacchat instruments).

Para las mediciones de concentración de amonio, nitritos y fósforos, las técnicas utilizadas se realizaron con base en el método sugerido por la NOM-AA-26 pero con adaptaciones a microplaca por el Laboratorio de Análisis químico de aguas en el CIBNOR (Hernandez-López y Vargas-Albores, 2003). El lector de microplaca utilizado fue Multiskan marca LabSystems Acent versión 1.3.1 (No. Cat. 1507540).

Amonio total (N-NH₄)

En cada muestra por triplicado se procedió de conformidad con el siguiente método:

- 1) Medir 250 µl de la muestra filtrada y ponerla en un pozo de microplaca
- 2) Agregar 10 µl de la solución fenol al 10%. Agitar
- 3) Agregar 10 µl de la solución nitroprusiato de sodio al 0.5%. Agitar
- 4) Agregar 50 µl de la mezcla oxidante (Hipoclorito de sodio en solución salina)
- 5) Incubar por 5 minutos
- 6) Leer absorbancia a 640 nm en lector de microplaca Multiskan.

Nitritos (N-NO₂)

En cada muestra por triplicado se procedió de conformidad con el siguiente método:

- 1) Medir 250 µl de la muestra filtrada y ponerla en un pozo de microplaca
- 2) Agregar 10 µl de reactivo de sulfanilamida. Agitar
- 3) Agregar 10 µl de la solución de clorhidrato de N-(1-naftil)-etilédiamina. Agitar
- 4) Incubar por 5 minutos
- 5) Leer absorbancia a 640 nm en lector de microplaca Multiskan.

Nitratos (N-NO₃)

En cada muestra por triplicado se procedió de conformidad con el siguiente método:

- 1) Colocar un volumen mínimo de 7.5 ml por muestras para analizar por triplicado
- 2) Agregar 0.2 ml de solución concentrada de Cloruro de Amonio por cada 10 ml de muestra y estándar
- 3) Colocar las gradillas de muestras en el automuestreador aleatorio
- 4) Iniciar la corrida cuando la línea base es uniforme en espectrofotómetro (Quikchen 8000 lacchat instruments).

Fosfatos (P-PO₄)

Esta determinación fue basada en la técnica propuesta por Murphy y Riley (1962), minaturizada por Hernández-López y Vargas-Albores (1993) en microplaca y adaptada en el laboratorio de Análisis químico de agua en el CIBNOR. En general se procedió de conformidad con el siguiente método:

- 1) Colocar en la microplaca 30 μL de solución reactiva de Heptamolibdato de amonio (0.6%), ácido sulfúrico (12.74%), ácido ascórbico (1.08%) y tartrato de sodio (0.0163%)
- 2) Agregar 250 μL de muestras en la microplaca
- 3) Incubar 10 min a temperatura ambiente
- 4) Leer a 655 nm en lector de microplaca Multiskan.

6.3. Determinación total de sólidos suspendidos (TSS)

Esta determinación solo se realizó para el experimento 1 (CIBNOR). La metodología para la determinación de total sólidos suspendidos fue basada en la norma mexicana NMX-F-527-1992 y modificada en el laboratorio de análisis químico de agua del CIBNOR, la cual se basa en la filtración del material suspendido en una muestra de agua y su evaporación total. Se procedió de conformidad con el siguiente método:

- 1) Poner a peso constante el filtro a utilizar. Se utilizó un horno a 105°C por dos horas y el filtro se mantuvo en un desecador hasta su uso
- 2) Pesarse el filtro y anotar el peso exacto. Devolver al desecador hasta su uso
- 3) Agitar la muestra
- 4) Tomar como mínimo 50 ml de la muestra y anotar el volumen exacto.
- 5) Filtrar por medio de una bomba al vacío
- 6) Enjuagar las sales de la muestra con ayuda de agua desionizada
- 7) Calentar el filtro con la muestra a 105 °C por dos horas (horno de secado Terlab XMTG-9000)
- 8) Colocar el filtro con la muestra filtrada en un desecador por 30 minutos
- 9) Pesarse el filtro con la muestras y anotar el peso exacto
- 10) Hacer los cálculos correspondientes

Sólidos suspendidos totales= Peso muestra filtrada (mg)/Volumen de filtrado (ml)

6.4. Medición del volumen de sólidos (VS)

Se determinó el volumen de los sólidos en los acuarios (experimento 1) y estanques (experimento 2) con el objetivo de conocer la cantidad de materia orgánica en suspensión en asociación con flóculos. La medición se realizó con ayuda de conos Imhoff, los cuales fueron llenados con 1.0 L de agua del estanque o acuario y al término de una hora se registró la cantidad de sólidos que sedimentaron en el cono, como se observa en la siguiente foto (Figura 1)



Figura 1. Medición del volumen de sólidos (VS).

La medición se realizó diariamente a partir del 17 de septiembre hasta el final del cultivo (26-octubre) en el caso del cultivo en CIBNOR, mientras que en el cultivo en granja se realizó a partir de 18 de octubre cada tercer día hasta el principio de las cosechas (25 de noviembre).

6.5. Determinación del tamaño de partícula

Este análisis solo se realizó para en el experimento 1 (CIBNOR). Se tomaron una muestra de agua (50 ml) de cada acuario con el tratamiento de microbiota, dos veces durante el experimento. La primera muestra fue tomada el 20 de septiembre y la segunda el 12 de octubre del 2012. El tamaño de partícula fue analizado por medio de un

autoanalizador de iones (lanchat instruments-quikchen FIA 8000 series) en el laboratorio de edafología en el CIBNOR.

6.6. Conteos celulares

Se realizaron conteos celulares de la microbiota que llegaba de la granja Acuacultura Mahr. Para cada muestra se realizaron diluciones 1×10^6 y posteriormente se vaciaba una alícuota de 10 μ l de la solución en un cámara de Neubauer. Las células de levaduras se contaron bajo microscopio y con la técnica de alta concentración celular. La concentración celular se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Cel/ml} = \text{Número de células} / \text{volumen (ml)}$$

6.7. Estado fisiológico y nutricional durante los cultivos

Para conocer el estado fisiológico y nutricional de los camarones cultivados tanto en granja como en laboratorio bajo los respectivos tratamientos, se midieron las concentraciones de hemocianina, proteínas totales, triglicéridos, glucosa y lactato en hemolinfa; proteínas totales, lípidos totales, triglicéridos, glucógeno y lactato en hepatopáncreas; proteínas totales, glucógeno, lactato, ATP y fosfato de arginina en músculo.

Tal como se mencionó en las secciones correspondientes de cada experimento, se realizaron dos muestreos. En el caso del experimento 1 (CIBNOR) en cada muestreo se sacrificaron un total de 60 camarones, considerando 10 camarones por 6 grupos, los cuales pertenecieron a 2 tratamientos (agua clara o microbiota) y a 3 niveles de proteína (25 o 30 o 35% proteína). La composición bioquímica en hepatopáncreas y músculo y los niveles de nucleótidos y fosfato de arginina en músculo fue analizada en ambos muestreos. En el primer muestreo, debido al pequeño tamaño de los organismos sólo se midieron dichos niveles en organismos completos. Adicionalmente en el segundo muestreo se analizaron las variables fisiológicas en hemolinfa.

En caso de experimento 2 en Acuacultura Mahr, se realizó un solo muestreo casi al final de ciclo de producción con un total de 120 camarones, considerando 10 camarones por

12 grupos experimentales: 3 condiciones de estrés(basal sin toma de hemolinfa, basal con toma de hemolinfa, estrés por confinamiento e hipoxia) y 4 estanques (ver Sección 6.2). Se analizaron las variables fisiológicas en hemolinfa (excepto grupo basal sin toma de hemolinfa), la composición bioquímica en hepatopáncreas y músculo y los niveles de nucleótidos y fosfato de arginina en músculo.

6.7.1 Medición de variables fisiológicas en hemolinfa

Se siguió la metodología establecida en el laboratorio de bioquímica fisiológica en el CIBNOR.

A partir del seno hemolinfático ventral se extrajeron aproximadamente 100 µl de hemolinfa con ayuda de una jeringa de 1 ml con aguja removible, previamente impregnada con oxalato de potasio al 5% (Racotta y Hernández-Herrera, 2000) como anticoagulante disuelto en una solución isotónica de crustáceos, llamada SIC (450 mM NaCl, 10 mM KCl, pH a 7.3) (Vargas Albores *et al.*, 1993). Se obtuvo el plasma a partir de la hemolinfa por medio de centrifugación a 800 g por 4 minutos a 4°C. El plasma obtenido se conservó en tubos Eppendorf a -20°C, para su análisis posterior.

Todas las variables medidas en hemolinfa fueron analizadas con técnicas adaptadas a microplaca y leídas en un espectrofotómetro Bio-Rad para la cuantificar la absorbancia. Cabe mencionar que se realizaron curvas de calibración para calcular la concentración de las distintas variables a medir.

6.7.1.1 Hemocianina

Se realizó una dilución 1:20 del plasma obtenido con agua des-ionizada y posteriormente se midió la absorbancia a 335 nm. La concentración de hemocianina se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración hemocianina} = (\text{absorbancia} \times \text{factor de dilución} \times 10) / E_{1\%}$$

Dónde:

$E_{1\%}$ representa el coeficiente de extinción de una solución de hemocianina al 1% y tiene valor de 2.83 (Hagerman, 1986).

Factor de dilución=20

La multiplicación por un factor de 10 es para expresar la concentración en mg ml^{-1} .

6.7.1.2 *Proteínas totales*

Esta medición fue basada en el método de Bradford (1976) adaptado a microplaca por Sigma-Aldrich (2006). En este método hay una reacción de los grupos amino libres con el azul de Comassie en presencia de ácido fosfórico y etanol produciendo un compuesto colorido, cuya concentración es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra. Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (ABS, Sigma) con concentraciones de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 mg ml^{-1} , utilizando agua desionizada como diluyente y blanco. Con el objetivo de obtener una lectura dentro de la curva de calibración, el plasma se diluyó (1:300) (Licon-Jain, 2012) y para cada muestra se procedió de la siguiente manera:

- 1) Tomar 10 μl de la dilución y colocar en un pozo de microplaca
- 2) Agregar 200 μl de reactivo de Bradford (Sigma) y agitar
- 3) Incubar 5 minutos
- 4) Leer a 595 nm en lector de microplaca Multiskan.

6.7.1.3 *Triglicéridos*

Los triglicéridos en hemolinfa fueron determinados por medio de un kit comercial (GPO-PAP, Randox, Crumlin, Reino Unido), en el cual la solución reactiva que se utilizó contiene lipasas que hidrolizaron a los triglicéridos, formando un producto colorido (quinoneimina cuya intensidad es medida con la absorbancia. El blanco fue agua desionizada y la curva de calibración se realizó con concentraciones de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg dl^{-1} . Se procedió de la siguiente manera:

- 1) Tomar 20 μl de plasma y colocarlo en un pozo de microplaca
- 2) Agregar 200 μl de la solución reactiva del kit comercial

- 3) Incubar por 20 min
- 4) Determinar absorbancia a 540 nm en lector de microplaca Multiskan.

6.7.1.4. *Glucosa*

La determinación de la concentración de la glucosa fue por medio del método enzimático con ayuda de un kit comercial (GOD-PAP, Boehringer Mannheim GMBH, Biberach, Alemania) y fue de la siguiente manera:

- 1) Tomar 20µl del plasma y colocarlo en un pozo de microplaca.
- 2) Agregar 200 µl de solución reactiva del kit comercial e incubar por 30 minutos
- 3) Determinar la absorbancia a 490 nm en lector de microplaca Multiskan.

Este método enzimático consiste en la preparación de una solución que reacciona con fenol y 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa y forma un cromógeno rojo-violeta, cuya absorbancia registrada por el lector de microplaca es proporcional a la concentración de la glucosa en la muestra.

En este caso se realizó la curva de calibración a partir de una solución estándar de glucosa (100 mg dl⁻¹) con concentraciones de 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg dl⁻¹, como blanco se utilizó agua des-ionizada.

6.7.1.5. *Lactato*

La determinación de lactato se realizó con ayuda del kit comercial PAP (Randox, Crumlin, Reino Unido) y al igual que en el caso anterior consiste en la preparación de una solución reactiva, la cual realiza una oxidación enzimática del lactato a piruvato con la formación de peróxido de hidrógeno y éste es oxidado por una peroxidasa para formar un cromógeno de color violeta, cuya absorbancia detectada por el lector de microplaca es proporcional a la concentración de lactato en la muestra.

La curva de calibración a partir de la solución estándar se realizó con concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 mg dl⁻¹ y el blanco con agua des ionizada.

El procedimiento a seguir fue:

- 1) Realizar diluciones del plasma en agua des ionizada en una proporción 1:4, en los casos que se necesitó, cuando la densidad óptica fue >2 .
- 2) Tomar 20 μ l de la dilución o plasma y colocarlo en un pozo de microplaca
- 3) Agregar 200 μ l de solución reactiva e incubar 10 minutos
- 4) Determinar la absorbancia a 540 nm en lector de microplaca Multiskan.

6.7.2. Medición variables fisiológicas en camarones completos o en hepatopáncreas y músculo

Primeramente los organismos de cada muestreo inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C. En el caso del primer muestreo del experimento 1 (CIBNOR) los camarones completos fueron pulverizados con ayuda del homogeneizador criogénico de balines (Restch-MM400) y con nitrógeno líquido, es decir estos camarones no fueron disectados para la separación del musculo y hepatopáncreas, debido a la dificultad para separarlos y al pequeño tamaño del hepatopáncreas. Se registró el peso del camarón completo. Los camarones del segundo muestreo del experimento 1 y los del muestreo del experimento 2 (Acuicultura Marh) se disectaron sobre una placa fría aproximadamente para separar 100-150 mg de hepatopáncreas y músculo del primer segmento abdominal y se registró el peso de cada tejido.

El siguiente procedimiento fue igual en todos los muestreos de ambos experimentos. Los tejidos se liofilizaron por 24 horas en una liofilizadora Virtis SP-Industries modelo bench top 3.5. Las muestras secas fueron pulverizadas en una homogeneizador de tejidos Fast PREP-24 MO-Biomedicals modelo 6004-500.

Por último, las muestras se hidrataron con 1 ml de una solución isotónica de crustáceos (SIC) y nuevamente los extractos fueron homogenizados para los análisis correspondientes.

Todas las variables medidas en los tejidos fueron analizadas con técnicas adaptadas a microplaca y leídas en un espectrofotómetro de microplacas Miltiskan Spectrum Thermo

Scientific para cuantificar la absorbancia. Cabe mencionar que se realizó una curva de calibración para calcular la concentración de las muestras.

6.7.2.1. *Proteínas totales*

En el caso de este análisis se utilizaran las lecturas de un espectrofotómetro (UNICO, UV-2100; Dayton, NJ, USA). Esta medición se realizó con base en el método de Bradford (1976) de la siguiente manera para cada muestra:

- 1) Tomar 40µl del homogenizado de músculo o 25 µl de hepatopáncreas y agregar 500µl u 800 µl en el caso del músculo de NaOH (0.1 N). Agitar
- 2) Digerir durante 2 horas.
- 3) Tomar 10 µl de la muestra digerida y agregar 1 ml de reactivo de Bradford. Agitar
- 4) Incubar por 5 minutos
- 5) Determinar absorbancia a 595 nm en lector de microplaca Multiskan.

Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (ABS, Sigma) con concentraciones de 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, mg ml⁻¹ y con un blanco con agua des ionizada.

6.7.2.2 *Lípidos totales*

Basado en el método de sulfofosfovainillina de Barnes y Blackstock (1973) en el cual los lípidos no saturados, en presencia de ácido sulfúrico y calor, forman iones que al estar en contacto con la fosfovainillina dan una coloración rosada cuya intensidad es proporcional a la concentración de lípidos totales en la muestra. La curva de calibración fue elaborada con las siguientes concentraciones 0.188, 0.37, 0.75, 1.5, 3.01, 6.025, 12.05, 24.1 mg ml⁻¹ a partir de un kit comercial (Lipid LIN-TROL, Sigma) así como el blanco. La técnica consistió en:

- 1) Tomar 25 µl del homogenizado y agregar 250 µl de H₂SO₄ concentrado. Agitar
- 2) Calentar a 90 °C en baño maría por 10 minutos
- 3) Enfriar en baño con hielo

- 4) Colocar 5 μl en un pozo de microplaca (dilución *in situ*)
- 5) Agregar 200 μl de vainillina
- 6) Incubar por 40 minutos a temperatura ambiente
- 7) Determinar absorbancia a 540 nm en lector de microplaca Multiskan.

6.7.2.3 Triglicéridos

Se utilizó el mismo kit comercial (GOD-PAP, Randox) y la misma curva de calibración que para hemolinfa.

Se utilizaron 5 μl del homogenizado y se colocó en un pozo de microplaca (dilución *in situ*) y el resto del procedimiento fue similar que para hemolinfa

6.7.2.4 Glucógeno y Lactato

Esta determinación se realizó utilizando el mismo kit comercial PAP (Randox, Crumlin, Reino Unido). El mismo procedimiento y la misma curva de calibración para lactato. Y para glucógeno se utilizó una curva de calibración de 0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25 y 2.5 mg ml^{-1} y como blanco se utilizó agua destilada. Se procedió de la siguiente manera:

- 1) Tomar 100 μl de homogenizado y añadir 100 μl de TCA al 20% a 4 °C
- 2) Centrifugar a 2100 g (3500 rpm) por 10 min a 5 °C
- 3) Recuperar 20 μl de sobrenadante para el análisis de lactato y 25 μl de sobrenadante para el análisis de glucógeno, colocarlos en un pozo de microplaca

Glucógeno

- 4) Agregar 250 μl de etanol a 4 °C y 10 μl de sulfato de sodio anhídrido al 20%
- 5) Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C
- 6) Eliminar el sobrenadante y evaporar el etanol residual en un horno a 70 °C
- 7) Agregar a la muestra seca 25 μl de agua des ionizada y 250 μl de solución antrona al 1% en H_2SO_4 al 80%
- 8) Agitar la muestra
- 9) Colocar en baño caliente a 80 °C por 10 minutos

- 10) Enfriar en baño con hielo por 5 minutos
- 11) Leer absorbancia a 630 nm en lector de microplaca Multiskan.

6.7.3. Medición de Carga Energética Adenilica (CEA) en músculo del camarón o en el camarón completo

Para determinar las concentraciones de ATP, ADP y AMP se procedió según la metodología de Le Coz (1989) y Moal *et al.*, 1989 con modificaciones realizadas en el laboratorio de metabolismo de lípidos del CIBNOR. Primeramente, se disectó sobre una placa fría el primer segmento abdominal al cual se les quitó el exoesqueleto y se homogenizó o pulverizó con ayuda del homogeneizador criogénico de balines (Restch-MM400) y con nitrógeno líquido para evitar el descongelamiento del musculo.

En el caso del primer muestreo del experimento 1 (CIBNOR) los camarones completos fueron pulverizados, es decir sin disectar ni quitar el exoesqueleto, debido a la dificultad para separar el hepatopáncreas y al pequeño tamaño del mismo. Los camarones del segundo muestreo del experimento 1 y los del muestreo del experimento 2 (Acuacultura Marh) se procesaron de la manera anteriormente mencionada.

A partir del polvo obtenido, se tomaron 150 mg de tejido sobre una placa fría e inmediatamente después se homogenizaron en 1.5 ml de ácido tricloroacético (TCA; 0.5 M) a 4 °C. Posteriormente, sin que transcurriera más de una hora, las muestras se centrifugaron a 1800 g a 4°C por 10 minutos y se siguieron los siguientes pasos en cada muestra:

- 1) Recuperar 0.5 ml de sobrenadante y agregar 1.3 ml de una mezcla recién preparada de trioctilamina y diclorometano 1:5.
- 2) Mezclar con vórtex por 30 s
- 3) Centrifugar a 800 g por 5 min a 4°C y verificar el pH a 6-7
- 4) Recuperar 200 µl totales de sobrenadante que se dividieron en alícuotas de 50 µl
- 5) Almacenar a -70 C

La cuantificación se realizó por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa. Se utilizó una columna Hyperclone ODS (C18) 3 μm 150 x 4.6 mm (PHENOMENEX No. Cat 00F-4356-EO), con una fase móvil 0.15 M de $\text{NaH}_2\text{P-PO}_4$, 0.003 M de tetrabutilamonio, al 8% de metanol y ajustado a pH de 6 con NaOH 5 N, la corrida de cada muestra tuvo una duración de aproximadamente 20 minutos a un flujo de $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Se emplearon estándares de ATP, ADP, y AMP (Sigma) para la identificación de picos y el cálculo de concentración en las muestras.

6.7.4. Medición de Fosfato de arginina (Arg-P) en músculo

Para la determinación de Arg-P se utilizó el mismo extracto que en el caso de CEA. El Arg-P fue cuantificado en cada muestra por HPLC de fase reversa pero con una columna SphereClone NH_2O 5 μm 250 x 4.6 mm (PHENOMENEX), utilizando una fase móvil 20 mM de $\text{KH}_2\text{P-PO}_4$ a pH 2.6, con acetonitrilo en una proporción de 72:28 respectivamente, durante 15 min a un flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Viant *et al.*, 2001). Se empleó estándar de Arg-P (Santa Cruz) para la identificación del pico de Arg-P y el cálculo de su concentración.

6.8. Desempeño en cultivo

A lo largo del cultivo en laboratorio y en granja, el crecimiento específico semanal (CES), el factor de conversión alimenticia (FCA), la eficiencia alimenticia (EA), la eficiencia proteica (EP), la supervivencia (S), la tasa de crecimiento semanal (k) y la tasa de desempeño productivo (D), fueron determinados con el fin de conocer el desempeño de los camarones en cultivo intensivo.

Dichos parámetros fueron medidos de acuerdo a las siguientes formulas:

$$\text{CES} = 100 \times [\ln(\text{peso inicial en gramos}) - \ln(\text{peso final en gramos})] / \text{días de muestreo}$$

$$\text{FCA} = \text{peso húmedo ganado (g)} / \text{alimento seco proporcionado (g)}$$

Basado en Xia *et al.* (2010).

$$\text{EA} = \text{peso húmedo ganado (g)} / \text{proteína ingerida (g)}$$

EP = peso húmedo ganado (g)/ proteína ingerida

S (%) = 100 x (número final de organismos/ número inicial de organismos)

Basado en Hu *et al.*, 2008.

K= Incremento de peso semanal/ días de cultivo

D= (S%/100)*k / FCA

6.9. Análisis químico proximal

Para conocer las características de los alimentos y la composición de los organismos, se realizó el análisis proximal de los alimentos comerciales con diferente nivel de proteína al igual de los organismos cultivados en CIBNOR y en la granja Acuacultura Mahr. Todas las determinaciones fueron realizadas por el laboratorio de análisis químico proximal en el CIBNOR.

8.1. Determinación de humedad

Por medio del método de pérdida de peso se realizó la determinación de la humedad de los diferentes alimentos de la siguiente manera:

- 1) Poner a peso constante una cápsula de porcelana y pesar en ella 2gr de muestra
- 2) Desecar en horno a 105 °C durante 4 hrs
- 3) Dejar enfriar en desecador durante 40 min
- 4) Pesar la muestra seca
- 5) Realizar cálculos correspondientes

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso capsula+muestra húmeda} - \text{Peso capsula+muestra seca}}{\text{Peso muestra húmeda}} \times 100$$

8.2. Determinación de cenizas

La fracción de cenizas representa el material mineral contenido en el material biológico, el cual se elimina por medio de incineración de la siguiente manera:

- 1) Poner a peso constante una cápsula de porcelana

- 2) Pesar 2g del material residual de la determinación de humedad
- 3) Incinerar en mufla a 600 °C durante 5 hrs.
- 4) Colocar la cápsula en la estufa a 100 °C y enfriar en desecador durante 40 min
- 5) Pesar y hacer los cálculos correspondientes

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{peso cápsula con cenizas} - \text{Peso cápsula vacío}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

8.3. Determinación de proteína cruda

Esta determinación realizada por el método de combustión directa (DUMAS) por medio del equipo Leco FP-528. El método DUMAS se basa en la determinación del nitrógeno total el cual es un estimado del contenido total de proteína, incluyendo polipéptidos y aminoácidos. La determinación de nitrógeno es a partir de la mezcla de la muestra con óxido de cobre en una atmósfera de dióxido de carbono, donde los gases emanados de la combustión se redujeron en cobre y el nitrógeno molecular, el cual fue determinado volumétricamente.

El procesamiento consistió en la combustión de la muestra analizada en el equipo, de la siguiente manera:

- 1) Pesar la muestra y colocarla en el horno de combustión
- 2) Presionar el botón start
- 3) Colectar los gases de la combustión
- 4) Los gases colectados son homogenizados y mezclados con oxidó de cobre para reducir los NOx a N₂
- 5) Medición de la concentración de N₂
- 6) Resultado transmitido a la red de datos

6.10. Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) bifactorial con el propósito de evaluar el efecto de diferentes niveles de proteína (25, 30 y 35%) y la presencia y ausencia de organismos capaces de asimilar compuestos residuales a lo largo del cultivo, así como su efecto combinado de los tratamientos.

En el caso del cultivo en granja también se realizó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial para evaluar las diferencias debido al grupo (basal sin toma de hemolinfa, basal con toma de hemolinfa y estrés) y/o por el número de estanque.

En ambos casos se verificó que los datos cumplieran con los postulados de homogeneidad de varianza y normalidad.

7. RESULTADOS

7.1. Nutrientes residuales

7.1.1. *Experimento 1: Cultivo hiperintensivo en condiciones de laboratorio (CIBNOR)*

Nitrógeno Amoniacal Total (TAN= N-NH₄ + N-NH₃), nitritos (N-NO₂) y nitratos (N-NO₃) en cultivo de CIBNOR.

La concentración de TAN (N-NH₄ + N-NH₃) a lo largo del cultivo realizado en CIBNOR se muestra en la figura 2, donde se observa que en los acuarios con microbiota la concentración empieza a subir a los cuatro días de cultivo, hasta alcanzar un máximo de concentración a los 18 días después de la siembra (5.8 TAN mg L⁻¹). El tratamiento con microbiota presentó las mayores concentraciones de TAN, cuatro veces mayores que en el cultivo en agua clara (AC), el cual presentó concentraciones por debajo de 1.48 mg L⁻¹ durante todo el cultivo. En ambos tratamientos los niveles de TAN estuvieron directamente relacionados con el nivel de proteína en la dieta, siendo 35% de proteína el nivel que presentó mayores concentraciones (Figura 2).

En acuarios con microbiota después de la semana tres la concentración de TAN disminuyó rápidamente hasta niveles comparables a los acuarios de agua clara y se mantuvo a bajas concentración hasta el final del cultivo (Figura 2). En particular, en el tratamiento con microbiota la concentración de N-NH₃ fue diferente significativamente entre el porcentaje de proteína del alimento en las primeras tres semanas de cultivo (Figura 3), en las cuales la concentración en el agua residual con 35% de proteína, fue la mayor

concentración ($0.20 \text{ N-NH}_3 \text{ mg L}^{-1}$), seguido del tratamiento con 30% de proteína ($0.17 \text{ N-NH}_3 \text{ mg L}^{-1}$) y por ultimo con 25% de proteína en la dieta ($0.14 \text{ N-NH}_3 \text{ mg L}^{-1}$). Los niveles de N-NH_3 en tratamiento de agua clara se mantuvieron por debajo de $0.1 \text{ N-NH}_3 \text{ mg L}^{-1}$. La disminución de N-NH_4 y de N-NH_3 también coincidió con el aumento de la concentración de nitritos (N-NO_2), tal y como se muestra la figura 4.

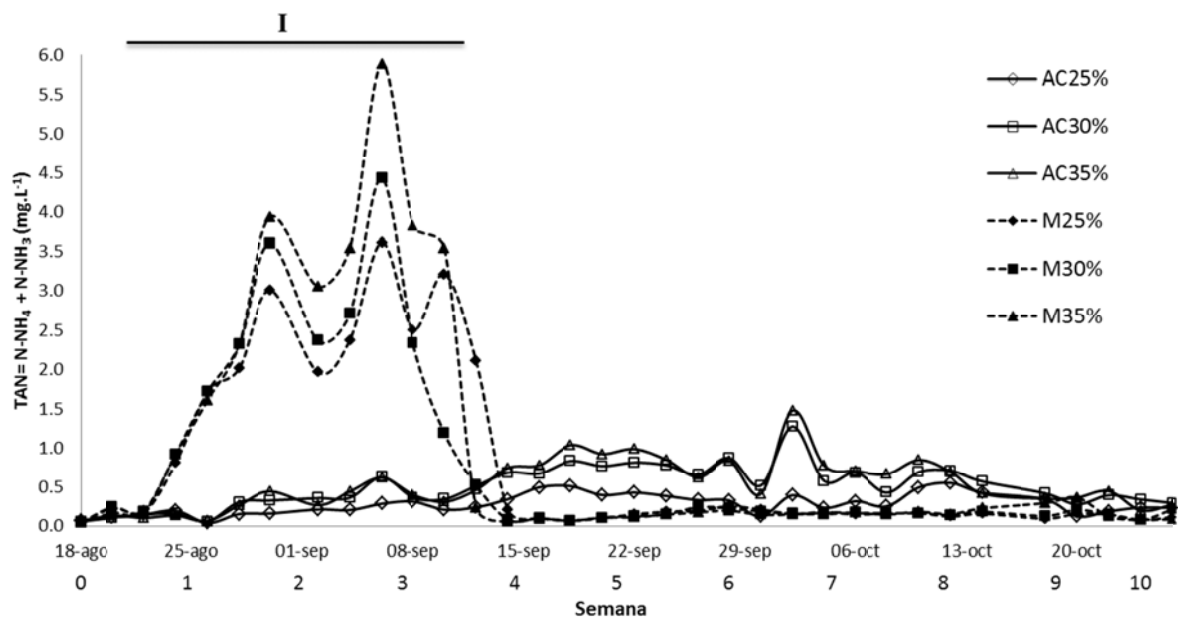


Figura 2. Concentración de TAN ($\text{N-NH}_4 + \text{N-NH}_3$) en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína del cultivo en CIBNOR.

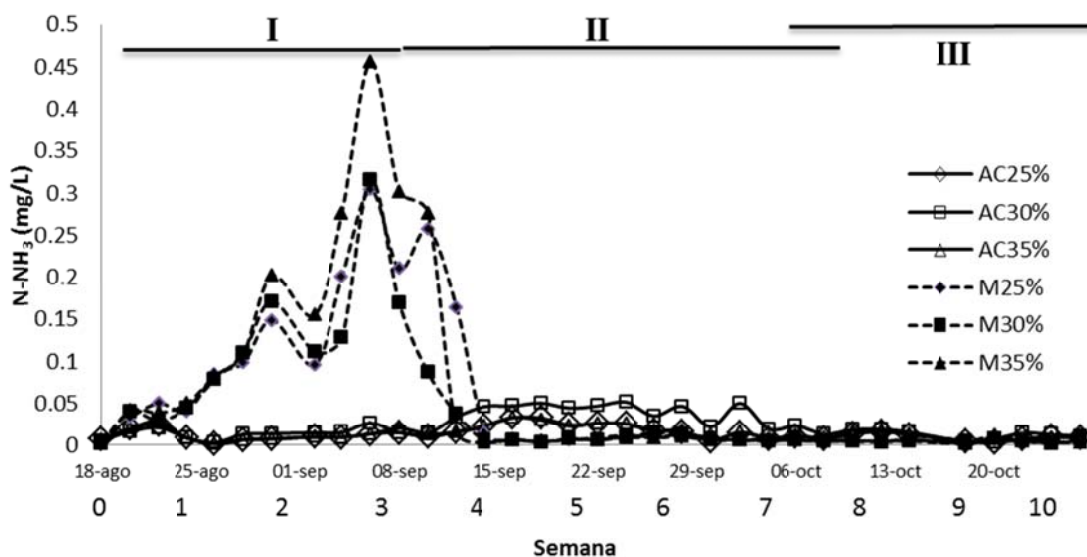


Figura 3. Concentración de N-NH₃ en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína del cultivo en CIBNOR.

Nitrógeno de Nitritos y Nitratos (N-NO₂ y N-NO₃) en cultivo de CIBNOR

Al igual que en la concentración de N-NH₄ y N-NH₃, los niveles más altos de N-NO₂ y N-NO₃ se obtuvieron con 35% de proteína en la dieta. La concentración de N-NO₂ y N-NO₃ en acuarios con microbiota se diferenció del tratamiento con agua clara (AC) a partir de los 20 días de cultivo (semana tres) con un máximo de aproximadamente 11 N-NO₂ mg.L⁻¹ y 1.0 N-NO₃ mg L⁻¹. La concentración de N-NO₂ y N-NO₃ presentaron una disminución, por los recambios de agua (10%) que se realizaron después de la semana cinco, posteriormente y entonces el contenido de N-NO₂ y N-NO₃ aumentó hasta alcanzar un nuevo máximo de 33.2, 31.7 y 25.4 N-NO₂ mg L⁻¹ y 5.5, 4.2 y 2.5 N-NO₃ mg L⁻¹, para los niveles de 25, 30 y 35% de proteína en la dieta, respectivamente (figura 4 y 5). En particular el pico de N-NO₃ con el nivel de 35% de proteína, se presentó dos días después del pico de N-NO₂, mientras que los picos de N-NO₃ para 25% y 30% de proteína se presentaron cuatro días antes del máximo de N-NO₂ (figura 4 y 5).

Después de la semana nueve de cultivo se realizaron fuertes recambios (30%) en los acuarios con microbiota debido a mortalidades registradas en la biometría correspondiente a esa semana. La disminución en las concentraciones de N-NO_2 y N-NO_3 por efecto de dichos recambios se observó a partir de la semana 9. Al final del cultivo se registró un nuevo aumento en el contenido de N-NO_2 y N-NO_3 (figura 4 y 5).

El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) es la suma de nitrógeno que proviene del N-NH_3 , N-NO_2 y N-NO_3 . En la Figura 6 se muestra la acumulación de NID a lo largo del ciclo de cultivo, donde se observa que la mayor concentración se presentó entre la semana 8 y 9. Al igual que en el caso de los demás nutrientes el NID fue significativamente mayor en el tratamiento con microbiota en comparación con agua clara. Además el NID se encontró relacionado con el nivel de proteína, por lo que el máximo obtenido se presentó con 35% de proteína (39.03).

En la figura 7 se muestra el comportamiento de P-PO_4 a lo largo del cultivo. El P-PO_4 aumenta progresivamente en las primeras tres semanas de cultivo, mientras en las siguientes semanas varía entre 0.3 a 0.85 mg L^{-1} . Por último a partir de la semana siete se observó un aumento que triplicó la concentración de P-PO_4 y posteriormente a la siguiente semana se reportó una disminución por debajo de niveles no detectables con la metodología aplicada. Al final de cultivo la concentración de P-PO_4 disminuyó de nuevo posterior al recambio de agua del sistema de cultivo.

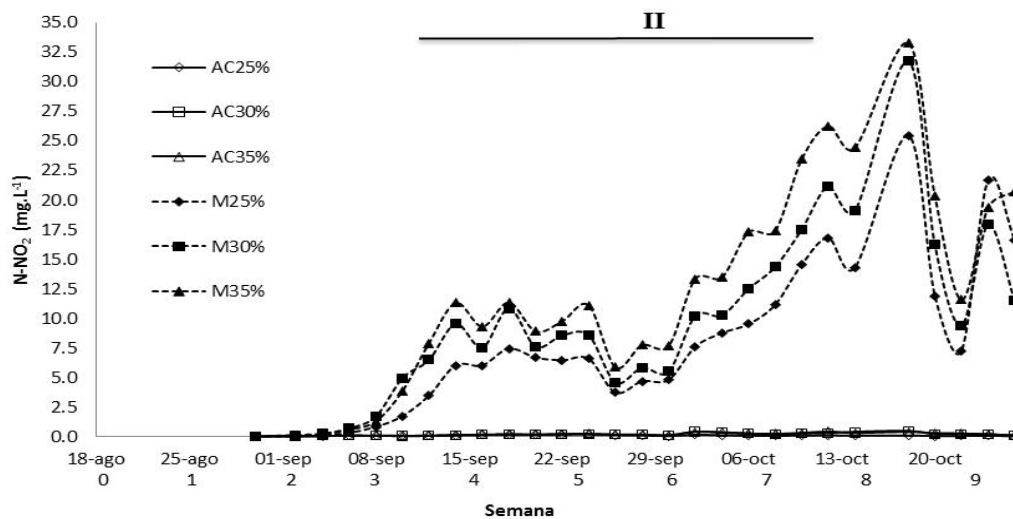


Figura 4. Concentración de N-NO₂ en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.

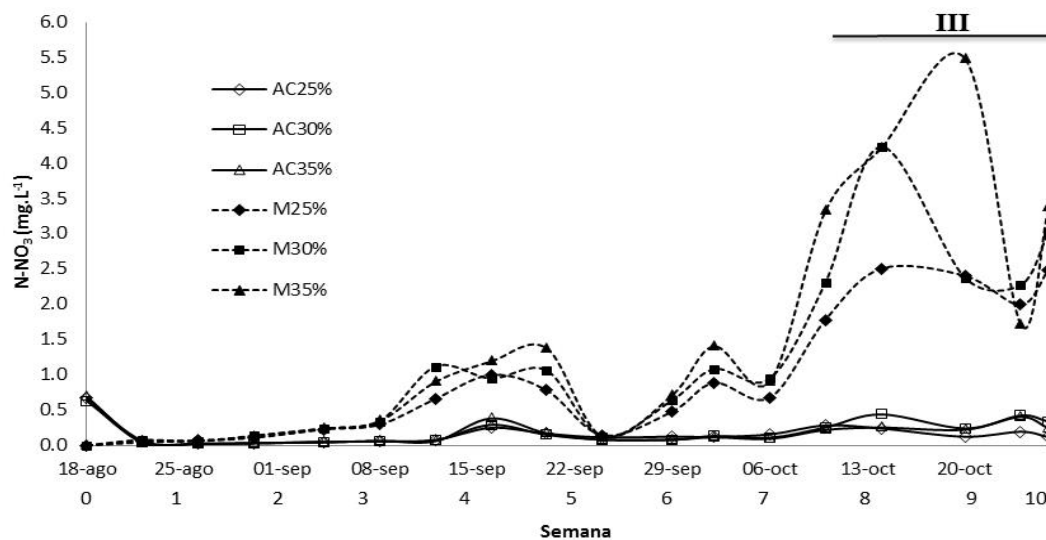


Figura 5. Concentración de N-NO₃ en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.

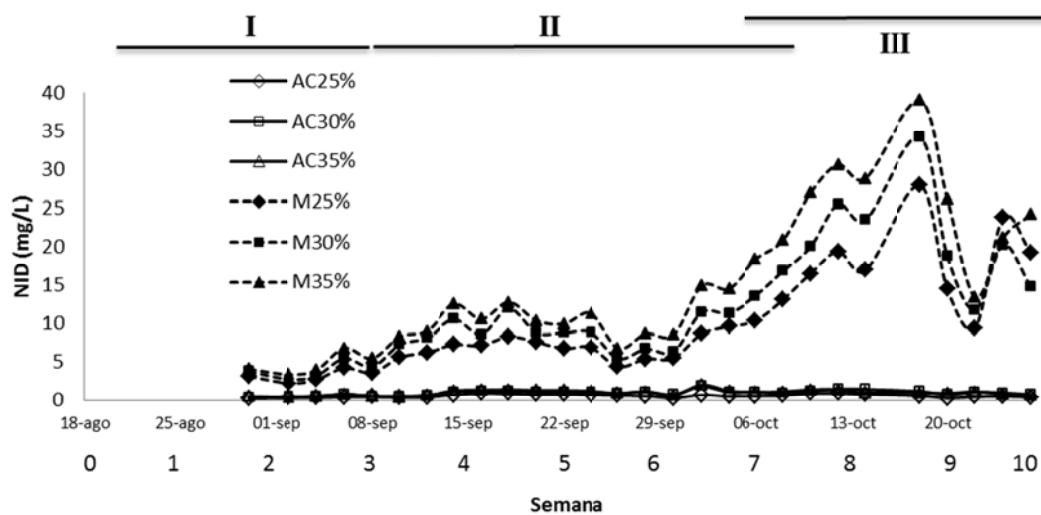


Figura 6. Nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.

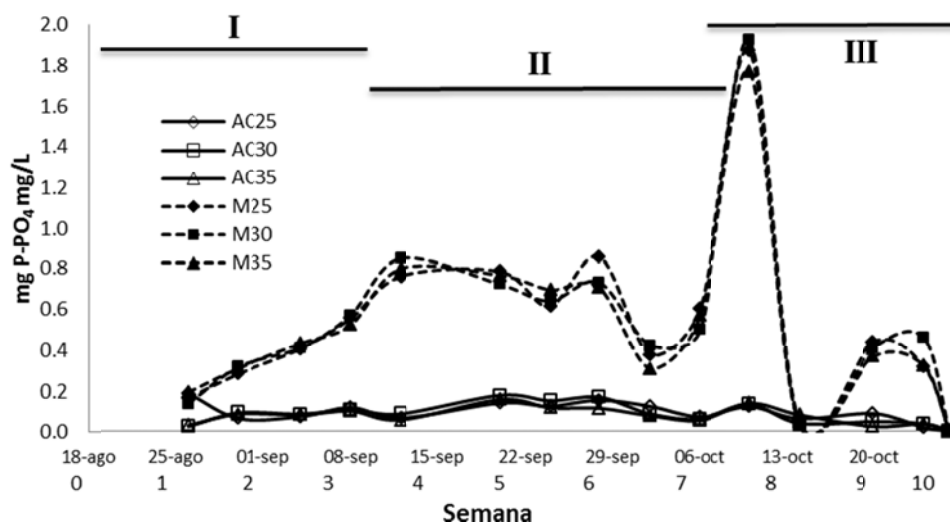


Figura 7. Concentración de P-PO₄ en el agua del tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.

7.1.2. Experimento 2: Cultivo hiperintensivo bajo condiciones de granja (Acuicultura Marh)

Nitrógeno Amoniacal Total ($TAN = N-NH_4 + N-NH_3$), nitritos ($N-NO_2$) y nitratos ($N-NO_3$) en cultivos de Acuicultura Marh

La concentración de los nutrientes residuales en el sistema de cultivo intensivo a lo largo de los 7 estanques se muestra en las figuras 9, 10 y 11, en las cuales se registró la concentración de TAN ($N-NH_4 + N-NH_3$) de la maternidad (25 julio al 19 septiembre 2012). Es importante recordar que en los estanques 1, 2, 3 y 4 se realizó paro total del cultivo entre la etapa de maternidad y la etapa de engorda, en el cual los estanques fueron lavados y después se resembró y se empezó el ciclo de engorda, esto se indica con una letra R en las figuras correspondientes. Diferentes observaciones del cultivo de engorda se muestran en la figura 8.

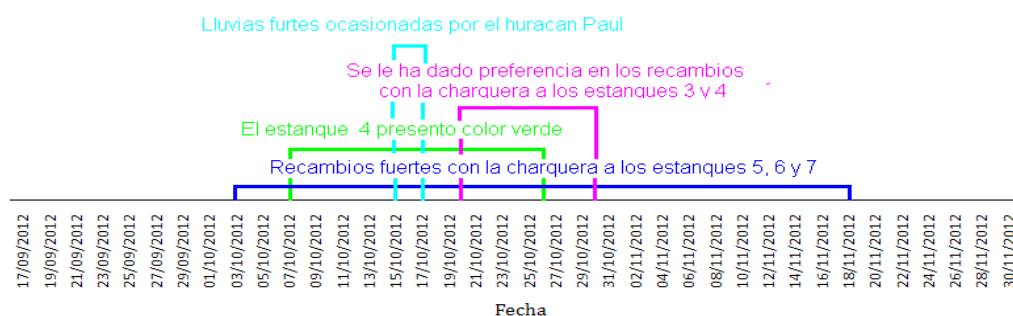


Figura 8. Observaciones generales en el cultivo en granja del experimento 2 (Acuicultura Mahr).

Por lo anterior en el estanque 1 (25% de proteína), se observó que la concentración de TAN alcanzó a un máximo de 24.8 mg L^{-1} en la maternidad (29 de agosto). Posteriormente no se realizaron mediciones durante la interrupción del cultivo hasta el 13 de septiembre. Después de que el estanque fue resembrado, la concentración de TAN empezó a subir y alcanzó un máximo de 14.4 mg L^{-1} a los 18 días de cultivo y posteriormente la concentración disminuyó hasta valores comparables a los del principio del cultivo. Ésta disminución de TAN en la engorda, correspondió al aumento de $N-NO_2$ y

N-NO₃ a partir del 07 de octubre y 09 de octubre, respectivamente; que alcanzaron un máximo de 13.8 N-NO₂ mg L⁻¹ y 3.9 N-NO₃mg L⁻¹ (Figura 9).

Los nutrientes residuales del estanque 2 se comportaron casi de la misma manera que en el estanque 1 con un máximo en la maternidad de 23.7 N-NH₄ + N-NH₃ mg L⁻¹. En el caso del estanque 2 se logró observar una disminución de la concentración de TAN en la maternidad, debido a que el paro del cultivo fue hasta el 13 de septiembre, 14 días después del paro en el estanque 1. Esta disminución también correspondió al aumento de N-NO₂ y N-NO₃, los cuales alcanzaron niveles máximos de 19.5 y 6.7 mg L⁻¹, respectivamente. El ciclo de cultivo de engorda empezó con concentraciones de TAN ligeramente mayores a lo esperado (4.9 mg L⁻¹), tal vez debido a la falta de secado total de dicho estanque entre las etapas de maternidad y engorda, aunque la concentración de TAN disminuyó en seis días y se mantuvo en niveles relativamente bajos durante todo el cultivo. La concentración de N-NO₃ y N-NO₂ en el ciclo de engorda se mantuvieron por debajo de los 8.54 mg L⁻¹ y 2.6 mg L⁻¹, respectivamente; pero en el caso de N-NO₂ se observó un aumento (13.7 N-NO₂ mg L⁻¹) 10 días antes de la cosecha (Figura 9).

El estanque 3 al igual que el estanque 2 se observó un aumento y disminución de TAN en la maternidad, correspondiente al aumento de N-NO₂ y N-NO₃, con niveles máximos de 28.4 y 10.2 mg L⁻¹, respectivamente. Durante la etapa de engorda, también se observó un patrón similar al estanque 2 a excepción de un incremento de TAN (14.7 mg L⁻¹) hacia finales del ciclo de cultivo, el cual fue acompañado de la disminución de N-NO₂ y N-NO₃. La concentración de N-NO₂ y N-NO₃ no superó los 11.1 y 3.1 mg L⁻¹, respectivamente, en el ciclo de engorda (Figura 9).

Igualmente en el estanque 4 se realizó un paro del cultivo del 19 de septiembre al 1 de octubre, correspondiente al cambio de la etapa de maternidad a la etapa de engorda, por lo que las concentraciones iniciales de TAN en el ciclo de engorda disminuyeron (2.3 mg L⁻¹) en comparación con la concentración máxima presentada en la maternidad (26.9 mg L⁻¹). La concentración de estos nutrientes rápidamente empezó a subir y alcanzó un máximo menor que en la maternidad de 12.7 N-NH₄ + N-NH₃ mg L⁻¹ a 10 días del cultivo de

engorda. Posteriormente se registraron una serie de variaciones tal vez debido a los fuertes recambios realizados (Figura 8) y por lo tanto el aumento de N-NO₂ se ve retrasado en el ciclo de engorda y posteriormente se presentó un máximo 11.5 mg L⁻¹ hasta el final del cultivo, el cual fue menor que el alcanzado en la maternidad (23.5 N-NO₂ mg L⁻¹). No se logró observar un aumento en la concentración de N-NO₃ en el ciclo de engorda, mientras que en la maternidad el máximo alcanzado fue de 8.6 N-NO₃ mg L⁻¹, correspondiente al aumento de N-NO₂ y disminución de TAN (Figura 10).

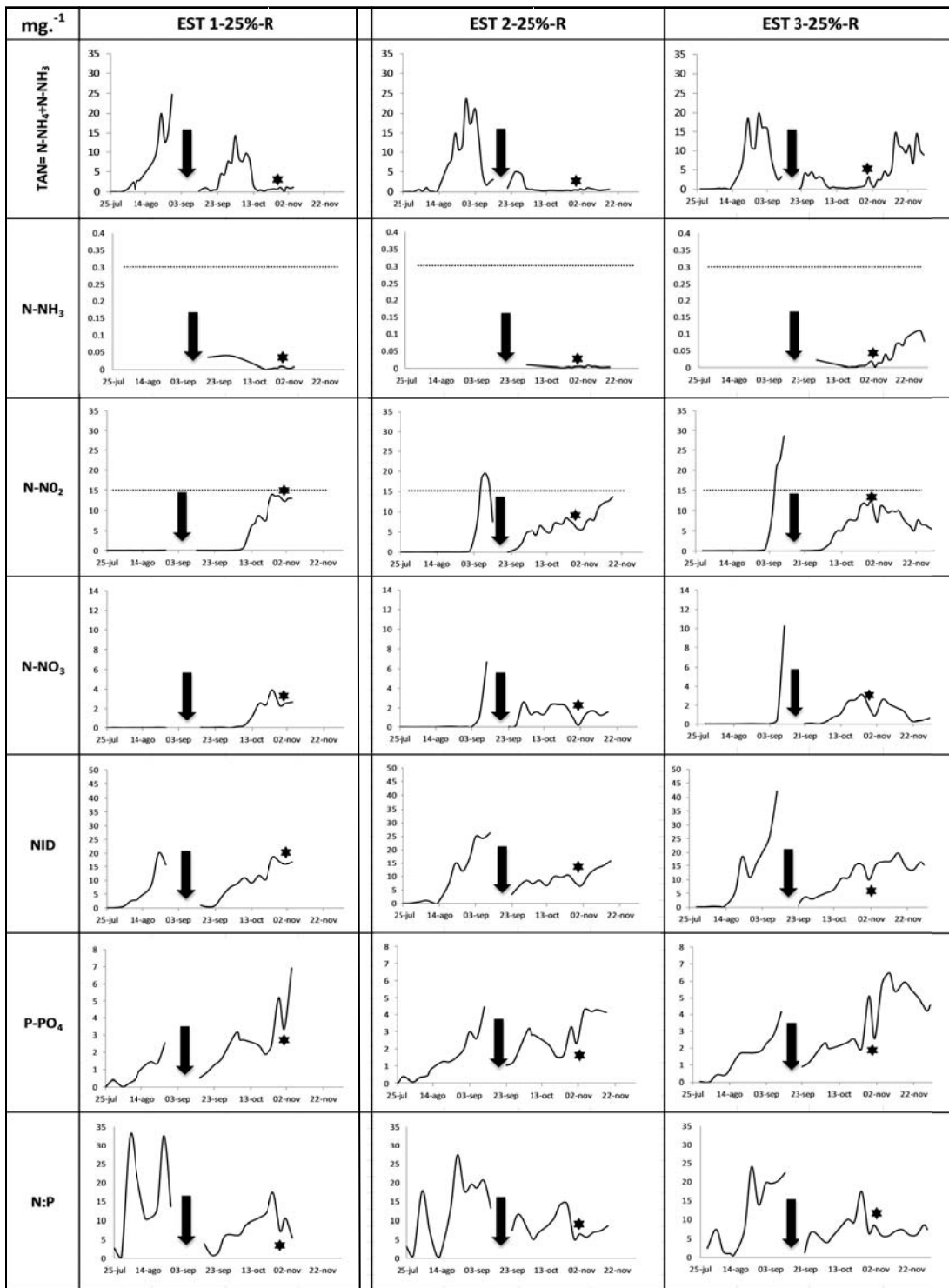


Figura 9. Concentración de nutrientes residuales de nitrógeno y fósforo en estanques 1, 2 y 3 (25% de proteína). Donde la flecha indica el reseteo del estanque entre la etapa de maternidad y engorda; *fecha de muestreo; --- niveles tóxicos.

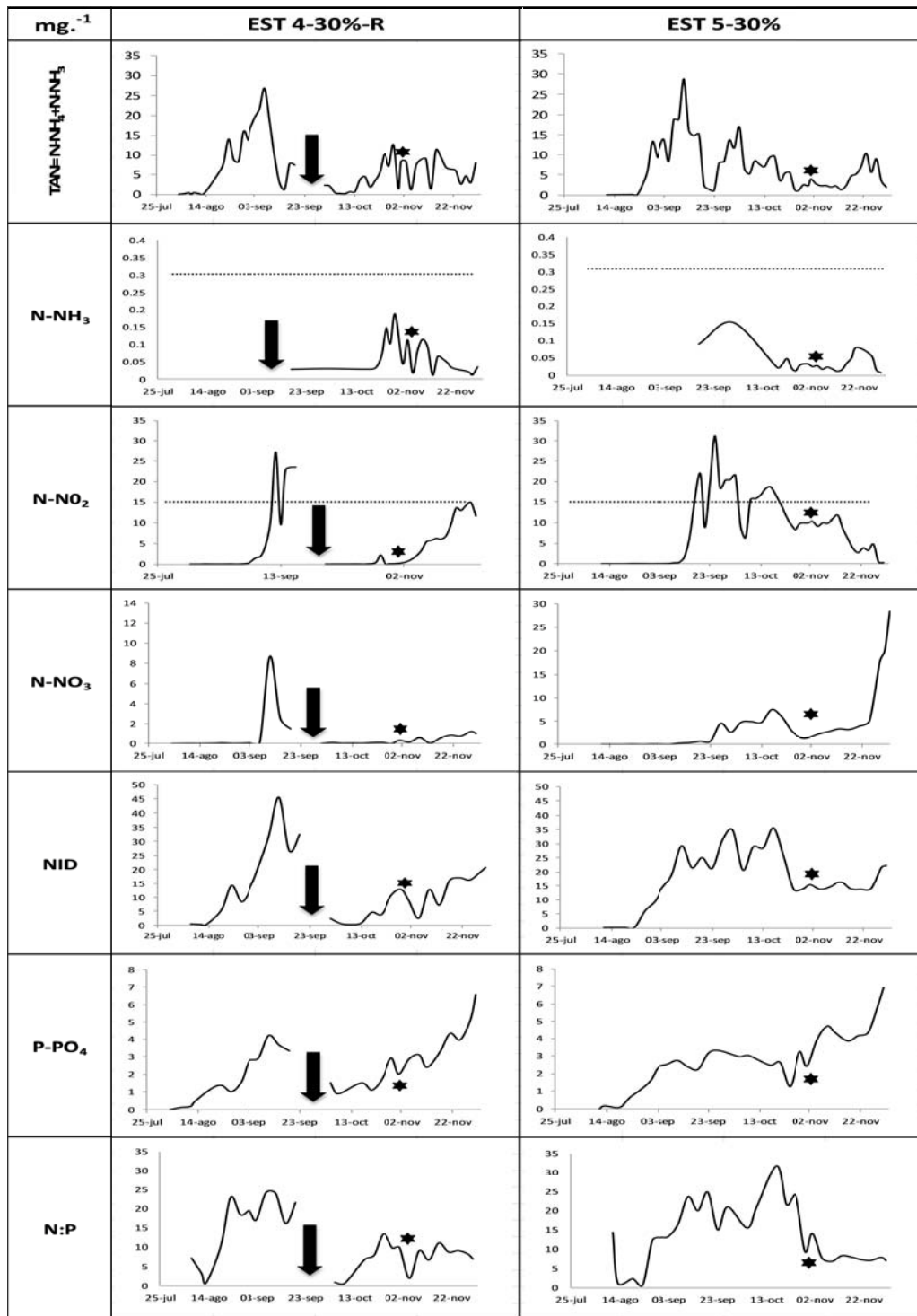


Figura 10. Concentración de nutrientes residuales de nitrógeno y fósforo en estanques 4 y 5 (30% de proteína). Donde la flecha indica el reseteo del estanque entre la etapa de maternidad y engorda; *fecha de muestreo --- niveles tóxicos.

En los estanques 5, 6 y 7 no se realizó lavado de estanques entre la etapa de maternidad y la etapa de engorda (Tabla III), por lo que solo se trató de controlar la concentración de nutrientes residuales por medio de altos recambios de agua. Por ejemplo, en el caso del estanque 5 se observó que dichos recambios (Figura 10) disminuyeron la concentración de TAN de niveles 28.6 mg L^{-1} hasta 1.3 mg L^{-1} . En 12 días después la concentración el TAN alcanzó un nuevo máximo de 17 mg L^{-1} , seguido de una disminución ($0.2\text{-}10.3 \text{ N-NH}_4 + \text{N-NH}_3 \text{ mg L}^{-1}$) y con un ligero aumento hacia el final del cultivo. Sin embargo, la disminución de TAN a partir del 11 de septiembre correspondió a valores mayores de $21.9 \text{ N-NO}_2 \text{ mg L}^{-1}$, los cuales disminuyeron a niveles de $2.1 \text{ N-NO}_2 \text{ mg L}^{-1}$ en los días de cosecha. Después del 27 de septiembre la concentración de N-NO_3 osciló entre 0.01 a 7.4 mg L^{-1} , pero al final del cultivo se registró un aumento notable que llegó a $28.4 \text{ N-NO}_3 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 10).

En los estanques 6 y 7 se presentó un pico máximo de concentración de $\text{N-NH}_4 + \text{N-NH}_3$ alrededor de 24.4 y 27.8 mg L^{-1} , respectivamente el cual disminuyó en los siguientes días hasta 31 de octubre en ambos estanques, posteriormente los niveles aumentaron nuevamente hasta 29.9 y 25.6 N-NH_4 y $\text{N-NH}_3 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, en los días previos a la cosecha. Los aumentos en la concentración de N-NO_2 y N-NO_3 correspondieron a la disminución de TAN, siendo más notable para el caso de N-NO_2 , donde se alcanzaron niveles superiores a los 30 mg L^{-1} (Figura 11).

La concentración de P-PO_4 en todos estanques registró una tendencia ascendente. En los estanques donde se realizó un paro total del cultivo (1, 2, 3 y 4; Tabla III) entre las etapas de maternidad y engorda, se observó que la concentración de P-PO_4 fue menor al inicio del cultivo de engorda, la cual aumentó pocos días después. En el caso de los estanques donde se presentó un cultivo continuo, se observa la disminución de P-PO_4 debido a los altos recambios realizados y posteriormente la concentración de P-PO_4 aumentó nuevamente. En los estanques 1 y 6 se observa una disminución en la concentración de P-PO_4 al final del cultivo (Figura 9, 10 y 11).

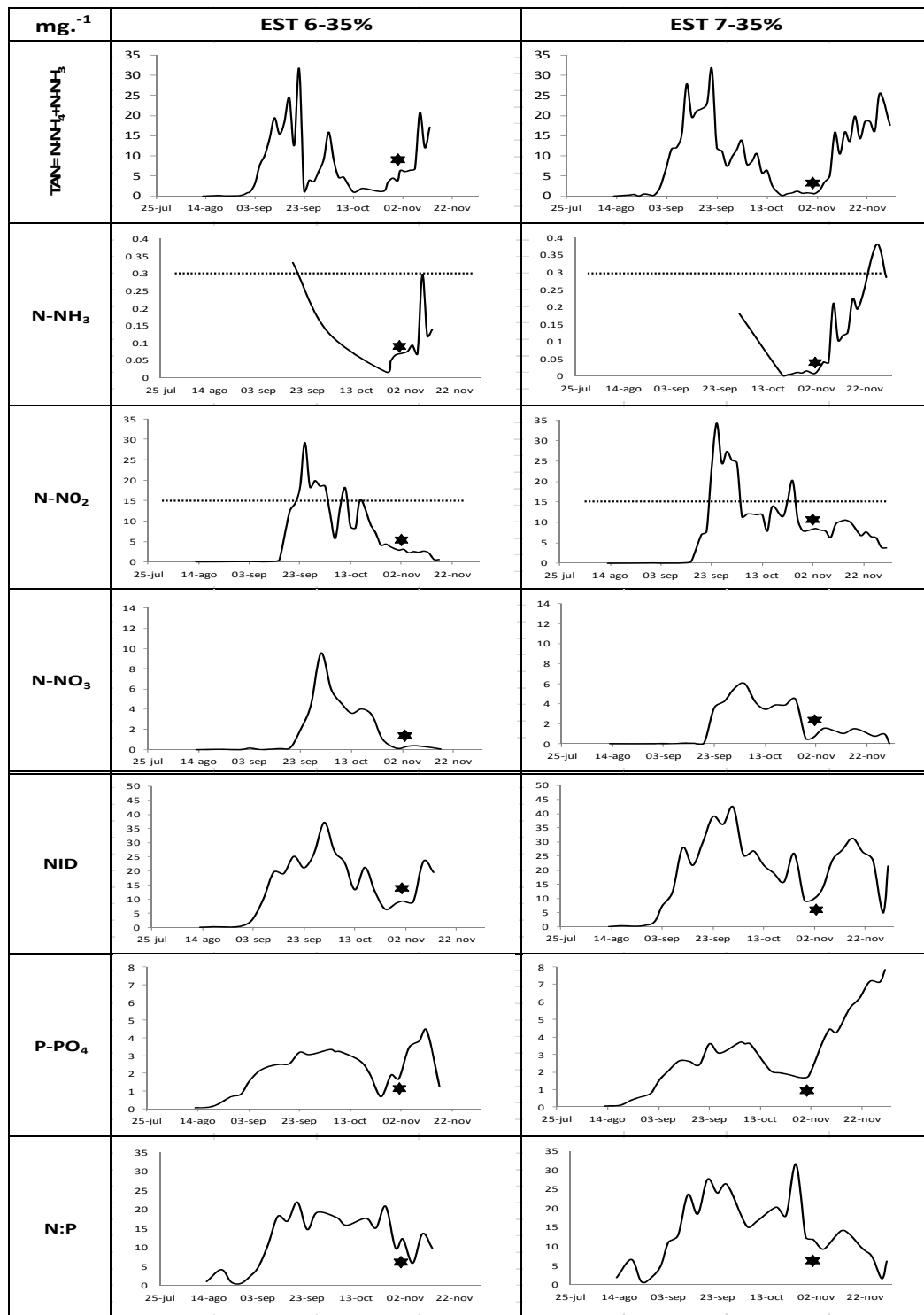


Figura 11. Concentración de nutrientes residuales de nitrógeno y fósforo en estanques 6 y 7 (35% de proteína). Donde la flecha indica el reseteo del estanque entre la etapa de maternidad y engorda; *fecha de muestreo --- niveles tóxicos.

En la figura 12 se muestra el comportamiento del Nitrógeno Inorgánico disuelto (NID= $N-NH_4 + N-NH_3 + N-NO_2 + N-NO_3$) en los siete estanques, donde se observó que el máximo obtenido se presentó en el estanque 4 donde se alimentó con 30% de proteína (45.4 mg L^{-1}). En el final de cultivo se registró que la concentración de NID varió entre $16-22 \text{ mg L}^{-1}$. En el caso del estanque 6 la concentración de NID fue menor a 1 mg L^{-1} en la cosecha. De manera general el NID disminuyó significativamente entre las etapas de maternidad y engorda en el caso de los estanques que se secaron entre ambas etapas (estanques 1, 2, 3 y 4), mientras que permanecieron elevados en los estanques 5, 6 y 7 donde no se realizó un secado entre ambas etapas.

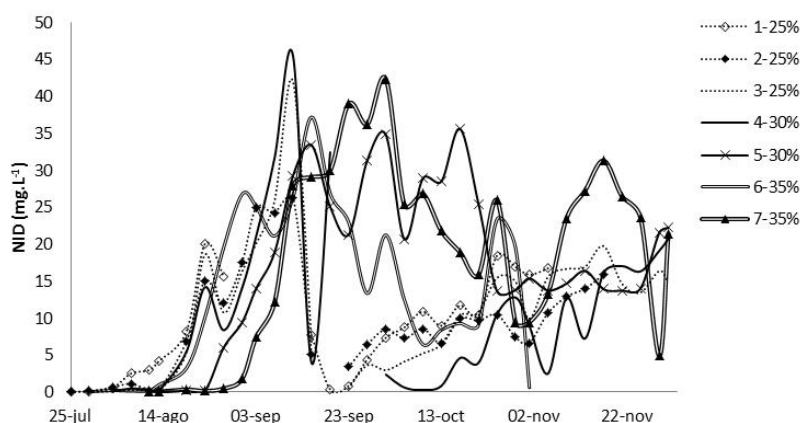


Figura 12. Concentración del total de Nitrógeno Inorgánico Disuelto (NID= $N-NH_3 + N-NH_4 + N-NO_2 + N-NO_3$) en los estanques a lo largo del ciclo de cultivo.

7.2. Parámetros productivos

Experimento 1: Parámetros productivos del cultivo intensivo en acuarios en los laboratorios del CIBNOR

En las primeras cuatro semanas de cultivo no se realizaron recambios en los acuarios con microbiota, a partir de la mitad de la semana 5 hasta el final del experimento se realizaron recambios mayores del 5%; en la semana 9 de cultivo se reportaron altas mortalidades por lo que se realizó un recambio inicial del 50% y días posteriores del 30-10%. En los acuarios de agua clara el recambio de agua fue mayor (50-90%) y diariamente (Tabla II).

El sistema de recirculación de agua mantuvo la materia orgánica constantemente en suspensión, pero se observó la formación de una película de materia orgánica en la marca del nivel del agua, por lo que constantemente se mezcló con el agua del acuario para tratar que la materia orgánica estuviera al alcance de los camarones.

La densidad de siembra fue de 300 org/ m³, es decir 15 organismos por acuario de 50 L, con un peso promedio inicial de 0.64g, sin diferencias significativas entre tratamientos y cumplieron los postulados de homogeneidad de varianzas y normalidad.

La alimentación se realizó cada 4 horas por 24 horas, es decir, 6 raciones al día. La alimentación inicial fue con 6.25% de la biomasa y al final del experimento fue 4% de la biomasa registrada. Se realizaron biometrías cada semana siendo en total 10 biometrías.

A lo largo de 69 días los cultivos presentaron las siguientes condiciones fisicoquímicas promedio: temperatura de 28 ± 0.3 °C (figura 13), la salinidad de 38 ± 0.2 ‰, el oxígeno disuelto en el agua marina fue de 4.5 ± 0.4 O₂mg L⁻¹ y el pH en tratamientos con agua clara fue de 8, mientras que acuarios con microbiota varió de 8 a 7 al final del experimento.

En la Tabla IV se muestran las características finales del cultivo por tratamiento así como la diferencias significativas encontradas, cabe mencionar que es importante analizar el desempeño del cultivo a lo largo de los 69 días debido a que las características del agua en los tratamientos con microbiota fueron cambiando significativamente conforme al tiempo en comparación con los acuarios con agua clara, en los cuales al tener un mayor recambio diario, las características del agua fueron reguladas.

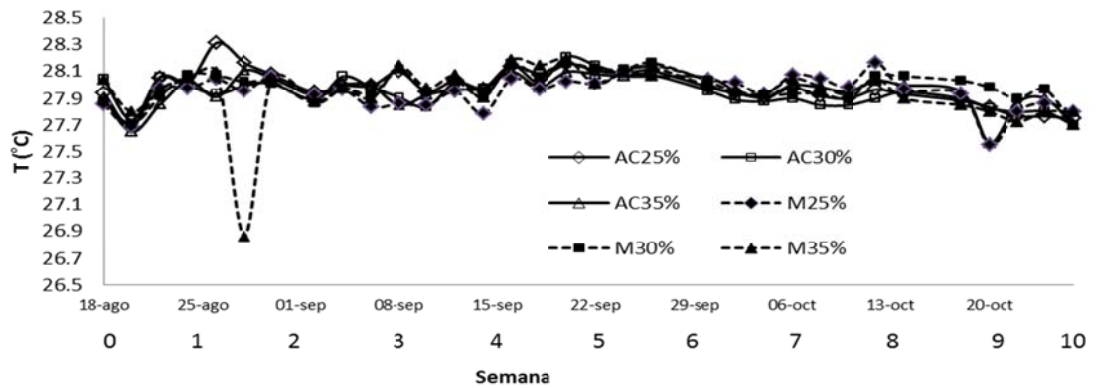


Figura 13. Variaciones de temperatura en cultivo en CIBNOR (experimento 1).

El incremento de peso a partir de la semana 2 fue significativamente diferente entre los tratamientos, siendo los tratamientos con microbiota los que presentaron mayores pesos y el tratamiento con microbiota y 30% de proteína fue el mejor de todos y diferente significativamente con los tratamientos de agua clara. Dicha tendencia se mantuvo hasta la semana 4 de cultivo. En la semana 5 también se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre los niveles de proteína de 25% y 35%, donde el mejor crecimiento se registró con el nivel de proteína de 35% en agua clara y 30% en agua con microbiota. En la siguiente semana se sumaron las diferencias por la combinación de la presencia de microbiota y el nivel de proteína, siendo aún el tratamiento con microbiota con 30% de proteína el que presentó el mayor peso ganado (Figura 14).

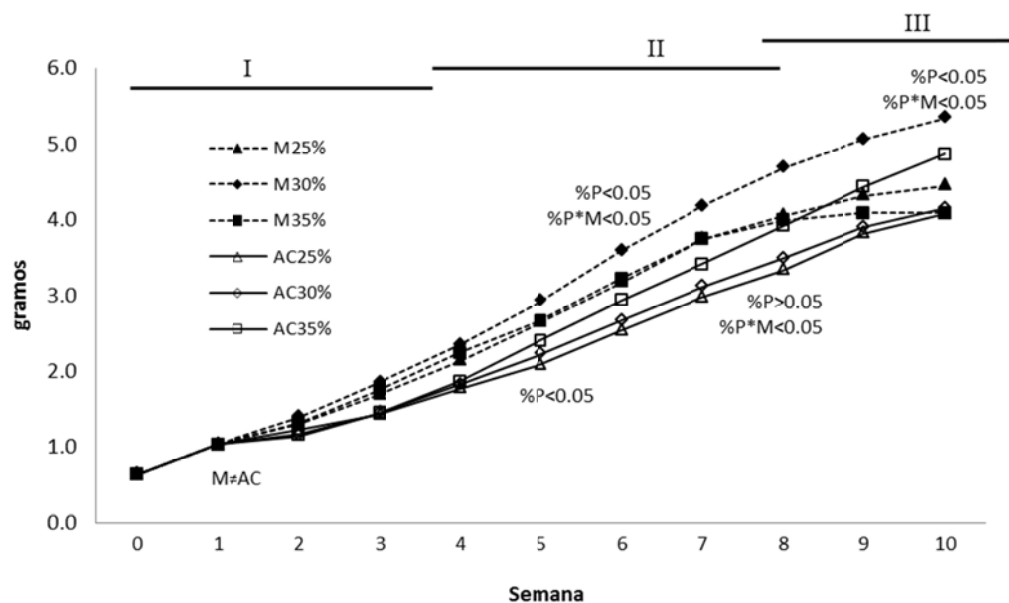


Figura 14. Incremento de peso en tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (AC), ambos con tres niveles de proteína.

El peso final promedio en organismos bajo el tratamiento con microbiota fue de 3.98 g, mientras que el tratamiento en agua clara alcanzó en promedio 3.08 g. A partir de la segunda semana de cultivo el aumento de biomasa en los tratamientos con microbiota ($10.3 \text{ g} \cdot 50\text{L}^{-1}$) fue significativamente mayor que el tratamiento con agua clara ($8.0 \text{ g} \cdot 50\text{L}^{-1}$). El incremento de biomasa en acuarios con agua clara se relacionó con el nivel de proteína en la dieta, es decir, con alimentos de 35% de proteína se obtuvieron los mayores incrementos y con 25% los menores. Mientras que en tratamientos con microbiota, el incremento mayor en peso final se presentó en organismos alimentados con 30% de proteína, el cual se apreció a partir de la semana 4 de cultivo (Figura 14).

Sin embargo, debido a las altas mortalidades en los tratamientos con microbiota a partir de la semana 9, se observó una disminución de la biomasa por acuario incluso hasta niveles por debajo del tratamiento en agua clara en el final del cultivo. Dicha disminución se relacionó con el nivel de proteína, es decir, el tratamiento microbiotac con 35% de proteína presentó menores supervivencias que el tratamiento microbiota con 25% y por lo tanto una disminución en la biomasa (Figura 15).

La biomasa promedio final en acuarios con microbiota fue de $32.5 \text{ g.acuario}^{-1}$ mientras que en acuarios con agua clara fue de $48.6 \text{ g.acuario}^{-1}$, como ya se mencionó esto fue debido a que existieron grandes mortalidades en acuarios con microbiota en el periodo de máxima acumulación de N-NO_2 a partir de la semana 9, los cuales obtuvieron un promedio 61% de supervivencia y en el caso de acuarios de agua clara fue de 89% (Figura 16).

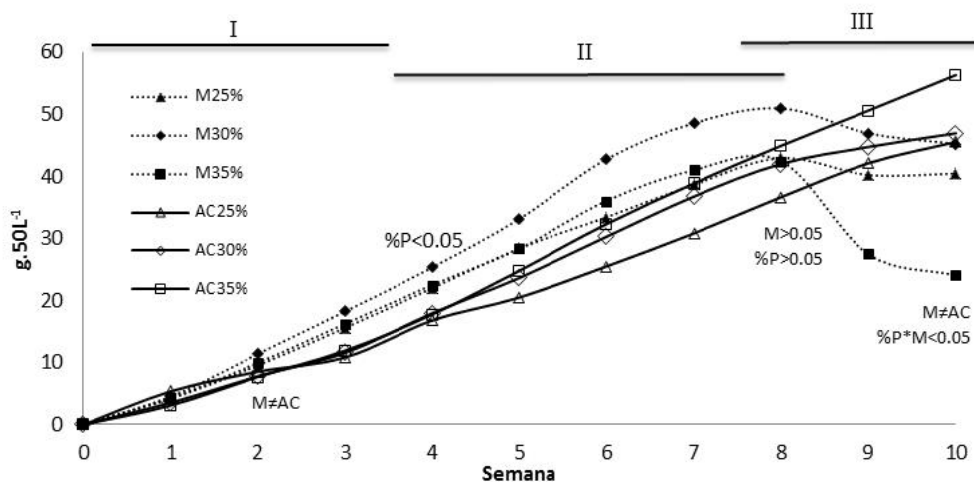


Figura 15. Incremento de biomasa en tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (P), ambos con tres niveles de proteína.

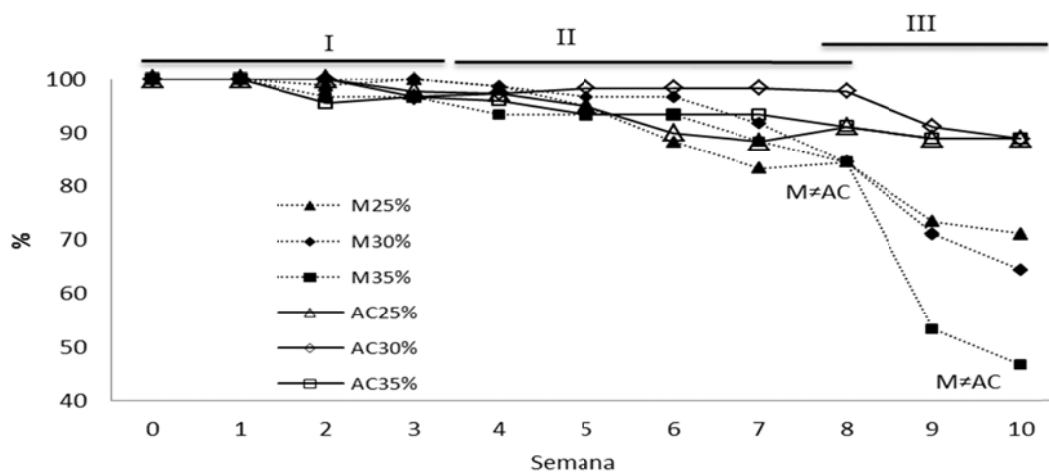


Figura 16. Supervivencia en tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (P), ambos con tres niveles de proteína.

En la segunda semana el factor de conversión alimenticia (FCA) fue significativamente diferente entre los tratamientos con agua clara (1.5) y microbiota, siendo esta última donde se obtuvieron los menores valores de FCA (1.2). Las diferencias en FCA con respecto al nivel de proteína se observaron a partir de la semana 5 a la 7 de cultivo donde el tratamiento con 35% de proteína en agua clara se obtuvieron los FCA más bajos, mientras que en tratamientos con microbiota se presentaron con el 30% de proteína. En las últimas tres semanas de cultivo (8, 9 y 10) no se observaron diferencias entre ninguno de los tratamientos con respecto al FCA (Tabla IV).

Para conocer la tasa de desempeño productivo de los organismos bajo cada uno de los tratamientos se relacionó la supervivencia, la tasa de incremento semanal (k) y el FCA, donde los valores cercanos a 1 representan un óptimo desempeño.

En general, a partir de la semana 2 los organismos bajo tratamiento con microbiota presentaron un mayor desempeño en comparación con los organismos cultivados en agua clara. En la siguiente semana el desempeño fue diferente significativamente con respecto al nivel de proteína. En los tratamientos con agua clara el desempeño fue dependiente al nivel de proteína, pero en los acuarios con microbiota el mejor desempeño se observó a 30% de proteína, esto se mantuvo hasta la semana 8. Posteriormente no existieron diferencias significativas, sin embargo, en la última semana de cultivo aparecen de nuevo las diferencias entre los tratamientos con microbiota y agua clara, esta vez se presentó el menor desempeño en microbiota en comparación con el tratamiento de agua clara (Figura 17).

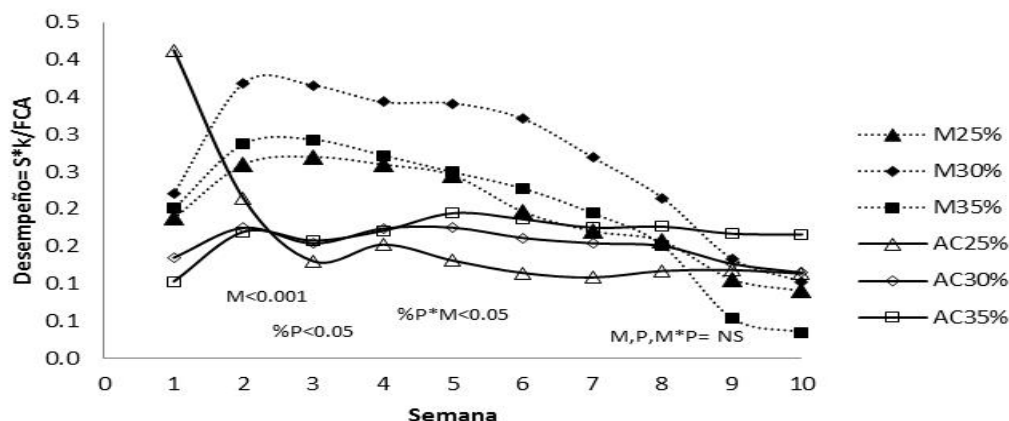


Figura 17. Desempeño en tratamiento con microbiota (M) y en agua clara (P), ambos con tres niveles de proteína.

Tabla IV. Parámetros del cultivo hiper-intensivo en acuarios experimentales de 50L en CIBNOR con error estándar (\pm). Se presentan las diferencias significativas ($P < 0.05$) debido al tratamiento microbiota / agua clara (M/AC), al porcentaje de proteína (%P) y la interacción entre los factores (MxP).

	AC25%	AC30%	AC35%	M25%	M30%	M35%	M/AC	%P	MxP
Incremento de peso (g/69 días)	3.4 \pm 0.2	3.5 \pm 0.2	4.2 \pm 0.3	3.8 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1	NS	<0.05	<0.001
Peso final (g)	4.0 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2	4.8 \pm 0.3	4.4 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1	4.0 \pm 0.1	NS	<0.05	<0.001
Biomasa (g.50L⁻¹)	45.6 \pm 5.6	47.0 \pm 2.7	56.4 \pm 8.5	40.5 \pm 7.2	45.3 \pm 2.1	24.1 \pm 6.5	<0.05	NS	<0.05
Supervivencia (%)	88.8 \pm 0.6	88.8 \pm 0.4	88.8 \pm 0.8	71.1 \pm 1.2	64.4 \pm 0.2	47.0 \pm 1.1	<0.001	NS	NS
K (g.semána⁻¹)	0.35 \pm 0.02	0.36 \pm 0.02	0.43 \pm 0.03	0.38 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01	0.35 \pm 0.01	NS	<0.05	<0.001
FCA	2.9 \pm 0.3	2.8 \pm 0.1	2.5 \pm 0.3	3.4 \pm 0.5	3.0 \pm 0.1	6.1 \pm 1.5	NS	NS	NS
Desempeño	0.11 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.16 \pm 0.04	0.09 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	<0.05	NS	NS

Experimento 2: Parámetros productivos del cultivo hiper-intensivo en Acuicultura Mahr

El seguimiento de los cultivos hiper-intensivos en la granja fue durante el ciclo de engorda del 2 de Septiembre al 3 de Diciembre de 2012. El protocolo de cultivo se diseñó con una etapa de maternidad antes del ciclo de engorda, la cual se llevó a cabo en los mismos estanques. En los estanques 1, 2 y 3 se realizó un paro total del cultivo para lavar el estanque, mientras que los estanques 5, 6 y 7 el ciclo fue seguido y solo se realizaron

grandes recambios de agua del 13 de octubre a 11 de noviembre del 2012 con la intención de controlar el impacto de la concentración de nutrientes residuales, principalmente el contenido de $N-NH_4$ y $N-NH_3$ en el agua. Los cultivos hiper-intensivos de la granja en los 7 estanques presentaron diferentes características y eventos. Por ejemplo, los días de cultivo en cada estanque fueron variables como se muestran en la Tabla III, en promedio fue de 62 días.

La variación de los parámetros fisicoquímicos en los 7 estanques se muestra en la Tabla V. En general la temperatura varió entre 22 a 35 °C. Los valores más bajos de oxígeno disuelto se presentaron en el estanque 4 y 5, en los cuales se observó la mayor proliferación de microalgas, por lo cual el agua de los estanques se tornó de color verde intenso (Tabla III). Por otro lado el estanque 6 presentó una baja repentina de oxígeno debido a problemas técnicos en la granja, los cuales fueron corregidos lo más pronto posible, pero esto ocasiono mortalidades en este estanque. Cabe mencionar que los días del 15 al 17 de octubre se presentaron fuertes lluvias debido al huracán "Paúl", por lo que la salinidad fue menor en estos días. En general el pH varió entre 6.7 a 7.6, el valor más bajo de pH fue de 6.6 en el estanque 4, mientras que el valor más alto fue de 7.6, en 1 (Tabla V).

Debido a la falta de coordinación en la toma de muestras para las biometrías semanales, no fue posible realizar estadísticos, por lo que la siguiente información se basa en diferencias cuantitativas no validadas estadísticamente.

En la Tabla VI se muestran las características finales del cultivo en los 7 estanques, cabe mencionar que es importante analizar el desempeño del cultivo a lo largo de los días debido a que las características del agua fueron cambiando significativamente conforme al tiempo en comparación.

En general la densidad inicial fue de 480-730 org/m^3 mientras que al final del cultivo la densidad varió de 202- 520 org/m^3 con una densidad de cosecha promedio de 381 org/m^3 (Figura 18).

El mayor incremento de peso en promedio fue estimado en el estanque 6 (9.7 g.49 días⁻¹) y 7 (10.2 g.66 días⁻¹) los cuales fueron alimentados con 35% de proteína, pero también fueron los estanques que presentaron menor biomasa debido a bajas supervivencias (Figura 19). En promedio los mayores incrementos los presentaron los organismos alimentados con 35% de proteína y los más bajos incrementos fueron con proteína 25%. De igual manera las mayores tasas de crecimiento semanal (k) se presentaron en el estanque 6 y 7 que corresponden al nivel más alto de proteína aplicado, 35% (Tabla VI).

Tabla V. Parámetros fisicoquímicos promedio en el cultivo intensivo de Acuicultura Marh.

Estanque		1	2	3	4	5	6	7
Nivel de proteína		25%	25%	25%	30%	30%	35%	35%
Temperatura (°C)	Min	25.8	21.9	22.5	22.0	21.9	21.4	22.1
	Max	29.7	33.9	34.0	35.0	33.9	33.4	34.1
	Promedio±SD	29.7±1.9	28.9±2.6	28.0±2.6	27.6±2.7	27.9±2.7	28.6±2.6	28.0±2.9
Oxígeno (mg L ⁻¹)	Min	2.2	2.0	1.6	0.9	1.3	1.8	1.7
	Max	7.5	7.7	7.7	8.1	7.4	6.8	6.7
	Promedio±SD	4.3±1.0	4.0±1.1	4.0±1.1	3.6±1.1	3.7±0.9	3.5±0.8	4.2±0.9
Salinidad (‰)	Min	35	34	35	34	35	33	36
	Max	37	39	41	40	41	40	42
	Promedio±SD	37±1.2	37±1.8	37±1.5	37±1.3	38±1.3	38±1.8	39±1.6
pH	Min	6.7	6.8	6.8	6.6	6.7	7.0	7.0
	Max	7.6	7.2	7.3	7.3	7.3	7.4	7.5
	Promedio±SD	6.9±0.2	7.0±1.8	7.0±0.04	7.1±0.04	7.1±0.04	7.2±0.03	7.2±0.04

Los valores más bajos de FCA se presentaron en los estanques 1, 2, 4 y 7, mientras que los mayores valores se presentaron en los estanques 5 y 6 alimentados con 30% y 35% de proteína, respectivamente. En general la alimentación con 25% de proteína resultó con menores valores de FCA en comparación con 30% y 35% de proteína en la dieta.

El mejor y peor desempeño lo presentaron los organismos en el estanque 4 (30% de proteína) y 6 (35% proteína), respectivamente. Al agrupar por nivel de proteína el mejor desempeño fue con 25% y el peor con 35% (tabla VI).

Tabla VI. Características de la cosecha de los 7 estanques del cultivo en granja. Donde densidad es org.m³, biomasa es ton.ha, P= incremento de peso en g, Pf= peso final en g, S= supervivencia, K=tasa de crecimiento, FCA= Factor de Conversión Alimenticia y D= desempeño.

Estanque	1	2	3	4	5	6	7			
% Proteína	25%	25%	25%	30%	30%	35%	35%	25%	30%	35%
org/m³	365	438	416	429	520	202	297	407	474	250
ton/ha	34.6	43.8	42.2	41.8	44.2	24.0	35.0	40.2	43	29.5
P (g)	7.4	6.7	7.9	8.1	6.6	9.7	10.2	7.3	7.4	9.9
Pf (g)	9.5	10.0	10.1	9.7	8.5	11.9	11.8	9.9	9.1	11.8
Días	54	60	75	62	66	49	66	63	64	58
S (%)	89	97	97	97	100	46	66	94	98	56
K	0.95	0.78	0.93	0.92	0.7	1.39	1.08	0.9	0.8	1.2
FCA	1.4	1.4	1.6	1.4	2.1	2.1	1.2	1.5	1.7	1.7
Desempeño	0.62	0.53	0.56	0.65	0.33	0.3	0.57	0.6	0.5	0.4

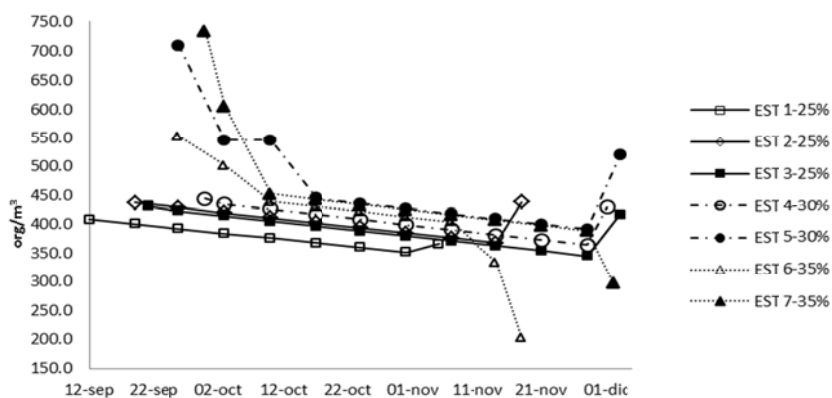


Figura 18. Variación de la densidad en los estanques con diferente nivel de proteína

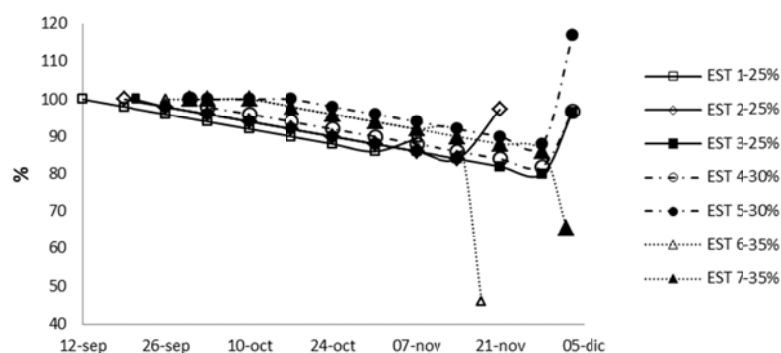


Figura 19. Variación de la Supervivencia estimada en los estanques con diferente nivel de proteína.

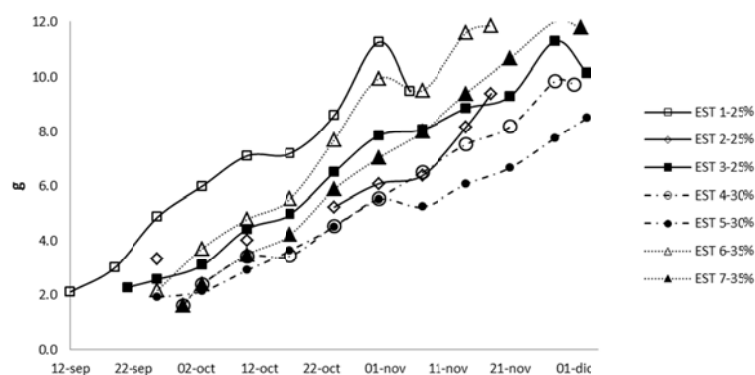


Figura 20. Peso de los camarones a lo largo del ciclo de cultivo en los estanques con diferentes niveles de proteína en la dieta.

7.3. Total de sólidos suspendidos (TSS)

Esta determinación solo se realizó en el cultivo en CIBNOR. El total de sólidos fue mayor en los acuarios con microbiota en comparación con acuarios con agua clara. El total de sólidos fue aumentando con los días de cultivo con algunas alteraciones, las cuales se observan en la figura 21. El máximo de sólidos se presentó a una semana de la cosecha y fue en los acuarios con microbiota y 30% de proteína, seguido del nivel de 35% y 25%, tal como se observa en la figura 21.

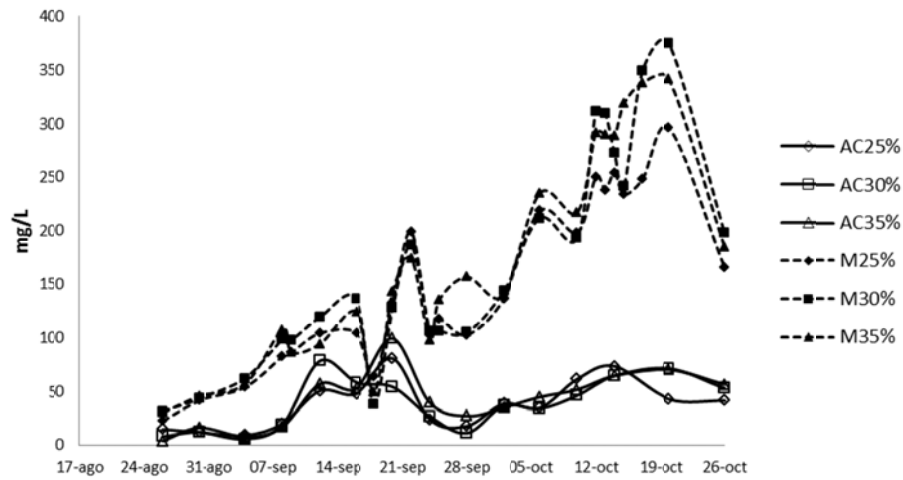


Figura 21. Total de sólidos suspendidos en el cultivo en CIBNOR.

7.3. Volumen de solidos (VS)

7.3.1 .Experimento 1 (CIBNOR)

La variación de sólidos suspendidos (VS) registrados en los acuarios con microbiota en el cultivo en CIBNOR se muestra en la figura 22, donde se observa que los mayores valores corresponden al nivel de proteína en la dieta, siendo el tratamiento con 35% de proteína el que contiene los mayores sólidos suspendidos (83 ml L^{-1}). Al final del cultivo se observa una disminución del VS debido a los recambios realizados una semana antes de la cosecha.

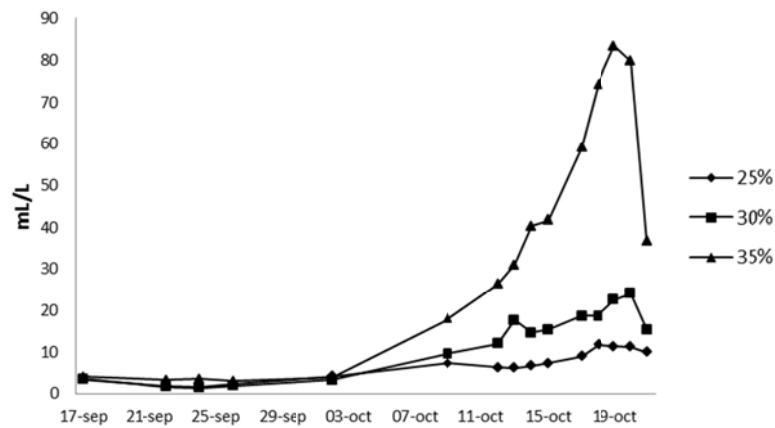


Figura 22. Volumen de sólidos del cultivo en CIBNOR.

7.3.2. Experimento 2 (Acucultura Marh)

El VS en los cultivos en granja fueron menores a los presentados en el cultivo en CIBNOR, ya que los valores no rebasaron los 25 ml L⁻¹. El máximo de sólidos suspendidos en granja fue en el estanque 2, seguido por el estanque 1, ambos de 25% de proteína, mientras que en los demás estanques las concentraciones oscilaron entre 1-10 ml L⁻¹ (Figura 23).

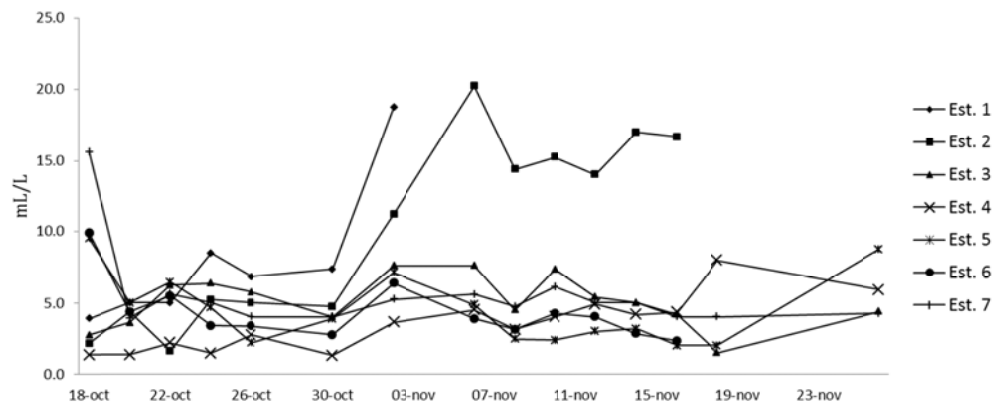


Figura 23. Volumen de sólidos en el cultivo en granja

7.4. Tamaño de partícula

Esta determinación solo se realizó en el cultivo en CIBNOR. En la gráfica de la figura 24 se muestran la distribución de los tamaños de partícula que se encontraron en el agua de los acuarios con microbiota en los diferentes niveles de proteína. La distribución se presentó homogénea entre los 3 niveles de proteína, en los cuales el 62% de las partículas fueron de 30 a 100 μm de tamaño. Posteriormente en la segunda muestra de agua (12 de octubre) se observó un ligero incremento en el tamaño de las partículas ya que el 62% de las partículas presentaron de 40 a 130 μm (Figura 24).

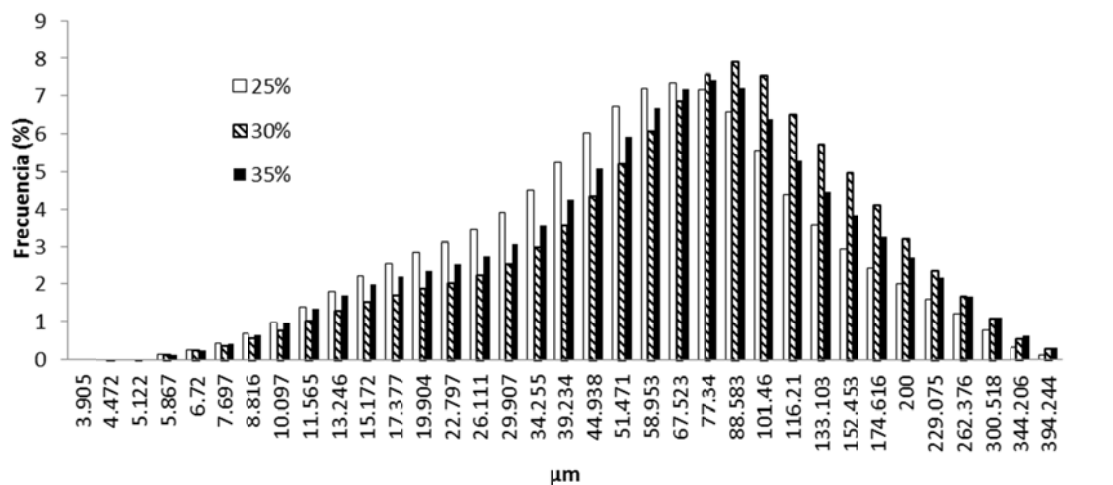
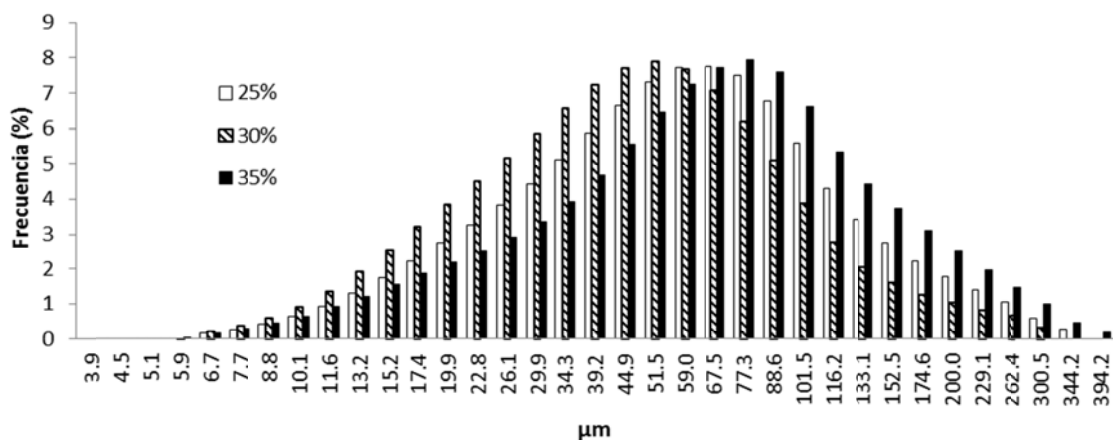


Figura 24. Tamaño de partícula del día 20 de septiembre (arriba) y 12 de octubre (abajo) del cultivo en CIBNOR.

7.5. Eficiencia en el uso de N y P en cultivos hiper-intensivos en experimento 1 y 2.

El resultado del análisis químico proximal de los alimentos comerciales proporcionados a los camarones en cultivo, se muestra en la tabla VII. En la Tabla VIII y IX se muestran los balances de nitrógeno y fósforo en el cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio (experimento 1) y en condiciones comerciales (experimento 2), respectivamente, dichos balances se realizaron a partir de los análisis proximales de los alimentos comerciales.

Tabla VII. Análisis químico proximal de alimento comercial, utilizado en experimento 1 y 2.

Natural Force ® VIMIFOS	25%	30%	35%
Humedad (%)	8.17±0.08	7.72±0.18	6.36±0.03
Proteína (%)	30.14±0.09	33.35±0.23	38.97±0.10
Lípidos (%)	7.81±0.22	8.70±0.10	9.01±0.08
Fibra cruda (%)	2.32±0.07	2.27±0.25	1.70±0.10
Cenizas (%)	6.37±0.06	6.83±0.23	7.64±0.28
Carbohidratos (%)	53.36	48.46	42.69
Energía (cal/g)	4577.9±21.5	4655.6±25.4	4882.6±21.4
P en cenizas (%)	25.91	30.56	35.93
P en alimento seco (%)	1.65	2.09	2.75

En el cultivo del experimento 1 el nitrógeno y fósforo residual aumentaron conforme se incrementó el nivel de proteína en tratamiento con microbiota y en agua clara. Mientras que el porcentaje de retención de nitrógeno disminuyó con el aumento en el nivel de proteína en tratamiento con agua clara, sin embargo en el tratamiento con microbiota el mayor porcentaje de retención de nitrógeno se obtuvo con el alimento de 30% de proteína. La retención del fósforo disminuyó con el nivel de proteína tanto en el tratamiento con microbiota como en agua clara (Tabla VIII).

En el caso del experimento 2, se observó que el mayor contenido promedio de nitrógeno y fósforo residual se presentó con el 30% de proteína en la dieta (382.2 y 99.0 mg L⁻¹, respectivamente). El porcentaje de retención de nitrógeno promedio fue mayor en los camarones alimentados con 25% de proteína la dieta en los estanques 1, 2, y 3 (46.9%) en comparación con el porcentaje de retención promedio en camarones alimentados con 30% y 35% de proteína (40.4% y 26.7%, respectivamente). De igual manera que en el experimento 1, la retención de fósforo promedio fue mayor con 25% de proteína en la dieta (15.7%) en comparación con 35% de proteína (7.1 %; Tabla IX).

En general, se observó que el porcentaje de retención de nitrógeno y fósforo en el cultivo en granja (experimento 2) fue mayor que en el cultivo de laboratorio (experimento 1). La retención de nitrógeno y fósforo en ambos experimentos aumentó con la disminución del nivel de proteína en la dieta.

Tabla VIII. Balance de N y P en el cultivo hiper intensivo bajo condiciones de laboratorio (experimento 1: CIBNOR).

	M25%	M30%	M35%	AC25%	AC30%	AC35%	M	AC
N I T R Ó G E N O								
SUMINISTRADO (Kg)	0.06	0.07	0.07	0.06	0.06	0.08	0.06	0.07
RETENIDO (Kg)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
RETENCIÓN (%)	19.77	19.83	9.31	23.16	20.86	22.87	16.30	22.29
RESIDUAL (mg L⁻¹)	24.19	28.30	35.01	22.77	26.95	31.56	29.17	27.09
F Ó S F O R O								
SUMINISTRADO (Kg)	0.019	0.026	0.032	0.019	0.025	0.034	0.026	0.026
RETENIDO (Kg)	0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002
RETENCIÓN (%)	7.837	6.553	2.831	8.980	7.051	6.255	5.740	7.429
RESIDUAL (mg L⁻¹)	0.951	1.290	1.652	0.923	1.238	1.689	1.298	1.283

Tabla IX. Balance de N y P en los cultivos hiper intensivos bajo condiciones de granja (experimento 2: Acuicultura Marh).

	1-25%	2-25%	3-25%	4-30%	5-30%	6-35%	7-35%	25%	30%	35%
N I T R Ó G E N O										
SUMINISTRADO (Kg)	527.3	694.4	714.3	744.6	855.5	734.9	906.5	645.3	800.0	820.7
RETENIDO (Kg)	259.2	328.2	316.0	313.0	330.9	180.0	262.5	301.1	322.0	221.3
RETENCIÓN (%)	49.2	47.3	44.2	42.0	38.7	24.5	29.0	46.9	40.4	26.7
RESIDUAL (mg L⁻¹)	248.8	339.3	369.5	345.2	419.2	347.6	403.8	319.2	382.2	375.7
F Ó S F O R O										
SUMINISTRADO (Kg)	196.6	258.8	266.3	315.6	362.6	345.5	426.2	240.5	339.1	385.8
RETENIDO (Kg)	32.3	40.9	39.4	39.0	41.2	22.4	32.7	37.5	40.1	27.6
RETENCIÓN (%)	16.4	15.8	14.8	12.4	11.4	6.5	7.7	15.7	11.9	7.1
RESIDUAL (mg L⁻¹)	72.6	95.5	98.3	92.1	105.9	76.7	94.6	88.8	99.0	85.7

7.6. Conteos celulares

Se realizaron conteos celulares de la microbiota que llegó al CIBNOR así como del día de aplicación de ésta en los acuarios correspondientes. Los resultados variaron de 37 a 344 millones de células por ml con un promedio de 146 millones de células por ml (figura 25). Los conteos celulares tienen como referencia las células de levaduras marinas, las bacterias no se contaron por este método.

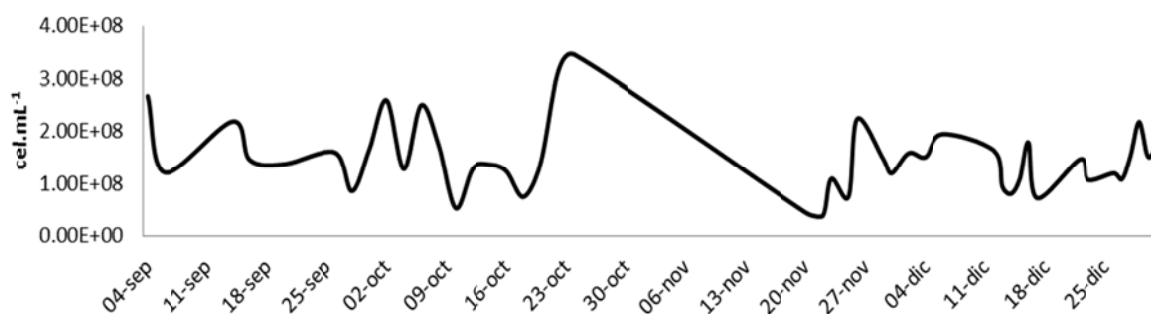


Figura 25. Conteos celulares de la microbiota durante los cultivos en CIBNOR y granja

7.7. Variables fisiológicas

7.7.1. Experimento 1: Cultivo hiper intensivo bajo condiciones de laboratorio (CIBNOR).

En total se realizaron cuatro muestreos en los cuales se sacrificaron al menos 10 camarones por tratamiento, sin embargo, solo se analizaron el primer y cuarto muestreo, por lo que a continuación se presentan los resultados de las variables fisiológicas de solamente dos muestreos.

Muestreo I

En este caso es importante recordar que se analizó el camarón completo, sin diferenciar entre músculo y hepatopáncreas (ver sección 6.1.1.), debido a la poca cantidad de muestra por el bajo peso de los organismos (1.8 g) a 15 días de cultivo.

Los niveles de proteínas totales, glucógeno, lactato y lípidos totales en camarones cultivados bajo condiciones controladas de laboratorio no fueron diferentes significativamente debido al tratamiento, al nivel de proteína en la dieta o a la interacción entre ambos factores. La concentración promedio de proteínas totales fue de 254.6 mg g⁻¹, de glucógeno 18.2 mg g⁻¹, de lactato 0.36 mg g⁻¹ y de lípidos totales de 71.3 mg g⁻¹ (Figura A, B, C y D, respectivamente).

Los niveles de triglicéridos fueron significativamente más altos con el nivel de proteína de 30% (35.1 mg g⁻¹), en comparación con los camarones alimentados con 25% y 35% (25.9 y 27.3 mg g⁻¹, respectivamente; Figura 26 E).

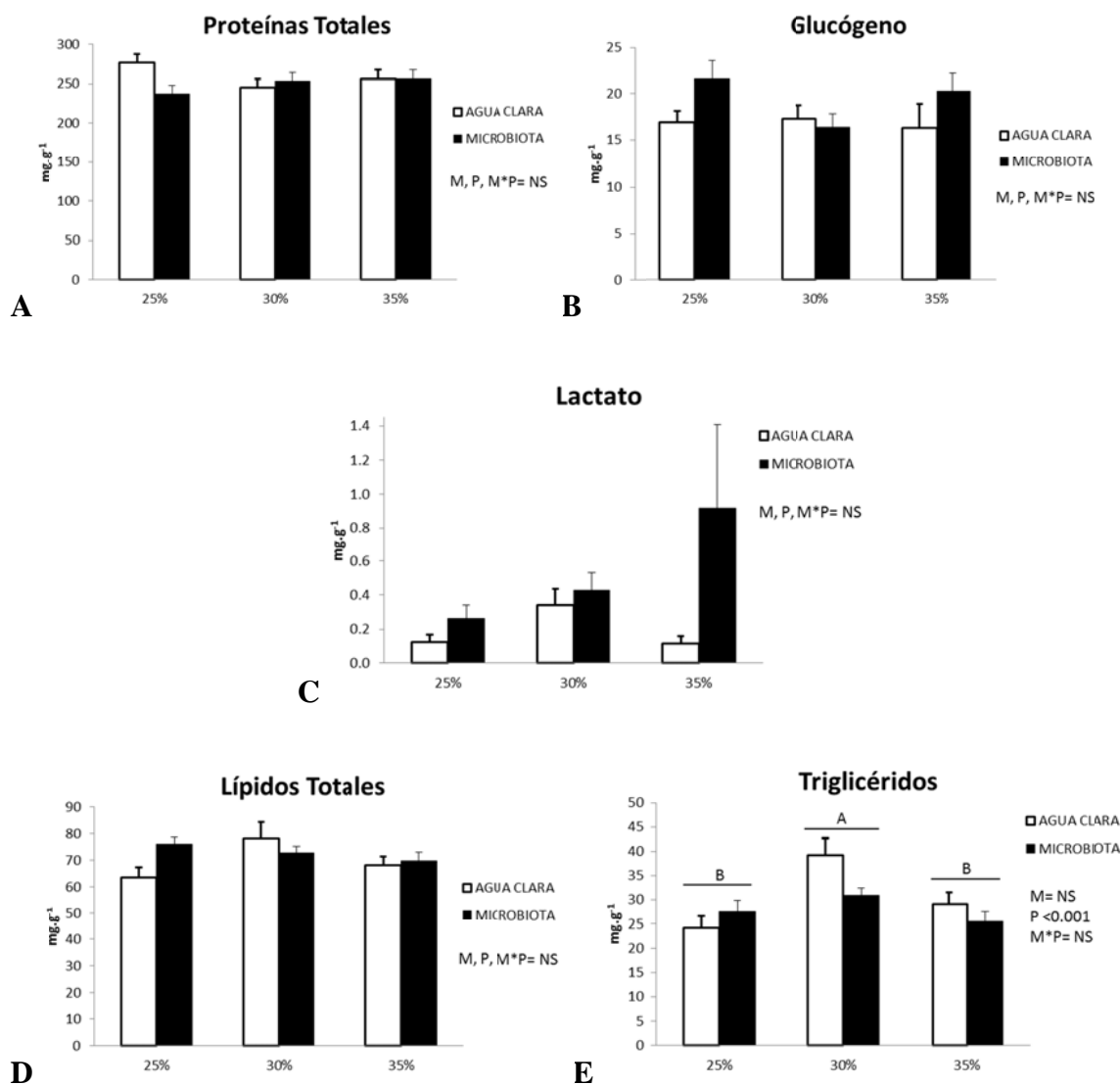


Figura 26. Análisis de proteínas totales, glucógeno, lactato, lípidos totales y triglicéridos en camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P).

Muestreo IV

Hemolinfa

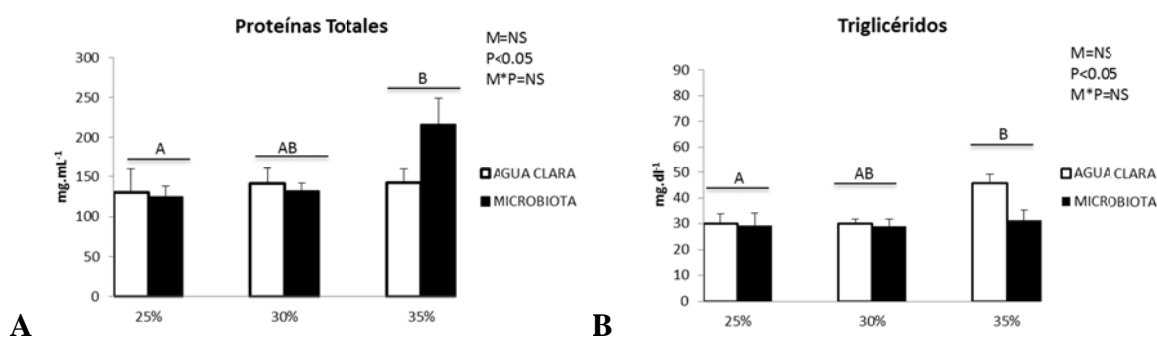
El contenido de proteínas totales y triglicéridos en hemolinfa fueron diferentes significativamente ($P < 0.05$) por efecto del nivel de proteína en la dieta, sin efecto por la presencia de microbiota. Particularmente, el nivel de 35% presentó mayores

concentraciones promedio de proteínas totales (179.1 mg ml^{-1}) en comparación con el tratamiento de 25% de proteína en la dieta (127 mg ml^{-1}). Aunque la interacción no fue significativa ($P>0.11$) en el contenido de proteínas, este efecto se observó solamente en el grupo con 35% de proteína del tratamiento microbiota (216 mg ml^{-1} ; Figura 27 A).

El contenido promedio de triglicéridos con 35% de proteína fue de 38.6 mg dl^{-1} , significativamente mayor a 29.7 mg dl^{-1} en camarones alimentados con 25% de proteína. En este caso fue el tratamiento agua clara y 35 % de proteína el que presentó los niveles más altos (45.8 mg ml^{-1} ; Figura 27 B).

La concentración de hemocianina fue significativamente ($P<0.001$) mayor en los camarones bajo el tratamiento de agua clara (89.1 mg ml^{-1}) en comparación con el tratamiento de microbiota (61.5 mg ml^{-1}). Adicionalmente, se observaron diferencias significativas con respecto al nivel de proteína en la dieta, donde los camarones alimentados con 35% de proteína presentaron las mayores concentraciones promedio de hemocianina (87.3 mg ml^{-1}), mientras que las menores concentraciones se presentaron con 30% de proteína en la dieta (72.4 mg ml^{-1} ; Figura 27 C).

En la Figura 28 A y B se observa que no se registraron diferencias significativas ($P>0.05$) en el contenido de glucosa y lactato debido a los tratamientos, sin embargo, en promedio los mayores contenidos de glucosa y lactato se presentaron en camarones bajo el tratamiento con microbiota.



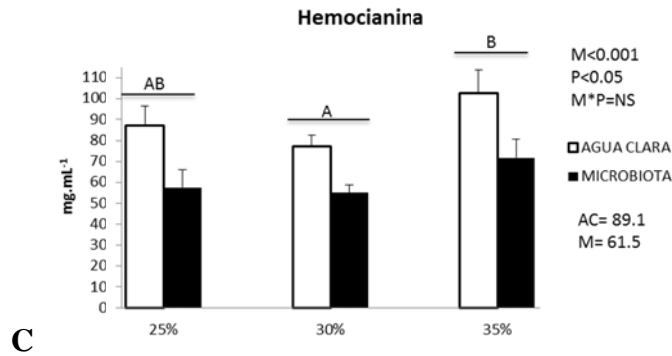


Figura 27. Análisis de proteínas totales, triglicéridos y hemocianina en hemolinfa de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P).

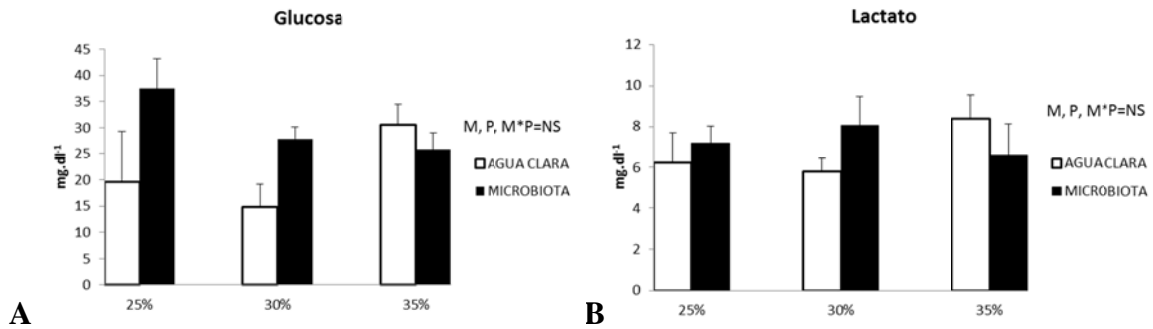


Figura 28. Análisis de glucosa y lactato en hemolinfa en hemolinfa de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P).

Músculo

En la Figura 29 A, C y D se muestran los contenidos de proteínas totales, lípidos totales, y lactato en músculo, los cuales no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) debido a los tratamientos de microbiota, porcentaje de proteína en la dieta y la interacción de ambos factores. Sin embargo, se observó que la concentración promedio de lípidos totales en el músculo de los camarones alimentados con 35% de proteína fue menor en comparación con los niveles de 25% y 30%.

El nivel de glucógeno en el músculo fue significativamente ($P < 0.01$) mayor en camarones bajo el tratamiento con agua clara (8.0 mg g^{-1}) en comparación con el tratamiento de microbiota (5.5 mg g^{-1}). Sin embargo, se registró una interacción significativa ($P < 0.001$), este efecto se debió a que los mayores niveles de glucógeno se presentaron en los camarones cultivados en agua clara y solo para las dietas con 25% (9.2 mg g^{-1}) y 35% (9.6 mg g^{-1}) de proteína. En el caso de 30% de proteína, fueron los camarones cultivados con microbiota lo que presentaron mayores contenidos de glucógeno (7.5 mg g^{-1} ; Figura 29 B).

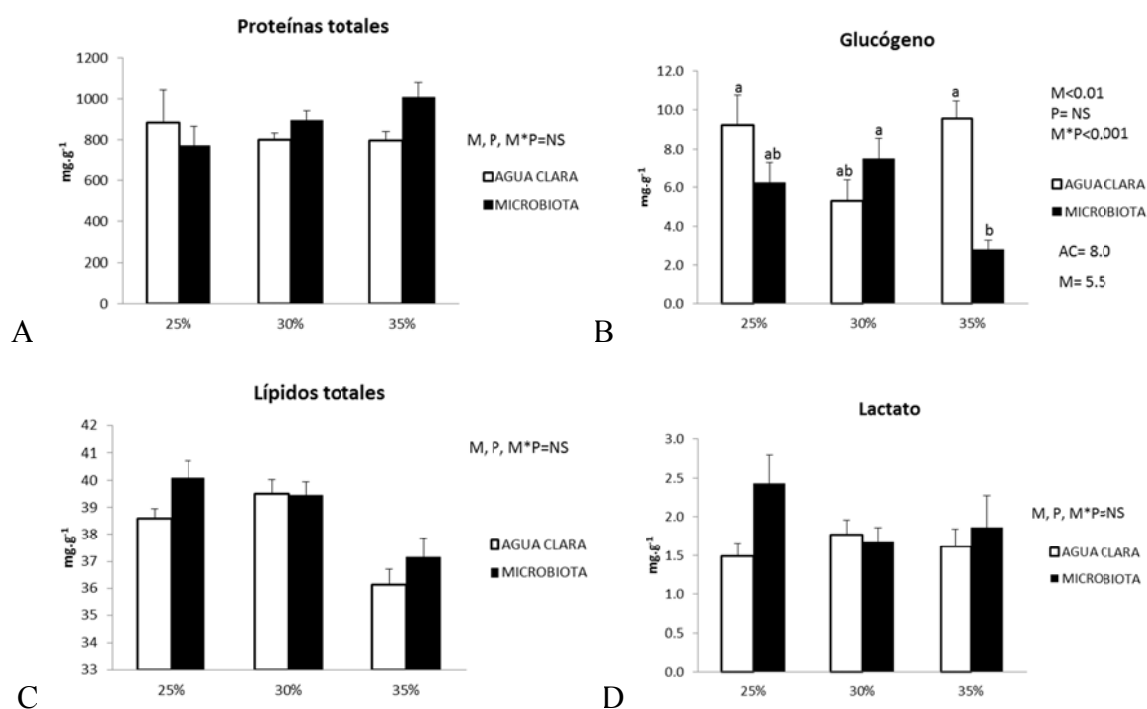


Figura 29. Análisis de proteínas totales, glucógeno lípidos totales y lactato en músculo de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P).

Hepatopáncreas

El nivel promedio de proteínas totales en hepatopáncreas de camarones cultivados bajo condiciones controladas de laboratorio fue de 242 mg g^{-1} y no se registró influencia

significativa ($P>0.05$) de la microbiota, ni del nivel de proteína en la dieta (Figura 30 A). Los niveles de glucógeno fueron mayores significativamente ($P<0.05$) en camarones cultivados en presencia de microbiota (26.2 mg g^{-1}) en comparación con los camarones cultivados en agua clara (20.6 mg g^{-1} ; Figura 30 B).

Las diferencias significativas en las concentraciones de lípidos totales ($P<0.05$) y triglicéridos ($P<0.01$) en hepatopáncreas se debieron a la presencia de microbiota y a la interacción de ésta con el porcentaje de proteína en la dieta. En general, los camarones cultivados bajo el tratamiento con microbiota, presentaron en promedio la menor concentración de lípidos totales y triglicéridos (124.6 y 103.2 mg g^{-1} , respectivamente) en comparación con los camarones cultivados en agua clara (173.9 y 149.8 mg g^{-1} , respectivamente; Figura 30 C y D). Sin embargo, fue el tratamiento con agua clara y 35% de proteína en la dieta, el que presentó el mayor contenido de lípidos totales (224.4 mg g^{-1}), mientras que los más bajos contenidos (123.7 y 93.8 mg g^{-1}) se presentaron en camarones cultivados con microbiota y con 25 y 35% de proteína en la dieta, respectivamente. De manera similar, la mayor concentración de triglicéridos (196.9 mg g^{-1}) se presentó en el tratamiento con agua clara y 35% de proteína en la dieta. En este caso, las menores concentraciones se presentaron en el tratamiento agua clara con 25% de proteína (110.3 mg g^{-1}) y microbiota con 35% de proteína (65.4 mg g^{-1} ; Figura 30 D).

Las diferencias significativas ($P<0.05$) entre los niveles de lactato en hepatopáncreas se debieron solamente al tratamiento con microbiota, el cual presentó las mayores concentraciones (0.10 mg g^{-1}) en comparación con los camarones cultivados en agua clara (0.06 mg g^{-1}), tal y como se muestra en la figura 30. Cabe mencionar que el nivel de lactato en camarones alimentados con 30% de proteína y con la presencia de microbiota (0.079 mg/g) fue similar al nivel en camarones cultivados sin microbiota (0.081 mg g^{-1} ; Figura 30 E).

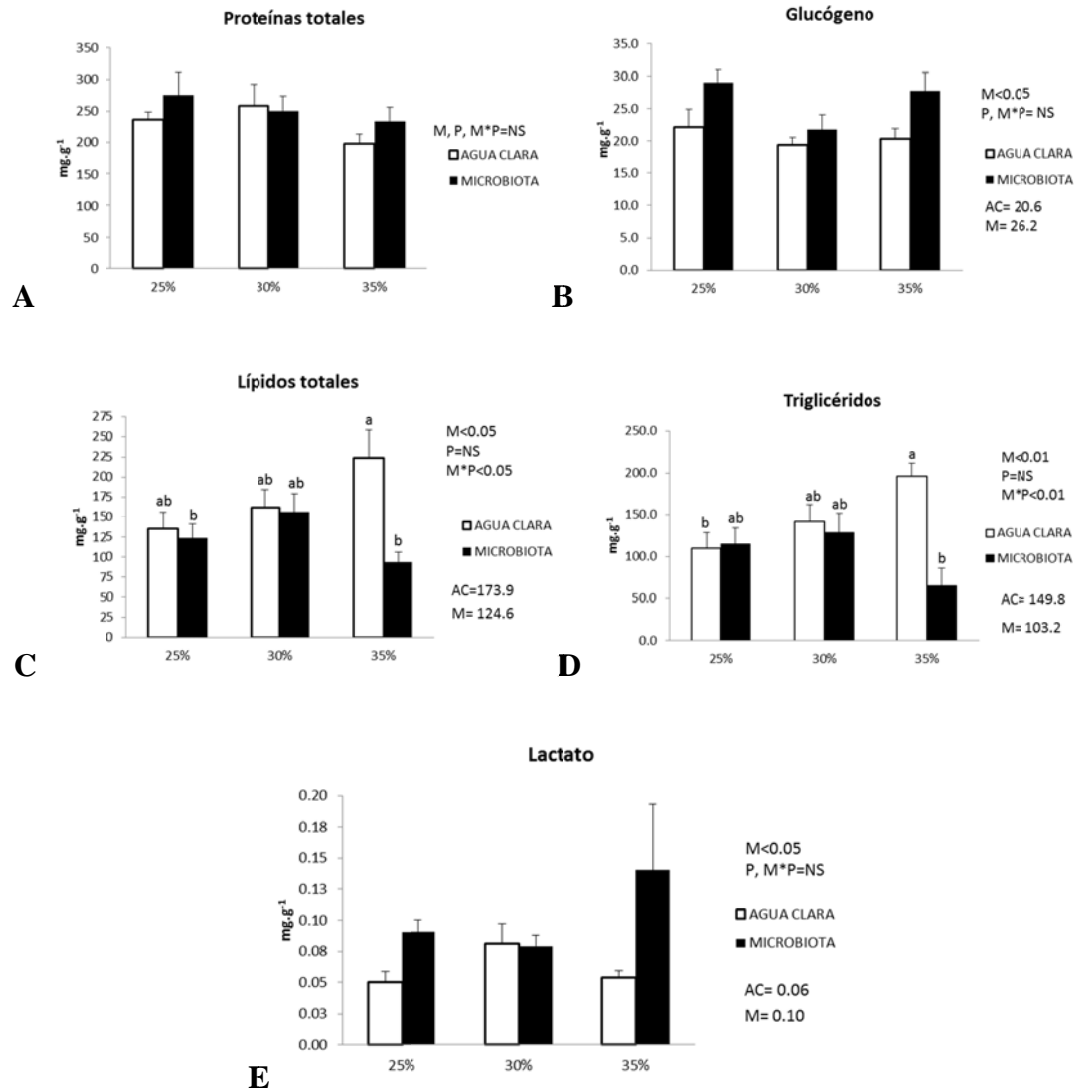


Figura 30. Análisis de proteínas totales, glucógeno, lípidos totales, triglicéridos y lactato en hepatopáncreas con (<0.05) o sin (NS) diferencias significativas debido al tratamiento microbiota (M), porcentaje de proteína en la dieta (P) o a la interacción de ambos factores (M*P).

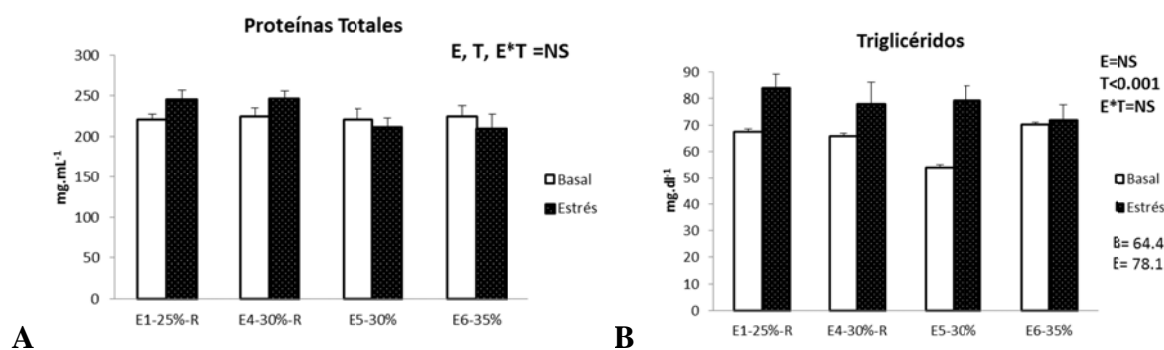
7.7.2. Experimento 2: Cultivo hiper-intensivo en condiciones de granja (Acuicultura Mahr)

Hemolinfa

La concentración promedio de proteínas totales en hemolinfa en camarones cultivados bajo condiciones comerciales, fue de 225.7 mg ml⁻¹. No se observó ningún efecto por la influencia del factor estrés ni por el estanque (Figura 31 A).

El contenido de triglicéridos en hemolinfa fue significativamente ($P < 0.001$) mayor en el grupo estrés (78.1 mg dl⁻¹) en comparación del grupo basal (64.4 mg dl⁻¹). Por otra parte, no se observaron diferencias entre los estanques ni por interacción con el tratamiento (Figura 31 B).

Con respecto al contenido de hemocianina, las diferencias significativas ($P < 0.001$) se debieron al estanque. Los camarones del estanque 5 alimentados con 30% de proteína y con re-siembra presentaron los menores concentraciones de hemocianina (98.9 mg ml⁻¹), en comparación con los camarones del estanque 4 alimentados con el mismo nivel de proteína y sin re-siembra y que registraron las mayores concentraciones (124.6 mg ml⁻¹; Figura 31 C).



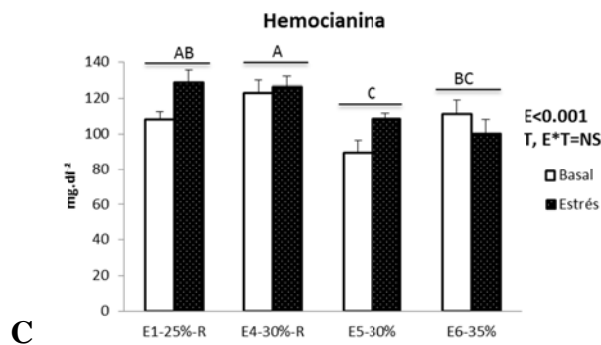


Figura 31. Análisis de proteínas totales, triglicéridos y hemocianina en hemolinfa con (<0.05) o sin (NS) diferencias significativas debido al estanques (E), al tratamiento (T= grupo basal y estrés) o a la interacción de ambos factores (E*T). R: indica resiembra de estanque.

Las diferencias significativas ($P < 0.01$) en los niveles de glucosa en hemolinfa se debieron al estanque y con los mayores niveles (53.3 mg dl^{-1}) en camarones del estanque 4 alimentados con 30% de proteína y con re-siembra, mientras que los menores niveles (28.5 mg dl^{-1}) se observaron en camarones alimentados con 25% de proteína en el estanque 1 y con re-siembra (Figura 32 A).

Los niveles de lactato fueron significativamente ($P < 0.001$) mayores en el grupo estrés (50.0 mg dl^{-1}), con respecto al grupo basal (7.9 mg dl^{-1}). Los mayores incrementos de lactato (68 y 66 mg dl^{-1}) se presentaron en los estanques 1 y 6 indicados con 25% y 35% de proteína en la dieta respectivamente, mientras que los incrementos menores fueron en los camarones alimentados con 30% de proteína en la dieta con y sin re-siembra en los estanques 4 y 5, respectivamente (Figura 32 B).

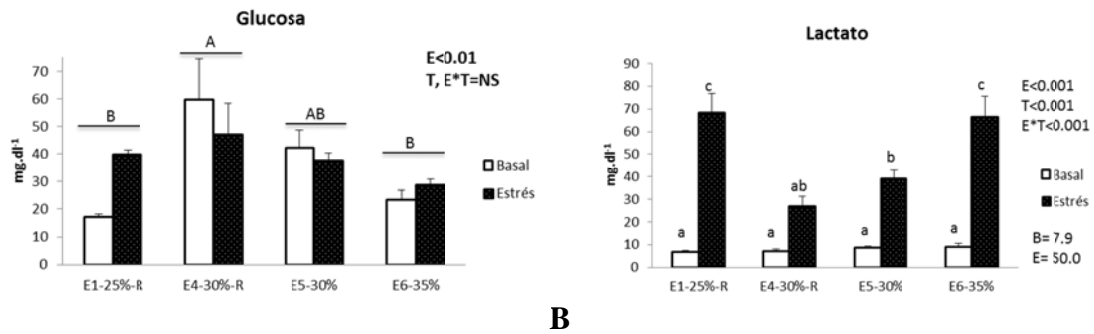


Figura 32. Análisis de proteínas glucosa y lactato en hemolinfa con (<0.05) o sin (NS) diferencias significativas debido al estanques (E), al tratamiento (T= grupo basal y estrés) o a la interacción de ambos factores (E*T). R: indica resiembra de estanque.

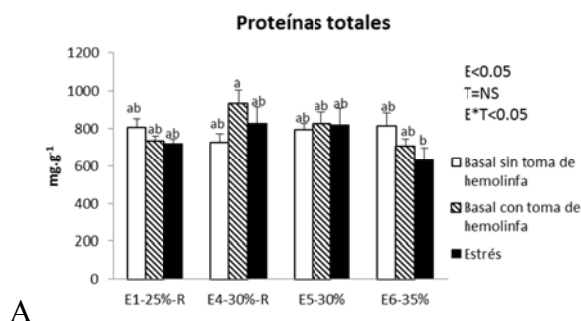
Músculo

Las diferencias significativas ($P < 0.05$) en la concentración de proteínas totales en el músculo de camarones cultivados bajo condiciones comerciales se debieron al estanque y a la interacción estanque y condición de estrés. Los mayores niveles de proteína (830 y 813 mg g^{-1}) se presentaron en los camarones del estanque 4 y 5 respectivamente, en ambos se alimentó con 30% de proteína pero solo en el caso del estanque 4 se realizó re-siembra. Los niveles más bajos de proteína en el músculo (752 y 717 mg g^{-1}) se presentaron en camarones del estanque 1 y 6, los cuales fueron alimentados con 25% y 35% de proteína, respectivamente. La interacción indica que el efecto de estrés moderado (basal con toma de hemolinfa) o intenso (confinamiento en cubeta) depende del estanque, aunque no se observaron diferencias significativas entre medias individuales (Figura 33 A).

El nivel de glucógeno fue diferente significativamente ($P < 0.001$) entre los estanques. Los camarones en el estanque 4 y 5, presentaron los mayores niveles (19.3 y 18.3 mg g^{-1}); en ambos estanques la alimentación fue con 30% de proteína pero solo en el estanque 4 se realizó re-siembra. La menor concentración de glucógeno (13.5 mg g^{-1}) la presentaron camarones del estanque 1, los cuales fueron alimentados con 25% de proteína y se realizó re-siembra. Por otra parte, los camarones del estanque 6 presentaron niveles promedio de 16 mg g^{-1} de glucógeno en músculo (Figura 33 B).

El contenido de lípidos totales fue significativamente ($P < 0.001$) mayor (39.7 mg g^{-1}) en el músculo de camarones cultivados en el estanque 1 con 25% de proteína en la dieta, en comparación con el contenido promedio (30.3 mg g^{-1}) de los demás estanques, tal y como se observa en la figura 33 C.

Las diferencias significativa ($P < 0.05$) en los niveles de lactato en músculo se debieron al estanque, al tratamiento (factor de estrés) y la interacción entre ambos factores. En general, el grupo basal sin toma de hemolinfa presentó el menor nivel (2.4 mg g^{-1}) de lactato, el cual fue significativamente diferente a los niveles en el grupo basal con toma de hemolinfa (3.5 mg g^{-1}) y al grupo estrés (3.9 mg g^{-1}). Particularmente en estanque 1 y 5, los camarones del grupo estrés presentaron mayores niveles de lactato (3.4 y 4.7 mg g^{-1} , respectivamente), mientras que el grupo basal sin toma de hemolinfa presentó los menores niveles (2.2 y 2.3 mg g^{-1} , respectivamente). En caso del estanque 4, el nivel presentado por el grupo basal con toma de hemolinfa fue mayor (4.1 mg g^{-1}) en comparación con el grupo basal sin toma de hemolinfa. Mientras que en el estanque 5, el grupo estrés presentó el mayor nivel de lactato (4.6 mg g^{-1}), en comparación al grupo basal sin toma de hemolinfa (2.3 mg g^{-1} ; Figura 33 D).



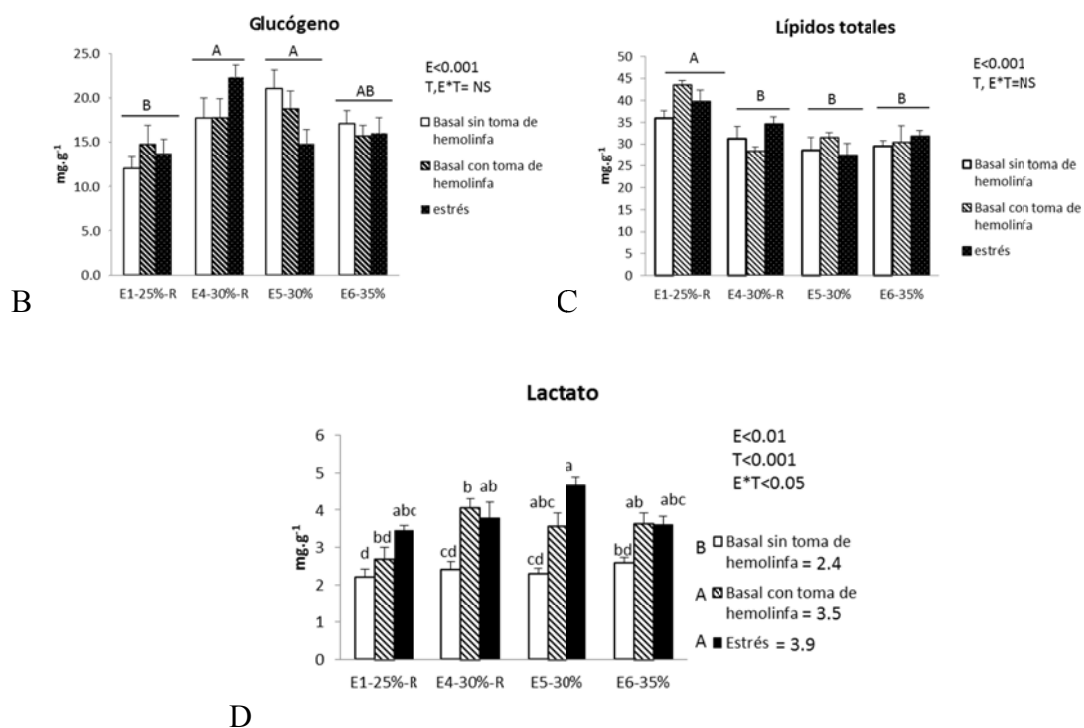


Figura 33. Análisis de proteínas totales, glucógeno, lípidos totales y lactato en músculo con (<0.05) o sin (NS) diferencias significativas debido al estanques (E), al tratamiento (T= grupo basal y estrés) o a la interacción de ambos factores (E*T). R: indica resiembra de estanque.

Hepatopáncreas

El contenido de proteínas totales en hepatopáncreas fue diferente ($P < 0.01$) en relación al estanque y la interacción entre éste y el tratamiento (factor estrés). El nivel de proteínas en camarones del estanque 4 ($113.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) y 5 ($115.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), alimentados con 30% fue significativamente menor que el encontrado en el estanque 1 ($187.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) y 6 ($169.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), indicados para 25% y 35% de proteína en la dieta, respectivamente (Figura 34 A).

El nivel de proteínas fue influenciado por el factor estrés únicamente en el estanque 1, en el cual la concentración fue significativamente menor con estrés moderado (grupo basal con toma de hemolinfa) e intenso (grupo estrés con confinamiento en cubeta) en comparación del grupo basal sin toma de hemolinfa (Figura 34 A).

El nivel de glucógeno fue diferente significativamente ($P < 0.05$) entre los estanques. Los camarones alimentados con 25% de proteína y con re-siembra del estanque 1, presentaron los mayores niveles (14.8 mg g^{-1}) en comparación a la concentración presentada en camarones alimentados con 30 y 35% de proteína en los estanques 5 y 6 (10.9 y 10.4 mg g^{-1} ; Figura 34 B).

La concentración de lípidos totales fue diferente significativamente debido al estanque ($P < 0.001$) y al tratamiento o factor estrés ($P < 0.05$), tal y como se observa en la figura 34 C. Los estanques 1 (501.7 mg g^{-1}) y 4 (483.5 mg g^{-1}) presentaron las menores concentraciones en comparación con el estanque 6 (651.2 mg g^{-1}) y con niveles intermedios en el estanque 5 (563.3 mg g^{-1}). También se presentó un efecto significativo del factor estrés, donde los camarones del grupo basal sin toma de hemolinfa presentaron las mayores concentraciones de lípidos (587.8 mg g^{-1}), que fueron significativamente mayores a las concentraciones en camarones del grupo estrés (514.3 mg g^{-1} ; Figura 34 C).

El nivel de triglicéridos en el hepatopáncreas fue diferente ($P < 0.05$) entre los estanques, siendo los camarones del estanque 1 alimentados con 25% de proteína y con resiembra, quienes presentaron mayores niveles de triglicéridos (243.4 mg g^{-1}), significativamente diferentes a los niveles en el estanque 5 (204.6 mg g^{-1}) y 6 (200.0 mg g^{-1}), en los cuales no se realizó re-siembra y se alimentó con 30% 35% de proteína, respectivamente (Figura 34 D).

Los niveles de lactato en hepatopáncreas se registraron en la figura 34 E, donde las diferencias significativas ($P < 0.05$) se debieron a la interacción entre el estanque y el tratamiento. Específicamente los camarones del grupo basal con toma de hemolinfa en el estanque 1 y 6, alimentados con 25% y 35% de proteína, respectivamente, presentaron mayores niveles de lactato (0.44 y 0.45 mg g^{-1} , respectivamente). En contraste, en el estanque 4 y 5 los camarones del grupo estrés presentaron los mayores niveles de lactato (0.40 y 0.51 mg g^{-1} , respectivamente), mientras que los camarones del grupo basal con toma de hemolinfa presentaron los menores niveles en dichos estanques (0.34 y 0.22 mg g^{-1} ; Figura 34 E).

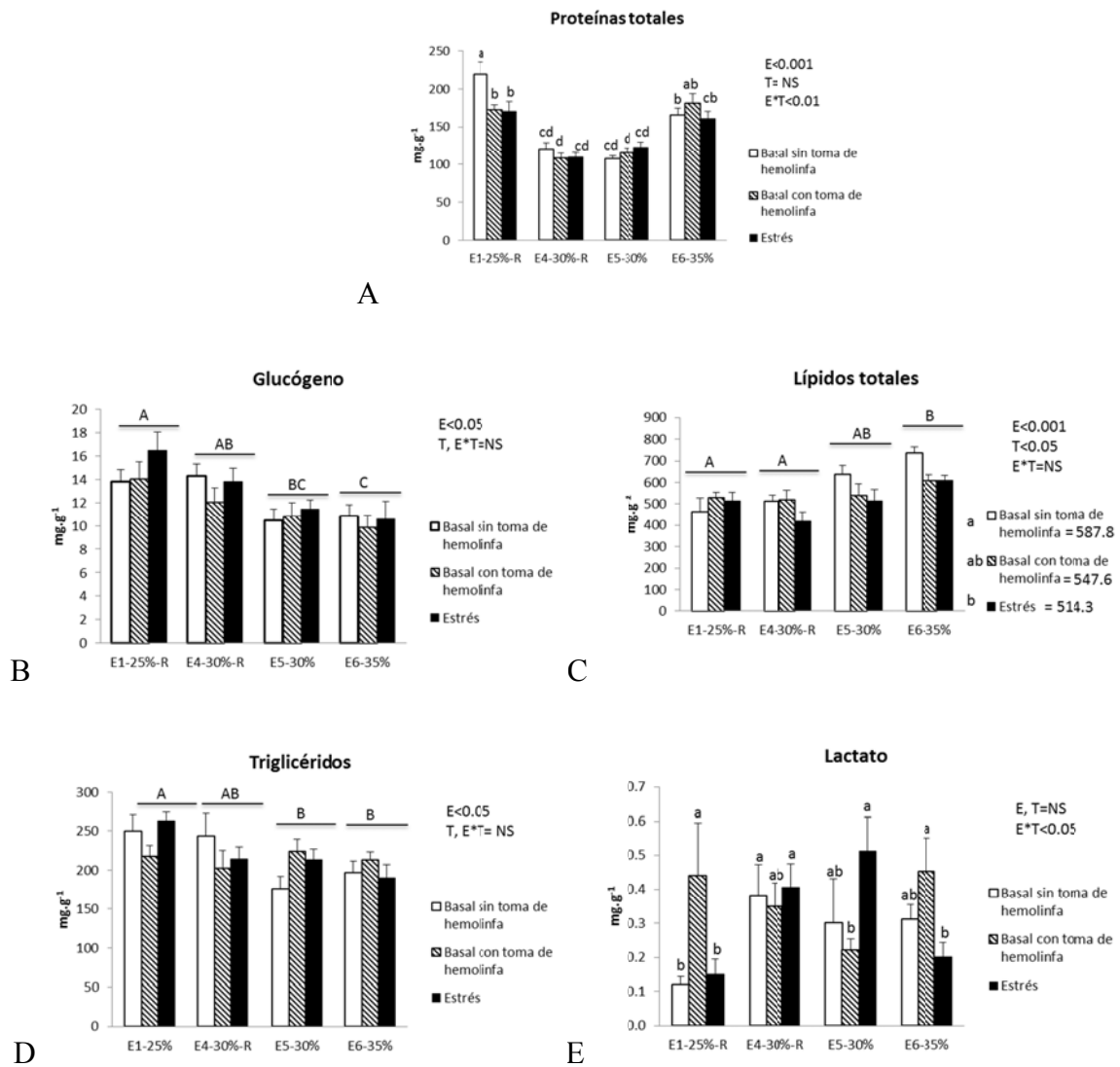


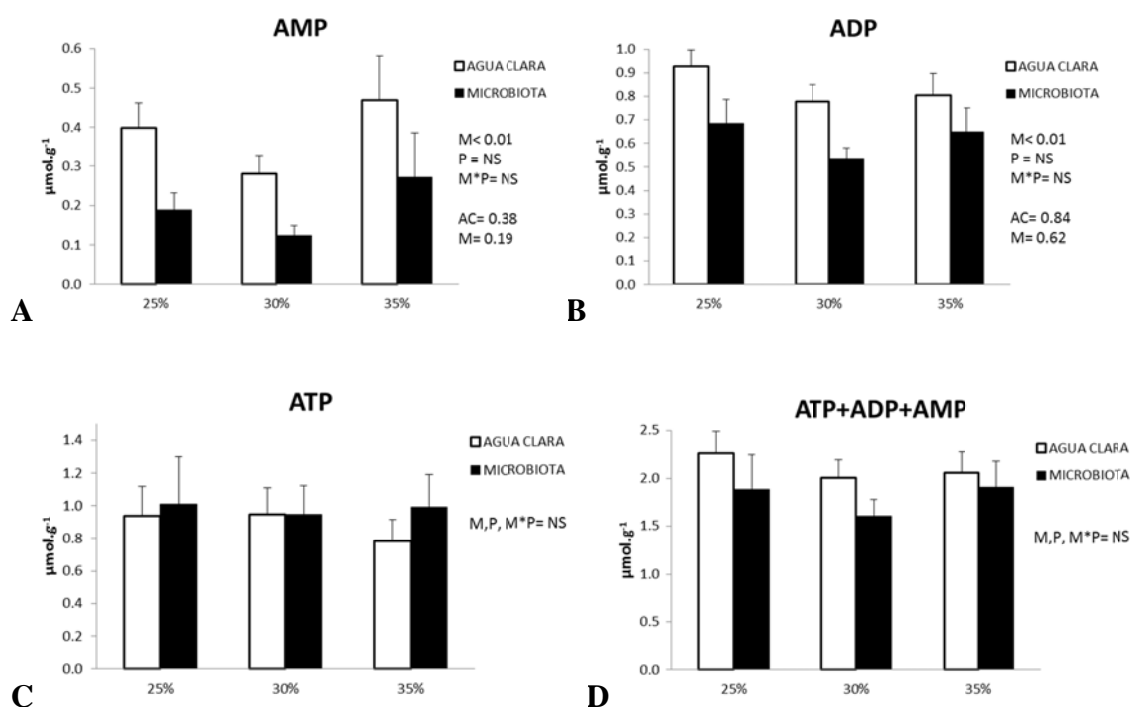
Figura 34. Análisis de proteínas totales, glucógeno, lípidos totales, triglicéridos y lactato en hepatopáncreas con (<0.05) o sin (NS) diferencias significativas debido al estanque (E), al tratamiento (T= grupo basal y estrés) o a la interacción de ambos factores (E*T). R: indica resiembra de estanque.

7.8. Carga energética adenínica (CEA)

7.8.1. Experimento 1: CIBNOR

Muestreo I

Las concentraciones de AMP, ADP, ATP, su suma y la CEA en camarones completos del muestreo I se muestran en la figura 35. Los niveles de AMP y ADP se vieron afectados significativamente ($P < 0.01$) por el tratamiento con microbiota, el cual presentó menores niveles (0.19 y $0.62 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente) en comparación con los camarones cultivados en agua clara (0.38 y $0.84 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente; Figura A y B). La concentración de ATP no fue significativamente diferente entre tratamientos, nivel de proteína y la interacción (Figura 35 C). La suma de todos los nucleótidos no presentó diferencias por el nivel de proteína en la dieta o por el tratamiento con microbiota (Figura 35 D). La CEA fueron significativamente mayor en el tratamiento con microbiota (0.71) en comparación con el tratamiento en agua clara (0.61 ; Figura E).



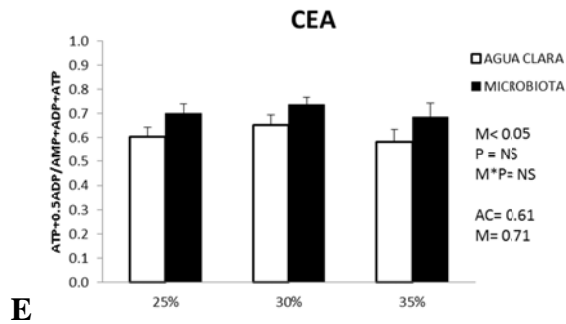


Figura 35. Concentraciones de AMP, ADP, ATP, su suma y CEA en músculo de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P) del muestreo I.

Muestreo II

La concentración de nucleótidos en el músculo de camarones del muestreo IV, se muestran en la figura 36. Los niveles de AMP y ADP no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) por efecto de los tratamientos, el nivel de proteína o de la interacción entre estos dos factores (Figura 36 A y B). Los niveles de ATP fueron significativamente ($P < 0.001$) mayores en el cultivo con microbiota ($4.1 \mu\text{mol g}^{-1}$) en comparación de camarones cultivados en agua clara ($3.2 \mu\text{mol g}^{-1}$; Figura 36 C).

La suma total de nucleótidos presentó diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.001$) y nivel de proteína en la dieta ($P < 0.05$). Los camarones bajo el tratamiento con microbiota presentaron una mayor suma de nucleótidos ($7.3 \mu\text{mol g}^{-1}$) en comparación con camarones cultivados en agua clara ($6.3 \mu\text{mol g}^{-1}$). La suma de nucleótidos en el tratamiento con 25% de proteína ($7.1 \mu\text{mol g}^{-1}$) fue significativamente mayor en comparación de 30% y 35% (6.8 y $6.42 \mu\text{mol g}^{-1}$; Figura 36 D).

La CEA no fue diferente significativamente ($P > 0.05$) entre tratamientos, por nivel de proteína y por la interacción entre ambos. Sin embargo, en la figura 36 E se observa que las mayores concentraciones las presentaron los camarones cultivados con microbiota.

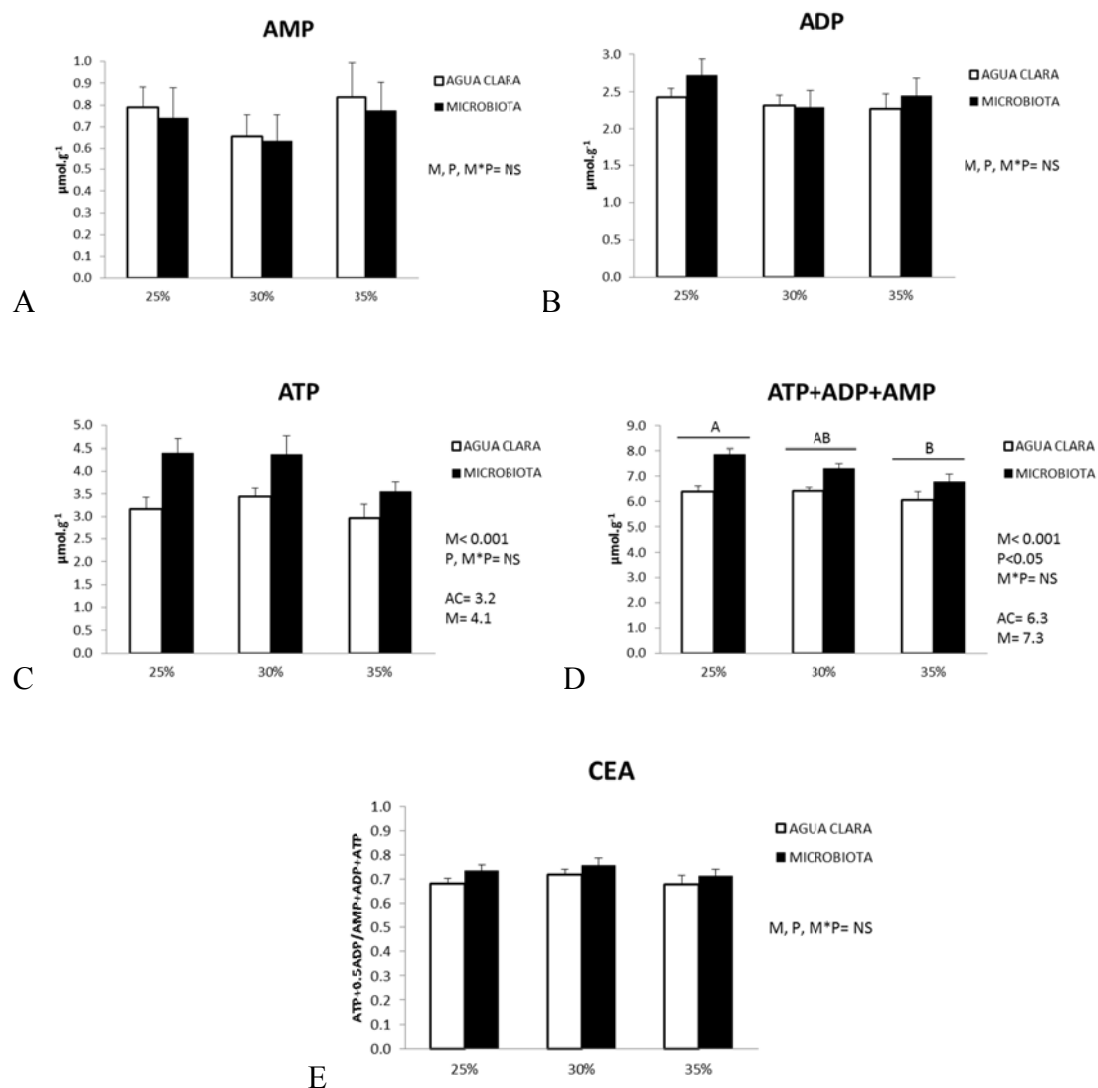


Figura 36. Concentraciones de AMP, ADP, ATP y CEA en músculo de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P) del muestreo II.

7.8.2. Experimento 2: Acuicultura Mahr

En la figura 37 se muestran las concentraciones de nucleótidos en el músculo de camarones cultivados bajo condiciones comerciales. La concentración de AMP fue diferente significativamente ($P < 0.001$) tanto por efecto de la condición de estrés como entre

los estanques. Los camarones del grupo basal sin toma de hemolinfa presentaron el mayor nivel promedio de AMP ($0.8 \mu\text{mol g}^{-1}$), posteriormente del grupo estrés presentó niveles intermedios ($0.6 \mu\text{mol g}^{-1}$) y por último el grupo basal con toma de hemolinfa presentó el menor nivel ($0.2 \mu\text{mol g}^{-1}$; Figura 37 A).

La concentración de AMP fue mayor en camarones del estanque 5 y 6, alimentados con 30% y 35% de proteína y sin re-siembra (0.6 y $0.7 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente) en comparación con camarones del estanque 1, alimentados con 25% de proteína y con re-siembra, ($0.3 \mu\text{mol g}^{-1}$; Figura 37 A).

En la figura 37 B se observa que las diferencias significativas ($P < 0.001$) en la concentración de ADP fueron debido solamente a la condición de estrés. Las concentraciones mayores se encontraron en camarones del grupo basal sin toma de hemolinfa y en el grupo estrés (2.5 y $2.2 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente), significativamente diferentes al grupo basal con toma de hemolinfa ($1.6 \mu\text{mol g}^{-1}$).

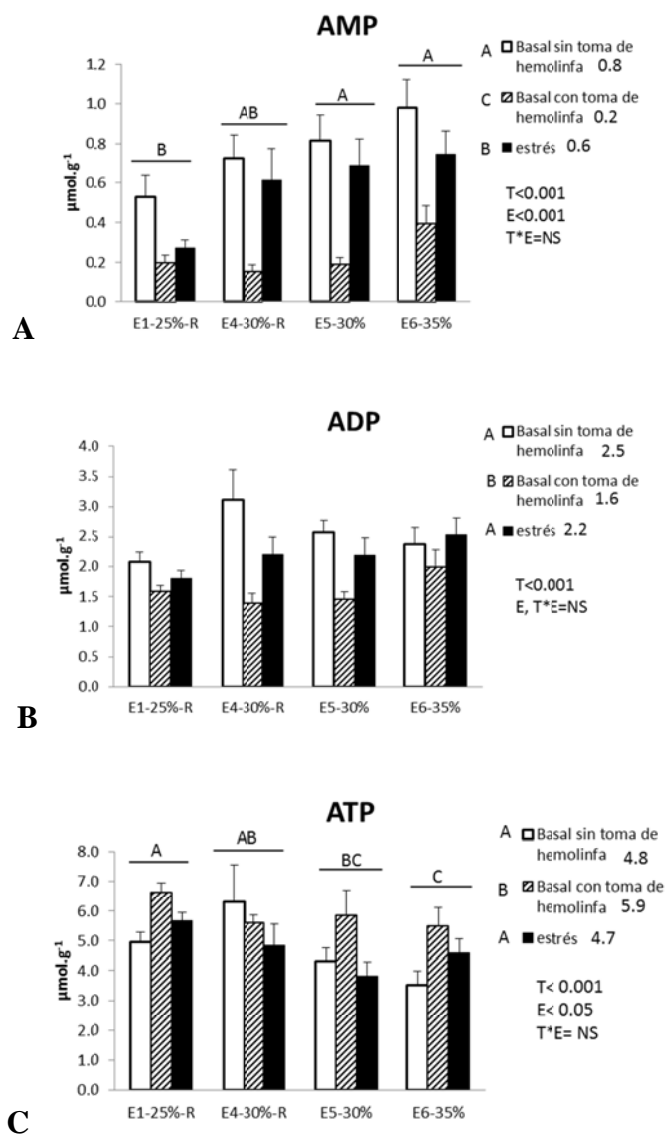
Los niveles de ATP fueron diferentes significativamente por efecto del tratamiento ($P < 0.001$) y entre estanques ($P < 0.05$). El grupo basal sin toma de hemolinfa y el grupo estrés, presentaron los menores niveles de ATP (4.8 y $4.7 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente) en comparación con el grupo basal con toma de hemolinfa ($5.9 \mu\text{mol g}^{-1}$; Figura 37 C).

Los camarones del estanque 1, alimentados con 25% de proteína y con re-siembra, presentaron los mayores niveles de ATP ($5.8 \mu\text{mol g}^{-1}$) diferentes significativamente a los niveles encontrados en camarones del estanque 6, alimentados con 35% de proteína y sin re-siembra, ($4.5 \mu\text{mol g}^{-1}$). Los camarones del estanque 4 y 5, los cuales fueron alimentados con 30% de proteína y con y sin re-siembra, presentaron valores intermedios (5.6 y $4.7 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente; Figura 37 C). Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la suma de nucleótidos por efecto de los tratamiento, entre estanques y su interacción (Figura 37 Figura 37D).

La CEA fue diferente significativamente ($P < 0.001$) según el grado de estrés y el estanque. En el grupo basal con toma de hemolinfa se encontró el mayor nivel promedio de

CEA (0.9), significativamente diferente al nivel en camarones del grupo basal sin toma de hemolinfa y el grupo estrés, los cuales presentaron menores niveles (0.7 y 0.8; respectivamente; Figura 37 E).

En los camarones del estanque 1, alimentados con 25% de proteína y con resiembra, se encontró el mayor valor de CEA (0.84), el cual fue diferente significativamente al valor en camarones del estanque 6(0.73), alimentados con 35% de proteína y sin resiembra. Por último, los valores intermedios de CEA se presentaron en camarones del estanque 4 y 5 (0.81 y 0.78, respectivamente; Figura 37 E).



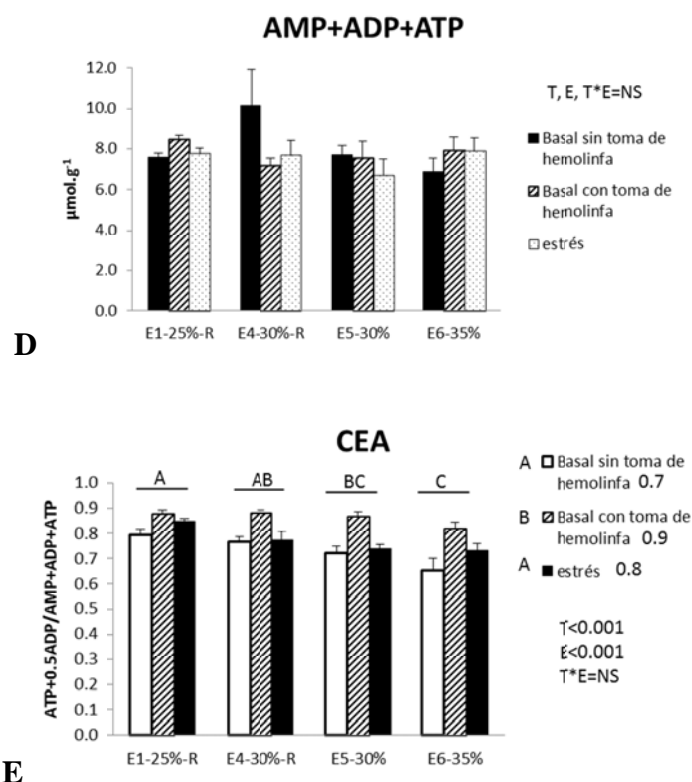


Figura 37. Concentraciones de AMP, ADP, ATP, ATP y CEA en músculo de camarones cultivados en distintos estanques (E) con distintos niveles de proteínas y resiembra, y bajo distintos tratamientos de estrés (T). R: indica resiembra de estanque.

7.9. Fosfato de arginina (Arg-P)

7.9.1. Experimento 1: CIBNOR

La figura 38 se muestra la concentración de fosfato de arginina (Arg-P) en el músculo de camarones del muestreo I y II, se observa que en ambos muestreos no se presentaron diferencias significativas por efecto de la microbiota, nivel de proteína en la dieta o su interacción. Sin embargo, en ambos muestreos, los camarones cultivados con microbiota presentaron mayores concentraciones de Arg-P, concretamente para las dietas con 25 y 30% de proteína en caso del muestreo I y para la dieta con 30% de proteína para el

muestreo II. Por último, cabe señalar que la concentración promedio en camarones del muestreo I fue 30% mayor ($3.7 \text{ nmoles.g}^{-1}$) que la concentración en los camarones del muestreo II ($2.6 \text{ nmoles.g}^{-1}$).

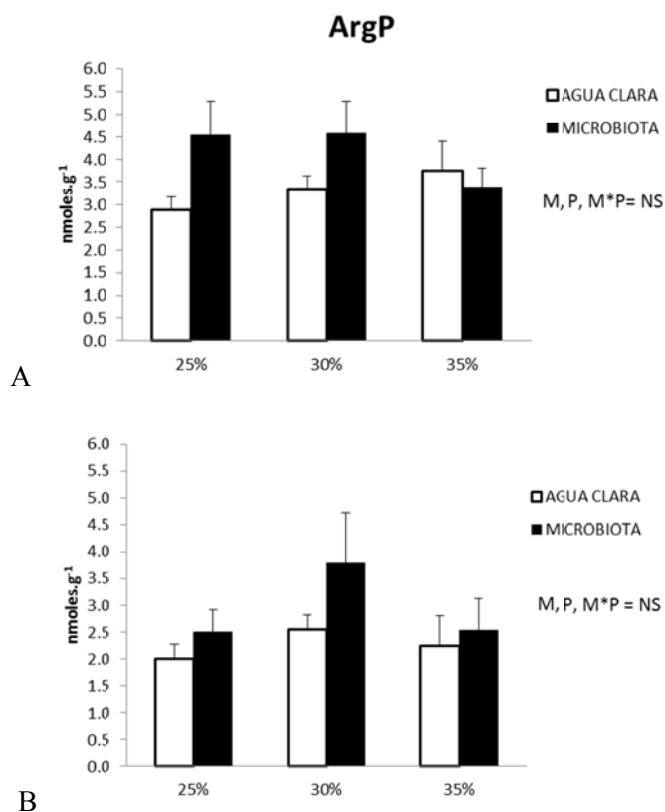


Figura 38. Concentración de fosfato de arginina (ArgP) en músculo de camarones cultivados en presencia y ausencia de microbiota (M) y con diferentes porcentajes de proteína en la dieta (P) del muestreo I (A) y muestreo II (B).

7.9.2. Experimento 2: Acuicultura Mahr

Las concentraciones de Arg-P en los camarones del experimento 2 se muestran en la figura 39, donde se observa que se presentaron diferencias significativas ($P < 0.001$) tanto por efecto del tratamiento y como del estanque.

Por un lado, en los estanques con resiembra y donde se alimentó con 25% y 30% de proteína, presentaron las mayores concentraciones en comparación con los estanques que no se resembraron. Por otro lado, los camarones del tratamiento basal con toma de hemolinfa presentaron casi el doble de concentración de Arg-P ($5.2 \text{ nmoles.g}^{-1}$) en comparación de los camarones del tratamiento de estrés intenso (confinamiento en cubeta; $2.7 \text{ nmoles.g}^{-1}$).

Aunque la interacción no fue significativa, sólo en el estanque 5 (30% de proteína y sin re-siembra) se observa claramente una disminución en la concentración de Arg-P por efecto del tratamiento de estrés intenso no sólo con respecto al grupo con toma de hemolinfa sino también al grupo control sin toma de hemolinfa (Figura 39).

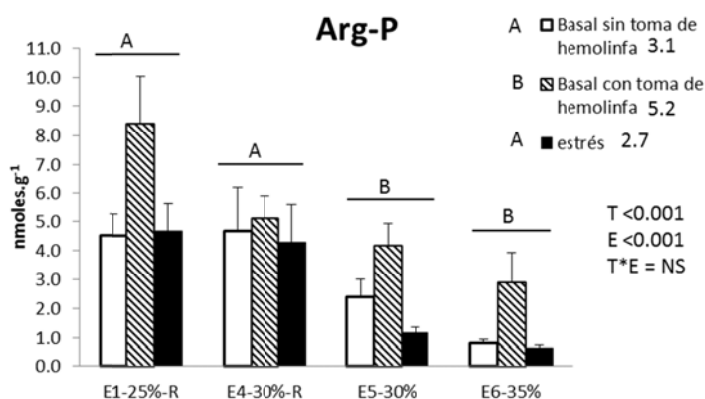


Figura 39. Concentraciones de fosfato de arginina (ArgP) en músculo de camarones cultivados en distintos estanques (E) con distintos niveles de proteínas y resiembra, y bajo distintos tratamientos de estrés (T). R: indica resiembra de estanque.

8. DISCUSIÓN

8.1. Nutrientes residuales

8.1.1. Dinámica de nutrientes en relación con el sistema de cultivo

El sistema hiperintensivo ($>300 \text{ org/m}^2$) con recambio mínimo de agua y con manejo microbiológico, consiste en la adición diaria de una mezcla diversificada de bacterias marinas, levaduras marinas y metabolitos producidos en un bioreactor. Éste sistema se caracteriza por presentar una dinámica de nutrientes, descrita en cuatro fases. La primera fase (FI) consiste en el aumento paulatino de TAN ($\text{N-NH}_4 + \text{N-NH}_3$) a medida que aumenta la biomasa, el suministro de alimento y el porcentaje de proteína del mismo (Figura 2). Una segunda fase (FII) en la cual los niveles de TAN declinan rápidamente y los niveles de N-NO_2 se incrementan rápidamente (Figura 2 y 4). La tercera fase (FIII) ocurre en corto tiempo después del inicio de la FII y se caracteriza por el incremento de N-NO_3 y N-NO_2 (Figura 5). En la cuarta fase (FIV) los N-NO_2 y N-NO_3 declinan simultáneamente y se presenta un resurgimiento asociado a los niveles de TAN (Figura 11). Estas fases están descritas de acuerdo a la dinámica de los diferentes compuestos de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) ya que otros componentes como el fósforo inorgánico disuelto, se incrementan paulatinamente a lo largo del ciclo de cultivo (Figura 7).

Desde un punto de vista biológico y microbiológico, la FI se caracteriza por la asimilación heterotrófica de $\text{N-NH}_4 + \text{N-NH}_3$ (Gao y Tao, 2011). La FII ocurre en exceso de $\text{N-NH}_4 + \text{N-NH}_3$, el cual se oxida microbiológicamente para generar N-NO_2 . La FIII ocurre cuando un incremento de N-NO_2 inicia los procesos microbiológicos de nitrificación que generan N-NO_3 . La FIV ocurre cuando domina el ambiente de N-NO_2 , N-NO_3 y P-PO_4 e inicia un proceso de asimilación autotrófica de N-NO_2 y N-NO_3 , el cual se podría caracterizar como desnitrificación asimilatoria autotrófica (Wagner *et al.*, 2002).

En la FI cuando la concentración de $\text{N-NH}_4 + \text{N-NH}_3$ o TAN es mayor, el nitrógeno puede ser reciclado en el sistema de cultivo de 3 maneras: 1) por medio del consumo de organismos foto-autotróficos, tales como las microalgas, 2) por la acción conjunta de bacterias oxidadoras de amonio y nitrificadoras, las cuales convierten el N-NH_4 en N-NO_2

y posteriormente a N-NO₃ y 3) a través de la incorporación directa del N-NH₄ + N-NH₃ en varios bio-componentes, por ejemplo aminoácidos y proteínas, que constituyen la biomasa microbológica por parte de levaduras y bacterias heterotróficas (Ebellig *et al.*, 2006; Hargreaves, 2006).

La dirección del reciclamiento del TAN en la FI depende principalmente de relación C:N, así por ejemplo Luo y colaboradores (2013) observaron la disminución en 5 días del TAN de niveles de 117.28 mg N L⁻¹ a 2 mg N L⁻¹ (sin un aumento significativo de N-NO₂ y N-NO₃) al adicionar de una fuente de carbono (glucosa). La disminución fue el resultado de la acción de bacterias heterotróficas, las cuales utilizan glucosa para su crecimiento en la FI. Estos mismos autores reportan un aumento de N-NO₂ 5 días posteriores a la disminución de TAN, el cual fue producido por oxidación y desnitrificación autotrófica (FII), por lo cual los autores concluyeron que la oxidación del amonio y la nitrificación se llevaron a cabo después de 5 días posteriores a la disminución de TAN. En comparación con los acuarios con microbiota (experimento 1), se observó una disminución de TAN de 5.8 mg.L⁻¹ hasta <0.1 mg L⁻¹ en 8 días, pero junto con ésta disminución se observó el aumento paulatino de N-NO₂ y N-NO₃ (Figura 2, 4 y 5), por lo tanto la primera parte del proceso de oxidación del amonio a nitritos se observó en la FII, y en comparación con Luo y colaboradores (2013) la duración de FI en acuarios con microbiota fue menor, por lo que la producción heterotrófica no fue significativa debido a la intensa actividad de bacterias oxidadoras que oxidaron rápidamente el N-NH₄ en N-NO₂ en la FII (Figura 4). La segunda parte del proceso de nitrificación también tuvo lugar en los acuarios con microbiota, pero las bacterias que convierten los N-NO₂ en N-NO₃ no fueron capaces o no presentaron la biomasa suficiente para disminuir significativamente la concentración de N-NO₂ (Figura 4).

En el desarrollo del cultivo de *Vinatea et al.* (2010) y al igual que en el cultivo del experimento 2 tuvieron lugar una serie de variaciones, donde un aumento de N-NO₃ fue coincidente con un decremento de N-NO₂, y al final del cultivo se presentó gran acumulación de N-NO₃, aproximadamente 9 veces mayor que la concentración presentada en el cultivo del experimento 2 (Figura 9, 10 y 11) y 19 veces mayor que en el cultivo del experimento 1. En el experimento 2 se presentaron mayores concentraciones de TAN

(Figura 12) y en comparación con las concentraciones reportadas por diversos autores al final del cultivo (Tabla X) se registraron concentraciones 30 veces mayores en todos los estanques con excepción del estanque 6 que presentó concentraciones menores de 1 mg L^{-1} en la cosecha.

En la Tabla X se muestran las concentraciones de nutrientes residuales en diferentes investigaciones y en general, se observa que en sistemas con altos recambios de agua o agua clara (AC) la concentración de nutrientes se mantiene a niveles bajos (Velasco, 2000; Wasielesky *et al.*, 2006; Xu y Pan 2013; Xu *et al.*, 2013). Mientras que en los sistemas de bioflocs (BF) la acumulación de nutrientes residuales dependen de las condiciones del sistema de cultivo. Por ejemplo, en el trabajo de Wasielesky *et al.*, (2006) el cultivo con bioflocs recibió el 50% de recambio y se realizó con agua residual del cultivo de maternidad, es probable que el recambio y la presencia de organismos autótrofos ayudó a mantener bajas concentraciones de compuestos nitrogenados, los cuales fueron comparables a la concentración en agua clara. Por otro lado, en los trabajos de Xu y Pan (2013) y Xu *et al.* (2013), Yaemsooksawat *et al.* (2009) y Tacon *et al.* (2002) no se reportan diferencias de las concentraciones de nutrientes entre agua clara y agua de biofloc al final del cultivo, debido a que al crecimiento de bacterias que fue promovido por la constante complementación de una fuente de carbono.

Lezama-Cervantes y colaboradores (2010) prueban la eficiencia del uso de tapetes microbianos y un sistema de hidrociclón con recirculación de agua (SRA) en el cultivo de *L. vannamei* y al igual que en el presente estudio observaron una sucesión de especies de nitrógeno inorgánico disuelto (N-NH_4 , N-NO_2 , N-NO_3) y una acumulación de N-NO_2 y N-NO_3 al final del cultivo, pero en este caso la nitrificación se presentó desde el inicio y a lo largo del cultivo. En comparación con el cultivo realizado en el experimento 1 y 2 la nitrificación acontece de forma retardada, lo cual sugiere que las bacterias nitrificantes llegaron a los acuarios y estanques de forma natural y no por medio de la microbiota aplicada. Lo anterior, se encuentra sustentado con el análisis negativo en la identificación de bacterias nitrificadoras realizado en la semana 3 y 6 de cultivo solo en el experimento 1.

La concentración de N-NO₂ y N-NO₃ reportados en los acuarios con microbiota (experimento 1) y estanques (experimento 2) fue aproximadamente 25-15 y 1.5-6 veces mayores respectivamente, a la concentración reportada por Lezama-Cervantes y colaboradores (2010) y Wasielesky y colaboradores (2006). El aumento en la concentración de los nutrientes residuales del cultivo que realizaron Lezama-Cervantes y colaboradores (2010) no fue drástico debido a una densidad menor (120 org/m²) y al sistema de hidrociclón, el cual ayudo a separar los sólidos (heces y alimento no consumido), mientras que en los cultivos analizados en el presente estudio, se trabajó con sistemas hiperintensivos (>300 org/m²) y todos los sólidos permanecieron en el acuario o estanque, lo cual aumentó la oxidación de materia orgánica y por lo tanto el flujo de nutrientes fue mayor (Lezama-Cervantes *et al.*, 2010).

En el caso del tratamiento con microbiota del experimento 1, también se presentó una mayor acumulación de N-NO₂ (Figura 4), seguido de una menor acumulación de N-NO₃ (Figura 5). Los niveles de N-NO₃ y N-NO₂ son mayores en comparación con lo reportado por diferentes autores en sistemas de cultivo similares a los probados en el presente trabajo, por ejemplo en comparación con el trabajo de Baloi *et al.* (2013), la acumulación de N-NO₂ fue cien veces mayor en el tratamiento con microbiota del experimento 1.

La acumulación de compuestos nitrogenados en forma de N-NO₂ puede deberse 1) a la nitrificación deficiente por lo cual, la transformación de N-NO₂ a N-NO₃ fue incompleta en los acuarios en comparación con el cultivo de Baloi *et al.* (2013) 2) a la alta densidad de cultivo (300 org/m² en acuarios y 300-500 org/m² en estanques) que sobrepaso la capacidad de carga para asimilar el N-NH₄ liberado, por la falta de estabilización de comunidades heterotróficas 3) y/o la ausencia de organismos autotróficos en los acuarios. En el trabajo de Baloi *et al.*, (2013) concluyeron que la concentración de N-NO₃ es menor cuando existe un mayor tiempo de irradiación en el sistema de cultivo, debido a la asimilación de compuestos inorgánicos, principalmente N-NO₂ y N-NO₃ por parte de fitoplancton. Además Vinatea *et al.*, 2010 reportan la presencia de diferentes microorganismos (clorofitas, cianobacterias, dinoflagelados y diatomeas, bacterias de floc) que son capaces

de asimilar diferentes presentaciones de compuestos nitrogenados. En contraste, el caso particular del estanque 6 y 7 del experimento 2 a pesar de la adición del mayor nivel de proteína probado (35%), no se presentó acumulación de N-NO₂ y N-NO₃, probablemente porque las microalgas o fitoplancton reportado (Tabla III) fueron la principal vía de asimilación nitrógeno y por lo tanto el nitrógeno en forma de N-NO₂ y N-NO₃ fue reciclado como biomasa microalgal, la cual estuvo disponible como fuente de alimento natural para el camarón, tal como reportaron en los trabajos de Ebelling *et al.*, (2006) y Hargreaves, (2006). La acumulación de N-NO₃ al final del cultivo ha sido reportada por diversos autores en diferentes sistemas de cultivo (Vinatea *et al.*, 2010; Baloi *et al.*, 2013; Schweitzer *et al.*, 2013; Kunh *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2012, Ray *et al.*, 2010; Tabla X). El cultivo que realizó Vinatea *et al.* (2010), inició y terminó con bajos niveles de N-NO₂ y altos niveles de N-NO₃, por lo tanto se podría definir que este cultivo se estabilizó en FIII.

En el trabajo de Ray y colaboradores (2010) también reportan la acumulación de N-NO₃ (12-150 mg L⁻¹) en un cultivo de camarón, la cual es coincidente con la disminución de N-NO₂ (4-<0.5 mg L⁻¹;) y en comparación con el presente trabajo, la acumulación de N-NO₃ fue 28 veces menor y además la concentración de N-NO₂ siguió aumentando hasta el final del cultivo (FIII; Figura 4). En el cultivo de Ray y colaboradores (2010) la nitrificación fue mayor que en el presente trabajo, ya que los N-NO₂ se convirtieron totalmente en N-NO₃ y el TAN incrementó su concentración 17 veces menor que el TAN que se presentó en los acuarios con microbiota (experimento 1; Figura 6). Los estanques 6 y 7 son la excepción tal como ya se mencionó.

La acumulación de N-NO₂ en los acuarios con microbiota muy probablemente también fue debido a la proporción entre carbono y nitrógeno en los acuarios ya que a una proporción menor de 10:1 hay una disminución en el crecimiento de las bacterias en el biofloc, por lo cual se recomienda por diversos autores mantener una proporción 20:1 aproximadamente, para alcanzar un efectivo flujo de nutrientes (Ballester *et al.*, 2010). Para el control de C:N Avinimalech (1999) propone la adición de una fuente de carbono barata, para la reducción de la acumulación de nitrógeno inorgánico, y el autor menciona que una concentración de 10 N-NH₄ mg N L⁻¹ podría ser removido del sistema en 5 horas sin la

acumulación de N-NO₂ y N-NO₃, por medio de la adición de una fuente de carbono. Lo anterior es comprobado por Samocha *et al.* (2007), quienes logran reducir la concentraciones de N-NH₄ y N-NO₂ en un cultivo de *L. vannamei* por medio de la adición de melaza. En el caso de los acuarios con microbiota a pesar de la adición de melaza como fuente de carbono, seguramente no fue suficiente la cantidad de ésta para mantener constantemente una alta proporción de C:N en el cultivo. Entonces, no se promovió el crecimiento de bacterias heterotróficas asimiladoras de N-NH₄ y por lo tanto la liberación de N-NH₄ por la excreción de los camarones o la oxidación de la materia orgánica rebasó fácilmente la capacidad de carga del sistema, y entonces ocurrió la oxidación de N-NH₄ para convertirse en N-NO₂. Además la ausencia de microalgas y bacterias nitrificadoras, que asimilaban el N-NH₄ y/o N-NO₂, también contribuyó a la acumulación de altas concentraciones de N-NO₂ y N-NO₃. En el caso de los estanques (experimento 2) la prolongación de la FI tampoco se presentó y al igual que en el experimento 1 seguramente el mantenimiento de C:N tampoco fue suficiente para promover el aumento de bacterias heterotróficas asimiladoras de N-NH₄, ya que se presentó su oxidación a N-NO₂ posteriormente a N-NO₃ y la mayor acumulación de éstos en los estanques 1 a 3 (25% de proteína) y 4 (30% de proteína), mientras que los estanques 5 (30% de proteína), 6 y 7 (35% proteína) presentaron menor acumulación, lo cual al parecer coincide con la proliferación de microalgas en estanques, debido al color verde en el que se tornó el agua del estanque (Tabla III y Figura 8). Así las microalgas constituyeron las principales vías de remoción del nitrógeno inorgánico, lo cual resulto en menores concentraciones de N-NO₂ y N-NO₃ al final del cultivo, específicamente en dichos estanques (Figura 10).

8.1.2. Dinámica de nutrientes en relación con el nivel de proteína

El flujo de nutrientes estuvo relacionado directamente con el nivel de proteína en el cultivo en el experimento 1 (Figura 3, 4, 5, 6 y 7) y 2 (Figura 9, 10 y 11), lo cual confirma la relación directa con el nivel de proteína en la dieta y la concentración de compuestos nitrógenos excretados al medio de cultivo por parte del camarón, principalmente en forma de amoníaco (NH₃), el cual es transformado a N-NH₄⁺ como producto final del

metabolismo de proteínas (González-Félix *et al.*, 2007; Wright, 1995; Yaemsooksawat *et al.*, 2009; Martínez-Córdoba, 2008).

El aumento de N-NO₂ y N-NO₃ al mismo tiempo que la disminución de TAN se ha reportado en otros trabajos tales como el de Azim y colaboradores (2008) en el cual producen proteína microbiana con dos niveles de proteína (22% y 35%) y concluyeron que la concentración de nutrientes es dependiente del nivel de proteína, con menores niveles de N-NO₂ y N-NO₃ a baja proteína (22%) en comparación de altos niveles de proteína (35%), tal y como se ocurrió en el presente trabajo. Cabe mencionar que Azim y colaboradores (2008) confirman que existe una mayor biomasa bacteriana a bajos niveles de proteína cruda en la dieta.

En la mayoría de los trabajos de la Tabla X, se observa que no presentan acumulación de N-NO₂ y N-NO₃. Sin embargo, en el cultivo del experimento 2 particularmente en estanques 1 al 3 indicados para 25% de proteína con paro entre ciclo de maternidad y engorda (Figura 9), se presentó mayor acumulación de N-NO₂ y N-NO₃ (10 y 1.6 mg L⁻¹, respectivamente), en comparación con los estanques 6 y 7 que además de probarse con alto nivel de 35% de proteína, el cultivo fue continuo, sin paro, presentaron menor acumulación de N-NO₂ y N-NO₃ (2.1 y 0.05 mg L⁻¹, respectivamente). El estanque 4 con reseteo y 5 sin reseteo, indicados para 30% de proteína, presentaron acumulaciones diferentes. La concentración final de N-NO₂ en el estanque 4 fue mayor (11.6 mg L⁻¹) que en el estanque 5 (0.3 mg L⁻¹), en este caso se observa claramente que en el estanque 5 se llevó a cabo el proceso de nitrificación completa, ya que el nivel de N-NO₃ fue mayor (28.4 mg L⁻¹) que en el estanque 4 (1 mg L⁻¹), lo cual indica la conversión de N-NO₂ a N-NO₃ en el estanque 5 y acumulación de N-NO₂ en el estanque 4 (Figura 10).

En el caso del experimento 1 la acumulación también estuvo relacionada con el nivel de proteína en la dieta. En la semana 8 y 9 se registró la más alta concentración de N-NO₂ (33.2 y 5.5 mg L⁻¹) con 35% de proteína, al mismo tiempo el tratamiento con 30 % de proteína presentó 31.7 mg L⁻¹, mientras que en el tratamiento con el nivel más bajo de proteína de 25%, la concentración de N-NO₂ fue significativamente menor (25.4 mg L⁻¹;

Figura 4). La concentración de N-NO₃ también fue dependiente del nivel de proteína, pero los picos máximos difirieron en tiempos (Figura 5). Por todo lo anterior, la concentración del NID también varió de acuerdo con el nivel de proteína (Figura 6), tal y como lo han reportado por algunos autores en sistemas de cultivo similares (Xu y Pan, 2013; Xu *et al.*, 2013), en contraste hay autores que no reportan diferencias en la concentración de nutrientes nitrogenados entre el nivel de proteína (Wasiolesky *et al.*, 2006; Yaemsooksawat *et al.*, 2009).

Tabla X. Concentración de compuestos residuales en diferentes sistemas de cultivo: biofloc (BF), agua clara (AC) recirculación de agua (SRA), total de sólidos suspendidos (TSS) * semana, ** sin/con sustratos 20 y * con reducción TSS.**

Sistema	TAN	N-NO ₂	N-NO ₃	P-PO ₄	Supervivencia (%)	Densidad (org/m ²)	Autor
BF	0.47	0.68	3.81		99	300	Wasiolesky <i>et al.</i> , 2006
AC	0.13	0.06	1.1		98		
BF	0.12	0.44	1.68		75-90	224	Xu <i>et al.</i> , 2013
AC	0.11	0.2	0.94		91		
BF	0.71	5.38	34.3	36.7		610	Vinatea <i>et al.</i> , 2010
BF*	>0.65	0.08	94.2	131.9			
BF	0.3	0.3	15.6	0.9	97.4	390	Baloi <i>et al.</i> , 2013
BF	0.1	0.3			90-96	250	Ballester <i>et al.</i> , 2010
BF-AC	0.37-0.76	0.10-0.4	0.12-0.27		75-90	100	Yaemsooksawat <i>et al.</i> , 2009
BF Y AC	7	22.5			72-93	100	Tacon <i>et al.</i> , 2002
SRA		1.35	3.87	6.43	96	120	Lezama-Cervantes <i>et al.</i> , 2010
BF**	0.2	0.2	65.7/7 2.3	1.7/ 2.5	95.2	238 /473 m ³	Schveitzer <i>et al.</i> , 2013
BF	0.4	0.9		1.3	81.5	1000 m ³	Emerenciano <i>et al.</i> , 2012
AC	0.1	0.5		1.1	84.8		
BF	0-0.070	0-0.024	5.9-31		93	4/10L	Kunh <i>et al.</i> , 2008
BF	1	0.8	85	124			Ray <i>et al.</i> , 2012
BF***	0.3	1.1	48	50			
BF	<0.5-1.7- <0.5	<0.5-4.5- <0.5	25- 140		71	460/m ³	Ray <i>et al.</i> , 2010

8.1.4. Acumulación de compuestos nitrogenados residuales a niveles tóxicos en el medio de cultivo

La acumulación diferencial de compuestos nitrogenados a lo largo de las fases (FI, FII, FIII y FIV) en el cultivo en CIBNOR y Acuicultura Mahr (experimento 1 y 2), desde el punto de vista del ambiente en donde se cultivaron los camarones, generaron al menos dos principales factores de estrés ambiental: 1) la acumulación de N-NH₃ en la FI y 2) la acumulación de N-NO₂ en la FII y FIII junto con la mezcla de N-NO₂, N-NO₃ y N-NH₄ en la fase FIV, debido a que se ha observado que la supervivencia, crecimiento, muda u otros aspectos fisiológicos de los organismos en cultivo es afectada por la acumulación de compuestos nitrogenados en el medio de cultivo (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Colt y Armstrong, 1981).

8.1.4.1. Acumulación de N-NH₃

Los niveles de TAN, la cual es la suma de la forma ionizada y desionizada (NH₃-N + N-NH₄), donde el amonio no-ionizado NH₃ (amoníaco) es la especie química a la cual se le atribuyen efectos tóxicos, y por lo tanto esta forma es la responsable de un menor rendimiento de los organismos en cultivo, por lo tanto el indicador de estas condiciones son las altas concentraciones de TAN y/o NH₃. Algunos ejemplos de dichos efectos tóxicos son: 1) disminución de la capacidad respiratoria debido a la inhibición de la absorción de Na⁺, 2) Incremento de pH intercelular, debido a que NH₃ en el sistema circulatorio es disuelto produciendo amonio ionizado (N-NH₄⁺) y iones hidroxilo (OH⁻), lo cual reduce la capacidad del transporte de oxígeno, 3) Altos niveles de NH₃ podrían provocar una inversión en la reacción glutamato deshidrogenasa removiendo el α-cetoglutarato del ciclo de Krebs, favoreciendo la acumulación de glutamato y con esto la disminución de la cantidad de NADH y por lo tanto una menor producción de ATP disponible. La toxicidad varía con la salinidad, temperatura, pH, especie y tiempo de exposición (Warren, 1962; Colt y Armstrong, 1981; Handy y Poxton, 1993). También se ha reportado que la toxicidad incrementa rápidamente con niveles pobres de oxígeno disuelto en el agua, el cual podría ser el resultado de alto consumo de oxígeno por la exposición a condiciones adversas o por

el consumo de comunidades heterotróficas (Jiann-Chu y Tzong-Shean, 1989; Wajsbrodt *et al.*, 1990).

En la tabla XI y XII se muestran concentraciones letales medias (LC_{50}) que han sido reportadas por varios autores y representan una medida comúnmente utilizada en la bibliografía para reportar la concentración de TAN y/o $N-NH_3$ a la cual se alcanza un 50% de mortalidades de los organismos en cultivo. En la tabla XI y XII se observa que la LC_{50} depende del tiempo de exposición, ya que disminuye conforme los organismos permanecen más tiempo bajo determinadas concentraciones de nitrógeno residual (Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990).

Altas concentraciones de TAN (120 mg L^{-1}) llevan a altas (100%) y rápidas mortalidades (18-38 horas), pero a concentraciones menores por ejemplo de 40 mg L^{-1} las altas mortalidades (90-97%) se presentan después de 108-168 horas de exposición. En el caso de Hernández-Herrera *et al.*, (1999) se observa que las mortalidades de 100% se alcanzan más rápidamente que lo reportado por otros autores, debido a que los camarones fueron estudiados en su fase larvaria, a diferencia de los otros autores que trabajaron con camarones juveniles, siendo esto una evidencia de mayor susceptibilidad a las concentraciones de TAN en etapas tempranas del camarón. Particularmente, las concentraciones de $N-NH_3$ reportados por diferentes autores y en comparación con los niveles de $N-NH_3$ encontrados en el cultivo en el experimento 1, fueron menores y con menores tiempos de exposición (Figura 3) que los valores de LC_{50} reportados en estos trabajos (Tabla XII).

A pesar de que la mayor concentración de $N-NH_3$ se presentó en el tratamiento microbiota y 35% de proteína, no causó problemas de toxicidad, debido a que la exposición fue menor a 0.45 mg g^{-1} por 48 hrs, tiempo al cual se ha reportada toxicidad pero con mayores concentraciones de $N-NH_3$ ($1.7-2.5 \text{ mg L}^{-1}$; Tabla XII; Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990; Ostrensky y Wasielesky, 1995; Lin *et al.*, 1993; Hernández-Herrera *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2005; Lin y Chen, 2003). En la figura 9 y 10 se muestra la concentración de $N-NH_3$ en los estanques 1 al 5 del experimento 2, donde se indica las concentraciones

toxicas reportadas en la tabla XII y se observa que no se alcanzaron niveles tóxicos en dichos estanques, los cuales fueron asignados con 25% y 30% de proteína. Por todo lo anterior, el ambiente en la FI en el cual se desarrollaron los camarones en experimento 1 y los estanques 1 al 5 en el experimento 2, no fue un ambiente tóxico, por lo cual la acumulación de TAN y N-NH₃ no fue un factor estresor importante en este caso.

Por otro lado, en los estanques 6 y 7 de 35% de proteína (experimento 2) se presentó un mayor riesgo de toxicidad, debido al aumento de TAN en el final del cultivo o FIV (Figura 11). La diferencia entre el estanque 6 y 7, es que en el primero se presentó una concentración por arriba de 0.30 N-NH₃ mg L⁻¹ alrededor de 24 hrs, mientras que en el estanque 7 dicha concentración se mantuvo por más de 96 hrs, lo cual coincide con 21% de mortalidad en este estanque en ese periodo con una supervivencia final del 66% (Figura 18). De manera similar, las mortalidades debido a concentraciones relativamente bajas de N-NH₃ (0.32 mg L⁻¹), pero altos tiempos de exposición han sido reportadas en el trabajo de Ostrensky y Wasieñesky, 1995, la cual ocasionó mortalidades del 50% a 96 horas de exposición (Tabla XII).

Los niveles de TAN en la etapa de maternidad, fueron mayores que en la etapa de engorda en todos los estanques, por lo cual probablemente el N-NH₃ fue mayor pero seguramente no paso a niveles críticos si se considera que las supervivencias fueron mayores al 90%.

Tabla XI. Concentración letal media (LC₅₀) de TAN en camarones a diferentes tiempos de exposición.

REFERENCIA	TIEMPO (h)	LC₅₀ (mg L⁻¹)
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	12	115.17
	12	81.7
	15	70.7
Hernández-Herrera <i>et al.</i>, 1999	18	59.9
	21	48.2
	24	34
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	24	24.19
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	36	68
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	48	8.59
Hernández-Herrera <i>et al.</i>, 1999	48	22.7
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	72	5.65
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	72	45
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	96	5.49
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	144	36.71

Tabla XII. Concentración letal media (LC₅₀) de N-NH₃ en camarones a diferentes tiempos de exposición.

REFERENCIA	TIEMPO (h)	LC50 (mg L ⁻¹)
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	12	3.26
Jiann-Chu y Tzong-Chiang, 1989	24	4.7
Lin <i>et al.</i>, 1993	24	2.3
Chen y Lin, 1991	24	1.85
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	24	1.4
Alcaraz <i>et al.</i>, 1999	24	1.49
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	36	1.9
Jiann-Chu y Tzong-Shean, 1989	48	2.5
Lin <i>et al.</i>, 1993	48	1.7
Chen y Lin, 1991	48	1.2
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	48	0.4
Alcaraz <i>et al.</i>, 1999	48	1.19
Jiann-Chu y Tzong-Chiang, 1989	72	1.54
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	72	1.5
Lin <i>et al.</i>, 1993	72	1.4
Chen y Lin, 1991	72	0.73
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	72	0.33
Alcaraz <i>et al.</i>, 1999	72	1.12
Jiann-Chu y Tzong-Chiang, 1989	96	1.04
Lin <i>et al.</i>, 1993	96	1.3
Chen y Lin, 1991	96	0.4
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	96	0.32
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	144	1.04

8.1.4.2. Acumulación de N-NO₂ y N-NO₃

La acumulación de nitritos (N-NO₂) en los sistemas de cultivos incrementa el riesgo de mortalidad debido a su gran toxicidad, la cual depende de las condiciones de cultivo (la

salinidad, temperatura, pH, etc.), de la especie y el tiempo de exposición (Colt y Armstrong, 1981).

En el caso de los camarones y de otros invertebrados en lugar de hemoglobina se presenta hemocianina, una proteína que se encuentra libremente en la hemolinfa y tiene en su estructura cobre dinuclear para el transporte de dos moléculas de oxígeno a diferencia de la hemoglobina. Cuando existe un ambiente con altas concentraciones de N-NO₂ y conforme se aumenta la exposición, se presenta una menor afinidad del O₂ por la hemocianina, por lo tanto existe el incrementando de des-oxihemocianina (sin oxígeno) en la hemolinfa, la cual es oxidada para convertirse en metahemocianina por la acumulación de nitritos en la hemolinfa (Chen y Cheng, 1995; Beltramini *et al.*, 1995). También se han reportado otros efectos de la exposición a altas concentraciones de nitritos, tales como la disminución de la tolerancia térmica, que a su vez está relacionada con la baja capacidad del transporte de oxígeno (Colt y Armstrong, 1981).

En camarones, se ha reportado que la LC₅₀ de 10-14 N-NO₂ mg L⁻¹ a 96 horas de exposición y al igual a otros compuestos tóxicos, este valor varía de acuerdo al tiempo de exposición, tal y como se muestra en la tabla XIII.

Por otro lado, los nitratos (N-NO₃) también afectan la osmoregulación y la capacidad del transporte de oxígeno de los camarones en cultivo, pero son necesarias mayores concentraciones en comparación con N-NH₃ y N-NO₂, para que los N-NO₃ provoquen dichos efectos. En camarones se ha reportado una LC₅₀ de 3400 N-NO₃ mg L⁻¹ (Colt y Armstrong, 1981).

En general el caso del tratamiento con microbiota (experimento 1), las máximas concentraciones de N-NO₂ y N-NO₃ se presentaron en la fase II y III (Figura 4 y 5), donde las concentraciones de N-NO₂ y N-NO₃ se relacionaron con el nivel de proteína en la dieta. Estas concentraciones fueron mayores a los 25 mg L⁻¹ de N-NO₂ en la fase III, las cuales son consideradas tóxicas a 72 horas de exposición (Tabla XIII). En el caso del tratamiento 35% de proteína, estos niveles tóxicos se presentaron durante más de 96 horas, por lo cual generaron la mortalidad de camarones en la semana 8 a 9 (Figura 16). El tratamiento con 30% de proteína presentó menores concentraciones de N-NO₂ pero de acuerdo con Ostrensky y Wasielesky, 1995 una concentración de 10.7 N-NO₂ mg L⁻¹ es suficiente para

disminuir el desempeño de los organismos en cultivo en 96 horas de exposición, resultando menores supervivencias, por lo cual también se presentaron grandes mortalidades en este tratamiento (Figura 16; Tabla XIII). Los camarones en tratamiento con microbiota y 25% de proteína fueron menos afectados por la acumulación de N-NO₂ (2.5 N-NO₂ mg L⁻¹), sin embargo es factible considerar como tóxica una concentración mayor a 1.5 N-NO₂ mg L⁻¹ que se presentó durante más de 9 días (216 horas aproximadamente), la cual podría explicar la disminución en la supervivencia de 93% a 71% al final del cultivo (Figura 16).

El aumento de N-NO₂ en sistemas con bajo recambio y con la inoculación de microorganismos, muy probablemente ocurrió como resultado del aporte de grandes cantidades de nutrientes que fueron retirados mediante recambio de agua y consecuentemente se acumularon en el sistema como materia orgánica, que es parcialmente oxidada en grado suficiente para aumentar la concentración de NID, y particularmente de NO₂ (Emerenciano *et al.*, 2011). La presencia de compuestos nitrogenados a niveles tóxicos pudo originarse también a una baja asimilación por parte de la comunidad heterotrófica combinada con la ausencia de comunidades autofototróficas como las que forma parte del fitoplancton y que tienen mayor capacidad de asimilación. También pudieron haber contribuido procesos de desnitrificación de NO₃ a NO₂ por bacterias del género *Bacillus* suministradas diariamente algunas de las cuales tienen esta capacidad. Aspectos que pueden ser abordados en estudios posteriores.

La acumulación de compuestos nitrogenados hasta niveles tóxicos ha sido prevenida por medio del control de la relación C:N, la cual induce a la asimilación de TAN por parte de la comunidad microbiana. Por ejemplo Emerenciano *et al.*, 2012 reportan que una proporción de C:N de 20:1 es capaz de mantener la concentraciones a niveles no tóxicos en un cultivo de postlarvas de camarón del 1000 org/m³ aún con la alimentación de alto nivel de proteína (40%), en comparación con los experimentos 1 y 2 el mantenimiento de dicha proporción no se logró, debido a que no se controló cuantitativamente la relación C:N durante los experimentos. En el caso del experimento 1 se comprobó por medio del análisis químico proximal de los camarones que la relación C:N fue menor a 1, por lo tanto la

cantidad de carbono vertido en los acuarios no fue insuficiente para promover la conversión por medio de microorganismos heterótrofos, del nitrógeno mineral (N-NH₄, N-NO₂ y N-NO₃) a nitrógeno orgánico.

Lo anterior es debido a que el crecimiento de las comunidades microbianas es promovido por la disponibilidad de una fuente de nitrógeno inorgánico y carbono orgánico para la producción de proteína microbiana. La fuente de nitrógeno inorgánico es el amonio (NH₃) derivado del catabolismo de proteínas de los organismos cultivados o de la descomposición de la materia orgánica. En una proporción de C y N de 4:1, el carbono es utilizado por los microorganismos para procesos metabólicos (condiciones aerobias), pero si se pretende optimizar el uso del carbono para maximizar la síntesis de proteínas la proporción deberá ser mayor (10:1) para promover la producción de proteína microbiana. Esto se ha logrado en la acuicultura por la inoculación de fuentes de carbono baratas (melaza, trigo o metanol) o la disminución del nivel de proteína en la dieta (Avnimelech, 1999; Ray *et al.*, 2011; Azim y Little, 2008; Singer, 2008). Bajo estas condiciones la absorción de nitrógeno promovido por el crecimiento bacteriano disminuye la concentración de TAN más rápidamente que la nitrificación, debido a que se favorece la presencia de sustrato de las bacterias heterotróficas en mayor medida las cuales convierten el nitrógeno inorgánico en aminoácidos en comparación con las bacterias nitrificantes (Crab *et al.*, 2007; Mook *et al.*, 2012; Figura 2).

Tabla XIII. Concentración letal media (LC₅₀) de N-NO₂ en camarones

NITRITOS		
REFERENCIA	TIEMPO (h)	LC₅₀ (mg L⁻¹)
	12	229.72
Jiann-Chu y Shun-Chiang, 1990	36	210
	72	90
	144	37.97
Jiann-Chu y Tzong-Chiang, 1989	24	61.9
Lin <i>et al.</i>,1993	24	83.4
Chen y Lin,1991	24	87.8
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	24	277.8
Alcaraz <i>et al.</i>, 1999	24	268.1
Jiann-Chu y Tzong-Chiang, 1989	48	33.2
Lin <i>et al.</i>,1993	48	53.8
Chen y Lin,1991	48	55
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	48	41.6
Alcaraz <i>et al.</i>, 1999	48	248.8
Jiann-Chu y Tzong-Chiang, 1989	72	20.5
Lin <i>et al.</i>,1993	72	21.8
Chen y Lin,1991	72	25
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	72	14.5
Alcaraz <i>et al.</i>, 1999	72	167.3
Jiann-Chu y Tzong-Chiang, 1989	96	13.6
Lin <i>et al.</i>,1993	96	13
Chen y Lin,1991	96	20.6
Ostrensky y Wasieñesky, 1995	96	10.7

8.2. Parámetros productivos

Los parámetros físicoquímicos, tales como oxígeno disuelto (OD), temperatura, salinidad y pH se mantuvieron en rangos aceptables para el cultivo de *L. vannamei* en las tres fases descritas (ver apartado 10.2 y figura 12; Alday-Sanz *et al.*, 1998).

La salinidad aumentó en los acuarios con el tratamiento microbiota en comparación con los acuarios de agua clara, debido a la evaporación y a los bajos recambios de agua, este aumento de salinidad ha sido reportado en otros experimentos con bioflocs (Emerenciano *et al.*, 2012). No se observaron diferencias entre la concentración de oxígeno disuelto y pH entre microbiota y agua clara, a pesar de que diversos autores reportan bajos niveles de pH y OD en tratamientos con bioflocs o bajos recambios de agua, lo cual se le atribuye a la presencia de una comunidad de bacterias heterotróficas, la cual incrementa los niveles de dióxido de carbono (Emerenciano *et al.*, 2012). Si bien es razonable suponer que una aireación eficiente es capaz de compensar la tendencia hacia una disminución del OD, es más difícil poder contrarrestar la disminución del pH. Por lo anterior, es posible que la comunidad heterotrófica no fuera bien establecida en los acuarios con microbiota o no se presentó en biomasa suficiente.

8.2.1. Sistemas de cultivo

En la tabla XIV se muestra el desempeño en cultivo de *L. vannamei* en diferentes sistemas de cultivo, donde en la primera parte se observa que en sistemas de agua clara, es decir, con altos recambios de agua, el mejor crecimiento se presenta con altos niveles de proteína cruda (PC). Xia y colaboradores (2010) experimentan con altos niveles de proteína en la dieta (31-47%) y observan un decremento en el crecimiento a 47% y no encuentran diferencias significativas entre 43% y 39% aunque a 43% se presenta el menor FCA, por lo cual el desempeño de los organismos en cultivo es mejor a 43% de PC. Esta relación directa entre el crecimiento y el nivel de proteína en la dieta en sistemas de agua clara fue confirmada en el presente trabajo (experimento 1) ya que a 35% de proteína los camarones crecieron 0.43 g por semana y con el menor FCA en comparación con 25% de proteína (0.35 g.semana⁻¹; tabla IV). Sin embargo, en tratamientos con microbiota en el experimento 1, el crecimiento no estuvo relacionado directamente con el nivel de proteína ya que el

mayor crecimiento fue a 30% de proteína en la dieta que a su vez fue mayor que en el tratamiento de agua clara al mismo nivel de proteína (Figura 13). Lo anterior concuerda con otros trabajos que reportan mayor crecimiento en camarones cultivados en sistemas que promueven la presencia de microorganismos con relativamente bajo nivel de proteína (microbiota y biofloc) en comparación con camarones cultivados en agua clara (Tabla XIV; Emerenciano *et al.*, 2012; Ju *et al.*, 2008; Epp *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002; González-Félix *et al.*, 2007).

Lo anterior es evidenciado por Ju *et al.*, (2008) quienes extrajeron el biofloc de un cultivo de camarón para agregarlo en el alimento comercial y observaron que el crecimiento mejoró al incluir el 100% de biofloc natural, a pesar de que éste presentó un menor nivel de proteína. Por lo anterior, resalta la importancia de mantener el alimento natural en el estanque sin procesamiento, como el aplicado a los alimentos formulados, debido a que estos procedimientos de altas temperaturas, presiones y extracciones con solventes provocan la oxidación de diferentes compuestos, mientras que, por medio de una dieta natural es posible ofrecerle al camarón micronutrientes, amino-azúcares, compuestos bioactivos importantes para mejorar su crecimiento (Ju *et al.*, 2008).

La supervivencia en el tratamiento de agua clara fue superior al 85% por lo cual las condiciones de cultivo fueron favorables para los camarones, haciendo de éste un grupo control confiable para comparar con el tratamiento de microbiota. En relación con lo anterior, el crecimiento de *L. vannamei* cultivado en agua clara fue similar a los reportados por diferentes autores (Tabla XIV). Se han reportado mayores tasas de crecimiento semanal en agua clara con altas densidades de cultivo, debido a la implementación de mayores niveles de proteína en la dieta (43%; Xia *et al.*, 2010) o debido a menores densidades de cultivo (Tabla XIV; Zhu *et al.*, 2010).

Tabla XIV. Reportes de desempeño de *L. vannamei* en diferentes sistemas de cultivo: agua clara (AC), biofloc (BF). Tasa de crecimiento semanal (k) en g.sema⁻¹, supervivencia (S), factor de conversión alimenticia (FCA) y densidad (D).

Autor	Sistema cultivo	MEJOR CRECIMIENTO	k	S (%)	FC A	D org/m ²
Zhu <i>et al.</i> , 2010	AC	44% PC y 6% LIPIDOS	1.23	100	1.2	78
Xia <i>et al.</i> , 2010	AC	43% PC	1.24	93	2.54	374
Smith <i>et al.</i> , 1985	AC	36% PC	0.16- 0.21			4.4
Ming-Yan <i>et al.</i> , 2010	AC	42% PC	0.51	97	1.09	
Velasco <i>et al.</i> , 2000	AC	25% PC	0.03	98	1.4	444
Ju <i>et al.</i> , 2008	AC	inclusión 100% de bioflocs (39%PC)	1.03	91.7	4.18	60 y 120
Emerenciano <i>et al.</i> , 2012	AC	Biofloc (40% PC)	0.50	85		1000 m ³
	BF		0.65	81.5		
Xu <i>et al.</i> , 2013	BF	30% PC	1.07	85		224
González-Félix <i>et al.</i> , 2007	BF	25% PC	0.61	66		
Baloi <i>et al.</i> , 2013	BF	24 hrs de luz (35% PC)	0.21	97	1.9	390
Wasielisky <i>et al.</i> , 2006	Aquamats	agua residual (35% PC)	1.26	99		300
Yaemsooksawat <i>et al.</i> , 2009	M	24-32% PC	1.34			100
Ray <i>et al.</i> , 2012	M	con sólidos suspendidos (35% PC)	0.90	76- 79	1.9- 2.1	460 m ³
Vinatea <i>et al.</i> , 2010	BF	-----	0.92			610
Schweitzer <i>et al.</i> , 2013	BF	sin sustratos y 238 org/m ³	0.15	70.6	4.1	238 y 473 m ³
		con sustratos y 238 org/m ³	0.29	95.2	1.6	
Scopel, <i>et al.</i> , 2011	BF	Alimento de harina de pescado y soya	0.77	80	1.46	235

Cabe mencionar que en el presente trabajo en el experimento 1, el FCA promedio en los tratamientos de agua clara y microbiota fue arriba de 2, lo cual se debió a principalmente a un mayor desperdicio del alimento en los acuarios con microbiota en la FII (semana 9 y 10 de cultivo) debido a los condiciones adversas a las que se enfrentaron los organismos.

Lezama-Cervantes *et al.*, en 2010 analizaron el desempeño de un cultivo con un sistema de recirculación del agua o hidrociclón y un tapete microbiano bajo condiciones de laboratorio y reportaron una mayor tasa de crecimiento en el cultivo con este tipo de sistemas (1.54 g.semana⁻¹). Los autores concluyen que el mejor desempeño en este tipo de cultivo se debe a que las condiciones de cultivo del tapete microbiano fueron adecuadas para el desarrollo y madurez de grupos taxonómicos importantes para la remoción de compuestos nitrogenados, fosfatados y carbonosos como por ejemplo diatomeas (*Nitzschia sp.*, *Navicula sp.*), cianobacterias (*Phormidium bohneri*, *Oscillatoria sp.*, *Phormidium sp.*), ciliados y clorofitas.

Como ya se ha mencionado el mayor crecimiento en el experimento 1 se presentó en el tratamiento microbiota durante las primeras 7 semanas (FIII) en comparación con el tratamiento en agua clara, pero en la semana 8 (FIII) de cultivo se presentó una importante mortalidad en los acuarios con microbiota, esto fue debido principalmente al aumento en la concentración de N-NO₂ (23.5 N-NO₂ mg L⁻¹) durante un periodo prolongado que particularmente disminuyó (<10 mg L⁻¹) al inicio de la semana 9 debido a recambio de agua (Tabla II). Además las altas mortalidades estuvieron relacionadas directamente con el nivel de proteína en la dieta ya que el tratamiento con microbiota y 35% de proteína presentó una mortalidad del 43% (ver apartado 8.1). Al presentarse un ambiente con altas concentraciones de N-NO₂ hasta niveles tóxicos en el agua con microbiota (ver sección 8.3) el crecimiento de camarones bajo estas condiciones también se vio afectado. El efecto tóxico a nivel de peso, supervivencia y consecuentemente en la biomasa, igualmente se observó relacionado con el nivel de 25 y 30% de proteína en la dieta (Figura 14 y 15), en estos tratamientos el desempeño en cultivo disminuyó hasta niveles por debajo del desempeño de los camarones en agua clara, tal y como se observa en la figura 17. La

disminución de la supervivencia fue significativa en el desempeño de los camarones ya que ha sido reportado por diversos autores que la supervivencia, crecimiento, muda u otros aspectos fisiológicos de los camarones son afectados por la presencia de altas concentraciones y tiempos de exposición a compuestos nitrogenados en el agua del cultivo (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Colt y Armstrong, 1981).

En el cultivo en granja (experimento 2) los camarones del estanque 1 (25% de proteína) presentaron el mejor desempeño en cultivo ya que tuvieron los mayores incrementos de peso (figura 20), mayores supervivencias y menores valores del FCA (Tabla III). Sin embargo, la mayor tasa de crecimiento semanal se presentó en el estanque 6, pero en este caso se presentaron altas mortalidades y el mayor FCA, por lo tanto disminuyó el desempeño, debido a que éste es una relación entre la supervivencia, la tasa de crecimiento y el FCA. Al igual que en el caso anterior el estanque 5 (30% proteína) presentó bajo desempeño en cultivo en comparación con los estanques 1 al 4.

Entonces tenemos que, en estanques donde se alimentó con altos niveles de proteína (35% de proteína) presentaron las menores supervivencias debido a que la concentración de compuestos nitrogenados fue mayor que en los estanques de menor proteína (25% y 30% de proteína; ver apartado anterior) aunado a decremento en la concentración de oxígeno disuelto y a problemas técnicos (Figura 8). En sistemas similares a los del presente trabajo (Tabla XIV), se ha reportado una menor supervivencia, específicamente el trabajo de Ray *et al.* (2011) y Schweitzer *et al.* (2013) incluyen la alimentación con altos niveles de proteína (35 a 40%).

También en la tabla XIV se muestran otros parámetros productivos de diferentes cultivos de *L. vannamei*. La tasa de crecimiento semanal (k) que se reporta en los diferentes estanques es mayor a los reportes en la tabla XIV, con excepción de Wasielesky *et al.* (2006) y Yaemsooksawat *et al.* (2009) quienes reportan mayores k , sin embargo, solo en el caso del estanque 6 se presentó tasas similares (Tabla VI). El FCA presentado en los estanques es menor que los reportados en tabla XIV.

Por todo lo anterior, a pesar de que en sistemas intensivos con inoculación de microorganismos y alimentación de alta proteína presentan mejores y más rápidos crecimientos en condiciones de granja, estos sistemas son más vulnerables a altas mortalidades por un mayor flujo de nutrientes y con esto menor control para mantener una buena calidad del agua.

Los cultivos que se han reportado en el presente trabajo incluyeron la inoculación de microorganismos cultivados bajo las mismas condiciones, pero a pesar que se utilizó la misma microbita en ambos cultivos, el crecimiento bajo condiciones de granja en el experimento 2 fue en promedio 3 veces mayor en comparación con el crecimiento bajo condiciones de laboratorio en el experimento 1 y con lo reportado por diversos autores (Tabla XIV). Las explicaciones de la diferencia entre los cultivos son diversas: 1) variaciones fisicoquímicas en la calidad del agua, 2) menor estabilización de una comunidad heterotrófica en el cultivo en laboratorio, 3) la presencia de fitoplancton que incluyeron otras fuentes de nutrientes naturales en los estanques del experimento 2, 4) la presencia de comunidades autotróficas que pudieron asimilar los N-NO₂ y N-NO₃, 5) con referente a lo anterior, al disminuir las concentraciones de N-NO₂ y N-NO₃, resulta en un ambiente más favorable en el experimento 2 en comparación con las altas concentraciones de N-NO₂ principalmente, alcanzadas en el experimento 1 y 6) un mayor flujo de agua, y mayor exposición a distintos estímulos externos en los acuarios del experimento 1, por lo cual el grado de estrés fue mayor en comparación con camarones en el experimento 2.

El caso en específico de los camarones cultivados en el estanque 6 (35% de proteína) quienes presentaron los valores mayores de crecimiento semanal durante todo el ciclo de cultivo, fue coincidente con la constante presencia de microalgas en el sistema. Brune *et al.* (2003), Burford *et al.* (2004), Cohen *et al.* (2005), Vinatea *et al.* (2010) y Boil *et al.*, (2013) también reportan que el crecimiento de camarones cultivados en altas densidades en sistemas cerrados está determinado por la presencia fitoplancton tal y como se observó en el caso del estanque 6 donde se presentaron las mayores tasas de crecimiento relacionadas con microalgas.

8.2.2. TSS y VS

El total de sólidos suspendidos (TSS) se ha relacionado como indicador de óptimos niveles de aeración y como medida para maximizar el área que utiliza la comunidad microbiana heterotrófica para asimilar los compuestos nitrogenados (Azim, 2008). En los estudios de Ray *et al.* (2012), al reducir la cantidad del TSS en el cultivo de *L. vannamei*, se observa un decremento en la abundancia bacteriana del sistema y por lo tanto disminuye la nitrificación y se estimula el aumento de microalgas.

Las variaciones en el TSS están relacionadas con cambios en la composición y la abundancia de la microbiota, debido a las exigencias ecológicas o a la sucesión en las comunidades. Schrader *et al.*, (2011) reportan una sucesión en las comunidades en los bioflocs, donde observaron que en las primeras etapas las algas verdes y diatomeas dominaban la comunidad del fitoplancton. También se ha observado que los protozoarios pueden llegar a dominar la comunidad fitoplanctónica (Emerenciano *et al.*, 2012). Aunque en el presente trabajo se observó las variaciones del TSS no fue posible identificar la variación de microorganismos presentes en el sistema de cultivo. También cabe aclarar que las condiciones en el experimento 1 no fueron favorables para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos.

En el sistema de hidrociclón de Lezama-Cervantes y colaboradores (2010) reportan bajos niveles TSS (20-46 mg L⁻¹) y en comparación con el experimento 1 a nivel laboratorio la concentración de sólidos fue 5 veces mayor (Figura 21), lo cual es similar al control del experimento de Lezama-Cervantes y colaboradores (2010) que no contaban con el hidrociclón de un máximo de 123 sólidos mg L⁻¹. La acumulación de sólidos en el sistema del presente estudio fue debido a los bajos recambios de agua realizados en las primeras 9 semanas de cultivo (Tabla II).

El TSS del experimento 1 se encuentra dentro del rango que ha sido reportado en otros estudios que se muestran en la tabla XV sin embargo, no hay reportes de diferencias entre niveles de proteína en la dieta (Lezama-Cervantes *et al.*, 2010, Ballester *et al.*, 2010,

Xu y Pan, 2013 y Schweitzer *et al.*, 2013), mientras que en el presente trabajo se observa en la Figura 21 una relación directa entre el TSS y el nivel de proteína.

La producción de alimento natural por parte de la microbiota puede ser estimada por el TSS en el sistema (Azim, *et al.*, 2008) y considerando el promedio el TSS en el experimento 1 fue en promedio de 150, 168 y 172 mg L⁻¹ en 69 días de cultivo para 25, 30 y 35% de proteína en la dieta respectivamente (Figura 21), la estimación de la producción de flóculos disponibles como alimento es de 2.5, 2.8 y 2.9 mg L⁻¹ por día, este aporte de la biota natural en el sistema del presente estudio es muy bajo en comparación a otro reportados (6.25 mg L⁻¹ día; Azim *et al.*, 2008).

El control del TSS también es importante debido al riesgo de obstrucción branquial a altos niveles de sólidos en el agua (Emerenciano *et al.*, 2012). Samocha *et al.* (2007) recomienda valores por debajo de 500 mg L⁻¹ en el cultivo de camarón, en comparación con el experimento 1, los niveles fueron por debajo de 400 mg L⁻¹ (Figura 22), por lo cual se descarta la obstrucción branquial como factor estresor en el cultivo realizado. En el caso del experimento 2 a pesar de que no se midió directamente la cantidad de TSS, se observó que el volumen de sólidos (VS) fue menor (25 ml L⁻¹; Figura 23) que en el experimento 1 (por debajo de 90 ml L⁻¹; Figura 22) por lo cual probablemente la cantidad de TSS tampoco fue crítica.

Unos de los pocos trabajos que reportan el VS en el sistema de cultivo es el de Xu *et al.*, (2012). El VS reportado con el nivel más bajo de proteína (25%) fue de 2-12 ml L⁻¹ (Figura 22) similar al promedio reportado por Xu *et al.*, (2012; 3-22 ml L⁻¹), quienes no encuentran relación con el nivel de proteína en la dieta, sin embargo, en el presente trabajo se observó que el VS es mayor conforme aumenta el nivel de proteína, hasta llegar a duplicar el VS con 35% de proteína (3-83 ml L⁻¹; Figura 22), lo cual no ha sido reportado en algún otro trabajo.

Tabla XV. Total de sólidos suspendidos reportados por diferentes autores.

TSS (mg L⁻¹)	Referencia
20.4-45.6	Lezama-Cervantes <i>et al.</i> , 2010
139.7	Xu <i>et al.</i> , 2013
194.4	Ballester <i>et al.</i> , 2010
150-200	Martinez-Córdova <i>et al.</i> , 2011
300-400	Xu y Pan 2013
100-400	Emerenciano <i>et al.</i> , 2012
453	Ray <i>et al.</i> , 2012
436-520	Schweitzer <i>et al.</i> , 2013
591	Baloi <i>et al.</i> , 2013
403-735	Vinatea <i>et al.</i> , 2010
820	Ray <i>et al.</i> , 2012
500-900	Ray <i>et al.</i> , 2010

8.2.3. Tamaño de partícula

La primer muestra para ser analizada fue tomada el 20-sep-12, fecha en la cual el cultivo se encontraba en la fase II con relativamente bajas concentraciones de N-NO₂ y N-NO₃ bajo estas condiciones la mayoría de las partículas en suspensión (62%) presentaron una medida de 30-100 µm. Posteriormente el 12-oct-12 el tamaño de partículas aumento a 40-130 µm cuando el cultivo se encontraba en la FIII, por lo cual la concentración de N-NO₃ aumento notablemente y la concentración de N-NO₂ continuaba aumentando (Figura 4 y Figura 5). Estos rangos del tamaño de partículas han sido encontrados en el agua de otros cultivos, por ejemplo, Azim y colaboradores (2008) reportan el tamaño de flocs de 100 a 200 µm en donde se encontraron microorganismos como protozoarios, rotíferos y oligoquetos. Mientras que Azimi *et al.*, (2012) reportaron en general un aumento del tamaño de partícula de 53-63 a 75-106 µm. El aumento de la talla y estructura de las partículas orgánicas está relacionada con la sucesión de comunidades microbianas bajo

diferentes factores biológicos y fisicoquímicos (Emerenciano *et al.*, 2011). Por lo anterior, se concluye que el aumento de partícula está relacionado con el desarrollo del cultivo y se debe muy probablemente a la sucesión de diferentes organismos que se presentan a lo largo de la sucesión de comunidades microbianas.

Kuhn *et al.*, 2008 reporta el promedio del tamaño de partícula de 78.5 μm en el agua de un cultivo de tilapia y un promedio del tamaño de partícula de 250 μm en el agua tratada para formar bioflocs, esta última es un tamaño mayor al reportado en el presente trabajo a pesar que el agua en los acuarios con microbiota fueron madurados 11 días antes, esto no fue suficiente para aumentar la biomasa microbiana para la obtención de un tamaño mayor de partícula. El tamaño de partícula mayor a 200 μm es una característica requerida para ser un alimento visible para los camarones en cultivo. Además cabe mencionar que posiblemente la aeración pudo ser otro factor determinante para el tamaño de partícula, por ejemplo Kuhn *et al.*, 2008 reporta una mayor área (12 cm) de difusor en un acuarios de menor capacidad (10L) en comparación con el presente trabajo (6cm/60L), esto tiene a lugar ya que es precisamente el difusor la parte fundamental para la compactación de partículas.

8.3. Variables fisiológicas.

Para evaluar el efecto de los factores en los camarones cultivados en el experimento 1 (microbiota y el porcentaje de proteína en la dieta) y experimento 2 (grupo estrés, estanque y nivel de proteína en a dieta), se han propuestos diferentes variables que se consideran indicativos de la condición fisiológica y nutricional de los camarones, estas variables son los niveles de glucosa, lactato, proteínas totales y triglicéridos en hemolinfa, musculo y hepatopáncreas (Racotta y Palacios, 1998; Rosas *et al.*, 2002).

8.3.1. Hemocianina

La hemocianina es una proteína hemolinfática multifuncional con función transportadora del oxígeno, reserva de proteína circulante, proveedor de aminoácidos como osmolitos, precursor de péptidos con actividad fungicida y con actividad fenoloxidasa, por lo que su concentración es reflejo de estado fisiológico del organismo. Además el nivel de hemocianina, así como el nivel de proteína en la hemolinfa, indican la movilización de

proteínas desde los sitios de reserva, para la síntesis de tejido nuevo por lo que este indicador ayuda a comprender el estado nutricional de los organismos en cultivo. (Rosas *et al.*, 2004).

En general, se observa que el contenido de hemocianina en el experimento 1 en el tratamiento con microbiota (61.5 mg ml^{-1}) y agua clara (89.1 mg ml^{-1}) es similar al grupo estrés y grupo control, respectivamente, reportado diversos autores (Tabla XIV). Los niveles significativamente menores de hemocianina en los camarones del tratamiento de microbiota (61.5 mg dl^{-1}), posiblemente se debe al efecto de la acumulación de N-NO_2 hacia el final del cultivo, debido a que los N-NO_2 en concentraciones elevadas pueden disminuir la afinidad de la hemocianina por el oxígeno, lo cual resulta en la reducción de oxihemocianina (Chen y Cheng, 1995; Chen y Lee, 1997).

En el caso del contenido promedio de hemocianina en camarones del experimento 2 fue mayor (111.8 mg ml^{-1}) con respecto al contenido promedio en camarones del experimento 1 (75.3 mg ml^{-1}). En el caso del experimento 2, el contenido de hemocianina es mayor a la mayoría de los valores reportados en la tabla XIV, a excepción del valor de 110.6 mg ml^{-1} en condiciones de hipoxia a largo plazo (Racotta *et al.*, 2002). En este experimento, los niveles de hemocianina no fueron afectados por el tratamiento con la inducción de una respuesta de estrés (Figura 30). Los niveles de hemocianina no reflejaron una respuesta de estrés posiblemente debido a dos razones: 1) la presencia de alimento natural, el cual pudiera aportar mayores sustratos energéticos que se utilizarían bajo una situación adversa (Mercier *et al.*, 2006) y/o 2) el confinamiento en cubetas no fue un factor lo suficientemente intenso para desencadenar una respuesta de estrés. De hecho, si bien esta condición de estrés lleva implícita un situación de hipoxia en la cual se incrementan los niveles de hemocianina, esto solo ocurre con una exposición prolongada de 2 semanas mas no con una exposición de tres días (Racotta *et al.*, 2002), aún menos de 30 minutos como se realizó en el presente trabajo.

Tabla XVII. Respuesta a factores estresores en la concentración de total de proteína (TP), glucosa (GL), lactato (LAC), triglicéridos (TG) y hemocianina (HC) en hemolinfa, reportado por diversos autores.

Factor estresor	TP	GL	LAC	TG	HC	REF.
	(mg ml ⁻¹)	(mg dl ⁻¹)	(mg dl ⁻¹)	(mg dl ⁻¹)	(mg ml ⁻¹)	
Control	174.7	15.48	13.86	31		1
aumento de TAN	185-168.8	14.0-22.7	15.1-10.6	32-21		
Inanición (5% PD)	250-100	50-20	3.5-0.5	33-20		2
Inanición (40% PD)	300-175	50-20	3--1	45-15		
Control	114.9	12.9	8.05		84.6	3
Hipoxia (3 días)	117	57	30.1		76.1	
Hipoxia (14 días)	135.7	45.3	34.4		110.6	
Pre-alimentación		39.4*				4
Post-alimentación		164.5*				
Control	87.4	22.7	7.3	82.2	72.1	5
aumento de 4 C	79.5*	26.3*	10.20*	87.2	58.7*	
Control			6.3-20.7			6
Con <i>V.campbellii</i>			8.1-6.3			
Control	174.5*	62.1*		121		7
c/biota	184.8*	56.8*		150		
Control		18				8
Anoxia		37.8*				
hipoxia (4,5 h)		50.4*				
Aumento CO ₂		39.6*				
Control	80-90*	18-25.2				9
Despues de nadar	70-50*	14.4-18				
Control	130*	18				10
Inyección dopamina	120-130*	34.2-68.4				
Control	100*	20*	5*			11
Post-alimentacion	90*	21	6*			
Control		22*	7*	33*		12
con <i>v. alginolyticus</i>		27*	14*	43*		
Control	122	16.9	4.2	49.7	83	13
Con persecusión ^o	111**	17.1	3.6	39.5*	72.7	
Control	70	5		210		14
Post-alimentacion	90	25		215		

Control		14 mg Kg ⁻¹	22.7 mg Kg ⁻¹	0.37 mmol.L ⁻¹	15	
inclusión de astaxantina		18.4 mg Kg ⁻¹ *	15.14 mg kg ⁻¹ *	1.01 mmol.L ⁻¹ *		
Control	150-175	18-26			16	
aumento de 12 C	145-160	49-57*				
Control	88.1*	15	3	59	65.6	17
manejo intensivo	77.7*	45*	17*	48.3	62.8	
Control	140-155		30		18	
Hipoxia	150		30-50*			
aumento de TAN	125-130*		25-30			
Hipoxi+TAN	140**		35-70*			
Control	130	15	>10	40	19	
inyección serotonina	100	45*	45*	30		
Control	157	76			20	
inclusión de acidulante	124.6*	45.4*				
Control	90.1	31.8			21	
con WSSV	100.7	24.8				

1. Racotta y Hernandez-Herrera, 2000.

2. Pascual *et al.*, 2006

3. Racotta *et al.*, 2002.

4. Rosas *et al.*, 2001.

5. Carreño-Mejía, 2009.

6. Thibodeaux *et al.*, 2009.

7. Porchas-Cornejo *et al.*, 2011.

8. Hall y Ham 1998.

9. Zhang *et al.*, 2006.

10. Chiu *et al.*, 2006.

11. Rosas *et al.*, 2002.

12. Hsieh *et al.*, 2008.

13. Mercier *et al.*, 2006.

14. Sánchez-Paz *et al.*, 2007.

15. Flores *et al.*, 2007.

16. Diaz *et al.*, 2013.

17. Aparicio-Simón *et al.*, 2010.

18. Mugnier *et al.*, 2008.

19. Racotta y Palacios, 1999.

20. Anuta *et al.*, 2011.

21. Annies Joseph, 2007.

8.3.2. Proteínas totales

Las proteínas son nutrientes esenciales para los camarones, ya que son fundamentales para el crecimiento, la regulación de la presión osmótica interna, la gluconeogénesis y el sistema inmune. Por lo tanto, las variaciones de este nutriente en hemolinfa se puede utilizar como un buen indicador general del estado fisiológico y particularmente del estado nutricional (Rosas *et al.*, 2002).

El nivel promedio de proteínas totales en hemolinfa de camarones cultivados bajo condiciones controladas fue de 147.6 mg ml⁻¹ en el experimento 1, valor ligeramente mayor al reportado por Racotta y Palacios en 1998 (100 mg ml⁻¹), Rosas *et al.*, en el 2002 (93 mg ml⁻¹ y 114.9 mg ml⁻¹) y Zhang *et al.*, en el 2006 (80-90 mg ml⁻¹) en cultivos de *L. vannamei*; sin

embargo, otros autores han reportado niveles superiores como el caso de Racotta y Herrera, 2000 (174.7 mg ml^{-1}) y Rosas *et al.*, 2002 (172.1 mg ml^{-1}) éste último en juveniles de *Litopenaeus setiferus* (ver Tabla XIV).

El contenido de proteínas en hemolinfa de camarones del experimento 1 fue afectado por el nivel de proteína donde el 35% presentó niveles mayores (179.1 mg ml^{-1}), lo cual indica una mayor disponibilidad de este nutriente para la síntesis de nuevo tejido (Rosas *et al.*, 2004; Rosas *et al.*, 2002). En este contexto, es admisible que el crecimiento de los camarones esté relacionado directamente con el nivel de proteína en la dieta (Xia *et al.*, 2010; Figura 27). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento de microbiota y agua clara, se observa una tendencia a aumentar el nivel de proteína en hemolinfa en el tratamiento con microbiota, aunque únicamente en el tratamiento con 35% de proteína en la dieta. Lo anterior concuerda con lo propuesto por Pascual *et al.* (2003) y Rosas *et al.* (2004) sobre el valor de los niveles circulantes de proteína como indicador de la condición nutricional, lo cual indica que la inoculación de microorganismos combinada con un nivel óptimo de proteína en la dieta, puede aumentar la proteína disponible para las necesidades fisiológicas el camarón. La misma tendencia se observó en el músculo de camarones cultivados en sistemas con microbiota y con 35% de proteína en la dieta, al contrario que en sistemas con altos recambios (agua clara), lo cual respalda que existe un mayor flujo de nutrientes en los sistemas con microbiota (Tacon *et al.*, 2002; González-Félix *et al.* 2007; Alvarez *et al.*, 2002 y Xia *et al.*, 2010). Asimismo, la falta de diferencias significativas por efecto de la microbiota en el contenido de proteína en el músculo en el experimento 1, puede deberse a efectos contrarios y al igual que lo mencionado para hemocianina, la acumulación de niveles altos de N-NO_2 hacia el final del cultivo y de amonio a mediados de cultivo pudo contrarrestar el efecto benéfico de la microbiota a nivel nutricional ya que tanto los N-NO_2 (Chen y Cheng, 1995; Chen y Lee, 1997) como el amonio (Chen *et al.*, 1994; Racotta *et al.*, 2000) disminuyen los niveles de proteínas y hemocianina en la hemolinfa de los camarones. Sin embargo y a diferencia de la hemolinfa, no se tiene documentado el efecto de altas concentraciones de amonio o nitritos sobre la proteína muscular.

La concentración promedio de proteínas en la hemolinfa de camarones cultivados bajo condiciones comerciales (experimento 2) fue 225.7 mg ml^{-1} , 53% mayor que el obtenido bajo condiciones controladas de laboratorio (experimento 1), un aumento similar (57%) fue reportado por Rosas *et al.* (2002) quienes también observaron mayores concentraciones de

proteína en camarones cultivados en tanques externos y junto con otros autores, lo han atribuido a la continua disponibilidad de comida natural en los estanques (Rosas *et al.*, 2002; Mercier *et al.*, 2006; Pascual *et al.*, 2003a).

Por otro lado, el nivel de proteínas promedio en el músculo de camarones del experimento 2 (778 mg g^{-1}) fueron similares al nivel encontrado en camarones del experimento 1 (858 mg g^{-1}). En el experimento 2, los diferentes niveles se presentaron por el efecto estanque y a la interacción entre éste y el tratamiento. Las menores concentraciones de proteína en el músculo corresponden al altos niveles de proteína en la dieta (35%) en el estanque 6, lo cual puede deberse a los problemas técnicos ocurridos en este estanque (mayores recambios, alta biomasa, baja supervivencia y altos niveles de nutrientes residuales) y también podrían explicar el menor porcentaje de retención de nitrógeno (24.5 %, Tabla VIII), que corresponde entonces también con los bajos niveles de proteínas en los camarones del estanque 6.

En promedio, el nivel de proteínas en el hepatopáncreas de los camarones en el experimento 1 (242 mg g^{-1}) fue mayor al encontrado en el experimento 2 (146.4 mg g^{-1}), que podría simplemente deberse a un mayor contenido de lípidos, el cual se retomará en el siguiente apartado. Por otro lado, no se observa un efecto significativo del estrés, aunque se ha reportado una disminución de las proteínas en hepatopáncreas en condiciones de estrés (Aparicio-Simón *et al.*, 2009, Mercier *et al.*, 2006, Sánchez-Paz *et al.*, 2007). Sin embargo, la interacción entre estanque y tratamiento de estrés si fue significativa, dado que sólo en el estanque 1 y 6 se observó dicha disminución, lo cual concuerda con que fueron los únicos estanques en donde se observó un incremento en los niveles de glucosa en hemolinfa y fueron los dos estanques con el incremento más marcado en los niveles de lactato en hemolinfa.

8.3.3. Lípidos totales y triglicéridos

Los lípidos presentan funciones diversas en los organismos, tales como reservas energéticas (triglicéridos), estructurales (fosfolípidos), reguladoras (esteroides), entre otras. Particularmente, los triglicéridos son una clase de lípidos, los cuales están compuestos por una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos y su función es principalmente energética. (Burton y Routh, 1977). Por lo anterior, los lípidos totales como los triglicéridos también han sido considerados como indicadores de la condición nutricional en relación con el nivel de lípidos del alimento balanceado (Pascual *et al.*, 2003). Algunos trabajos reportan mayores

niveles en el hepatopáncreas en condiciones de domesticación, en comparación con camarones silvestres (O'Leary y Matthews, 1990; Jiménez *et al.*, 1995). Lo anterior también se pudo apreciar en el presente trabajo tanto en hemolinfa como en hepatopáncreas.

En el experimento 1, los niveles promedio de triglicéridos en hemolinfa fueron de 32.6 mg dl⁻¹ lo cual concuerda con algunos valores reportados por otros autores (Tabla XIV) con los niveles más altos para el tratamiento con 35% proteína, particularmente para el grupo de agua clara (45.8 mg dl⁻¹). También en hepatopáncreas se encontraron los niveles más altos tanto de lípidos totales como de triglicéridos en el tratamiento de agua clara con 35% de proteína. Particularmente, en el tratamiento con agua clara se reportaron mayores niveles (173.9 mg g⁻¹) de lípidos en el hepatopáncreas en comparación con el contenido en camarones cultivados con microbiota (124.6 mg g⁻¹; Figura 29 C), lo cual puede deberse a la utilización de estos reservorios para cubrir la demanda metabólica incrementada por las condiciones adversas de altas concentraciones de compuestos tóxicos como los N-NO₂ en tratamientos con microbiota (ver sección 8.1.; Racotta y Palacios, 1998 y Hernández-Herrera, 2000)

El hecho que solo se hayan observado los niveles más altos de triglicéridos en hepatopáncreas sólo con una dieta con 35% de proteína (experimento 1) puede estar relacionado con una menor utilización de lípidos a nivel de metabolismo energético a expensas de una mayor utilización de proteína dado que hay mayor disponibilidad de ésta. Por otro lado, un bajo aporte de lípidos por parte de la microbiota inoculada también puede contribuir a dicho efecto.

En general, el nivel de triglicéridos en la hemolinfa de camarones del experimento 2 (71.3 mg dl⁻¹) fue 55% mayor en comparación con los niveles reportados por diversos autores (Tabla XIV), con excepción de Porchas-Cornejo *et al.*, 2011 y Sánchez-Paz *et al.*, 2007, quienes reportan mayores niveles. Al igual que en el caso del nivel de proteínas en hemolinfa, el aumento en la concentración de triglicéridos puede ser atribuido a la continua disponibilidad de comida natural en los estanques.

En particular, el nivel de triglicéridos en el experimento 2 aumentó 20% en el grupo estrés en comparación con el grupo basal (Figura 26), lo cual puede deberse a que después de la demanda de glucosa por vías anaerobias, los lípidos son la fuente de energía, la cual también es requerida bajo condiciones adversas, particularmente los triglicéridos son movilizados (Sanchez-Paz *et al.*, 2007). Sin embargo, este resultado es contrario a lo observado en otras

condiciones de estrés, como son la manipulación por inyección y toma de muestras repetidas (Racotta y Palacios, 1998), altas concentraciones de amonio (Racotta y Hernández-Herrera, 2000) e incluso estrés crónico por manipulación diaria (Mercier *et al.*, 2006; Tabla XIV), en donde los niveles de triglicéridos tienden a disminuir. Lo anterior se puede deber a la alta disponibilidad de este tipo de reservas en las condiciones de estanques tal y como se discutió anteriormente, lo cual podría explicar que si la reserva hepatopancreática es suficiente, puede haber movilización de triglicéridos a la hemolinfa en contraste con los trabajos anteriores realizados en condiciones de laboratorio con menor reserva de lípidos disponible. Dicho aumento de triglicéridos es presentado también en trabajos que evalúan el estado fisiológico de camarones infectados con virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (60 mg dl^{-1} Galván-Álvarez *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2008;)

Las diferencias en los niveles de lípidos totales en el músculo en el experimento 2, fueron por efecto del estanque, donde los camarones del estanque 1 (25% de proteína) presentaron las mayores concentraciones promedio (39.7 mg g^{-1} ; Figura 32C), lo cual contrasta con el menor contenido lípidos en hepatopáncreas para los camarones de este estanque (501 mg g^{-1} ; Figura 33C). En general, los lípidos totales en hepatopáncreas sólo fueron afectados por el estanque, y es en este único caso donde se muestra que el grupo estrés utilizó las reservas de lípidos en hepatopáncreas, con una tendencia al incremento a mayores niveles de proteína, mientras que para triglicéridos se observó un respuesta contraria con un disminución en los niveles más altos de proteína. Esta aparente contradicción es difícil de explicar en las condiciones actuales dado que a nivel de granja hubo muchos factores no controlados y de hecho estas tendencias contrarias en los niveles de lípidos y triglicéridos nos fueron observadas en el experimento 1.

A manera de resumen, el nivel de triglicéridos en hemolinfa de camarones del experimento 2, fue 3 veces mayor en comparación con los camarones del experimento 1, mientras que en hepatopáncreas fue 48% mayor. De manera similar los lípidos totales del hepatopáncreas también fueron 73% más altos en el experimento 2. Por lo anterior, se reportó mayor aporte de lípidos en estanques con alimento natural comparado con condiciones de laboratorio, lo cual ya ha sido reportado por otros autores (Pascual *et al.*, 2003; Mercier *et al.*, 2006). Esto sugiere un mayor aporte de lípidos únicamente por parte de la microbiota desarrollada en los estanques, más no de la que fue inoculada en acuarios del experimento 1. En este sentido, los camarones del experimento 2 tienen a su disposición mayores fuentes de

nutrientes, en comparación con los camarones del experimento 1 en el tratamiento de agua clara, donde la fuente de lípidos principalmente fue exclusiva del alimento balanceado y en el caso del tratamiento con microbiota, las fuentes alternativas de lípidos no fueron tan abundantes como en los estanques del experimento 2, ya que no se presentaron organismos foto sintéticos que pudieran ser fuente de lípidos, principalmente (Mercier *et al.*, 2006; Rosas *et al.*, 2002).

En el experimento 1, se puede observar que hasta un 90% de los lípidos totales en hepatopáncreas, se encuentran en forma de triglicéridos, mientras que en el experimento 2, se observa que esta proporción sólo es del 40%. En ambos casos, estos valores son mayores a lo reportado por otros autores (26% Aparicio-Simón *et al.*, 2009; 16% Mercier *et al.*, 2006), aunque en otros trabajos también se han reportado valores de 80% (Gonzalez-Felix *et al.*, 2002). Lo anterior indica que esta relación puede ser muy variable dependiendo de una serie de factores entre los cuales está la condición de cultivo (laboratorio vs estanques) que se discutió anteriormente, al destacar que los niveles de triglicéridos tanto en hemolinfa como en hepatopáncreas son mayores en el experimento 2 que en el experimento 1.

Tal como ya se mencionó, en el experimento 1 el nivel de triglicéridos en hemolinfa estuvo relacionado con el nivel de proteína en la dieta en el muestreo II cuando se logró obtener hemolinfa. En contraste y para el mismo muestreo del experimento 1, los niveles de triglicéridos y lípidos totales en hepatopáncreas sólo fueron influenciados por el tratamiento en agua clara, aunque este efecto se observó sólo para el nivel más alto de proteína (35%). Tal y como se mencionó, estas reservas energéticas pueden haber sido utilizadas para cubrir la demanda energética, en condiciones adversas en el tratamiento con microbiota en el experimento 1, causado por los altos niveles de nitritos y nitratos (Figura 30C y D). Por otro lado, en el primer muestreo de este experimento, se observaron niveles más altos de triglicéridos en el tratamiento con 30% que podría coincidir con el desempeño superior en cultivo de este tratamiento. Sin embargo, la diferencia en este desempeño fue observada en etapas más avanzadas por lo cual, se puede sugerir que una mayor capacidad metabólica de acumulación de reservas en etapas tempranas pudo traducirse en un mayor crecimiento en etapas posteriores.

8.3.4. Glucógeno y glucosa

L. vannamei está adaptado al uso de la proteína como fuente de energía por lo que tienen la capacidad de utilizar la proteína para el crecimiento y para la producción de glucosa por medio de la gluconeogénesis. Por otro lado, los niveles de glucosa también se ha considerado como indicadores de la condición nutricional dado que la glucosa es fuente de energía y es necesaria para la formación de la quitina, glucoproteína que forma el exoesqueleto (Pascual *et al.*, 2003; Rosas *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2004).

La glucosa hemolinfática proviene de dos fuentes diferentes, la primera es por la absorción de la glucosa de la dieta a través de las células epiteliales del intestino y hepatopancreáticas, la segunda fuente es a partir del glucógeno en el hepatopáncreas (Verri *et al.*, 2001). El incremento de niveles de glucosa en hemolinfa o hiperglucemia es una respuesta de estrés que se ha comprobado en crustáceos, específicamente en camarones bajo diversos factores estresores, como el manejo en cultivo (Racotta y Palacios, 1998, Mercier *et al.*, 2009; Aparicio-Simón *et al.*, 2010), la hipoxia (Racotta *et al.* 2002), la hipertermia (Diaz *et al.*, 2013), entre otras (ver Tabla XIV).

En los trabajos en los cuales se han analizado diversas condiciones de estrés, las concentraciones de glucosa en hemolinfa del grupo control fueron 18 a 26 mg dl⁻¹, similares a los niveles encontrados en el cultivo de laboratorio (experimento 1) en agua clara en los tratamientos con 25 y 30% de proteína en la dieta, con niveles entre 15 y 20 mg dl⁻¹, respectivamente. Sin embargo, para el tratamiento con microbiota en general y el de agua clara con 35% de proteína en la dieta, los niveles sobrepasan los 25 mg dl⁻¹ y llegan hasta 37 mg dl⁻¹ en el caso del tratamiento microbiota con 25% de proteína, la cual se parece más a las concentraciones reportadas en el grupo estrés de varios estudios (20 a 68 mg dl⁻¹; Tabla XIV). Sin embargo y por lo anteriormente expuesto sobre el significado de la glucosa como indicador de la calidad nutricional, parece más probable que los niveles más altos de glucosa en los tratamientos con microbiota y de agua clara con 35% de proteína puedan deberse a una mejor condición del estado nutricional más que a una condición de estrés crónico en el cual el incremento es mínimo o inexistente (Mercier *et al.*, 2006), a menos de que se trate de una condición crónica de hipoxia en la cual los niveles de glucosa si incrementan hasta 45 mg dl⁻¹ (Racotta *et al.*, 2002).

Aunque el efecto no fue significativo en el experimento 1 se presentaron niveles mayores de glucosa en el tratamiento de microbiota únicamente para los tratamientos de 25% y 30% de proteína. La ruta más directa para la producción de esta glucosa sería la movilización del glucógeno en el músculo o del hepatopáncreas, sin embargo, esto no fue comprobado en el presente estudio. Los niveles de glucógeno en el hepatopáncreas no presentaron disminuciones, por lo cual los niveles de glucógeno fueron significativamente mayores en el tratamiento con microbiota (26.2 mg g^{-1}) en comparación con agua clara (20.6 mg g^{-1} ; Figura 29B). Nuevamente, esto apunta hacia que la glucosa en hemolinfa resultó más bien ser un indicador del estado nutricional, en conjunto con los niveles de glucógeno en hepatopáncreas y refleja una mayor disposición de nutrientes en el cultivo con microbiota.

En el caso del cultivo en granja (experimento 2), sólo en caso del estanque 1 se observó un incremento en los niveles de glucosa en hemolinfa en el grupo sometido a un condición de estrés por manipulación, confinamiento e hipoxia. En este estanque, los niveles del grupo control fueron de 17.2 mg dl^{-1} con un incremento a 38.9 mg dl^{-1} , lo que equivale a un aumento de 2.3 veces, valores que concuerdan con niveles basales y de estrés respectivamente reportados por otros autores (Tabla XIV). En contraste, en el estanque 4, la respuesta tendió a ser contraria con niveles mayores de glucosa en el grupo basal en comparación con el grupo estrés y fue en este estanque donde se presentaron los niveles basales más altos (59.6 mg dl^{-1}), lo cual concuerdan más bien con niveles de estrés reportados por otros autores (Figura 31; Tabla XIV). Alternativamente estos niveles mayores concuerdan con una mejor condición nutricional como se discutió para el experimento 1 y que se retomará más adelante en términos de susceptibilidad a estrés. En tal caso un mayor nivel basal de glucosa podría representar una alta disponibilidad de la misma y por ende implicaría que ya no hay necesidad de su movilización en una condición de estrés.

Al igual que los niveles de glucosa en hemolinfa, los niveles de glucógeno en músculo y hepatopáncreas en el experimento 2, solamente presentaron diferencias significativas por el efecto estanque (Figura 31, 32 y 33). El hepatopáncreas participa en diversas funciones, tales como la muda, excreción, metabolismo de carbohidratos, síntesis y excreción de enzimas digestivas y proteínas plasmáticas y absorción de nutrientes. Una de las tantas funciones del hepatopáncreas es el almacenamiento de reservas de nutrientes tales como glucógeno y lípidos (Verri *et al*, 2001). Por lo anterior, se esperaría que los niveles de glucosa en hemolinfa fueran el resultado de 1) la movilización de los reservorios de glucógeno, por lo cual se obtendrían

bajos niveles de glucógeno en hepatopáncreas o bien 2) por la absorción de carbohidratos de la dieta. Ésta última explicaría la variación de altos niveles de glucosa (53.3 mg dl^{-1}) en hemolinfa de camarones del estanque 4 (30% de proteína) así como altas concentraciones de los reservorios de glucógeno en músculo (19.3 mg g^{-1}) y hepatopáncreas (13.4 mg g^{-1}). El caso contrario se presentó en el estanque 6 (35% de proteína), donde el menor nivel de glucosa en hemolinfa (26.2 mg dl^{-1}) correspondió a bajas concentraciones del glucógeno en el músculo (16.3 mg g^{-1}) y hepatopáncreas (10.4 mg g^{-1}).

Finalmente tenemos que promedio el nivel de glucógeno en músculo de camarones del experimento 1 (6.8 mg g^{-1}) fue 2.5 veces menor al encontrado en el experimento 2 (16.9 mg g^{-1}). Sin embargo, los niveles de glucógeno en hepatopáncreas en el experimento 1 (23.4 mg g^{-1}) fueron dos veces mayores en comparación con los niveles en camarones del experimento 2 (12.4 mg g^{-1}). Por lo anterior, se observó que hay una mayor reserva de glucógeno solo en el hepatopáncreas en camarones cultivados bajo condiciones controladas, particularmente en el tratamiento con microbiota (26.2 mg g^{-1}), por lo cual probablemente los camarones del experimento 2 contaban en abundancia con fuentes alternativas, tales como lípidos, que se reflejan en mayores niveles, tal como se analizó anteriormente.

8.3.5. *Lactato*

La acumulación de lactato en la hemolinfa se ha establecido como una medida del metabolismo anaeróbico, el cual representa una respuesta a condiciones adversas, tales como hipoxia (Racotta *et al* 2002), toma repetida de muestras e inyección de serotonina (Racotta y Palacios, 1998), persecución (Racotta *et al.*, 2003), captura y transferencia de la unidad experimental (Mercier *et al.*, 2009; Aparicio-Simón 2010), infección bacteriana (Ávila-Villa *et al.*, 2012). Racotta *et al.*, 2002, reportan el aumento de lactato en hemolinfa, tanto después de tres días como de dos semanas de exposición a hipoxia ($2 \text{ a } 2.5 \text{ mg L}^{-1}$). En paralelo, se observó un aumento significativo de hemocianina, que al parecer fue insuficiente para proveer del oxígeno necesario para llevar acabo el metabolismo aeróbico y por lo tanto fue necesario un aumento de vías anaeróbicas, con la concomitante producción de lactato. De manera similar, en el presente trabajo, el incremento de lactato fue muy evidente en caso del estrés inducido por captura, confinamiento en cubeta e hipoxia del experimento 2, aunque la magnitud de la respuesta fue variable en función de estanque. En este sentido y tal como ya se mencionó, el aumento de hemocianina ni siquiera fue aparente en tan corto tiempo y por ende es más clara la necesidad de activación del metabolismo anaerobio en la condiciones de

hipoxia ($50 \text{ mg lactato L}^{-1}$) del grupo sometido a estrés. Además de la hipoxia, el confinamiento de los camarones en la cubeta también representó un estímulo estresor importante (Mercier *et al.*, 2009), aunque sería difícil decir cuál fue el estímulo más importante involucrado en la respuesta de estrés observada, considerando que al parecer en el camarón los estímulos no son aditivos y se produce la máxima respuesta de estrés con un solo estímulo (Racotta *et al.* 2003). El hecho que la respuesta de estrés haya sido variable en función del estanque es difícil de explicar pero podría relacionarse con una menor susceptibilidad al estrés (Racotta, comunicación personal) en el caso de los estanques 4 y 5 con 30% de proteína en la dieta. Lo anterior puede hasta cierto punto relacionarse con el mejor desempeño en cultivo de organismos alimentados con un dieta a base de 30% de proteína que se observó en el experimento 2, sin embargo, hay una serie de factores adicionales que influyeron sobre dicho desempeño.

En el experimento 1, no se analizó la respuesta de estrés, pero se puede observar que el nivel en el tratamiento con microbiota (7.3 mg dl^{-1}) y agua clara (6.8 mg dl^{-1}) son muy similares a los valores basales reportados por diversos autores (Tabla XIV). Valores similares también se obtuvieron en el experimento 2 en condiciones de granja en el grupo control (7.9 mg dl^{-1}), sin diferencias entre los distintos estanques. Por lo anterior, se infiere que la obtención de muestras por sí sola, no representó una condición de estrés en los camarones de cultivo, a diferencia de algunos trabajos en los cuales los niveles de lactato fueron muy altos (31.3 mg dl^{-1} ; Aguilar *et al.*, 2012), muy probablemente por cierto nivel de estrés inducido durante el muestreo que fue más complejo y no se tomaron las precauciones necesarias para evitarlo. Dado estos niveles relativamente bajos de lactato, se refuerza el hecho de que los niveles altos de glucosa observados en algunos tratamientos del experimento 1 y algunos estanques del experimento 2, discutidos anteriormente, puedan deberse a una condición de estrés, considerando además que el lactato se incrementa mucho más rápido que la glucosa y es más sensible ante un estímulo estresor (Aparicio-Simón *et al.*, 2012). Dicha diferencia en el curso temporal de la glucosa y el lactato, podría también explicar los resultados obtenidos en el experimento 2 donde se observa sólo un incremento de lactato, más no de glucosa, en el grupo de estrés.

Adicionalmente, la disponibilidad de alimento también pudo haber influenciado los resultados del experimento 2, dado que en los sistemas de cultivo de este experimento, no fue posible mantener un ayuno, porque precisamente la finalidad de estos sistemas es mantener el

alimento natural día y noche para la disposición de los camarones (Crab *et al.*, 2012). El aumento de glucosa en hemolinfa se presenta después de la alimentación y permanece hasta después de 24 hr, ya que la glucosa que proviene de la dieta es rápidamente absorbida y pasa a la hemolinfa para ser utilizada como fuente de energía (Verri *et al.*, 2001). Por esta razón, se ha establecido un ayuno de por lo menos 12 horas antes de la toma de hemolinfa, con la finalidad de evitar la interferencia del aumento de glucosa debido al alimento recién consumido (Pascual *et al.*, 2003; Rosas *et al.*, 2002).

Resumiendo lo anterior, la variación en los niveles de glucosa en el experimento 1 (específicamente tratamiento con microbiota) y 2, podría deberse a la combinación de diversos factores: la respuesta a las condiciones del medio de cultivo, la toma de muestra y el estado nutricional de los organismos (alimentación continua). Lo anterior, es sustentado en otros estudios donde se observa que la intensidad de la respuesta no es siempre causada por un factor estresor específico, de hecho es afectada por diversos factores que algunos autores no los consideran como factores estresores directos (Martínez-Porchas, 2009).

En este contexto, se comprende que las variaciones en los niveles de glucosa principalmente en el experimento 2, fueron a la interacción sinérgica de diferentes factores y fueron diferentes entre estanques.

8.3.5. Carga energética adenilica (CEA) y fosfato de arginina (Arg-P)

Como ya se mencionó, los organismos presentan cambios metabólicos tales como la movilización de sustratos energéticos debido a la exposición a factores estresores, con la finalidad de producir la energía necesaria para restablecer la condición de homeostasis que fue alterada. Considerando que la homeostasis energética es esencial para asegurar una buena condición fisiológica y garantizar un óptimo desarrollo productivo del cultivo, el cambio del estado energético celular en los organismos es un buen indicador de la respuesta del organismo a factores estresores (Pascual *et al.*, 2004; Lucas, 1996).

Se ha establecido que el valor de la CEA entre 0.8 a 0.9 refleja que el organismo no se encuentra afectado por las alteraciones en su medio. Mientras que la disminución de la CEA hasta niveles 0.5 ha sido relacionada con la exposición a diferentes factores estresores (Dickson y Giesy, 1982), tales como el aumento de temperatura (Wang *et al.*, 2006),

exposiciones a altas concentraciones de NH₃ (Marazza *et al.*, 1996), variaciones de salinidad y temperatura (Ivanovici, 1979) y la presencia de sustancias tóxicas (Thébault *et al.*, 1996). Por otro lado, el Arg-P funciona como buffer para mantener niveles altos de ATP en situaciones de alta demanda de energía y/o insuficiencia de oxígeno como son hipoxia ambiental (Abe *et al.*, 2007) y actividad muscular intensa (Ellington, 2001). Adicionalmente, resultados recientes indican que los camarones en una condición subóptima de cultivo presentan valores menores tanto de CEA como de Arg-P, indicando un estatus energético deficiente que podría considerarse como una situación de estrés a largo plazo.

En general en el experimento 1 la CEA vario en promedio de 0.66 a 0.71, lo cual indica un estado sub-óptimo que se ha reportado como control en otros estudios con crustáceos que se observan en la Tabla XVII (Marazza *et al.*, 1996). Sin embargo, Thébault *et al.*, (1996) menciona que los organismos invertebrados toleran valores menores de CEA (0.3-0.4) que los vertebrados (0.5-0.6). En comparación con el experimento 1, la CEA fue mayor (0.7-0.9) en el experimento 2, esto podría explicarse por las condiciones adversas en el experimento 1 ya que se ha documentado que los factores estresores provocan la reducción de los recursos energéticos en un organismo, debido a que hay una redirección de energía para afrontar dichos factores, lo cual resulta en menos energía disponible para procesos tales como el crecimiento (Dickson y Giesy, 1982). Lo anterior es constatando por el bajo desempeño y crecimiento de los camarones en el experimento 1.

En el primer muestreo del experimento 1, la cuantificación se realizó en el camarón completo dado que los organismos estaban muy chicos para poder hacer la disección del músculo y poder realizar todos los análisis. En este sentido, los niveles de nucleótidos representan de alguna manera un promedio entre los distintos tejidos, principalmente músculo, hepatopáncreas y exoesqueleto. En músculo, tanto los niveles como la CEA son mayores comparado con en el hepatopáncreas (Abe *et al.*, 2007) y es de esperarse que en el exoesqueleto ni siquiera hay nucleótidos dado que no se trata de un tejido vivo como tal. Por lo anterior, no es obvio comparar con los valores del cuarto muestreo y por la razón anterior se observa que los niveles de nucleótidos totales son considerablemente menores en el primer muestreo. Esta diferencia es menos marcada para la CEA que en el primer muestreo el promedio es de 0.66 (Figura 35), lo cual que podría deberse al efecto de combinación la tejidos, dado que la CEA en el hepatopáncreas también es menor que en el músculo (Abe *et al.*, 2007). En el cuarto muestreo el valor bajo de CEA (0.71, Figura 36), parece ser más bien por la

condición de los organismos, tal como ya se mencionó. En ambos muestreos la CEA fue mayor en el tratamiento con microbiota, de manera significativa en el primer muestreo, aunque no alcanzó significancia en el cuarto. Lo anterior, indica una mejor condición fisiológica en el tratamiento con microbiota que coincide con un mejor desempeño en cultivo en este tratamiento. Ambos muestreos se realizaron cuando el tratamiento con microbiota presentaba altas concentraciones de N-NH₃ (primer muestreo, Figura 2) o de N-NO₂ (cuarto muestreo, Figura 4), lo cual pudo haber disminuido la CEA como cualquier agente estresor y de esa manera contrarrestar el efecto benéfico de la microbiota. Dicho efecto pudo haber sido más acentuado para el cuarto muestreo donde las concentraciones de nitritos estuvieron en el intervalo de niveles letales reportados por otros autores (Chen y Lin, 1991; Ostrensky y Wasielesky, 1995), y por ende puede explicar la falta de diferencia significativa para la CEA aun cuando la concentración de ATP si fue mayor en camarones cultivados con microbiota (Figura 36).

En el presente trabajo no se encontró ninguna relación entre la carga energética y el nivel de proteína en la dieta (Figura 35 y 36). Si bien no se tiene reportado el efecto de determinada dieta en los niveles de nucleótidos, se ha observado que el ayuno prolongado en acocil (*Procambarus clarkii*) no modifica la CEA en músculo mientras que ésta la disminuye en hepatopáncreas (Schirf *et al.*, 1987). De manera similar, la CEA en músculo incluso aumenta durante el ayuno en langosta Noruega (*Nephrops norvegicus*) (Gornik *et al.*, 2010). Estos resultados indican que la CEA se mantiene estrechamente regulada a pesar de deficiencias energéticas nutricionales; por lo tanto no representa un buen indicador del estado de alimentación, con lo cual no es sorprendente que una dieta sub-óptima no tenga efecto alguno sobre la CEA.

Los niveles de Arg-P siguieron un patrón similar al de la CEA con mayores niveles en el tratamiento con microbiota, indicando un mejor estatus energético aunque la diferencia no fue significativa, posiblemente por las mismas razones ya mencionadas sobre un efecto estresor de altas concentraciones de desechos nitrogenados que contrarrestan un efecto benéfico de la microbiota. En cualquier caso, el efecto más notorio del tratamiento de microbiota sobre los niveles de Arg-P fue con el nivel de proteína de 30% (Figura 38) lo cual coincide con el mejor desempeño en cultivo de los camarones.

En el experimento 2 se esperaba una disminución tanto de la CEA como de la Arg-P, al menos en el tratamiento de estrés intenso de confinamiento en cubeta con hipoxia, y posiblemente también en el tratamiento de estrés moderado por la toma de hemolinfa que si implica ciertas contracciones del abdomen que consumen ATP. En este sentido, está bien documentado que las contracciones del músculo abdominal durante la respuesta de escape hasta fatiga que es muy común en crustáceos decápodos, conlleva a una disminución de la CEA y prácticamente al agotamiento de la Arg-P (England y Baldwin, 1983; Onen y Zebe, 1983; Gäde, 1984). Es probable que el número de contracciones no fue suficiente para obtener dicho efecto aunque lo más sorprendente es que con la toma de hemolinfa, se incrementó tanto la CEA (Figura 37) como la Arg-P (Figura 39). El incremento de la CEA, se dio en mayor medida por la disminución del AMP y en menor grado por el aumento del ATP, posiblemente por una aumento de la AMP deaminasa que llega a ocurrir en ciertas condiciones de estrés (Thébault *et al.*, 1997). El incremento de ATP en incluso de ArgP también podría deberse en un incremento casi instantáneo de la fosforilación oxidativa a partir del NADH ya existente a nivel citoplásmico o bien por otra fuente de energía como los polifosfatos que se discuten mas adelante.

Por último, la toma de hemolinfa que se realizó a partir del seno abdominal podría representar cierta pérdida de líquido del tejido que se está congelando durante el muestreo, lo que equivaldría a estar “concentrando” este tejido y por ende a que aumente la concentración de los diferentes componentes que lo componen, incluyendo el ATP y la Arg-P. En cualquier caso y dado que en el grupo de estrés intenso, también se procedió a la toma de hemolinfa, la comparación más adecuada de este grupo es con el grupo de estrés moderado con toma de hemolinfa. En ese sentido, se puede observar que tanto la CEA (Figura 37) como la Arg-P (Figura 39) si presentaron una disminución. Esta disminución concuerda con lo que se observa en diferentes situaciones de estrés (Robles-Romo, en prensa), particularmente la hipoxia (Gäde, 1984; Abe *et al.*, 2007), aunque se desconoce el efecto del confinamiento. Finalmente cabe mencionar que la concentración de Arg-P en el músculo de camarones en ambos experimentos es menor a la reportada en otros crustáceos (Tabla XVII), particularmente a la reportada en estanques de mareas del CIBNOR (Zamora-Méndez, 2012), lo cual no es posible explicar por el momento y hacen falta más estudios que analicen la causas de este efecto. Uno de los factores que deben considerarse en el caso de cultivos hiper-intensivos con fuerte aireación es el nado persistente de los camarones debido al movimiento continuo del agua.

Otra explicación es en los sistemas con inoculación de microorganismos como los del experimento 2, se presentaron otros componentes en diferente medida que pudieran suplir eficientemente los requerimientos de fosfatos para la formación de Arg-P y con esto un mayor amortiguamiento para mantener altos niveles de ATP en comparación con los sistemas de agua clara. En relación con lo anterior, se ha reportado que las microalgas tienen la capacidad de acumular polifosfatos, los cuales por medio de la microalga pudieran estar a la disposición como alimento para el camarón (Powell *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2008).

Tabla XVII. Carga energética en distintos organismos. CEA: carga energética adenilica y ArgP: Arginin fosfato.

REFERENCIA	ORGANISMO	ATP	ADP	AMP	CEA	ArgP
Moal <i>et al.</i> , 1989	Ostión	>50%	25%	< 10%	0.77 a 0.63	
Abel <i>et al.</i> , 2007	Langostino tigre	8.3	0.4	0.1	9	31
Speed <i>et al.</i> , 2001	Langosta	3.22	0.59	0	0.92	10.22
	Langosta	3.46	0.9	0.2	0.87	7.25
Shimada <i>et al.</i> , 2000	Langosta	9				32
	Langosta	6.4				26
	Langosta	6.5				34
England y Baldwin, 1983	Langosta	7.43	0.94	0.08		24.9
	Camarón (<i>Palaemon serrutus</i>)	11-3	1.4-0.2	0.25-0.06		
	Camarón (<i>Palaemonetes varians</i>)				0.6-0-2	
Ellington, 2001	Camarón (<i>Crangon crangon</i>)					20.7

9. CONCLUSIONES

- En un cultivo hiperintensivo con alto recambio de agua (agua clara) en condiciones de laboratorio, el crecimiento de los organismos fue mayor con el nivel más alto de proteína en la dieta (35%), mientras que la presencia de micro-organismos (microbiota) permitió reducir el requerimiento proteico a 30% donde se obtuvo el crecimiento óptimo que fue superior al de cualquier tratamiento en agua clara.
- En el tratamiento de agua clara no se presentó acumulación de nutrientes residuales de nitrógeno y fosforo en el medio de cultivo, debido a las altas tasas de recambio. Sin embargo, en el tratamiento con microbiota no se logró la asimilación completa de los nutrientes residuales por las bajas tasas de recambio de agua, lo cual se produjo mayor mortalidad por la acumulación de nitritos hacia el final del cultivo y que además estuvo directamente relacionada con el nivel de proteína en la dieta.

- A nivel de granja con cultivo hiperintensivo en presencia de microbiota, el mejor crecimiento se obtuvo de manera en general con el nivel más alto de proteína (35%). Sin embargo con este nivel proteína también se observó la mayor mortalidad, aunque en ese caso no hubo una asociación clara con los niveles nutrientes residuales.
- El crecimiento de los organismos en cultivos con microbiota no se encuentra relacionado con el nivel de proteína en la dieta, siendo posible la disminución de ésta, con un mejoramiento principalmente del desempeño productivo (K, S y FCA) y la ecoeficiencia en el uso de nitrógeno y fósforo de los organismos en cultivo.
- Los cultivos tanto en laboratorio como en granja (experimento 1 y 2, respectivamente) con la inclusión de un consorcio microbiano mejoran el desempeño del cultivo en altas densidades ya que incrementan la capacidad de carga del sistema, pero hasta un cierto punto donde la acumulación de nitritos principalmente es la mayor causa de altas mortalidades
- Varios indicadores del estado nutricional y fisiológico de los camarones cultivados en presencia de microbiota se vieron influenciados de manera benéfica por la presencia de microbiota aunque los altos niveles de nitritos probablemente contrarrestaron este efecto (proteínas en hemolinfa y músculo, glucosa en hemolinfa, estatus energético en músculo) o afectaron negativamente (hemocianina), siendo este último efecto más pronunciado con el nivel más alto de proteína (glucógeno en músculo y lípidos en hepatopáncreas).
- El mejor crecimiento de los camarones en presencia de microbiota con un nivel de proteína de 30% al parecer se pudo asociar con algunos indicadores del estado nutricional y fisiológico como los triglicéridos en hemolinfa y el fosfato de arginina en músculo, aunque para otros indicadores (proteínas y hemocianina) los niveles más altos se observaron con el nivel de proteína más alto en la dieta (35%).
- Los camarones cultivados bajo condiciones de granja y con la presencia de microorganismos presentaron un mejor estado fisiológico en comparación con los camarones cultivados en laboratorio, en términos de niveles de proteínas totales, triglicéridos y lípidos en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas, probablemente debido a la disponibilidad de microorganismos capaces de realizar desnitrificación asimilatoria, tales como las microalgas presentes en los estanques en granja, representando así una fuente de proteína y lípidos para los camarones.

10. RECOMENDACIONES

Se requieren investigaciones más a fondo enfocadas a entender los efectos benéficos de un cultivo con la inoculación de microorganismos, mediante estudios sobre la capacidad de respuesta inmunes, la condición nutricional y fisiológica que logren explicar el papel de la microbiota e identificar requerimientos nutricionales adicionales del camarón, tales como ácidos grasos y aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas, que estén deficientes en la microbiota.

Además, para esta línea de investigación es de vital importancia establecer una forma de manipular de manera precisa las comunidades microbianas por medio de la relación C:N.

11. LITERATURA CITADA

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 2005. Official methods of analysis, 18th Edition. Association of official analytical chemists, Washington, d.c., 1108
- Alava, V.R. y C. Lim. 1983. The quantitative dietary protein requirements of *Penaeus monodon* juvenile in a controlled environment. *Aquaculture* 30, 53–61. En Shiau, S-Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture*. 164:77-93.
- Alday-Sanz, V., Thaikua, S., A. N. Yousif, L. J. Albright y T. W. Flegel. 1998. Studies on IgY for passive immunization of shrimp against white spot syndrome virus. En: Rosas, C., C. Pascual, N. López y A. Sanchez. 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. *Avances en Nutrición Acuícola. Memoras del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de septiembre del 2002. México.
- Alvarez, J. S., J. Galindo, B. Jaime, B. Anderes y E. Pelegrin. 2002. Empleo de diferentes niveles de proteína en dietas prácticas en el engorde del camarón *Penaeus schmitti* en estaque de tierra. *Avances de Nutrición Acuícola III*: 665-673.
- Anuta, J. D., A. Buentello, S. Patnaik, A. L. Lawrence, A. Mustafa, M. Hume, D. M. Gatlin y M. C. Kemp. 2011. Effect of dietary supplementation of acid calcium sulfate (Vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the world aquaculture society*.42: 6.

- Aparicio-Simon, B., M. Poñón, R. Racotta y I. Racotta. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture*. 298:308-314.
- Aranyakananda, P. y A.L. Lawrence.1993. Dietary protein and energy requirements of the white-legged shrimp, *Penaeus vannamei* and the optimal P/E ratio. En Pascual, C., E. Zenteno, G. Cuzon, A. Sánchez, G, Gaxiola, G, Taboada, J, Suárez, T, Maldonado y C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*. 236:431-450.
- Ávila-Villa, L. A., D. Fimbres-Olivarria, G. García-Sánchez, T. Gollas-Galván, J. Hernandez-López y M. Martínez-Porchas. Physiological and immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium. *Aquaculture*. 324:14-19.
- Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*. 264(1-4):140-147.
- Avnimelech, Y., y M. Kochba. 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using ¹⁵N tracing. *Aquaculture*. 287(1-2):163-168.
- Avnimelech, Y. 2012. Biofloc Technology: A Practical Guide Book. 2d Edition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Azimi, Y., D. G. Allen y R. R. Farnood. 2012. Kinetics of UV inactivation of wastewater bioflocs. *Water research*. 46: 3827-3836.
- Azim, M. E. y D. C. Little.2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 283:1-4.
- Ballester, E. L. C., P. C. Abreu, R. O. Cavalli, M. Emerenciano, L. ABREU y Jr, W. Wasielesky. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*. 16(2): 163-172.

- Baloi, M., R. Arantes, R. Schweitzer, C. Magnotti y L. Vinatea. 2013. Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. *Aquacultural Engineering*. 52: 39-44.
- Barnes H. y J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 12: 103-118.
- Bosma, R. H. y M. C. J. Verdegem. 2011. Sustainable aquaculture in ponds: Principles, practices and limits. *Livestock Science*. 139(1-2): 58-68.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-253.
- Bringas-Alvarado, L., M. Ezquerro-Brauer y J. A. López-Elías. 1999. En L. R. Marínez-Córdova. Cultivo de camarones peneidos: Principios y prácticas. AGT Editor, S. A. México. 143-206.
- Burford, M. A., P. J. Thompson, R. P. McIntosh, R. H. Bauman y D. C. Pearson. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*. 232(1-4):525-537.
- Burford M. A. y K. C. Williams 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. *Aquaculture* 198:79-93.
- Burton, D. J. y J. L. Rout. 1977. *Química Orgánica y Bioquímica*. Ed. McGraw-Hill. México. 416 pp.
- Brune, D.E., J.R. Tomasso. 2003. *Aquaculture and Water Quality Advances in World Aquaculture*. 3. pp. 506–533. En: Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., y J. W. Leffler. 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(1-4):89–98.
- Carreño-Mejía, A. 2009. Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 115pp.

- Chrousos, G. P. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*. 5: 374-381.
- Chen, C. Y. Y. Ting, J. N. Lin y M. N. Lin. 1990. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. *Marine Biology*. 107:427-431.
- Chen, J. C. y S. F. Chen. 1992. Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* exposed to ambiente ammonia. *Aquaculture*. 109:177-185.
- Chen, J. C., S. y Cheng. 1995. Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Aquatic Toxicology*. 33:215-226.
- Chen, J. C., y Lee. 1997. Effects of nitrite on mortality, ion regulation and acid-base balance of *Macrobrachium rosenbergii* at different external chloride concentration. *Aquatic Toxicology*. 39:291-305.
- Chiu, H-T., S-P Yeh, S-C. Huang, C-C. Chang, C-M. Kuo y W. Cheng. 2006. Dopamine induces transient modulation of the physiological responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 251:558-566.
- Cohen, J.M., T.M. Samocha, J.M. Fox, R.L. Gandy, y A.L. Lawrence. 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacultural Engineering* 32:425–442. En: Baloi, M., R. Arantes, R. Schweitzer, C. Magnotti y L. Vinatea. 2013. Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. *Aquacultural Engineering* 52:39-44.
- Colt, E. J. y D. A. Armstrong. 1981. Nitrogen Toxicity to Crustaceans, Fish and Molluscs. *Bio-Engineering Symposium for Fish Culture*. 1:34-47.
- Colvin, L.V. y C.W. Brand. 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life cycle stages in controlled environment system. *Proceed. WMS, Baton Rouge, Louisiana*. 8:821–840. En Cuzon, G., A. Laurence, G. Gaxiola, C. Rosas y J. 2006. Guillaume. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*. 235:513-551.

- Cousin, M., G. Cuzon , E. Blanchet y F. Ruelle. 1991. Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ration for *Penaeus vannamei* juveniles. En Kureshy, K. y D. D. Davis. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 204: 125-143.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., y W. Verstraete. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*. 270:1-4.
- Crab, R., T. Defoirdt, P. Bossier y W. Verstraete. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 356-357:351-356.
- Diaz, F. A. D. Re, A. Sánchez, H. Cruz., R. A. González, L. N. Sánchez, A. Licea, E. Ponce-Rivas. M. E. Muñoz-Márquez, I. Giffard y C. Rosas. 2013. The effects of exposure to critical thermal maxima on the physiological, metabolic, and immunological responses in adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Marine and freshwater behavior and physiology*. 45(5):365-374.
- Din, Z. B., y J. M. Brooks.1986. Use of adenylate energy charge as a Cirophysiological indicator in toxicity experiments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 36, 1–8.
- Ellington, W. R. 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annual Review of Physiology*. 63:289-325.
- Emerenciano, M., Ballester, E. L. C., Cavalli, R. O., y W. Wasielesky. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research*. 43(3): 447-457.
- England, W. R. y J. Baldwin. 1983. Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, decapoda, parastacide): Role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behavior. *Physiological Zoology*. 56(4):614-622.
- Espinoza, P. A. y M. C. A. Bermúdez. 2012. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. Laboratorios de Análisis Biológicos, CIAD. 232 pp.
- FAO, 2012. The state of world fisheries and aquaculture.

- Fast, W. A. 1992. Panaeid Growout Systems An Overview. En Fast W. A. y L. J. Laster (Eds) Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Elsevier Science Publishers. 345-367.
- Flores, M., F. Díaz, R. Medina, A. D. Re y A. Licea. 2007. Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water. *Aquaculture research*. 38:740-747.
- Galván-Alvarez, D., F. Mendoza-Cano, J. Hernández-López y A. Sánchez-Paz. 2012. Experimental evidence of metabolic disturbance in the white shrimp *Penaeus vannamei* induced by the Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). *Journal of Invertebrate Pathology*. 111:60–67.
- Gao, D. W. y Y. Tao. 2011. Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91:887-894.
- Giesy, J. P., S. R. Denzer, C. S. Duke y G. W. Dickson. 1981. Phosphoadenylate concentrations and energy charge in two freshwater crustaceans: responses to physical and chemical stressors. *Verhandlungen des. Internationalen. Verein. Limnologie*. 21: 205-220.
- Gomez-Jimenez, S., M. L. Gonzalez-Felix, M. Perez-Velazquez, D. A. Trujillo-Villalba, I. R. Esquerra-Brauer, y R. Barraza-Guardado. 2005. Effect of dietary protein level on growth, survival and ammonia efflux rate of *Litopenaeus vannamei* (Boone) raised in a zero water exchange culture system. *Aquaculture Research*. 36(9): 834-840.
- González-Félix, M. L., Gómez-Jiménez, S., Perez-Velazquez, M., Davis, D. A. y J. G. Velazco-Rameños. 2007. Nitrogen budget for a low salinity, zero-water exchange culture system: I. Effect of dietary protein level on the performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*. 38(8): 798-808.
- González-Felix, M.L., M. Delbert, Gatlin III, A. L. Lawrence y M. Perez-Velazquez. 2002. Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. 207:151-167.
- Hall, M. R. y E. H. Ham. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the world aquaculture society*. 29(3):290-299

- Handy, R. D. y M. G. Poxton. 1993. Nitrogen pollution in mariculture toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 3:205-241.
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*. 34 (3), 344–363.
- Hopkins, J.S., M. R. DeVoe y A. F. Holland. 1995. Environmental Impacts if shrimp farming special reference to the situation in the continental united states. *Estuaries*.18(1A):24-42.
- Hu, Y., B. Tan, K. Mai, Q. Ai, S. Zheng, y K. Cheng. 2008. Growth and body composition of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed different ratios of dietary protein to energy. *Aquaculture Nutrition*.14(6): 499-506.
- Hsieh, S. L., S. M. Chen, Y. H. Yang y C. M. Kuo. 2006. Involvement of norepinephrine in the hyperglycemic responses of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, under cold shock. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* 143: 254-263.
- Ivanovici, M. A. 1980. The adenylate energy charge in the estuarines mollusk, *Pyrazus ebeninus*. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. *Biochemistry Physiology*. 66A:43-55.
- Jiann-Chu, C. y C. Tzong-Shean. 1989. Effect of Ammonia at Different pH Levels on *Penaeus monodon* Postlarvae. *Asian Fisheries Science*. 2:233-238.
- Jiann-Chi, C. y L. Shun-Chiang. 1990. Toxicity of Ammonia and Nitrite to *Penaeus monodon* Juveniles. *Journal of world aquaculture society*. 21 (4).
- Joseph, A. y Philip. 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*. 272:87-97.
- Ju, Z. Y., I. Forster, L. Conquest y W. Dominy 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp flocc or flocc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition*. 14:533-543.

- Koshio, S., S. Teshima, A. Kanazawa, T. Watase. 1993. The effect of dietary protein content on growth digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 113: 101-114.
- Kuhn, D. D., D. S. R. Boardman, G. J. Craig, y E. M. Flick. 2008. Use of Microbial Floes Generated from Tilapia Effluent as a Nutritional Supplement for Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Recirculating Aquaculture Systems. *Journal of the world Aquaculture society*. 39(1):72-82.
- Kuhn, D. D., A. L. Lawrence, G. D. Boardman, S. Patnaik, L. Marsh, y G. J. Flick. 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 303(1-4):28-33.
- Kureshy, K. y D. D. Davis. 2002. Protein requirement for maintenance and a maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 204:125-143.
- Le Coz, J. R. 1989. La charge energetique adenylique: mise au point application a trois mollusques bivalves, synthese et perspectives. Memoire IFREMER. Centre de Brest. Direction des Ressources Vivantes.
- Lezama-Cervantes, C. J., J. Paniagua-Michel y J. Zamora-Castro. 2010. Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 38 (1):129-142.
- Licona-Jain, A. B. 2012. Comparación de dos anticoagulantes (EDTA y Oxalato de potasio) sobre la determinación de variables inmunológicas y metabólicas en hemolinfa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de licenciatura para obtener el título de biólogo marino. UABCS.
- Limsuwan, C. y P. Junratchakool. 2004. Shrimp culture industry of Thailand. Magic publishing, Bangkok.
- Lignot, J.-H., J. C. Cochard, C. Soyeux, P. Lemaire y G. Charmantier. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 170:79-92.
- Lignot, J.-H., C. Spanings-Pierrot y G. Charmantier. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. 191:209-245.

- Lucas, A. 1996. Bioenergetics of Aquatic Animals. Taylor y Francis. 169 pp.
- Luo, G-Z., Y. Avnimelech, Y-F. Pan y H-X. Tan. 2013. Inorganic nitrogen dynamics in sequencing batch reactors using bioflocs technology to treat aquaculture sludge. *Aquaculture Engineering*. 52:73-79.
- Madigan, M., J. Martinko y J. Parker. 2003. *Biología de los Microorganismos*. Person Educacion. Madrid.
- Marazza, D. Bornens y Y. L. Gal. 1996. Effect of Ammonia on Survival and Adenylate Energy Charge in the Shrimp *Palaemonetes varians*. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 34, 103-108.
- Martínez-Córdova, L. R. 2002. *Camaronicultura: Avances y tendencias*. AGT editor, S. A. México 167 pp.
- Martínez-Córdova, L. 2008. *Estrategias de Alimentación en la Etapa de Engorda del Camarón*. CIBNOR, S. A., CYTED y PRONACA. México. 110 pp.
- Martinez-Córdova, J. A. López-Elíaz, G. Leyva-Miranda, L. Armenta-Ayín. M. Matinez-Porchas. 2011. Bioremediation and reuse of shrimp aquaculture effluents to farm whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: a first approach. *Aquaculture research*. 42:1415-1423.
- Martínez-Porchas, M., L. R. Martínez-Cordova y R. Ramos-Enriquez. 2009. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress?. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 4 (2):158-178.
- Mercier, L. , E. Palacios, A. I. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramirez, R. Hernández-Herrera y I. S. Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258: 633-640.
- Mishra, J. K., T. K. Samocha, S. Patnaik, M. Seed, R. L. Gandy, A. M. Ali. 2008. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacultural engineering*. 38:2-15
- Moal, J., J.R. Le Coz, J.F. Samain, J.Y. Daniel, 1989. Nucleotides in bivalves: Extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 93, 307-316.

- Molina-poveda, C., y H. Villarreal-colmenares. 2008. Estrategias de alimentación en la Etapa de engorda del camarón. PROYECTO II.8.Optimización de alimentos y estrategias de alimentación para una Camaronicultura Sustentable. CIBNOR. 110 pp.
- Mugnier, C., E. Zipper, C. Goarant, H. Lemonnier. 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*. 274:398-407.
- Páez-Osuna, F. 2001. Camaronicultura y Medio Ambiente. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 450 pp.
- Palacios, E., C. I. Pérez-rostro, J. L. Ramirez, A. M. Ibarra y I. S. Racotta. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture*. 171:309-321.
- Pascual, C. A. Sánchez y C. Rosas. 2003. Manual de Métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones peneidos. CYTED. Laboratorio de ecología y biología marina experimental. Campeche.26 pp.
- Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gabriela, G., Brito, R. y R. Gelabert. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 251(2-4):416-429.
- Pascual, C., E. Zenteno, G. Cuzon, A. Sánchez, G. Gaxiola, G. Taboada, J. Suárez, T. Maldonado y C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*. 236:431-450.
- Porchas-Cornejo, M. A., L. R. Martínez-Córdova, L. Ramos-Trujillo, J. Hernández-López, M. Martínez-Porchas, y F. Mendoza-Cano. 2011. Effect of promoted natural feed on the production, nutritional, and immunological parameters of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) semi-intensively farmed. *Aquaculture Nutrition*. 17(2).
- Ostrensky A y W. Wasielesky.1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Sao Paulo shrimp, *Panaeus paulensis* Pirez-Farfante, 1967. *Aquaculture* 132:339-347. En: Frias-Espericueta, M.G., Harfush-Melendez, M., Paez-Osuna, F., 2000. Effects of ammonia on mortality and feeding of

- postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 65:98–103.
- Quadros, W. y L. Martínez-Córdoba. 2008. En C. Molina-Poveda y H. Villarreal-Colmenares (Eds). Estrategias de Alimentación en la etapa de engorda del camarón. CYTED. México. 13-27.
- Racotta, I. S., E. Palacios y L. Méndez. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. 35(4):269-275.
- Racotta, I. S. y R. Hernandez-Herrera. 2000. Metabolic responses of the White shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. 125:437-443.
- Racotta I. S.; E. Palacios. 1998. Hemolymph Metabolic in Response to Experimental Manipulation Stress and Serotonin Injection in *Panaeus vannamei*. Journal of The World Aquaculture. 29(3):1-6.
- Ray, J. A., B. L. Lewis, C. L. Browdy, J. W. Leffler. 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. 299:89-98.
- Ray, J. A., G. Seaborn, L. Vinatea, C. L. Browdy y J. W. Leffer. 2012. Effects of biofloc reduction on microbial dynamics in minimal-exchange, superintensive shrimp, *Litopenaeus vannamei*, culture systems. Journal of the World Aquaculture Society. 43(6).
- Rocha, I.P., Rodrigues, J. y L. Amorin. 2004. The Brazilian shrimp culture in 2003. Brazilian Association of Shrimp Rearing Magazine. 6(1):30–36. En Wasielesky, W., H. Atwood, A. Stokes y C. L. Browdy. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 258: 396-403.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., y A. Van Wormhoudt. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penae. Aquaculture Research. 32(7):531-547.

- Rosas, C., E.L. Cooper., C. Pascual, R. Brito, R. Galabert, T. Moreno, G. Miranda y A. Sánchez. 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Marine Biology*. 145:401-413.
- Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, C. Pascual, G. Taboada, L. Arena, y A. van Wormhoudt. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 268(1):47-67.
- Rosas, C., C. Pascual, N. López y A. Sanchez. 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. *Avances en Nutrición Acuícola. Memoras del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre del 2002. México.*
- Samocha T.M., S. Patnaik, M. Speed, A.M. Ali, J.M. Burger, R.V. Almeida, Z. Ayub, M. Harisanto, A. Horowitz y D. L. Brock. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*.36:184-191.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, J. Hernández-López, A. Muhlia-Almazán y G. Yepiz-Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 340(2).
- Schveitzer, R., R. Arantes, M. F. Baloi, P. F. S. Costódio, L. V. Arana, W. Q. Seiffert y E. R. Andreatta. 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates. *Aquacultural Engineering*. ARTICLE IN PRESS.
- Scopel, B. R., R. Schveitzer, W. Q. Seiffert, y V. Pierri. 2011. Substituição da farinha de peixe em dietas para camarões marinhos cultivados em sistema bioflocos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 1:928-934.
- Shiau, S-Y. 1998. Nitrient requiremenst of penaeid shrimps. *Aquaculture*. 164:77-93.
- Smith, L.L., Lee, P.G. y A. L. Lawrence. 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei*, Boon; effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture*. 46:85–96.

- Strickland, J. D. H. y T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada bulletin. 167. Second edition. 328 pp.
- Tacon, A. G. J., J. J. Cody, L. D. Conquest, S. Divakaran, I. P. Forster, y O. E. Decamp. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*. 8:121-137.
- Tacon, A. G. J. y I. P. Foster. 2003. Aquafeeds and the environment: policy implications. *Aquaculture*. 226:181-189.
- Teichert-Coddington, D.R. y M. Arrue , 1988. Efecto de las proteínas de la dieta y la densidad de siembra en la producción de *Penaeus vannamei* cultivados en estanques de tierra. *Revista Latinoamericana de Acuicultura*. 35:29–33. En Pascual, C., E. Zenteno, G. Cuzon, A. Sánchez, G. Gaxiola, G. Taboada, J. Suárez, T. Maldonado, C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*. 236: 431-450.
- Thibodeaux, L. K., K. G. Burnett, y L. E. Burnett. 2009. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *The Journal of experimental biology*. 212(Pt 21):3428-39.
- Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán, y J. L Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 106A:299-303.
- Vargas-Albores, F., P. Hinojosa-Baltazar, G. Portillo-Clark, y F. Magallón-Barajas. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquaculture. Research* 29:549-553.
- Velasco, M., A.L. Lawrence, F.L. Castille y L.G Obaldo. 2000. Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Verri, T., A. Mandal, L. Zilli, D. Bossa , P.K. Mandal, L. Ingrosso, V. Zonno, S. Vilella, G.A. Ahearn y C. Storelli. 2001. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 130A:585–606. En: Galván-Alvarez, D., F. Mendoza-Cano, J.

- Hernández-López y A. Sánchez-Paz. 2012. Experimental evidence of metabolic disturbance in the white shrimp *Penaeus vannamei* induced by the Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). *Journal of Invertebrate Pathology*. 111:60–67.
- Viant, M.R., E.S. Rosenblum y R.S. Tjeerdema, 2001. Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B* 765:107–111.
- Vinatea, L., A.O. Galvez, C.L. Browdy, A. Stokes, J. Venero, J. Haveman, B.L. Lewis, A. Lawson, A. Shuler y J.W. Leffler. 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*. 42:17–24.
- Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Ourkhold, N. Lee y H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81:665-680.
- Wajsbrodt N, A. Gasith, M. D. Krom, T. M. Samoch. 1990. Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 9:497-504. En: Frias-Espericueta, M.G., Harfush-Melendez, M. y F. Paez-Osuna. 2000. Effects of ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 65:98–103.
- Warren, K. S. 1962. Ammonia toxicity and pH. *Nature*. 195:47-49.
- Wasieliesky, W., H. Atwood, A. Stokes y C. L. Browdy. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 258: 396-403.
- Wright, P. A. 1995. Review nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*. 198:273-281.
- Xia, S., Li, Y., W. Wang, M. Rajkumar, K. Kumaraguru, P. Vasagam y H. Wang. 2010. Influence of dietary protein levels on growth, digestibility, digestive enzyme activity and stress tolerance in white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), reared in high-density tank trials. *Aquaculture Research*, 41(12):1845-1854.

- Xu, W-J. y L-Q., Pan. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*. 412-413: 117-124.
- Xu, W-J., L-Q., Pan, X. H. Sun y J. Huang. 2013. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture Research*. 44: 1093-1102
- Yaemsooksawat, N., O. Jintasataporn, N. Areechon, S. Puntuma-o-pas y C. Thongtuak. 2009. Effect of dietary protein level on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931 . Songklanakarin Journal of Science and Technology.31(1).
- Zhang, P., X. Zhang, J. Li y G. Huang. 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, 256(1-4), 579-587.
- Zhu., X. Z., Y-J. Lui, L. X.Tian, K. S. Mai, S. X. Zheng, Q. J., Pan, M. C. Cai, C. Q. Zheng, Q. H. Zhang y Y, Hu. 2010. Effects of dietary protein and lipid levels on growth and energy productive value of pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture Nutrition*. 16:392-399.