



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

RESPUESTA FISIOLÓGICA E INMUNE DEL CAMARÓN  
*Litopenaeus vannamei* BAJO CONDICIONES DE ALTA  
DENSIDAD E HIPOXIA AGUDA, EN PRESENCIA DE  
FLÓCULOS BIOLÓGICOS Y SUSTRATOS  
ARTIFICIALES DURANTE LA PRECRÍA

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta  
Enrique Emanuel Gomez Sorhouet

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2015

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 17 del Mes de Junio del 2015, 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:

**"Respuesta fisiológica e inmune del camarón *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de alta densidad e hipoxia aguda, en presencia de flóculos biológicos y sustratos artificiales durante la precría"**

Presentada por el alumno:

**Enrique Emanuel Guemez Sorhouet**

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



Dra. Laurence/Stéphanie Mercier  
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
CO-TUTOR



Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Directora de tesis**

Dra. Laurence Stéphanie Mercier  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

### **Co-tutores**

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dra. Laurence Stéphanie Mercier  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dra. Laurence Stéphanie Mercier  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

### **Suplente**

Dr. Francisco Magallón Barajas  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

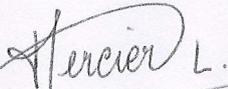
## RESUMEN

La tendencia mundial en la industria camaronícola está dirigida hacia la intensificación de los cultivos. Para ello, distintas herramientas tecnológicas fueron desarrolladas como son los sistemas de flóculos biológicos o “bioflocs”, que consisten en cultivar organismos en presencia de flóculos microbianos que actúan como un alimento *in situ* y favorecen la remoción de compuestos nitrogenados tóxicos. En estos sistemas también suelen colocarse sustratos artificiales que aumentan la superficie de cultivo y permiten un mayor desarrollo de la comunidad microbiana. Si bien estas herramientas han permitido intensificar los cultivos, no se conoce hasta hoy en qué medida dichos sistemas pueden ayudar a mitigar la condición de estrés provocada por las altas densidades usualmente empleadas. En este sentido, la presente tesis tuvo como objetivo evaluar el desempeño biológico, así como la respuesta fisiológica e inmune del camarón *Litopenaeus vannamei* cultivado a altas densidades de siembra y sometido a una hipoxia aguda durante la precría. Dichas respuestas fueron evaluadas en presencia o ausencia de flóculos biológicos y sustratos artificiales. Se mantuvieron postlarvas de camarón ( $0.17 \text{ g} \pm 0.03 \text{ D.E.}$ ) bajo nueve tratamientos, combinando tres densidades de cultivo (300, 600 y  $900 \text{ org./m}^3$ ) y tres condiciones de agua (agua clara [AC], biofloc [B] y biofloc con sustratos [BS]), por triplicado. Después de 8 semanas, se determinó el desempeño biológico (peso final, crecimiento, tasa semanal de crecimiento, supervivencia, factor de conversión alimenticia y biomasa) y la respuesta inmune (conteo total de hemocitos y cuantificación de la producción de anión superóxido) en hemolinfa. También se midió la respuesta fisiológica evaluando algunos parámetros fisiológicos (proteínas totales, hemocianina, lípidos totales, triglicéridos, carbohidratos totales, glucógeno, lactato, glucosa, carga energética adenilica y fosfato de arginina) en hemolinfa, hepatopáncreas y/o músculo. Al final del experimento, un lote de organismos de cada tratamiento fue sometido a una condición aguda de hipoxia y se evaluó la respuesta fisiológica. Las unidades experimentales con altas densidades de camarón y flóculos biológicos con o sin sustratos mantuvieron una baja concentración de compuestos nitrogenados ( $\text{NAT}: < 2 \text{ mg/l}$ ,  $\text{NO}_2^-: < 1 \text{ mg/l}$  y  $\text{NO}_3^-: < 1 \text{ mg/l}$ ), a diferencia de los tratamientos en agua clara, donde se observó una acumulación de nitritos y nitratos (hasta  $15 \text{ mg/l}$ ). El mejor desempeño biológico se obtuvo con el tratamiento de flóculos biológicos y sustratos para una densidad de siembra de  $600 \text{ org./m}^3$ . Las variables inmunológicas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos empleados. La respuesta fisiológica fue influenciada por la densidad de siembra y la condición de agua. La presencia de flóculos biológicos mejoró en cierta medida la condición fisiológica de los camarones, confiriéndoles mayor concentración de glucógeno y carbohidratos hepatopancreáticos. Los animales cultivados con flóculos biológicos tuvieron probablemente una mejor aptitud a contrarrestar la condición de estrés provocada por las densidades de siembra, como se evidenció con la tendencia de una mayor carga energética muscular. Los organismos mantenidos con flóculos biológicos y sustrato mostraron una respuesta hiperglicémica menos intensa y una menor

concentración de lactato plasmático en hemolinfa después de ser sometidos a una hipoxia aguda.

Palabras clave: desempeño biológico, estrés, biofloc, variables metabólicas e inmunológicas.

Vo.Bo.



---

Dra. Laurence Mercier

Directora de tesis

## ABSTRACT

Intensification of shrimp farming practices is increasing. Technological tools have been developed, including biofloc systems, which consist of cultivating shrimp in the presence of microorganisms that generate feed and remove toxic nitrogenous compounds. Artificial substrates are usually added in these systems to increase the surface area and develop the microbial community. While these practices increased cultivation, it is not known how these systems might mitigate stress caused by high stocking densities. The objective of this study was to assess biological performance, as well as physiological and immune responses of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivated at high stocking densities and acute hypoxic stress during a pre-growth phase. Responses were assessed in the presence or absence of biofloc and artificial substrates. Shrimp postlarvae ( $0.17 \text{ g} \pm 0.03 \text{ S.D.}$ ) were raised under nine treatments at three stocking densities (300, 600, and  $900 \text{ org./m}^3$ ) and three water conditions (clear water, biofloc, and biofloc with substrates) and performed in triplicate. After eight weeks, final weight, growth, weekly growth rate, survival, feed conversion ratio, and biomass were measured, as was immune response (total hemocyte count and superoxide anion production). Physiological response was also measured (total proteins, hemocyanin, total lipids, triglycerides, total carbohydrates, glycogen, lactate, glucose, adenylate energetic charge, and arginine phosphate) of hemolymph, the hepatopancreas, and muscle. After this experiment, a set of shrimp from each treatment were subjected to acute hypoxic conditions and their physiological response were measured. Units at high stocking densities under biofloc, with or without substrates, yielded low concentrations of nitrogenous compounds, compared to clear water treatments, which accumulated nitrogenous compounds. The best response was obtained with biofloc with substrates at a stocking density of 600 shrimp per cubic meter. Immune variables were not significantly different in the treatments. Physiological responses were influenced by stocking density and water condition. Biofloc improved the physiological conditions of the shrimp, yielding higher hepatopancreatic glycogen and concentrations of carbohydrates. Shrimp under biofloc had better conditioning to counter stress under high stocking density, reflected by levels in their adenylate energetic charge. Shrimp in biofloc with substrates had the lowest hyperglycemic response and lowest concentration of lactate in hemolymph after being subjected to acute hypoxia.

Keywords: biological performance, stress, biofloc, metabolic and immune variables

## DEDICATORIA

*Dedico todo mi esfuerzo y trabajo a mi familia,*

*A ti, Betsy.*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por abrirme sus puertas y permitirme realizar mis estudios de posgrado. Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de posgrado # 342439 otorgada.

A mi directora Dra. Laurence Mercier por su dirección, paciencia, apoyo y confianza, por inculcar en mí un pensamiento crítico y aportar a mi formación académica y de vida.

Al Dr. Humberto Villarreal Colmenares y al Dr. Ilie Racotta Dimitrov, por compartirme su visión y experiencia en el campo de la investigación y la acuicultura, por todo su apoyo y por sus aportaciones al presente trabajo.

A la Dra. Eliza Serviere Zaragoza y al personal de posgrado; Osvelia Ibarra Morales, Leticia González Rubio, Tania Núñez Valdez y Claudia Olachea León por todo su apoyo y atenciones.

A los técnicos y personal que desde el primer día de trabajo me compartieron su conocimiento y brindaron su apoyo para la realización de este multidisciplinario trabajo: Invernadero acuícola: Mayra Vargas Mendieta, Jesús Aguilar Villavicencio y Alfonso Cervantes. Laboratorio de bioquímica fisiológica: Roberto Hernández Herrera. Laboratorio de crustáceos: Sandra de La Paz Reyes. Laboratorio de análisis químico de agua: Iban Murillo Murillo y Celina Beltrán Camacho. Laboratorio de espectrofotometría de absorción atómica: Baudilio Acosta Vargas y Griselda Peña Armenta. Laboratorio de diagnóstico microbiológico: Norma Ochoa Álvarez. Laboratorio de metabolismo de lípidos: Olivia Arjona López. Laboratorio de cómputo de posgrado: Horacio Sandoval Gómez y José Melero Astorga. Biblioteca: Ana María Talamantes Cota, Susana Luna García y María Ojeda Castro. Laboratorio de salud ambiental: Orlando Lugo Lugo. Laboratorio de análisis químico proximal: Sonia Rocha Meza y Dolores Rondero Astorga. Laboratorio de diagnóstico parasitológico: Roxana Bertha Inohuye Rivera.

Al Dr. Francisco Magallón, Dr. Enrique Morales y Dra. Bertha Arredondo por compartirme su conocimiento y por toda su ayuda.

A Julio Ayala y David Carvajal por todo su apoyo durante el bioensayo y por compartirme sus experiencias en el manejo de los cultivos.

A Rosa Icela Fong y Alejandra Mazariegos Villarreal, quienes me apoyaron desde mi llegada al CIBNOR.

A Sergio Ulaje, Arlett Robles, Celene Navarro, Eliza Martínez, Yenitze Fimbres, Saúl Zamora, Bryan Licon, Denisse Morales y a mis compañeros por todo su apoyo y por compartir conmigo esta etapa de mi vida.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 El camarón blanco del Pacífico.....	3
2.2 El cultivo del camarón en México.....	5
2.3 La tecnología de flóculos biológicos .....	10
2.4 Respuesta fisiológica a una condición estresante y sus indicadores.....	16
2.5 Respuesta inmune en camarón .....	26
3. JUSTIFICACIÓN .....	30
4. HIPÓTESIS .....	30
5. OBJETIVOS .....	31
5.1 General .....	31
5.2 Específicos.....	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
6.1 Diseño experimental .....	32
a. Preparación de flóculos biológicos y aclimatación de organismos .....	32
b. Tratamientos.....	34
c. Unidades experimentales .....	35
d. Condiciones experimentales.....	37
6.2. Muestreos .....	40
a. Primer muestreo: parámetros bioquímicos bajo las tres condiciones de densidad .....	40
b. Segundo muestreo: parámetros inmunes bajo las tres condiciones de densidad .....	42
c. Tercer muestreo: parámetros bioquímicos bajo una condición de hipoxia aguda.....	42
6.3 Análisis estadísticos.....	44
7. RESULTADOS .....	46
7.1 Calidad de agua.....	46
a. Variables fisicoquímicas .....	46

b. Desechos nitrogenados .....	48
c. Sólidos suspendidos totales y composición de los flóculos .....	53
7.2 Desempeño biológico .....	57
a. Crecimiento .....	57
b. Supervivencia, factor de conversión alimenticia y biomasa .....	60
7.3 Respuesta inmune .....	63
a. Conteo total de hemocitos y producción de anión superóxido.....	63
7.4 Respuesta fisiológica .....	64
a. Condiciones de alta densidad y calidad de agua.....	64
b. Condición aguda de hipoxia .....	74
8. DISCUSIÓN.....	87
8.1 Calidad de agua.....	87
a. Desechos nitrogenados .....	87
b. Sólidos suspendidos totales .....	90
8.2 Desempeño biológico .....	91
8.3 Respuesta inmune .....	94
8.4 Respuesta fisiológica. ....	96
a. Condiciones de alta densidad y condición de agua .....	96
b. Condición aguda de hipoxia .....	98
9. CONCLUSIONES.....	102
10. RECOMENDACIONES .....	104
11. LITERATURA CITADA.....	105
12. ANEXOS .....	142

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Anatomía de <i>L. vannamei</i> .	4
Figura 2	Ciclo de vida de <i>L. vannamei</i> .	5
Figura 3	Producción anual de camarón por acuicultura en México.	6
Figura 4	Diagrama del funcionamiento de un sistema de flóculos biológicos.	12
Figura 5	Flóculos biológicos fotografiados en microscopio óptico (20x).	13
Figura 6	Preparación de los flóculos biológicos en tinas a la intemperie.	33
Figura 7	Colocación de los sustratos artificiales en las tinas.	33
Figura 8	Matriz de combinación de factores.	35
Figura 9	Unidades experimentales con flóculos biológicos (a) y con agua clara (b).	36
Figura 10	Sistema de aireación de una unidad experimental.	36
Figura 11	Toma del peso de los organismos.	40
Figura 12	Extracción de hemolinfa.	41
Figura 13	Burbujeo de nitrógeno gaseoso a unidad experimental para generar una condición de estrés por hipoxia aguda.	44
Figura 14	Monitoreo semanal de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) para los tratamientos con 300 org./m <sup>3</sup> .	49
Figura 15	Monitoreo semanal de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) para los tratamientos con 600 org./m <sup>3</sup> .	51
Figura 16	Monitoreo semanal de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) para los tratamientos con 900 org./m <sup>3</sup> .	52

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 17	Concentraciones de sólidos suspendidos totales (SST) durante el bioensayo.	54
Figura 18	Cambios en la composición de los flóculos biológicos a la 1 <sup>ra</sup> , 4 <sup>ta</sup> y 8 <sup>va</sup> semana del experimento.	56
Figura 19	Crecimiento de <i>L. vannamei</i> por densidad de siembra durante el experimento.	58
Figura 20	Crecimiento de <i>L. vannamei</i> por condición de agua durante el experimento.	59
Figura 21	Conteo total de hemocitos en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> mantenidos en los tratamientos experimentales.	63
Figura 22	Cuantificación de la producción de anión superóxido en hemolinfa de <i>L. vannamei</i> mantenidos en los tratamientos experimentales.	64
Figura 23	Concentración de glucógeno en hepatopáncreas de camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.	68
Figura 24	Concentración de nucleótidos totales en músculo de los camarones mantenidos en diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.	74
Figura 25	Concentración de lactato en el plasma de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	77
Figura 26	Concentración de lípidos totales en el plasma de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	78
Figura 27	Concentración de triglicéridos en el plasma de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	79
Figura 28	Concentración de glucógeno en el hepatopáncreas de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	80

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 29	Concentración de carbohidratos totales en el músculo de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	83

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabla I	Clasificación de los sistemas de cultivo de camarón.	9
Tabla II	Efecto observado en la concentración de carbohidratos en camarones peneidos sometidos a diferentes estímulos estresores.	19
Tabla III	Efecto observado en la concentración de proteínas totales y hemocianina en camarones peneidos sometidos a diferentes estímulos estresores.	21
Tabla IV	Efecto observado en la concentración de lípidos totales y triglicéridos en camarones peneidos sometidos a diferentes estímulos estresores.	23
Tabla V	Relación entre la CEA, la condición ambiental y las características fisiológicas de los organismos.	24
Tabla VI	Efecto observado en la CEA y concentración de fosfato de arginina en crustáceos sometidos a diferentes estímulos estresores.	25
Tabla VII	Ejemplos del efecto de distintas condiciones sobre el conteo total de hemocitos (CTH) y el estallido respiratorio en varias especies de camarones.	29
Tabla VIII	Determinaciones de variables fisicoquímicas durante el bioensayo.	39
Tabla IX	Promedios de las variables fisicoquímicas cuantificadas en el agua de cultivo durante el experimento.	47
Tabla X	Crecimiento, supervivencia, factor de conversión alimenticia y biomasa de <i>L. vannamei</i> obtenidos durante el experimento.	62
Tabla XI	VARIABLES metabólicas medidas en el plasma de los camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.	66
Tabla XII	VARIABLES metabólicas medidas en el hepatopáncreas de los camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.	69

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabla XIII	Variables metabólicas medidas en el músculo de los camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.	72
Tabla XIV	Variables energéticas medidas en el músculo de los camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.	73
Tabla XV	Variables metabólicas medidas en el plasma de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	76
Tabla XVI	Variables metabólicas medidas en el hepatopáncreas de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	81
Tabla XVII	Variables metabólicas medidas en el músculo de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	85
Tabla XVIII	Variables energéticas medidas en el músculo de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.	86

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el consumo de productos acuáticos se ha triplicado en los últimos 50 años. Lo anterior se debe principalmente al crecimiento poblacional e incremento de los ingresos económicos, así como a los efectos de la globalización y urbanización que permitieron una mejor distribución de dichos productos (Brugère y Ridler, 2004; Hawkes, 2006; Kearney, 2010). Como la obtención de productos marinos por pesquerías no alcanza a cubrir la demanda mundial de pescados y mariscos, la acuicultura parece ser hoy en día la mejor opción para satisfacer la demanda de productos acuáticos y ofrecer alternativas para enfrentar la inseguridad alimentaria, la cual afecta aproximadamente a 870 millones de personas en el mundo (FAO *et al.*, 2012).

En el 2011, la acuicultura contribuyó con más del 41% de la producción total de pescados y mariscos, alcanzando una producción de 63.6 millones de toneladas (FAO, 2012); no obstante, la FAO estima que se debe aumentar la producción acuícola mundial a 23 millones de toneladas más para el año 2030, con el fin de mantener el nivel actual de alimentos acuáticos disponibles *per capita* (FAO, 2012). Dicho nivel es actualmente de 18.8 kg (FAO, 2012). Adicionalmente, la acuicultura tiene el desafío de proveer productos acuáticos de manera sustentable y amigable con el ambiente, garantizando que sean de alta calidad nutricional, inocuos y bioseguros (FAO, 2012). Para lograr dichos desafíos y alcanzar los volúmenes de producción requeridos, la tendencia mundial en la industria acuícola está dirigida hacia la intensificación, la cual permite optimizar áreas de cultivo, incrementando la productividad de los cultivos y los márgenes de ganancias económicas (Piedrahita, 2003; Bosma y Verdegem, 2011; Gyalog *et al.*, 2011).

Un buen ejemplo de esta tendencia es el desarrollo de sistemas basados en la tecnología de “bioflocs”, ya que minimiza la descarga de efluentes, promueve la bioseguridad de los cultivos, así como propicia una mejor utilización del alimento suministrado, favoreciendo la continua producción *in situ* de una fuente proteica microbiana (Burford *et al.*, 2003; Avnimelech, 2007). Dicha tecnología incrementa

también el rendimiento de los cultivos. De manera general, los sistemas de “bioflocs”, también conocidos como flóculos biológicos, consisten en establecer una comunidad de microorganismos acuáticos predominantemente heterotróficos dentro del cultivo que sirvan como fuente de alimento y como un agente biorremediador (De Schryver *et al.*, 2008). Dicha microbiota es capaz de reciclar los desechos nitrogenados (nitrógeno amoniacal total,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ; y nitritos,  $\text{NO}_2^-$ ) antes de que estos lleguen a niveles tóxicos (Schrader *et al.*, 2011), reduciendo así la necesidad de recambios de agua del sistema de cultivo. La tecnología de producción en presencia de flóculos biológicos ha sido utilizada de manera exitosa en granjas acuícolas comerciales de camarón y tilapia (Avnimelech, 2012). Adicionalmente, esta tecnología ha mostrado buenos resultados en cultivos experimentales de camarón blanco del Pacífico en las etapas de reproducción, maternización y precría (Wasiolesky *et al.*, 2006; Samocha *et al.*, 2007; Becerra-Dórame *et al.*, 2012; Emerenciano *et al.*, 2013).

Otras herramientas utilizadas en la intensificación de los cultivos son los sustratos artificiales (Thompson *et al.*, 2002) y la práctica de cultivo multifásico (Van Wyk, 1999). Los sustratos artificiales sirven para aumentar la superficie de cultivo sin modificar el volumen del estanque y como sustrato para el desarrollo de una comunidad de microorganismos (denominada “perifiton”) que fungen como un agente biorremediador de desechos nitrogenados y como alimento para los organismos en cultivo (Zhang *et al.*, 2010). Adicionalmente, los sustratos artificiales pueden servir como escondrijos para los organismos de cultivo, ofreciéndoles protección en periodos de muda. Las estrategias de cultivos multifásicos consisten en separar el ciclo de producción de organismos en distintas fases con el fin de realizar cada una de ellas en estanques separados. Estas prácticas han permitido obtener organismos con pesos más homogéneos, reduciendo el canibalismo y la competencia (Sturmer y Lawrence, 1987; Moss y Moss, 2004).

En los cultivos intensivos de camarón, los organismos pueden estar sujetos a condiciones de estrés crónico (de una a varias semanas) o agudo (de horas a

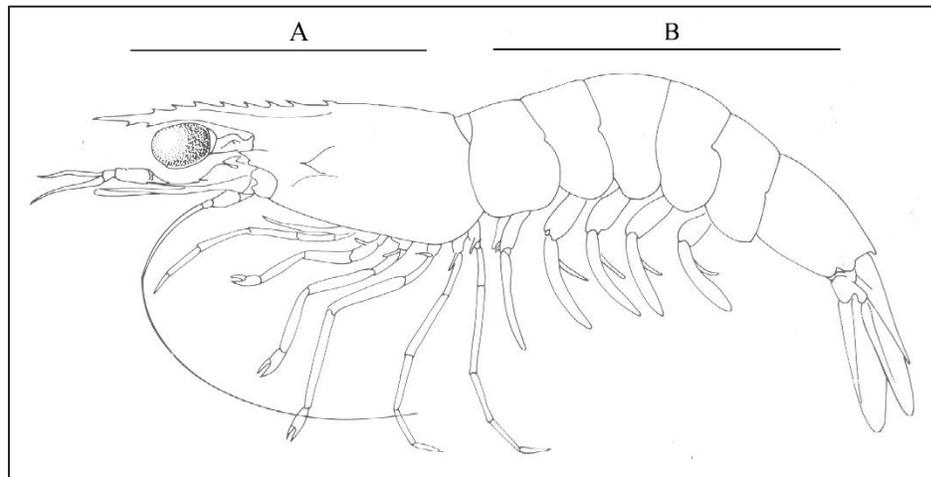
algunos días), provocadas por disminuciones de oxígeno disuelto en el agua, manipulaciones y altas densidades, entre otras cosas. Estas condiciones pueden afectar el crecimiento y la supervivencia de los organismos y en consecuencia la rentabilidad del cultivo. Adicionalmente, las condiciones estresantes aumentan la vulnerabilidad de los camarones a los agentes infecciosos presentes en el agua de mar, disminuyendo la capacidad de respuesta inmune de los camarones e incrementando su susceptibilidad a distintas enfermedades (Le Moullac y Haffner, 2000). Estas enfermedades son hoy en día uno de los principales problemas que enfrenta la camaronicultura a nivel mundial (Lightner, 2011).

En el presente trabajo se determinó el desempeño biológico, así como la respuesta fisiológica e inmune del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, cultivado a diferentes densidades y en presencia o ausencia de flóculos biológicos y sustratos artificiales durante la fase de precría. Se evaluó también la respuesta fisiológica de dichos camarones después de someterlos a una condición aguda de hipoxia.

## **2. ANTECEDENTES**

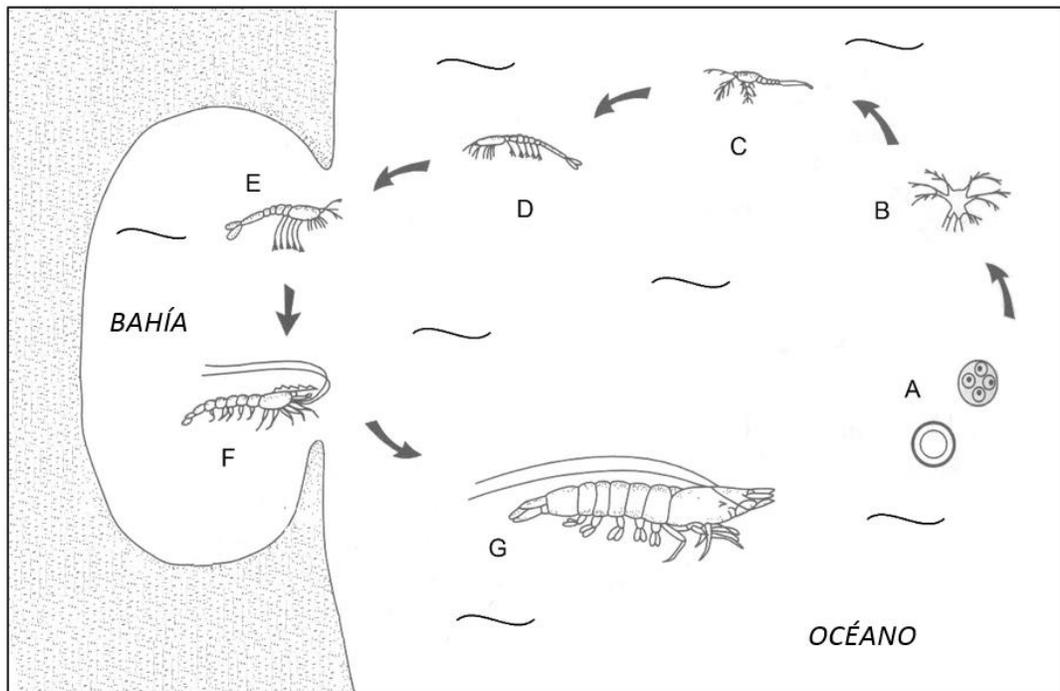
### **2.1 El camarón blanco del Pacífico**

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Pérez-Farfante, 1967) es un crustáceo marino de la familia Penaeoidea, que es nativo de la costa oeste del continente americano, distribuyéndose desde el noroeste de México hasta Perú. El arreglo corporal del camarón blanco del Pacífico se compone de dos partes: la parte anterior llamada cefalotórax alberga los principales órganos vitales (boca, branquias, estómago y hepatopáncreas), las pinzas y los apéndices ambulatorios; la parte posterior o abdomen, contiene el intestino y los apéndices natatorios (Dall *et al.*, 1990) (Figura 1).



**Figura 1. Anatomía de *L. vannamei*.** A: cefalotórax, B: abdomen. Modificado de Fast y Lester (1992).

El ciclo de vida de este organismo inicia en aguas oceánicas, donde los adultos se reproducen y las hembras liberan huevos fertilizados (FAO, 2006). Al eclosionar el huevo, se inicia la etapa larval del organismo, durante la cual realiza una serie de metamorfosis que conducen a estadios denominados *nauplio* (con 6 subestadios morfológicos), *protozoa* (con 3 subestadios), *mysis* (con 3 subestadios) y finalmente *postlarva*, la cual es morfológicamente similar a un camarón adulto (Kitani, 1986) (Figura 2). La postlarva inicia una migración hacia áreas costeras protegidas tales como estuarios o bahías, donde obtiene refugio y una gran variedad de alimentos de origen animal y vegetal (Gillett, 2008). Una vez terminado su estadio juvenil, el camarón deja la zona costera y regresa a aguas oceánicas para la etapa adulta y su fase de reproducción (Martínez-Córdova, 1994). Como adulto, el camarón blanco del Pacífico llega a medir hasta 23 centímetros y pesar hasta 60 gramos (FAO, 2003, 2006).



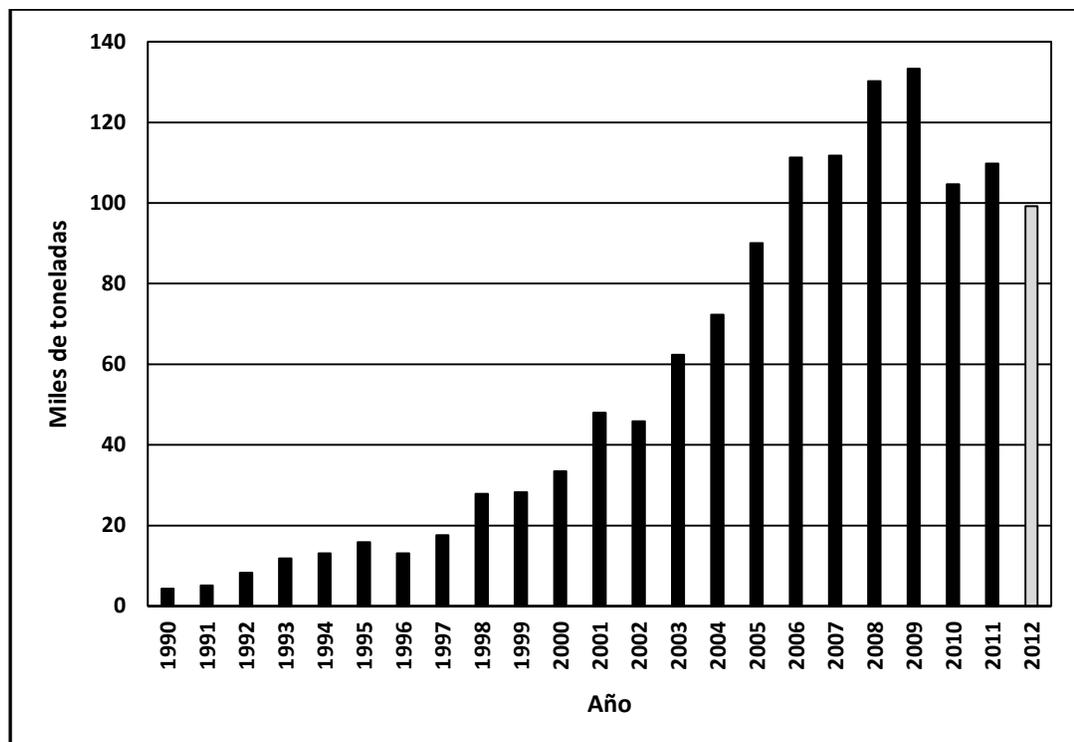
**Figura 2. Ciclo de vida de *L. vannamei*.** A: huevo, B: nauplio, C: protozoa, D: mysis, E: postlarva, F: juvenil, G: adulto. Modificado de Fast y Lester (1992).

## 2.2 El cultivo del camarón en México

Los primeros trabajos enfocados al cultivo de camarón en México iniciaron a finales de los 60's con la especie *Farfantepenaeus californiensis* en el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey en Guaymas. En los 70's, se desarrolló la tecnología de cultivo del camarón *L. stylirostris* a partir de investigaciones conjuntas entre las Universidades de Sonora y Arizona (Arredondo-Figueroa, 2002; DeWalt *et al.*, 2002) y fue hasta los 80's que se obtuvieron las primeras operaciones comerciales rentables (DeWalt *et al.*, 2002). A medida de que las investigaciones se fueron diversificando acerca del cultivo de camarón, *L. vannamei* se posicionó como la principal especie producida en México debido a distintas características biológicas tales como alta supervivencia larval en laboratorios de producción (>70%) (FAO, 2003), tolerancia a altas densidades de cultivo (hasta 750 organismos/m<sup>3</sup>) (Tacon *et al.*, 2004) y resistencia a amplios rangos de salinidad (desde 0.5 ppm hasta 40 ppm) (Samocho *et al.*, 2001; Zhu

*et al.*, 2004). Adicionalmente, *L. vannamei* mostró una mayor resistencia a enfermedades tales como la enfermedad de infección hipodérmica y necrosis hematopoyética (IHHND, por sus siglas en inglés) (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

La producción de camarón en México mostró un crecimiento anual lento desde su inicio hasta la primera mitad de los 90's (Figura 3); sin embargo, a partir de ese periodo y hasta finales de la década de los años 2000, la producción mostró un crecimiento anual promedio del 20%, alcanzando un total de poco más de 130 000 toneladas producidas en el año 2009 (CONAPESCA, 2005, 2011). Desde entonces, la producción ha disminuido fuertemente hasta llegar a 99 000 toneladas en 2012 (SAGARPA, 2013; cifra preliminar) debido principalmente a cuadros epizooticos en los cultivos.



**Figura 3. Producción anual de camarón por acuicultura en México.** (SEMARNAP, 2000; CONAPESCA, 2005, 2011).

La producción de camarón en México está afectada por la aparición de epizootias y por los daños ambientales que la actividad origina sobre los

ecosistemas aledaños a las granjas. Distintas enfermedades han frenado el desarrollo de la industria camaronícola desde hace varias décadas. En 1995, la enfermedad de Taura (TSV, por sus siglas en inglés) apareció y provocó mortandades de hasta el 90% en fases larvarias y juveniles. En 1999, se detectó la enfermedad del síndrome de la mancha blanca (WSSD, por sus siglas en inglés) (Zarain-Herzberg y Ascencio-Valle, 2001; Briggs *et al.*, 2004) que ha ocasionado altas mortandades a nivel de granja. Otras enfermedades menos masivas y severas, como la enfermedad de la hepatopancreatitis necrotizante (NHP, por sus siglas en inglés) y la enfermedad de necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHND, por sus siglas en inglés) también han afectado la producción, a pesar de no haber ocasionado daños masivos (Magallón-Barajas *et al.*, 2007). En fechas más recientes, en el año 2013 la industria sufrió la aparición de la enfermedad catalogada como síndrome de mortandad temprana o de necrosis hepatopancreática aguda (EMS o AHPNS, por sus siglas en inglés), la cual ya había sido observada en distintos países asiáticos (NACA, 2012). A nivel nacional, el impacto de esta enfermedad ha sido tal que se estimó una reducción del 45% de la producción nacional en el año 2013 en comparación con el año 2012 (FAO, 2014). Por otra parte, la descarga de aguas de desecho de granjas camaronícolas, que contienen altas cantidades de materia orgánica, desechos nitrogenados y fosfatos, ha ocasionado problemas de eutrofización y anoxia en distintos cuerpos de agua de la zona noroeste de México, representando impactos ecológicos y económicos para la misma industria (Páez-Osuna *et al.*, 2003; Martínez-Córdova *et al.*, 2009). Así mismo, el uso de zonas costeras para la construcción de granjas de camarón también ha sido criticado por su impacto sobre la flora y fauna, principalmente en zonas de manglares, aunque se ha observado que este impacto es menor en México en relación a otros países (DeWalt *et al.*, 2002).

Las actividades de cultivo de *L. vannamei* se concentran en un 70% en el Noroeste del país, en la zona costera de los estados de Baja California, Baja California Sur, Sinaloa, Sonora y Nayarit (CONAPESCA, 2011). Así mismo, se han

implementado cultivos en otras localidades como son los estados de Yucatán, Tamaulipas, Campeche y Colima, entre otros. El camarón blanco se cultiva en la mayoría de los casos (más del 98%) en sistemas semi-intensivos pero se encuentran también granjas que usan sistemas extensivos e intensivos (CONAPESCA, 2011). En la tabla I, se muestran las características técnicas de dichos sistemas de producción en términos de densidad de siembra, alimentación y volúmenes de producción, entre otros. Actualmente, el cultivo de camarón en México representa el cultivo más tecnificado del país, siendo además un producto con calidad de exportación.

**Tabla I. Clasificación de los sistemas de cultivo de camarón.** \$: pesos moneda nacional, org: organismos, ha: hectárea. Modificado de Tacon *et al.* (2004).

<b>FACTOR:</b>	<b>SISTEMA:</b>	
	<i>Extensivo</i>	<i>Semi-intensivo</i>
<i>Aireación</i>	Por fotosíntesis de microalgas	Mecánica parcial o continua
<i>Estanques</i>	De fondo de tierra, hasta 100 ha	De fondo de tierra, <1-20 ha
<i>Recambio de agua</i>	< 5%	5-20%
<i>Alimentación</i>	Alimento comercial y por fertilización del agua	Alimento comercial y por fertilización del agua
<i>Costo de producción</i>	22.1-32.5 \$/kg	29.9-42.9 \$/kg
<i>Rendimiento</i>	<1000 kg/ha/año	1000-3000 kg/ha/año
<i>Densidad de siembra</i>	5-10 org./m <sup>3</sup>	10-20 org./m <sup>3</sup>
	<i>Intensivo</i>	<i>Superintensivo</i>
<i>Aireación</i>	Mecánica continua	Mecánica continua y con inyección de oxígeno
<i>Estanques</i>	De fondo de tierra o plástico, < 1-20 ha	De concreto o plástico, dentro de invernaderos, <1 ha
<i>Recambio de agua</i>	5-40%	0-5%
<i>Alimentación</i>	Alimento comercial y por fertilización del agua	Alimento comercial y por fertilización del agua
<i>Costo de producción</i>	45.5-65 \$/kg	52.0-97.5 \$/kg
<i>Rendimiento</i>	10,000-40,000 kg/ha/año	40,000-340,000 kg/ha/año
<i>Densidad de siembra</i>	25-75 org./m <sup>3</sup>	120-750 org./m <sup>3</sup>

El ciclo de producción del camarón está dividido en las siguientes tres fases: el cultivo larvario, la precría (también llamada maternización o pre-engorda) y la engorda (Aragón-Noriega *et al.*, 1999; Wang y Leiman, 2000). La precría se realiza en los laboratorios de producción de postlarvas a partir de aproximadamente 0.03 g y termina cuando los organismos alcanzan entre 1 y 2 g, aunque los pesos varían dependiendo de las características de cada operación acuícola (por ejemplo, la densidad de siembra y la duración de la etapa). Esta etapa que implica un costo adicional para los laboratorios de producción se

justifica por distintos beneficios como es incrementar la talla de siembra en los estanques de engorda y otorgar una mayor protección contra enfermedades a los camarones durante su etapa juvenil (Gervais y Zeigler, 2014). La implementación de dicha etapa de precría permite sembrar camarones más resistentes y más difíciles de ser depredados (Moss y Moss, 2004), lo que representa una mejor cosecha al final de la engorda. En algunas zonas templadas de México, la precría ha permitido también lograr dos ciclos de producción al año, en vez de uno (Páez-Osuna *et al.*, 1997; Aragón-Noriega *et al.*, 1999; Bridson y Tetrault, 2010).

### **2.3 La tecnología de flóculos biológicos**

La tecnología de flóculos biológicos fue desarrollada a principios de los años 70's en Tahití y su desarrollo continuó independientemente en EE.UU. e Israel hasta la década de los 90's (Avnimelech *et al.*, 1994; DuRant *et al.*, 2011; Avnimelech, 2012). Dicha tecnología radica en la manipulación de las concentraciones de carbono y nitrógeno presentes en el agua de cultivo, para generar agregados microbianos que contienen predominantemente bacterias heterótrofas, algas y protozoarios (ciliados y flagelados), junto con materia orgánica (Hargreaves, 2013). La formación de dichos agregados se presenta después de adicionar una fuente de carbono orgánico en el medio de cultivo (Gao *et al.*, 2012) y se considera óptima cuando se mantiene una relación carbono/nitrógeno (relación C:N) en una proporción de 15:1 a 20:1 (Panjaitan, 2011; Becerra-Dórame *et al.*, 2014). Distintas fuentes de carbono orgánico se emplean para generar dichos flóculos biológicos y las más usuales son glicerol, glucosa, melaza de caña y almidón (Avnimelech, 2007; Crab *et al.*, 2010a; Schrader *et al.*, 2011). Se ha demostrado que las propiedades nutricionales, así como la disponibilidad, palatabilidad y digestibilidad de los flóculos biológicos pueden variar en función de la fuente de carbono usada (Crab *et al.*, 2010a, 2010b)

La formación de los agregados se debe a que el carbono orgánico es un sustrato limitante para la proliferación de las bacterias heterótrofas en sistemas

acuícolas, mientras que el nitrógeno amoniacal total (NAT) ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_3$ ) y otros compuestos nitrogenados como los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) son generalmente abundantes y resultan ser tóxicos para los camarones (Avnimelech, 1999; Frías-Espericueta y Páez-Osuna, 2001). El NAT proviene del catabolismo de las proteínas por los organismos en cultivo y de la descomposición de materia orgánica (microalgas y bacterias muertas, heces y alimento no consumido) en el estanque de cultivo (Hargreaves y Tucker, 2004). Al adicionar carbono orgánico, éste deja de ser un sustrato limitante, lo que lleva a la proliferación de las bacterias heterótrofas (ej. *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.) que incorporan los compuestos nitrogenados a su biomasa (Hargreaves, 2013), removiéndolos del agua de cultivo más rápidamente que las bacterias quimioautótrofas nitrificantes (ej. *Nitrospira* spp., *Nitrobacter* spp.) que tienen un tiempo de generación más lento y son más susceptibles a cambios en el medio (Ebeling *et al.*, 2006; Avnimelech, 2012; Monroy-Dosta *et al.*, 2013). Cabe mencionar que pueden existir también algas (ej. *Thalassiosira* spp., *Nannochloropsis* spp., *Chlorella* spp., *Oocystis* spp.) presentes en los flóculos o la columna de agua que ayudan a dicha remoción (Ray *et al.*, 2010b; Vinatea *et al.*, 2010; Kent *et al.*, 2011). La aglutinación de la masa bacteriana en flóculos se logra por la presencia de polímeros extracelulares en las membranas bacterianas así como fuerzas electrostáticas (De Schryver *et al.*, 2008; Avnimelech, 2012). Dicho proceso requiere una fuerte aireación (hasta  $100 \text{ W/m}^3$ ) para generar movimiento en el agua de cultivo y la suspensión de la materia orgánica. Esto propicia también el contacto entre la masa bacteriana y otros microorganismos, además de proveer de oxígeno a las comunidades bacterianas (McIntosh, 2000; De Schryver *et al.*, 2008). En la figura 4, se muestran los principales procesos biogeoquímicos de la tecnología de flóculos biológicos.

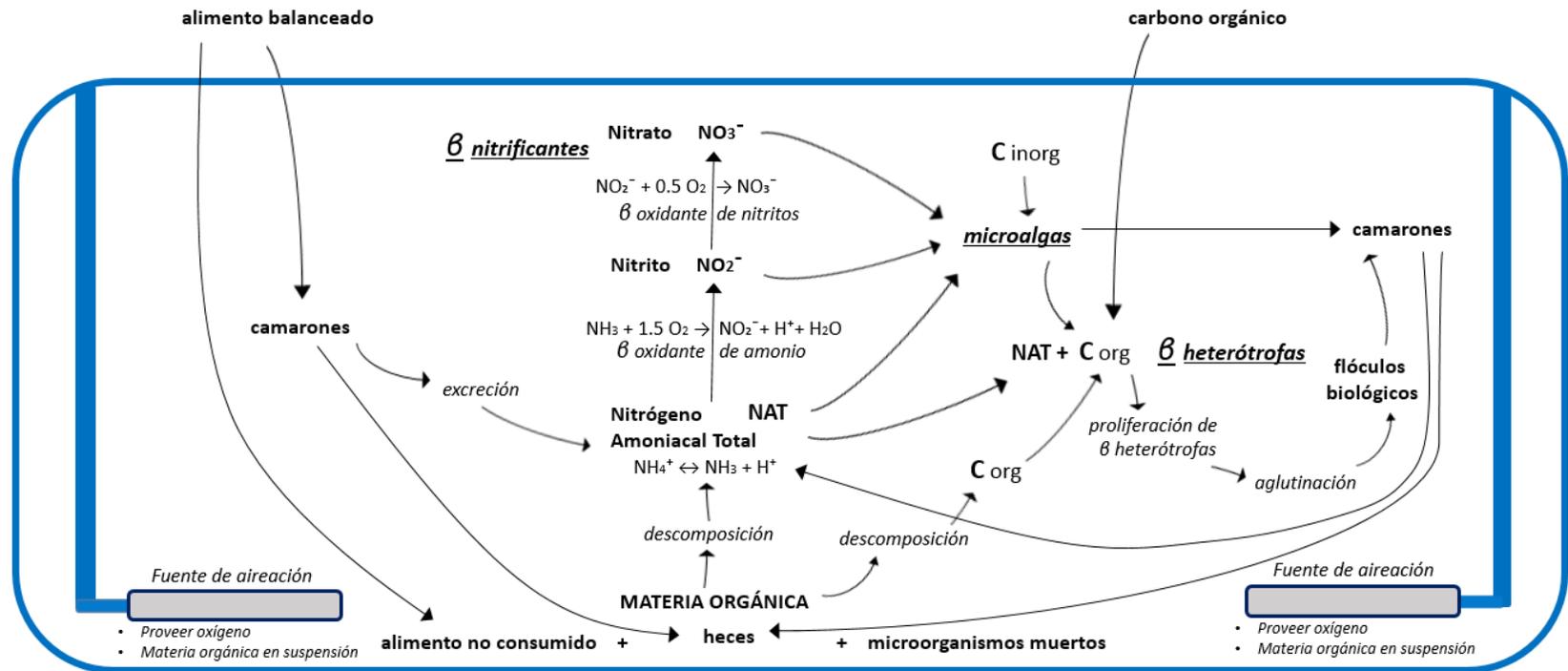
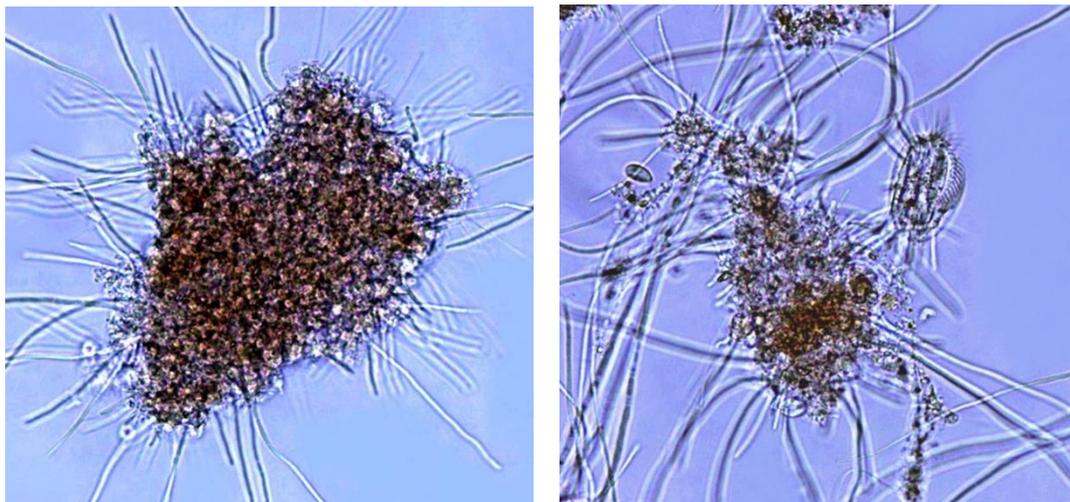


Figura 4. Diagrama del funcionamiento de un sistema de flóculos biológicos. C org: carbono orgánico, C inorg: carbono inorgánico,  $\beta$ : bacterias.

Los flóculos biológicos, que se muestran en la figura 5, tienen diferentes formas y son de manera general porosos y con un diámetro entre 0.1 y varios milímetros (Avnimelech, 2012). Están compuestos por un 20-40% de proteína, 14-31% carbohidratos y 0.1-10% de lípidos (Azim y Little, 2008; Crab *et al.*, 2010a; Kuhn *et al.*, 2010; Megahed, 2010). Dichos agregados forman una red trófica que funciona como alimento natural y está disponible continuamente para los organismos en cultivo (Burford *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2010b; Emerenciano *et al.*, 2013). Xu y colaboradores (2012) han observado que el consumo de las proteínas de los flóculos por *L. vannamei*, permite reducir el contenido de proteína del alimento comercial suministrado de 35% de proteína cruda hasta 25%. Asimismo, los organismos cultivados pueden obtener de los flóculos algunas vitaminas, ácidos grasos saturados e insaturados para complementar su nutrición (Emerenciano *et al.*, 2013).



**Figura 5. Flóculos biológicos fotografiados en microscopio óptico (20×).**

Los cultivos que implementan la tecnología de flóculos biológicos muestran una reducción en el factor de conversión alimenticia (FCA), es decir requieren menos kilogramos de alimento comercial para producir un kilogramo de la especie en cultivo (Krummenauer *et al.*, 2014). La disminución del FCA permite una mejor eficiencia de los cultivos y un menor costo de producción (Megahed, 2010).

A nivel experimental, el camarón *L. vannamei* cultivado en sistemas con flóculos biológicos muestra una mayor tasa de crecimiento semanal (hasta 1.7 g/semana) y supervivencia (hasta un 100%) (Wasieliesky *et al.*, 2006; Samocha *et al.*, 2007; Krummenauer *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2011; Schock *et al.*, 2013). Adicionalmente, la densidad de siembra puede ser incrementada (hasta 1,800 postlarvas/m<sup>3</sup> en maternización y 300 postlarvas/m<sup>2</sup> en engorda) y el FCA alcanza valores entre 1.3 y 2.5. A nivel comercial, las tasas de crecimiento observadas por Taw (2010, 2012) con *L. vannamei* fueron de 1.2 g/semana con densidades de 167 postlarvas/m<sup>2</sup> y la supervivencia alcanzó 95%. El FCA resultó ser entre 1.3 y 1.6.

Además de la generación de alimento *in situ* en forma de biomasa bacteriana así como de la remoción de compuestos nitrogenados en el agua de cultivo, la tecnología de flóculos biológicos ha mostrado también ser benéfica para disminuir brotes de enfermedades bacterianas por medio de distintos mecanismos. Se ha mostrado que algunas de las bacterias presentes en los cultivos de flóculos biológicos son capaces de producir polihidroxicanoatos, principalmente polihidroxibutirato, un compuesto que presenta propiedades de protección contra patógenos acuícolas como *Vibrio harveyi* y *V. campbellii* (Defoirdt *et al.*, 2007; Crab *et al.*, 2010b). Adicionalmente, se observó que las bacterias de los flóculos biológicos son capaces de inhibir la virulencia de *V. harveyi*, al interrumpir su comunicación química (*quorum sensing*) (Crab *et al.*, 2010b). Finalmente, la presencia de polisacáridos bacterianos en sistemas de flóculos biológicos ha permitido proponerlos como componentes inmunoestimulantes para los organismos en cultivo (Crab *et al.*, 2012; Xu y Pan, 2013). En Tailandia, en el año 2012, un reporte de campo comprobó la efectividad de estos sistemas contra enfermedades bacterianas, ya que en granjas que utilizaron sistemas de flóculos biológicos se presentaron menores pérdidas por el síndrome de mortandad temprana (NACA, 2012).

La tecnología de flóculos biológicos es considerada como un método que mejora la sustentabilidad de los cultivos ya que permite un muy bajo o cero

recambio de agua y disminuye la dependencia del alimento comercial (Megahed, 2010; Haslun *et al.*, 2012). Por sí mismas, estas situaciones presentan varias ventajas. Disminuir el recambio de agua reduce los costos de bombeo de agua (Avnimelech *et al.*, 2008) y minimiza la entrada de patógenos a los cultivos lo que garantiza una mejor bioseguridad (Tucker *et al.*, 2009). Por otro lado, el menor uso de alimento comercial y la reducción del porcentaje de proteína en las dietas permiten reducir los costos de producción y la dependencia del sector acuícola con respecto a la utilización de harina y aceite de pescado.

Los sistemas de flóculos biológicos requieren de un alto grado de manipulación y tecnificación para su adecuada aplicación. El exceso de agregados y materia orgánica en el agua puede producir un exceso de sólidos suspendidos totales (SST), los cuales pueden tapar las branquias de los organismos en cultivo (Hargreaves, 2013). Niveles de SST comprendidos entre 200 y 600 mg/l son recomendados para el cultivo de camarón (Ray *et al.*, 2010a; Avnimelech, 2012; Schweitzer *et al.*, 2013). Adicionalmente, la intensa actividad microbiana en estos sistemas puede hacer disminuir el pH de los estanques conforme avanzan los días de cultivo, por lo que es necesario monitorear la alcalinidad de los estanques (Furtado *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que el uso de la tecnología de flóculos biológicos está limitada a aquellas especies acuícolas que puedan tolerar altas cantidades de sólidos suspendidos en la columna de agua y una elevada turbidez (Hargreaves, 2013), así como a las especies detritívoras, capaces de aprovechar proteína bacteriana para su crecimiento (Mcneil, 2000). Actualmente, solo *L. vannamei* y distintas especies de tilapia son cultivadas comercialmente bajo estas condiciones (Burford *et al.*, 2004; Taw, 2011; Hargreaves, 2013), pero se encuentran en investigación otras especies como son lisas (*Mugil hospes*) (Rocha *et al.*, 2012), carpas (Cyprinidae), bagres (*Ictalurus punctatus*) (Schrader *et al.*, 2011) y otros crustáceos (*L. stylirostris*, *F. paulensis* y *Macrobrachium rosenbergi*) (Mcneil, 2000; Asaduzzaman *et al.*, 2008; Emerenciano *et al.*, 2011).

## 2.4 Respuesta fisiológica a una condición estresante y sus indicadores

El estrés es un concepto que fue desarrollado por Hans Selye en los años 30's del siglo pasado para explicar la respuesta adaptativa de los vertebrados a una situación adversa. Una definición más moderna de este concepto es la condición en la cual el equilibrio dinámico fisiológico (homeostasis) de un organismo es alterado como resultado de estímulos externos e internos que son llamados agentes estresores (Chrousos, 2009). Una condición de estrés puede ser clasificada como crónica si tiene una duración prolongada (de una a varias semanas) o aguda si es de duración corta (de horas a días) (Mercier *et al.*, 2009). Ante la influencia de agentes estresores, un organismo produce diversas respuestas para tratar de reestablecer su equilibrio fisiológico y mantener sus funciones vitales (Vernberg, 1983; Nelson y Cox, 2005). Dichas respuestas adaptativas se pueden detectar a diferentes niveles: primario, secundario y terciario (Fotadar y Evans, 2011).

Las respuestas primarias consisten en la activación del sistema neuroendocrino, la cual inicia con la percepción de los agentes estresores. Enseguida, se realiza una comunicación intercelular por medio de la producción y liberación de señales bioquímicas (hormonas y neurotransmisores) hacia distintas células de los tejidos del organismo (Hill *et al.*, 2006; Aparicio-Simón *et al.*, 2010; Shinji *et al.*, 2012). Las respuestas primarias dan lugar a las respuestas secundarias, que son aquellos procesos metabólicos que se generan en las células a partir del reconocimiento de las señales bioquímicas (Racotta y Palacios, 1998; Hill *et al.*, 2006). Dicha respuesta secundaria puede ser rápidamente detectable a nivel fisiológico, determinando la concentración de algunas biomoléculas como son los carbohidratos, proteínas, lípidos y moléculas energéticas. Finalmente, la respuesta terciaria se puede observar a nivel del sistema inmune, en el comportamiento de los animales o en el desempeño biológico (Snieszko, 1974; Wu *et al.*, 2002; Mercier *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2012).

Los carbohidratos son moléculas utilizadas por los animales principalmente como combustibles metabólicos inmediatos, reservas energéticas y como estructuras para los tejidos conjuntivos (Nelson y Cox, 2005). Los carbohidratos son también un constituyente básico del exoesqueleto de los crustáceos en forma de quitina (Stevenson, 1985). La glucosa y el lactato son dos tipos de carbohidratos que han sido propuestos como indicadores de una condición de estrés aguda para diferentes especies de crustáceos (Racotta *et al.*, 2002; Rosas *et al.*, 2002; Gulec y Aksu, 2012). Se ha propuesto a la glucosa como el principal carbohidrato circulante en la hemolinfa, la cual representa para los organismos un “combustible” metabólico inmediato (Chang y O'Connor, 1983). Esta molécula es metabolizada por la ruta de la glucólisis aerobia y el ciclo del ácido tricarboxílico (Nelson y Cox, 2005); mientras que el lactato proviene de la glucólisis anaerobia cuando la demanda de energía en tejidos sobrepasa la disponibilidad de oxígeno en la hemolinfa (condiciones de actividad física intensa o de hipoxia) (Nelson y Cox, 2005). El lactato produce una menor cantidad de ATP en comparación con la glucosa (Racotta *et al.*, 2002; Nelson y Cox, 2005) pero puede ser transportado desde el músculo hacia el hepatopáncreas para ser procesado por la ruta metabólica de la gluconeogénesis y ser transformado en glucosa o glucógeno, evitando su acumulación a niveles tóxicos dentro del organismo (Rosas *et al.*, 2001). Como se muestra en la tabla II, en camarones peneidos se ha observado que el nivel de glucosa plasmática puede aumentar (hasta más del triple de su nivel basal) cuando éstos son sometidos a diversos estímulos estresores (químicos, físicos y biológicos) del tipo agudo (Hall y Van Ham, 1998; Racotta *et al.*, 2002; Mercier *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011). Por otro lado, no se han observado incrementos tan significativos en los niveles de glucosa cuando los camarones están expuestos a una condición estresante de manera crónica (Racotta *et al.*, 2002; Mercier *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2011). Para el lactato, se ha observado un patrón similar al mencionado para la glucosa; sin embargo, es un indicador menos sensible, que muestra una concentración mayor solo cuando se activa el metabolismo anaerobio (Racotta y Palacios, 1998; Pérez-

Rostro *et al.*, 2004; Mercier *et al.*, 2009). Cabe señalar que las variaciones en los niveles de glucosa y lactato pueden cambiar de acuerdo a cada agente estresor, su magnitud y el estado fisiológico o nutricional de los organismos en experimento.

**Tabla II. Efecto observado en la concentración de carbohidratos en camarones peneidos sometidos a diferentes estímulos estresores. Carb.: carbohidratos, HI: hemolinfa, Mus: músculo, Hep: hepatopáncreas.**

Variable	Efecto	Tejido	Estímulo estresor	Especie y peso	Referencia
Glucosa	↑	HI	Hipoxia (2.1 mg/l) por 4.5 h. Emersión por 10 min. Burbujeo de CO <sub>2</sub> por 20 min.	<i>P. monodon</i> 17.1 ± 2.3 g	Hall y Van Ham (1998)
Glucosa	↑	HI	Hipoxia (2-2.6 mg/l) por 3 días. Hipoxia (2-2.6 mg/l) por 2 semanas.	<i>L. vannamei</i> 8 ± 1 g	Racotta <i>et al.</i> (2002)
Glucosa	↑	HI	Reto con virus de la mancha blanca después de 24 h.	<i>P. indicus</i> 10 - 15 g	Yoganandhan <i>et al.</i> (2003)
Glucosa	↑	HI	Manipulación diaria por 28 días en tanques interiores.	<i>L. vannamei</i> 8 - 12 g	Mercier <i>et al.</i> (2006)
Glucógeno	↑	Mus y Hep	Amonio (2.1 mmol/l) por 24 h.	<i>L. vannamei</i> 10.2 ± 1.1 g	Racotta y Hernández-Herrera (2000)
Carb. totales	↓	Mus y Hep	Reto con virus de la mancha blanca después de 24 h.	<i>P. indicus</i> 10 - 15 g	Yoganandhan <i>et al.</i> (2003)
Carb. totales	↓	Mus y Hep	Manipulación diaria por 28 días en tanques exteriores.	<i>L. vannamei</i> 8 - 12 g	Mercier <i>et al.</i> (2006)
Carb. totales	↓	Hep	Hipoxia (0.4 mg/l) por 1 h.	<i>L. vannamei</i> 5.1 ± 1.5 g	Pérez-Rostro <i>et al.</i> (2004)
Lactato	↑	HI y Mus	Hipoxia (2-2.6 mg/l) por 3 días Hipoxia (2-2.6 mg/l) por 2 semanas.	<i>L. vannamei</i> 8 ± 1 g	Racotta <i>et al.</i> (2002)
Lactato	↑	Mus y Hep	Hipoxia (0.4 mg/l) por 1 h.	<i>L. vannamei</i> 5.1 ± 1.5 g	Pérez-Rostro <i>et al.</i> (2004)

La medición de la concentración de glucógeno y de carbohidratos totales permiten también conocer el estado nutricional o de salud de los organismos ya que el glucógeno representa una reserva de glucosa que puede ser degradado metabólicamente para mantener niveles basales en condición de baja alimentación o proceso de muda (Passano, 1960; Cuzon *et al.*, 2000; Galindo *et al.*, 2009).

Las proteínas son moléculas, formadas por varios aminoácidos, que funcionan principalmente como estructuras, señales bioquímicas, transporte, información genética y de defensa (Nelson y Cox, 2005). Asimismo, las proteínas son una fuente de energía mediante reacciones catabólicas y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Regnault, 1981; Rosas *et al.*, 2001; Mugnier y Justou, 2004; Duan *et al.*, 2014). En crustáceos, las proteínas son también degradadas para la obtención de aminoácidos, los cuales son utilizados en los procesos de osmoregulación (Gilles, 1977; Chen *et al.*, 1994; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Yancey, 2001). Por otro lado, la hemocianina es una proteína especializada en el transporte de oxígeno, almacenamiento de proteínas en la hemolinfa (Paul y Pirow, 1997) y presenta una actividad de defensa ante agentes extraños (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001; Bachère *et al.*, 2004; Terwilliger, 2007). Por lo anterior, la determinación de la concentración de proteínas en diferentes tejidos ha sido propuesta para conocer el estado de salud de los camarones (Sánchez *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2004; Mercier *et al.*, 2006). En condiciones de estrés, se ha observado que la concentración de proteínas totales en la hemolinfa puede verse afectada por diversos agentes estresores que se presentan tanto de manera crónica como aguda (Chen *et al.*, 1994; Chen y Cheng, 1995; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Sánchez *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003a) (Tabla III). En hepatopáncreas, incrementos en la concentración de proteínas totales han sido detectados en camarones cuando han sido sometidos a estresores como reto viral (Yoganandhan *et al.*, 2003), hipoxia (Pérez-Rostro *et al.*, 2004) y altos niveles de cadmio (Wu y Chen, 2005). También se observó una disminución en proteínas totales por estrés nutricional (Stuck *et al.*, 1996).

**Tabla III. Efecto observado en la concentración de proteínas totales y hemocianina en camarones peneidos sometidos a diferentes estímulos estresores.** HI: hemolinfa, Hep: hepatopáncreas, Mus: músculo, Cef: cefalotórax.

Variable	Efecto	Tejido	Estímulo estresor	Especie y peso	Referencia
Proteínas totales	↓	HI	Amonio (1-20 mg/l) por 24 h.	<i>P. monodon</i> 22.1 ± 2.3 g	Chen <i>et al.</i> (1994)
Proteínas totales	↑	HI	Amonio (1.0 mmol/l) por 24 h.	<i>L. vannamei</i> 10.2 ± 1.1 g	Racotta y Hernández-Herrera (2000)
Proteínas totales	↓	HI	Manipulación diaria por 28 días en tanques exteriores.	<i>L. vannamei</i> 8 - 12 g	Mercier <i>et al.</i> (2006)
Proteínas totales	↓	HI	Estrés por condiciones de cautiverio por 7 días a 27 °C.	<i>L. setiferus</i> 32.5 - 35.4 g	Sánchez <i>et al.</i> (2001)
Proteínas totales	↑	HI y Hep	Reto con virus de la mancha blanca después de 24 h.	<i>P. indicus</i> 10 - 15 g	Yoganandhan <i>et al.</i> (2003)
Proteínas totales	↑	Mus y Hep	Hipoxia (0.4 mg/l) por 1 h.	<i>L. vannamei</i> 5.1 ± 1.5 g	Pérez-Rostro <i>et al.</i> (2004)
Proteínas totales	↓	Cef	Inanición por 8 días.	<i>L. vannamei</i> 0.1 - 0.2 g	Stuck <i>et al.</i> (1996)
Hemocianina	↓	HI	Amonio (1-20 mg/l) por 24 h.	<i>P. monodon</i> 22.1 ± 2.3	Chen <i>et al.</i> (1994)
Hemocianina	↓	HI	Amonio (2.1 mmol/l) por 24 h.	<i>L. vannamei</i> 10.2 ± 1.1 g	Racotta y Hernández-Herrera (2000)
Hemocianina	↑	HI	Hipoxia (2-2.6 mg/l) por 2 semanas.	<i>L. vannamei</i> 8 ± 1 g	Racotta <i>et al.</i> (2002)

Los lípidos tienen funciones biológicas que incluyen principalmente el almacenamiento de energía (en forma de triglicéridos), así como la estructuración y permeabilidad de las membranas celulares (en forma de fosfolípidos) (Nelson y Cox, 2005). También, actúan en cantidades reducidas como cofactores enzimáticos, transportadores de iones, agentes emulsionantes, hormonas y mensajeros intracelulares (Nelson y Cox, 2005). En camarón, los lípidos representan una importante fuente de energía y son almacenados principalmente

en el hepatopáncreas en forma de triglicéridos, de donde son transportados a los órganos a través de la hemolinfa como fosfolípidos y lipoproteínas (Claybrook, 1983).

Los niveles de lípidos y triglicéridos han sido usados como herramienta para determinar el estado nutricional de los camarones sometidos a diferentes condiciones de estrés. Enseguida, se muestra en la tabla IV las variaciones observadas en diferentes estudios.

El ATP o adenosina trifosfato es la molécula que otorga la energía necesaria a las células para llevar a cabo las reacciones bioquímicas en los organismos y es obtenida a partir del procesamiento de los principales sustratos energéticos (Nelson y Cox, 2005). La energía liberada proviene de la hidrólisis de los enlaces fosfoanhídrido y de la transferencia de fosfato. El ADP (Adenosina Difosfato) o AMP (Adenosina Monofosfato) que se forman pueden continuar transfiriendo sus grupos fosfato para generar energía o pueden ser utilizados como receptores de grupos fosfato para la regeneración de ATP (Nelson y Cox, 2005).

La proporción de ATP, ADP y AMP en una célula es el reflejo del estado energético de un organismo y de la energía metabólica disponible para él mismo. El índice del estado energético de una célula o carga energética adenílica (CEA) puede ser calculado de la siguiente manera de acuerdo a Atkinson y Walton (1967):

$$CEA = \frac{ATP + \frac{1}{2} ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

**Tabla IV. Efecto observado en la concentración de lípidos totales y triglicéridos en camarones peneidos sometidos a diferentes estímulos estresores.** HI: hemolinfa, Cef: cefalotórax, Hep: hepatopáncreas.

Variable	Efecto	Tejido	Estresor	Especie y peso	Referencia
Lípidos totales	↓	HI	Manipulación diaria por 28 días en tanques exteriores.	<i>L. vannamei</i> 8 - 12 g	Mercier <i>et al.</i> (2006)
Lípidos totales	↓	Cef	Inanición por 8 días.	<i>L. vannamei</i> 0.1 - 0.2 g	Stuck <i>et al.</i> (1996)
Lípidos totales	↑	Hep	Manipulación diaria por 28 días en tanques interiores.	<i>L. vannamei</i> 8 - 12 g	Mercier <i>et al.</i> (2006)
Triglicéridos	↓	HI	Amonio (2.1 mmol/l) por 24 h.	<i>L. vannamei</i> 10.2 ±1.1 g	Racotta y Hernández-Herrera (2000)
Triglicéridos	↓	HI	Estrés por condiciones de cautiverio por 7 días.	<i>L. setiferus</i> 32.5 - 35.4 g	Sánchez <i>et al.</i> (2001)
Triglicéridos	↓	HI	Manipulación diaria por 28 días en tanques exteriores.	<i>L. vannamei</i> 8 - 12 g	Mercier <i>et al.</i> (2006)

El valor máximo que se puede obtener de la CEA es igual a 1 e indica un *estatus* energético óptimo. Dicho valor se adquiere cuando la mayoría de la energía disponible en una célula es bajo la forma de ATP. Al contrario, una gran proporción de ADP y AMP en una célula representa un *estatus* energético deficiente (Marazza *et al.*, 1996). La CEA ha mostrado tener una relación con las condiciones ambientales al cual están expuestos los organismos y puede indicar una condición de estrés (Tabla V).

**Tabla V. Relación entre la CEA, la condición ambiental y las características fisiológicas de los organismos.** Tomado de Ivanovici (1980b).

Valor CEA	Condición ambiental	Condición fisiológica
0.9-0.8	No estresante/limitante	Alta tasa de crecimiento y reproducción
0.75-0.5	Parcialmente estresante/ limitante	Sin crecimiento o crecimiento frenado Sin reproducción Supervivencia mantenida
~0.5	Severamente estresante/limitante	Sin crecimiento y sin reproducción Supervivencia comprometida aun mejorando la calidad ambiental

Como se observa en la tabla VI, la CEA también ha sido empleada para evaluar el *estatus* energético de organismos sometidos a distintos agentes estresores como son la captura (Zamora-Méndez, 2012), altas concentraciones de amonio (Marazza *et al.*, 1996), condición de hipoxia (Abe *et al.*, 2007), distintos niveles de pH (Wang *et al.*, 2002) y ante una actividad física intensa (Thibodeaux, 2008).

Otras moléculas energéticas presentes en los organismos son los fosfágenos, los cuales son formados por un aminoácido y un grupo fosfato que actúa como un reservorio para la regeneración de ATP a partir de ADP y AMP (Nelson y Cox, 2005).

**Tabla VI. Efecto observado en la CEA y concentración de fosfato de arginina en crustáceos sometidos a diferentes estímulos estresores.** Arg-F: fosfato de arginina, Mus: músculo, Ent: organismo entero.

Variable	Efecto	Tejido	Estímulo estresor	Especie y peso	Referencia
CEA	↓	Ent	Amonio(0.5-3 mg/l) por 96 h.	<i>Palaemonetes varians</i>	Marazza <i>et al.</i> (1996)
CEA	↓	Mus	pH = 6 y 8.5.	<i>P. chinensis</i> 2.5 ± 0.2 cm	Wang <i>et al.</i> (2002)
CEA	↓	Mus	30 minutos de actividad física.	<i>Callinectes sapidus</i> 80 - 140 g	Thibodeaux (2008)
CEA	↓	Mus	Captura por atarraya.	<i>L. vannamei</i> 17.9 - 23.7 g	Zamora-Méndez (2012)
Arg-F	↓	Mus	Hipoxia (1.3-1.7 mg/l) por 6 h.	<i>Marsopeneaus japonicus</i> 20 g	Abe <i>et al.</i> (2007)
Arg-F	↓	Ent	Anoxia nominal por 12 horas.	<i>Lepidophthalmus louisianensis</i>	Holman y Hand (2009)
Arg-F	↓	Mus	30 minutos de actividad física.	<i>C. sapidus</i> 80 - 140 g	Thibodeaux (2008)
Arg-F	↓	Mus	Captura por atarraya.	<i>L. vannamei</i> 17.9 - 23.7 g	Zamora-Méndez (2012)

Se ha observado que los fosfógenos son la forma más básica y rápida de obtención de ATP, seguido del metabolismo de sustratos energéticos como la glucosa (Hochachka y Somero, 2002). Dentro del grupo de los fosfógenos se encuentran el fosfato de creatina, fosfato de arginina, fosfato de lombricina y el fosfato de glucosamina entre otros, siendo el fosfato de arginina, el fosfógeno encontrado en los crustáceos (Ellington, 2001). Particularmente en dichos organismos se ha observado que los fosfatos de arginina son más abundantes en músculos que desempeñan actividades de contracción rápida, como es el músculo abductor de los camarones (Ellington, 2001). La cuantificación de fosfato de arginina, de manera similar a la CEA, es una herramienta que permite evaluar el *estatus* energético de los organismos, encontrando mayores niveles en organismos con una mayor capacidad de respuesta a condiciones demandantes de ATP (Lucas, 1996). Como se muestra en la tabla VI, en crustáceos se ha observado una disminución en los niveles de fosfato de arginina en organismos

sometidos a condiciones estresantes como hipoxia (Abe *et al.*, 2007; Holman y Hand, 2009) y actividad física (Thibodeaux, 2008).

## **2.5 Respuesta inmune en camarón**

Los crustáceos, como la mayoría de los invertebrados, poseen un sistema inmune innato, constituido por una línea de defensa no específica (Tsing *et al.*, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1998; Roch, 1999). Para detectar, atacar y eliminar los patógenos (virus, bacterias, hongos y protozoarios) que logran pasar a través de la cutícula, los crustáceos tienen efectores celulares y humorales que actúan en conjunto para proteger la integridad del organismo (Bachère, 2000).

La respuesta celular está basada en la actividad directa de células hemolinfáticas libres llamadas hemocitos. En camarones y otras especies de crustáceos, se ha clasificado a los hemocitos como: 1) hialinos, 2) semi-granulares y 3) granulares, de acuerdo a sus características morfológicas e histoquímicas (Hose *et al.*, 1987; Tsing *et al.*, 1989; Liu y Wang, 1998; van de Braak *et al.*, 2002; Vargas-Albores *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). A pesar de los numerosos trabajos de investigación realizados, existen resultados contradictorios sobre la función específica de cada tipo de hemocito en el sistema inmune de los crustáceos. Esta situación posiblemente se debe a que los trabajos se han realizado sobre distintas especies de crustáceos como cangrejos, langostinos y camarones, así como el empleo de distintas técnicas analíticas como herramientas genéticas o microscopios ópticos y electrónicos (Söderhäll *et al.*, 1986; Johansson *et al.*, 2000; Cerenius *et al.*, 2008, 2010). A pesar de las discrepancias, se han planteado distintas funciones específicas para los hemocitos de los camarones. Cabe destacar que la proporción de cada tipo de hemocitos sobre el total, así como su abundancia en la hemolinfa depende de numerosos factores, entre ellos su estado fisiológico y el periodo de muda (Le Moullac *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 2000).

Se ha observado que los hemocitos hialinos son los más pequeños de los tres tipos (7-8  $\mu\text{m}$  de diámetro), son circulares y poseen una alta relación

núcleo/citoplasma (N/C), además de no presentar gránulos citoplasmáticos cuando son observados bajo microscopia óptica (Tsing *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1991; van de Braak *et al.*, 2002; Vargas-Albores *et al.*, 2005). Dentro de sus funciones inmunológicas, se ha estipulado que los hemocitos hialinos de los camarones son los encargados de la coagulación de hemolinfa (Hose *et al.*, 1987; Omori *et al.*, 1989) y que no participan en la encapsulación o ingestión de partículas ajenas al organismo (fagocitosis) ya que no presentan lisosomas. Los hemocitos granulares son las células plasmáticas que presentan el mayor tamaño, que están caracterizadas por una forma ovoide ( $>18 \times 6 \mu\text{m}$ ) y la presencia de gránulos citoplasmáticos de 0.8-1.1  $\mu\text{m}$  de diámetro, observados bajo microscopia óptica (Tsing *et al.*, 1989; Vargas-Albores *et al.*, 2005). Se ha estipulado que estos hemocitos actúan principalmente en la liberación de la peroxinectina, una proteína de señalización que participa en la fagocitosis, así como en la liberación de la enzima intracelular profenoloxidasa, que una vez en el citoplasma cataliza la formación de la melanina, un compuesto antimicrobiano plasmático (Johansson y Söderhäll, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1998; Johansson *et al.*, 2000; Vargas-Albores *et al.*, 2005). También se ha estipulado que estos hemocitos generan y almacenan péptidos antimicrobianos, que en camarones peneidos son denominados peneidinas. Estos péptidos son liberados a la hemolinfa después de la detección de un efector inmunológico.

Los hemocitos semi-granulares son de tamaño y forma similar a los granulocitos, distinguiéndose por ser ligeramente más pequeños y por presentar un menor número de gránulos pequeños (0.4-0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Tsing *et al.*, 1989; Bachère *et al.*, 1995; Vargas-Albores *et al.*, 2005). Se ha observado que dichos hemocitos presentan una actividad fagocítica o de encapsulación y también contienen la enzima profenoloxidasa, (Hose *et al.*, 1987; Vargas-Albores *et al.*, 2005). Además, se ha observado que estos hemocitos producen peneidinas (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002).

Debido a la participación de los hemocitos en la respuesta inmune de los camarones, la cuantificación del número total de estas células (conteo total de

hemocitos o CTH) en la hemolinfa ha sido sugerida como un parámetro general que indica la capacidad de respuesta inmune de los organismos. Se ha observado que estímulos estresores como la inanición (Pascual *et al.*, 2006), presencia con agentes patógenos (Burge *et al.*, 2007), exposición a ambientes hiposalinos y ablación ocular (Perazzolo *et al.*, 2002), condiciones de hipoxia (Le Moullac *et al.*, 1998), alta concentración de nitritos (Tseng y Chen, 2004) y condiciones de reproducción en cautiverio (Pérez-Jar *et al.*, 2006), así como temperaturas subóptimas (Pan *et al.*, 2008), provocan una disminución en el CTH (Tabla VII). Estos hallazgos concuerdan con el hecho de que el ambiente y distintos estímulos estresores modulan la capacidad inmune de los organismos (Le Moullac y Haffner, 2000; Zhao *et al.*, 2012). También se ha observado que algunos agentes estimulantes como extractos de levaduras (Sritunyalucksana *et al.*, 2005) y probióticos (Li *et al.*, 2008b; Kongnum y Hongpattarakere, 2012) incrementan el CTH.

La respuesta humoral está compuesta por moléculas plasmáticas con actividad inmunológica (Smith y Chisholm, 1992). En camarones, estas moléculas están comprendidas por péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno, enzimas que regulan los procesos inmunes y moléculas asociadas al reconocimiento de agentes extraños (Roch, 1999; Bachère *et al.*, 2000; Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001).

Las ERO son moléculas oxidantes que presentan propiedades citotóxicas. Su producción es un fenómeno conocido como “estallido respiratorio”, debido a que los hemocitos incrementan su consumo de oxígeno para realizar su producción (Lesser, 2006). La producción de estas moléculas se lleva a cabo en lisosomas intracelulares y en la membrana de los hemocitos e inicia con la reducción enzimática de oxígeno atómico ( $O_2$ ) a anión superóxido ( $O_2^-$ ), molécula que da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión hidroxilo ( $OH^-$ ) y otras moléculas citotóxicas (Babior, 1984; Muñoz *et al.*, 2000). En camarones peneidos, se ha empleado la producción de anión superóxido por hemocitos como un parámetro para medir la respuesta inmune de organismos sometidos a distintos

estímulos estresores (Tabla VII) (Song y Hsieh, 1994; Bachère *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 2000; Liu y Chen, 2004). Se ha observado que la producción de  $O_2^-$  incrementa en organismos alimentados con probióticos y aditivos alimentarios (Cheng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008b), disminuye con la inyección de organismos patógenos (Hsieh *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008a) y no se ve afectada por condiciones de hipoxia (Le Moullac *et al.*, 1998).

**Tabla VII. Ejemplos del efecto de distintas condiciones sobre el conteo total de hemocitos (CTH) y el estallido respiratorio en varias especies de camarones.**

Variable	Efecto	Condición	Especie y peso	Referencia
CTH	↓	Hipoxia (1 mg/l $O_2$ ) por 24 horas.	<i>L. stylirostris</i> ~15 g	Le Moullac <i>et al.</i> (1998)
CTH	↓	Toxicidad por nitritos (9.9 mg/l) por 48 horas.	<i>L. vannamei</i> 10.5 ± 1.8 g	Tseng y Chen (2004)
CTH	↓	Alimento con 5% proteína seguido de 14 días de inanición.	<i>L. vannamei</i> 8.9 ± 0.4 g	Pascual <i>et al.</i> (2006)
CTH	↓	Inyección de <i>V. campbellii</i> , 48 horas después.	<i>L. vannamei</i> 19.6 ± 2.5 g	Burge <i>et al.</i> (2007)
CTH	↑	Alimentación con extracto de levadura por 4 semanas.	<i>P. monodon</i> 4.3 - 4.7 g	Sritunyalucksana <i>et al.</i> (2005)
Estallido	↓	Alimento con 5% proteína seguido de 14 días de inanición.	<i>L. vannamei</i> 8.9 ± 0.4 g	Pascual <i>et al.</i> (2006)
Estallido	↓	Inyección con <i>V. alginolyticus</i> , 12 horas después.	<i>L. vannamei</i> 12.7 ± 1.5 g	Hsieh <i>et al.</i> (2008)
Estallido	↑	Suplemento alimenticio con 2 g/kg de alginato de sodio.	<i>L. vannamei</i> -	Cheng <i>et al.</i> (2005)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Hoy en día, el cultivo de camarón en el noroeste de México representa una actividad de alto valor económico. No obstante, dicha industria está siendo afectada por enfermedades que disminuyen el rendimiento de los cultivos, principalmente en cultivos extensivos y semi-intensivos, los cuales implican un recambio de agua. Aunque el uso de las tecnologías de flóculos biológicos y sustratos artificiales han mostrado buenos resultados en términos de supervivencia y crecimiento del camarón, las vías a través de las cuales los organismos son beneficiados no han sido totalmente esclarecidas. Adicionalmente, se desconoce si dichas tecnologías pueden afectar la respuesta de estrés ante condiciones de cultivo adversas. El conocimiento generado en el presente estudio ayudará a tener un mejor entendimiento de estas tecnologías, lo cual puede ser valioso para la industria camaronícola del país.

### **4. HIPÓTESIS**

El uso de flóculos biológicos y sustratos artificiales puede aminorar el efecto de un estrés provocado por una alta densidad de siembra y condición de hipoxia en un cultivo de precría superintensiva, lo cual se reflejará en un mejor desempeño biológico, una mejor condición fisiológica y una mayor capacidad de respuesta inmune.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

- Evaluar el efecto del uso de flóculos biológicos y sustratos artificiales sobre el desempeño biológico, la respuesta fisiológica e inmune de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* cultivados en una precría superintensiva a diferentes densidades y sometidos a una hipoxia aguda.

### 5.2 Específicos

- Evaluar parámetros de desempeño biológico (supervivencia, peso final y factor de conversión alimenticia) de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* durante la precría en presencia de flóculos biológicos y sustratos artificiales, bajo condiciones de alta densidad e hipoxia.
- Evaluar la respuesta metabólica (proteínas totales, carbohidratos totales, glucógeno, glucosa, lactato, lípidos totales, triglicéridos, hemocianina, carga energética adenílica y fosfato de arginina) de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* durante la precría en presencia de flóculos biológicos y sustratos artificiales, bajo condiciones de alta densidad e hipoxia.
- Evaluar la respuesta inmune (conteo total de hemocitos y producción de anión superóxido) de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* durante la precría en presencia de flóculos biológicos y sustratos artificiales, bajo condiciones de alta densidad.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Diseño experimental**

#### **a. Preparación de flóculos biológicos y aclimatación de organismos**

Los flóculos biológicos utilizados en el bioensayo fueron previamente preparados durante 15 días, en dos tinas de plástico (Figura 6) con capacidad de 1000 l cada una. Las tinas fueron ubicadas a la intemperie, equipadas con aireación por microburbujeo y llenadas con agua de un estanque de cultivo de camarón. Se agregaron a cada tina 35 camarones que fueron alimentados diariamente a ración del 7% de su biomasa, con un alimento balanceado conteniendo 35% de proteína (CAMARONINA 35, Agribrands Purina de México S. De R.L. de C.V.). Adicionalmente, se agregaron 100 g de harina de trigo integral a cada tina, como agente de nucleación de los flóculos. Durante la preparación de los mismos, se ajustó la relación C:N a 20:1 mediante la adición diaria de melaza de caña. Para establecer una comunidad saludable de microorganismos, 500 ml de probióticos comerciales (AliBio 2135<sup>®</sup>, ECOTERRA LO<sup>®</sup>, AliBio AC<sup>®</sup> y AliBio Bionutre PREMIUM<sup>®</sup>) fueron agregados a las tinas cada dos días. Además, periódicamente se adicionó agua salobre a las tinas con el objetivo de recuperar el agua evaporada y mantener una salinidad de  $40 \pm 1$  ppm.



**Figura 6. Preparación de los flóculos biológicos en tinas a la intemperie.**

Los sustratos artificiales (Figura 7) utilizados en el bioensayo consistieron en piezas rectangulares de malla plástica rígida (0.40 m x 0.25 m). Los sustratos fueron mantenidos verticalmente dentro de las tinas donde se prepararon los flóculos biológicos para que sean colonizados por microorganismos marinos. Después del periodo de preparación, el agua con flóculos y los sustratos artificiales fueron transferidos a las unidades experimentales, 6 días antes de dar inicio al bioensayo. El agua clara utilizada en las unidades experimentales, fue obtenida del sistema de bombeo del Laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR. Esta fue previamente filtrada hasta 1 micra y desinfectada con luz UV.



**Figura 7. Colocación de los sustratos artificiales en las tinas.**

Las postlarvas de *L. vannamei* que se utilizaron en el bioensayo, fueron obtenidas en talla PL 20, con un peso aproximado de 0.003 g. Las postlarvas fueron aclimatadas en una tina de fibra de vidrio en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR. El agua de la tina fue mantenida a una temperatura de  $27 \pm 1$  °C y salinidad de  $39 \pm 1$  ppm, con un recambio diario de agua de 50%. La tina fue mantenida con aireación permanente y a una concentración de oxígeno disuelto  $\geq 5$  mg/l. La alimentación diaria se realizó en 3 raciones, utilizando el alimento PIASA Migaja (Promotora Industrial Acuasistemas S.A. de C.V.) con 45% de proteína. Se alimentó a las postlarvas a un 30% de su biomasa al inicio de la aclimatación y después, su alimentación fue ajustada *ad libitum*. Las postlarvas fueron mantenidas en condiciones de aclimatación por un periodo de 5 semanas. Después de este periodo, se seleccionó a las postlarvas de un peso de  $0.17 \pm 0.002$  g (promedio  $\pm$  error estándar) para transferirlas a las unidades experimentales y dar inicio al bioensayo.

#### **b. Tratamientos**

Los tratamientos utilizados en el experimento fueron una combinación de 2 factores del cultivo de camarón: el ambiente de cultivo y la densidad de siembra. Para el factor ambiente de cultivo se utilizaron 3 niveles: agua clara (“AC”), agua con flóculos biológicos (“B”) y agua con flóculos biológicos y sustratos artificiales (“BS”). Para el factor densidad de siembra también se utilizaron 3 niveles: 300 postlarvas por metro cúbico (“300”), 600 postlarvas por metro cúbico (“600”) y 900 postlarvas por metro cúbico (“900”). La combinación de todos los niveles produjo 9 tratamientos que fueron distribuidos aleatoriamente y evaluados por triplicado. Una matriz de combinación de niveles ilustra los tratamientos en la figura 8. Al inicio del bioensayo, se colocaron 17, 33 y 50 postlarvas en los acuarios para mantener las densidades de 300, 600 y 900 org./m<sup>3</sup>, respectivamente.

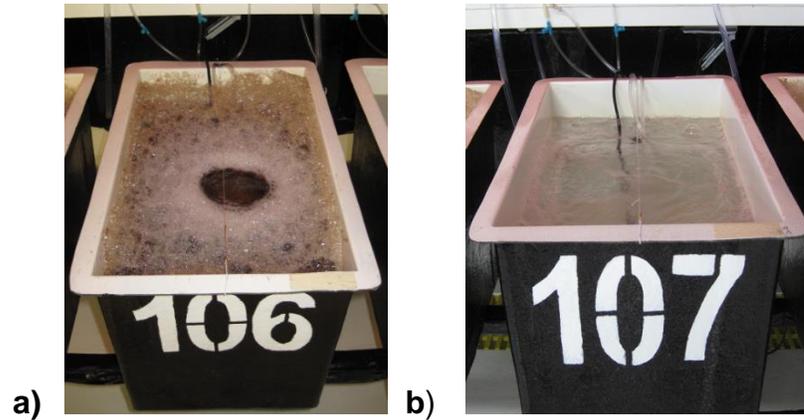
		<b>FACTOR:</b> <i>Densidad de siembra</i>		
		<u>300 org. /m<sup>3</sup></u>	<u>600 org. /m<sup>3</sup></u>	<u>900 org./m<sup>3</sup></u>
<b>NIVELES</b>				
<b>FACTOR:</b> <i>Ambiente de cultivo</i>	<u>Agua clara</u>	<b>AC300</b>	<b>AC600</b>	<b>AC900</b>
	<u>Flóculos biológicos</u>	<b>B300</b>	<b>B600</b>	<b>B900</b>
	<u>Flóculos biológicos con sustratos artificiales</u>	<b>BS300</b>	<b>BS600</b>	<b>BS900</b>

**Figura 8. Matriz de combinación de factores.**

### **c. Unidades experimentales**

Las unidades experimentales (Figura 9) consistieron en 27 acuarios (0.33 m × 0.38 m × 0.55 m) de fibra de vidrio, con un volumen funcional de 55 l. A lo largo del bioensayo, los acuarios fueron mantenidos bajo un fotoperiodo artificial de 12 horas luz (9:00 h a 21:00 h) y 12 horas oscuridad. Los acuarios fueron equipados cada uno con un calentador metálico (FINNEX electric heater 300 W) para mantener la temperatura del agua a 28 °C. Así mismo, se les equipó con un sistema de aireación de tubería PVC perforada, el cual se colocó a media agua en el perímetro de la unidad y en el fondo en la parte media (Figura 10). Adicionalmente una manguera de microburbujeo se sujetó en el fondo. Todo este sistema tuvo como fin mantener la concentración de oxígeno disuelto a 5 mg/l y propiciar la formación de los flóculos biológicos así como mantenerlos suspendidos en la columna de agua (Figura 9), particularmente para los

tratamientos B y BS. Por otra parte, se colocó una malla tipo mosquitero en la parte superior de cada acuario para evitar que los organismos brincaran fuera de las unidades experimentales.



**Figura 9. Unidades experimentales con flóculos biológicos (a) y con agua clara (b).**



**Figura 10. Sistema de aireación de una unidad experimental.**

#### **d. Condiciones experimentales**

Se alimentaron los organismos con el alimento comercial CAMARONINA 35 (Agribands Purina de México S. De R.L. de C.V.) con 35% de proteína, en 3 raciones diarias (9:00 h, 14:00 h y 19:00 h). La alimentación fue establecida de inicio a 4% de la biomasa de cada acuario, pero fue incrementada hasta 10% al finalizar la primera semana. En la semana 7, el porcentaje de biomasa fue reducido a 8%, debido a que se observó la presencia de alimento no consumido dentro de los acuarios. La biomasa fue calculada con base en biometrías realizadas cada 15 días y en función del crecimiento de los organismos. Durante el transcurso del experimento, el alimento comercial fue molido y cernido a distintos diámetros de partícula, de acuerdo a la recomendación de Molina-Poveda y Villarreal-Colmenares (2008). Cabe mencionar que las biometrías también sirvieron para evaluar el crecimiento de los organismos. Dichas biometrías se realizaron en las semanas 2, 4 y 6 del bioensayo y se muestrearon en cada una 15 organismos de los tratamientos con 300 org./m<sup>3</sup>; 30 organismos de los tratamientos con 600 org./m<sup>3</sup> y 45 organismos de los tratamientos con 900 org./m<sup>3</sup>.

Los diferentes tratamientos presentaron algunas particularidades en su manejo:

##### **i. Recambio de agua:**

- Los acuarios AC tuvieron un recambio diario de agua marina del 50%.
- Los acuarios B y BS inicialmente tuvieron un recambio diario de 1 l por acuario. El recambio fue incrementado de 1 a 6 l hacia el final del experimento para tratar de no rebasar la concentración de sólidos suspendidos totales a más de 600 mg/l.
- Con un día de anticipación, el agua utilizada para los recambios fue depositada en un tanque equipado con un calentador y aireación. Esto permitió asegurar que el agua agregada se

encontraba a la misma temperatura y oxigenación que en las unidades experimentales.

**ii. Melaza:**

- Los acuarios B y BS fueron suplementados diariamente con melaza de caña. El cálculo para mantener la relación C:N se hizo con base en el contenido de carbono de la melaza, la cantidad de alimento suministrado y cuantificaciones de nitrógeno amoniacal total (TAN) en el agua. El cálculo se realizó de acuerdo a Avnimelech (1999) y De Schryver y colaboradores (2008) y el procedimiento se encuentra descrito en el anexo I.
- En los acuarios B y BS se estableció un límite permisible de nitrógeno amoniacal total en 1.5 mg/l. Cuando este límite era sobrepasado en algún acuario, una cantidad adicional de melaza era suministrada para eliminar el nitrógeno amoniacal total arriba de este límite.

**iii. Probióticos:**

- Los acuarios B y BS fueron inoculados con 1 ml de probióticos comerciales (AliBio 2135<sup>®</sup>, ECOTERRA LO<sup>®</sup>, AliBio AC<sup>®</sup> y AliBio Bionutre PREMIUM<sup>®</sup>) cada 2 días, los cuales fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Durante el bioensayo, se realizaron diversas mediciones de parámetros fisicoquímicos y de composición de flóculos como se muestra en la tabla VIII.

**Tabla VIII. Determinaciones de variables fisicoquímicas durante el bioensayo.**

Parámetros	Hora	Seguimiento
pH (potenciómetro OAKTON Waterproof pHtestr 10)	9:00 y 14:00 h	Diariamente
Salinidad (refractómetro portátil VeeGee STX-3)	9:00 h	Diariamente
Oxígeno disuelto y temperatura (oxímetro YSI 550A)	9:00, 14:00 y 19:00 h	Diariamente
Nitrógeno amoniacal total (Hernández-López y Vargas-Albores, 2003) (Anexo II)	9:00 h	tres veces por semana
Nitritos (Hernández-López y Vargas-Albores, 2003) (Anexo III)	9:00 h	dos veces por semana
Nitratos <sup>1</sup> (Morris y Riley, 1963) (Anexo IV)	9:00 h	una vez por semana
Sólidos suspendidos totales (Azim y Little, 2008) (Anexo V)	9:00 h	dos veces por semana
Composición de flóculos <sup>2</sup> (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007) (Anexos VI, VII y VIII)	-	Inicio, mitad y fin de experimento

<sup>1</sup>Las muestras de nitratos fueron congelados a -80 °C para su posterior cuantificación.

<sup>2</sup>Solo a los acuarios B y BS. A estas muestras se les realizaron 3 ciclos de lavado con formato de amonio (0.5 M) y un centrifugado a 2000 rpm por 3 minutos, para después ser congeladas a -80 °C y posteriormente realizar los análisis de carbohidratos totales, proteínas totales y lípidos totales.

Después de haber realizado el bioensayo por 8 semanas, se inició el muestreo de los organismos.

## 6.2. Muestreos

### a. Primer muestreo: parámetros bioquímicos bajo las tres condiciones de densidad

En el primer muestreo se tomaron 4 camarones de cada uno de los acuarios experimentales. Cada organismo fue capturado individualmente con una red de malla, colocado en un desecador, secado con una tela absorbente y depositado en una balanza electrónica (ADAM, AQT 200) para registrar su peso (Figura 11).



**Figura 11. Toma del peso de los organismos.**

El muestreo de cada camarón prosiguió de la siguiente manera: se extrajo hemolinfa de los senos ventrales con una jeringa de 1 ml (Figura 12), bañada con anticoagulante de solución isotónica de crustáceos (Mendoza, 1992) (SIC; 26.29 g NaCl, Sigma S-9888 + 0.745 g KCl, Sigma P-5405, en 1000 ml de agua destilada) con oxalato de potasio (0.5 g en 10 ml de SIC). La muestra de hemolinfa fue depositada en un tubo Eppendorf<sup>®</sup> refrigerado y se realizó el mismo día la cuantificación de hemocianina y proteínas totales (Anexos IX y X). La hemolinfa restante fue congelada a -80 °C para posteriormente cuantificar glucosa, lactato, triglicéridos y lípidos totales (Las técnicas de cada análisis bioquímico se encuentran descritas en los anexos XI, XII, XIII y XIV, respectivamente). A

continuación, el camarón fue segmentado separando el cefalotórax, primer segmento abdominal y urópodos. Los urópodos fueron almacenados momentáneamente en un tubo Eppendorf® con agua marina para determinar enseguida el estadio de muda de cada organismo (Robertson *et al.*, 1987). El cefalotórax y primer segmento abdominal fueron depositados individualmente en bolsas de plástico y congelados en nitrógeno líquido para enseguida almacenarlos en un ultracongelador a -80 °C. Más adelante, aproximadamente 0.1 g de músculo y hepatopáncreas de cada organismo fueron disectados sobre una placa metálica congelada. A continuación los tejidos fueron liofilizados, pesados y enseguida hidratados con solución isotónica de crustáceos para realizarles distintos análisis bioquímicos. En músculo, se determinó la concentración de glucógeno, carbohidratos totales, lactato y proteínas totales. En hepatopáncreas, se determinó la concentración de glucógeno, carbohidratos totales, proteínas totales, lípidos totales y triglicéridos. Las técnicas de cada análisis se encuentran descritas en los anexos XV al XX.



**Figura 12. Extracción de hemolinfa.**

### **b. Segundo muestreo: parámetros inmunes bajo las tres condiciones de densidad**

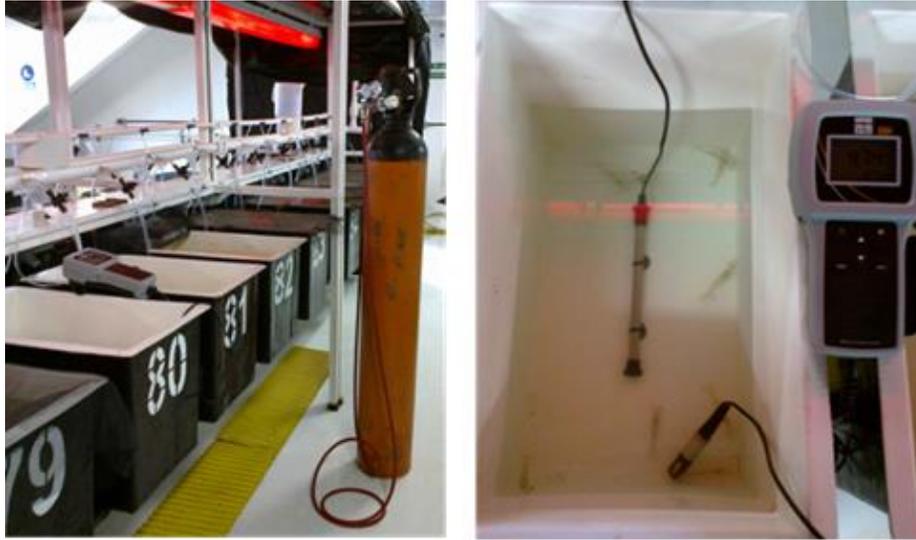
En el segundo muestreo se tomaron 3 camarones de cada uno de los acuarios experimentales. La captura y el registro del peso de cada camarón se realizaron de la misma manera que en el primer muestreo.

A continuación se extrajo hemolinfa de los senos ventrales de los organismos, con una jeringa de 1 ml que contenía 250  $\mu$ l de anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993) (13.16 g NaCl, Sigma S-9888 + 0.372 g KCl, Sigma P-5405, + 1.301 g HEPES Sodium Salt H706 + 1.681 g EDTA- $\text{Na}_2$  Sigma E-5134) ajustado a un pH de 7.3. La hemolinfa fue colocada en un tubo Eppendorf<sup>®</sup> refrigerado y el mismo día del muestreo se determinó el conteo total de hemocitos y se cuantificó la producción de anión superóxido (Anexos XXI y XXII, respectivamente). El estadio de muda de los animales fue determinado observando en un microscopio óptico la cutícula de los urópodos.

### **c. Tercer muestreo: parámetros bioquímicos bajo una condición de hipoxia aguda**

Para el tercer muestreo, se capturaron dos camarones de cada réplica de AC300 ( $n = 6$ ) y se les disectaron dos urópodos para determinar el estadio de muda. Inmediatamente, los organismos fueron depositados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriormente determinar la CEA y la concentración de Arg-F en músculo. Las técnicas para cuantificar dichas variables se encuentran descritas en el anexo XXII. Enseguida, se tomaron 18 camarones (seis de cada réplica) y se colocaron todos en un solo acuario (llenado con agua marina a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , oxígeno disuelto  $\geq 5\text{ mg/l}$  y salinidad a  $38 \pm 1\text{ ppm}$ ) donde se les aplicó un estímulo estresor agudo de hipoxia (Figura 13). La condición de estrés consistió en desactivar la aireación del acuario y burbujear nitrógeno gaseoso a un flujo de 6 l/min, con la finalidad de que el gas nitrógeno desoxigene el agua del acuario. Una vez transcurridos 20 min de burbujeo de nitrógeno, la concentración de oxígeno disuelto disminuyó a aproximadamente 0.5 mg/l. A continuación, se

detuvo el burbujeo de nitrógeno y los camarones fueron mantenidos en hipoxia por 25 minutos. Después de este estímulo estresor, 6 de los 18 camarones en hipoxia fueron depositados rápidamente en nitrógeno líquido para congelarlos y posteriormente determinar su CEA y concentración en Arg-F. El estadio de muda de estos camarones fue también determinado. Los 12 camarones restantes fueron pesados y procesados para análisis bioquímicos de la misma manera que los camarones del primer muestreo. Estos procedimientos se realizaron para los tratamientos B300 y BS300, así como para los organismos mantenidos a las densidades de 600 org./m<sup>3</sup> y 900 org./m<sup>3</sup>. Cabe mencionar que los resultados de las mediciones de CEA y Arg-F de los organismos que fueron muestreados previo a la hipoxia serán reportados como parte de la respuesta fisiológica a diferentes densidades y calidad de agua, en conjunto con los análisis bioquímicos. Al final de este tercer muestreo, se cuantificó y pesó a todos los camarones de los acuarios para determinar la supervivencia y peso final de los animales del bioensayo.



**Figura 13. Burbujeo de nitrógeno gaseoso a unidad experimental para generar una condición de estrés por hipoxia aguda.**

### **6.3 Análisis estadísticos**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa STATISTICA Ver. 8.0 (StatSoft, Tulsa, EE.UU). Se evaluó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las varianzas de los datos por medio de la pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Aquellos datos que cumplieron con los supuestos fueron empleados para realizar un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (desechos nitrogenados y crecimiento), de dos vías (desempeño biológico, respuesta fisiológica e inmune) o tres vías (composición de los flóculos biológicos). Posteriormente se realizó una prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, fueron transformados con la fórmula de logaritmo base diez, raíz cuadrada o seno inverso para lograr la normalidad y homocedasticidad. Se utilizó la prueba de análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis para los datos que no satisficieron los supuestos a pesar de las transformaciones (proteínas totales, CEA y ADP en

músculo de camarones mantenidos bajo condiciones de alta densidad; lípidos totales en hepatopáncreas y proteínas totales en músculo de organismos sometidos a hipoxia aguda). Para todas las pruebas, el nivel de significancia fue establecido en 0.05.

## 7. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados que se obtuvieron durante el bioensayo.

### 7.1 Calidad de agua

#### a. Variables fisicoquímicas

La tabla IX muestra los promedios de las variables fisicoquímicas medidas en los tratamientos experimentales. Cabe mencionar que todos los parámetros registrados estuvieron dentro de las condiciones óptimas para el cultivo y crecimiento de los camarones. Para temperatura, oxígeno disuelto y pH, se observaron medias globales similares que variaron poco entre tratamientos (de 0 a 0.25 unidades). En el caso de la salinidad, se observó que ésta fue ligeramente mayor en los tratamientos B y BS ( $40 \pm 1$ ) en comparación con AC ( $38$  o  $39 \pm 1$ ). El incremento en la salinidad se debe a que los tratamientos con flóculos biológicos tuvieron un recambio de agua mínimo diario (entre 4 y 10%), mientras que en los tratamientos con agua clara se hizo un recambio del 50% de agua al día.

**Tabla IX. Promedios de las variables fisicoquímicas cuantificadas en el agua de cultivo durante el experimento.** Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar. Temp: temperatura, OD: oxígeno disuelto, Sal: salinidad, AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>.

Parámetros	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS		
	AC300	AC600	AC900	B300	B600	B900	BS300	BS600	BS900
<b>Temp (°C)</b>	28.1 $\pm$ 0.1	28.0 $\pm$ 0.1	28.1 $\pm$ 0.1	28.1 $\pm$ 0.1	28.1 $\pm$ 0.1	28.1 $\pm$ 0.1	28.0 $\pm$ 0.1	28.1 $\pm$ 0.1	28.1 $\pm$ 0.1
<b>OD (mg/l)</b>	6.1 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.1
<b>Sal (ppm)</b>	39 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1
<b>pH</b>	8.5 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.1	8.5 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.1	8.5 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.1

### **b. Desechos nitrogenados**

La figura 14 muestra los niveles de NAT,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  a lo largo del experimento para los tratamientos con 300 org./m<sup>3</sup>. Con respecto al NAT, los tratamientos con flóculos biológicos (B y BS) tuvieron valores significativamente más altos (~2-8 mg/l) que los de agua clara ( $p \leq 0.05$ ) durante las primeras dos semanas. A partir de ese momento, los niveles disminuyeron y se mantuvieron durante el resto del bioensayo en valores similares a los de agua clara, con excepción de tres observaciones puntuales. Para  $\text{NO}_2^-$ , se observó una tendencia similar en todos los tratamientos, en la que los niveles se mantuvieron bajos (~1 mg/l) durante las dos primeras semanas del experimento e incrementaron al final de la tercera semana. A partir de entonces, los tratamientos con agua clara incrementaron sus niveles; mientras que los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos tuvieron oscilaciones y un decremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) respecto a los de agua clara en la penúltima semana del experimento. En el caso de los  $\text{NO}_3^-$ , se observó un patrón parecido al de  $\text{NO}_2^-$ , donde los tratamientos con agua clara presentaron un incremento sostenido al final de la cuarta semana y los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos disminuyeron en la penúltima semana del experimento, aunque estos no fueron significativamente diferentes con los tratamientos de agua clara ( $p > 0.05$ ).

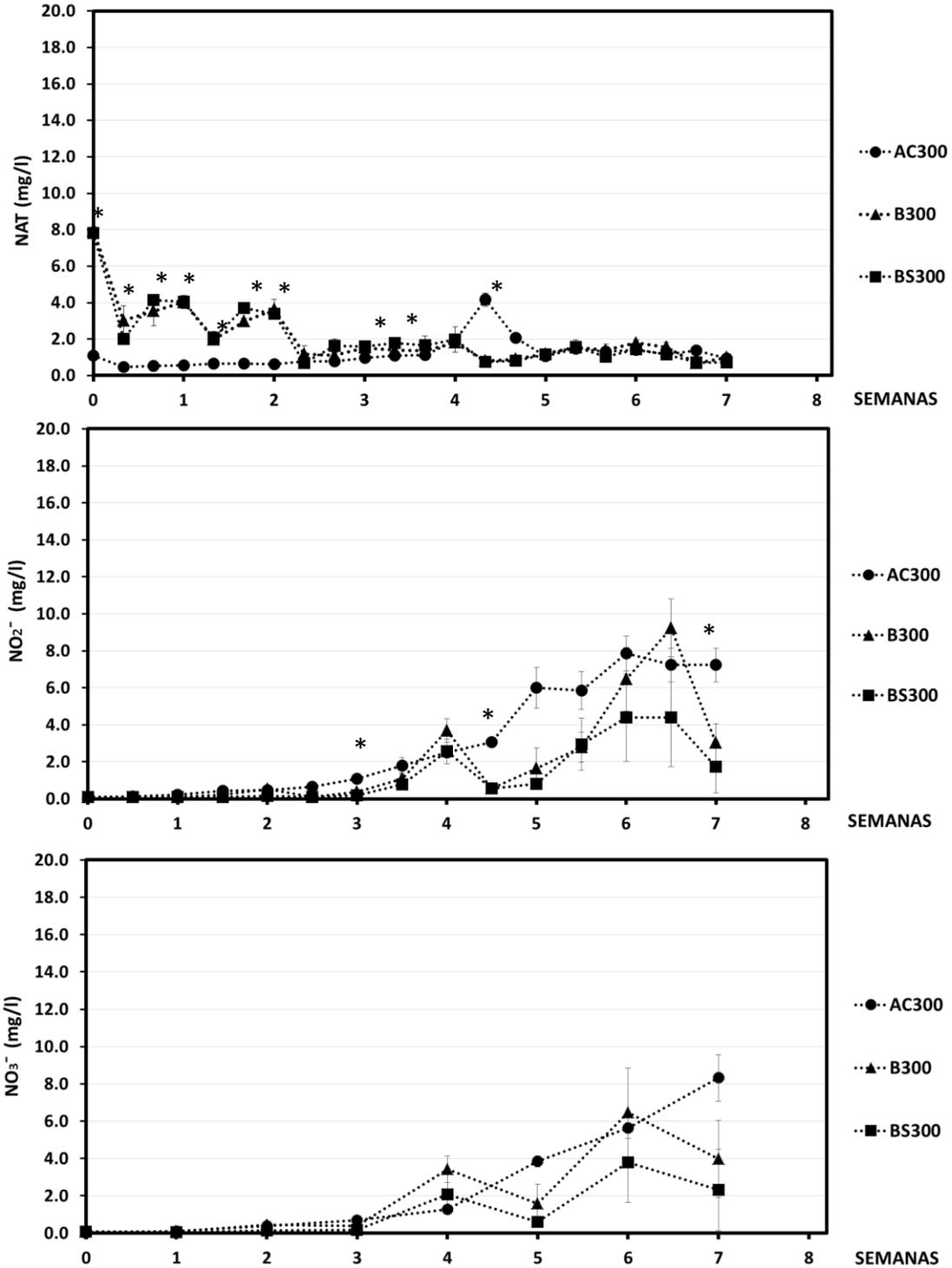


Figura 14. Monitoreo semanal de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) para los tratamientos con 300 org./m<sup>3</sup>. Los símbolos indican los promedios y las barras representan el error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, \*: diferencia significativa (p ≤ 0.05).Tamaño de muestras: n = 3.

Las concentraciones en compuestos nitrogenados para los camarones mantenidos a una densidad de 600 org./m<sup>3</sup> se presentan en la figura 15. El comportamiento del NAT fue similar al descrito previamente donde los tratamientos con flóculos biológicos con y sin sustratos tuvieron valores significativamente más altos que los de agua clara durante las dos primeras semanas. Para NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, se observó que los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos mantuvieron valores relativamente bajos (promedios NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = 0.4 mg/l, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 0.7 mg/l) y homogéneos, en tanto que los tratamientos con agua clara incrementaron sus concentraciones a partir de la semana 4, mostrando diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a los anteriores.

Para los tratamientos con densidad 900 org./m<sup>3</sup>, la concentración de NAT fue también similar a la descrita para las anteriores densidades, donde los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos fueron significativamente mayores que los de agua clara durante las dos primeras semanas. Enseguida, entre la tercera y quinta semana, se registró una tendencia inversa, donde los tratamientos con agua clara fueron ligera y significativamente más altos ( $p \leq 0.05$ ) que los de flóculos biológicos con y sin sustratos (Figura 16). En el caso de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, los tratamientos de agua clara mostraron incrementos significativos ( $p \leq 0.05$ ) respecto a los otros dos tratamientos a partir de las semanas 2 y 4, respectivamente. Los acuarios con flóculos biológicos con y sin sustratos mantuvieron concentraciones bajas (promedios NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = 0.5 mg/l, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 0.1 mg/l) y constantes durante el resto del bioensayo.

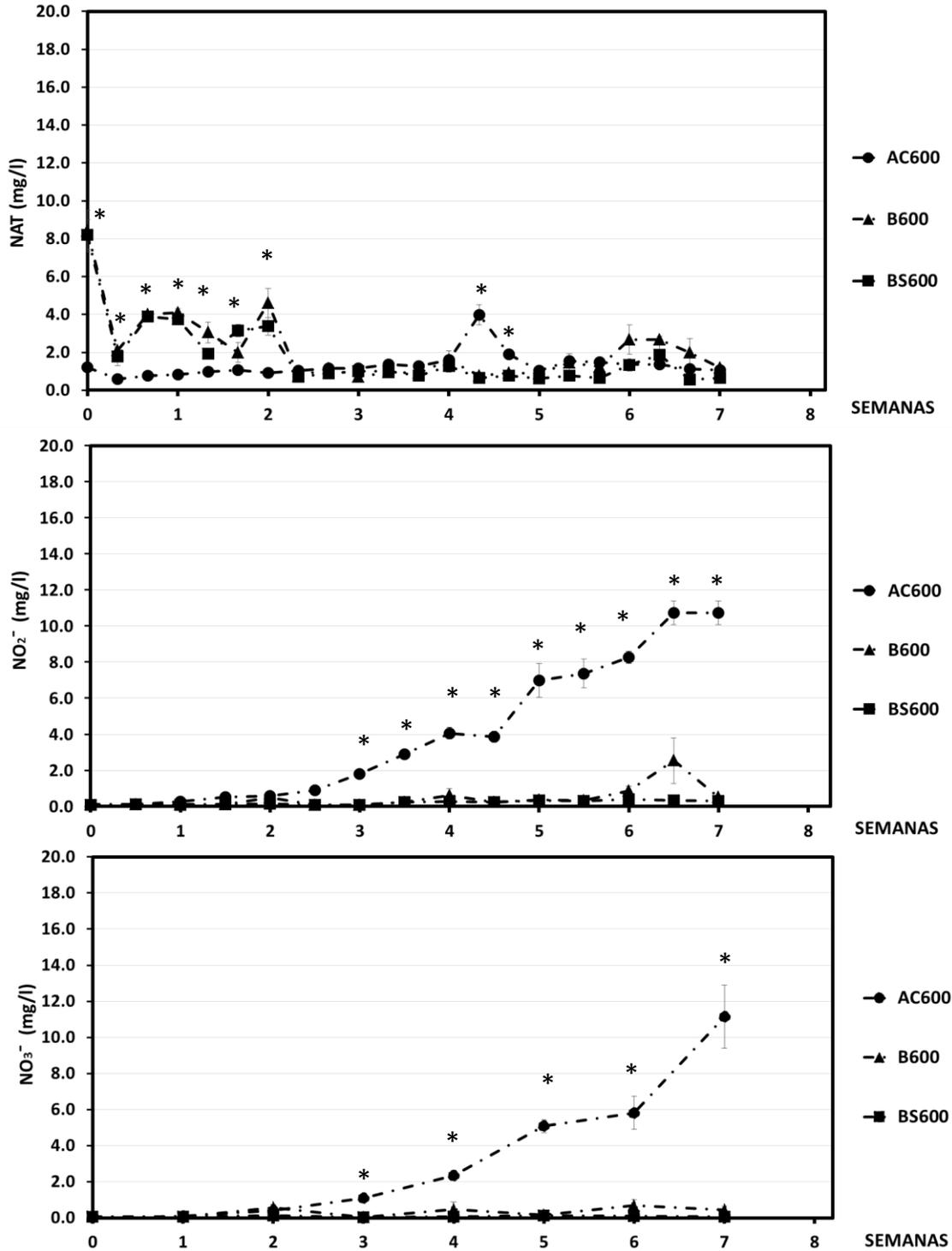


Figura 15. Monitoreo semanal de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) para los tratamientos con 600 org./m<sup>3</sup>. Los símbolos indican los promedios y las barras representan el error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, \*: diferencia significativa (p ≤ 0.05). Tamaño de muestras: n = 3.

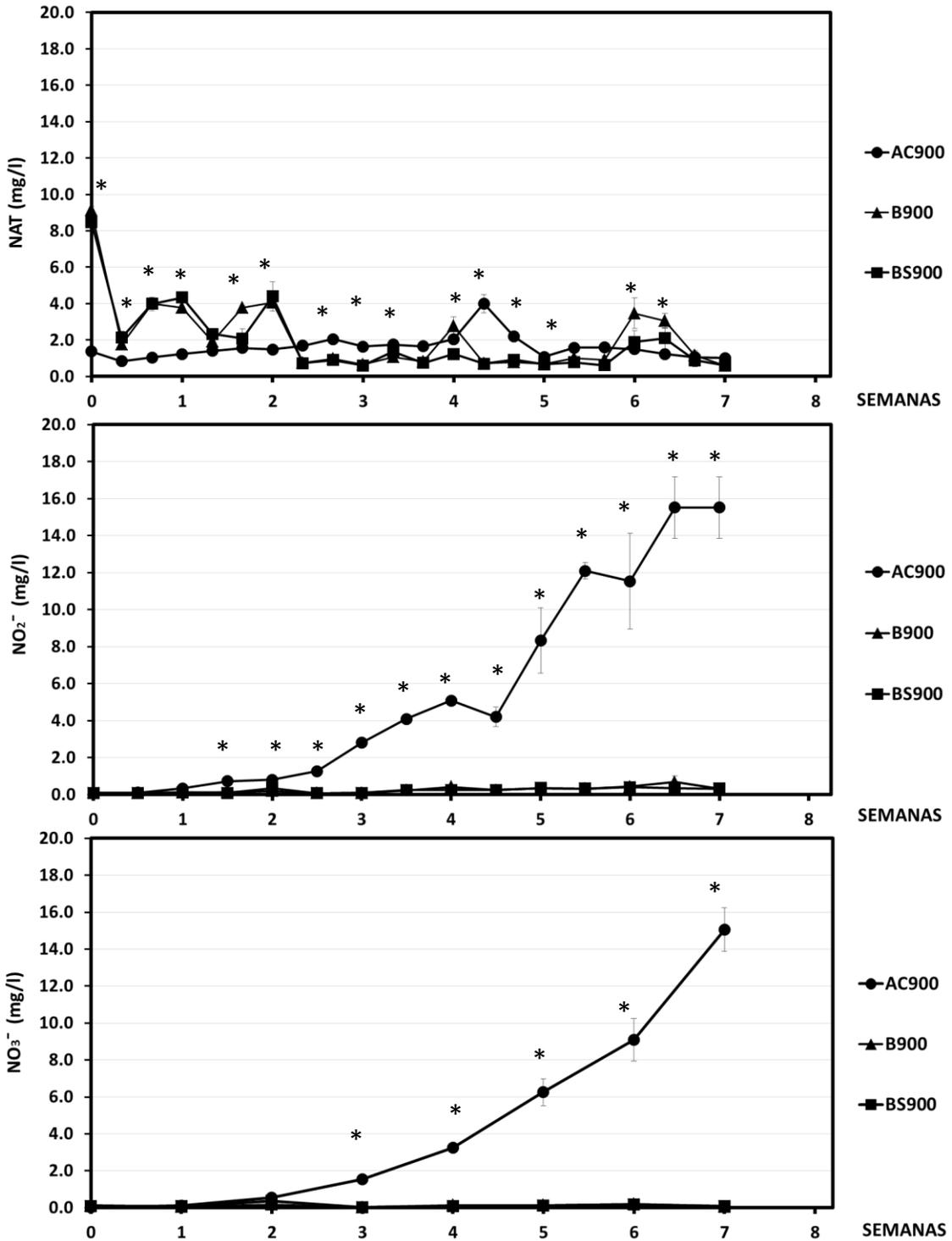


Figura 16. Monitoreo semanal de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) para los tratamientos con  $900 \text{ org./m}^3$ . Los símbolos indican los promedios y las barras representan el error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, \*: diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). Tamaño de muestras:  $n = 3$ .

### **c. Sólidos suspendidos totales y composición de los flóculos**

Los resultados de la concentración en sólidos suspendidos totales (SST) se muestran en la figura 17. Se destaca que los tratamientos con agua clara para las tres densidades de siembra tuvieron una baja concentración en SST (promedio global SST = 40 mg/l) durante todo el bioensayo, mientras que los tratamientos con flóculos biológicos con o sin sustratos mostraron un incremento en la concentración de SST a partir de la tercera semana. Adicionalmente, se observó que los niveles de SST incrementaron en función de la densidad de siembra, registrando las unidades experimentales con 900 org./m<sup>3</sup> mayor concentración de SST que sucesivamente las de 600 org./m<sup>3</sup> y 300 org./m<sup>3</sup>. A partir de la sexta semana fue necesario realizar recambios de agua adicionales para prevenir que los niveles continuaran incrementando a niveles perjudiciales para los organismos. Dichos recambios fueron realizados principalmente para las densidades de 600 org./m<sup>3</sup> y 900 org./m<sup>3</sup>.

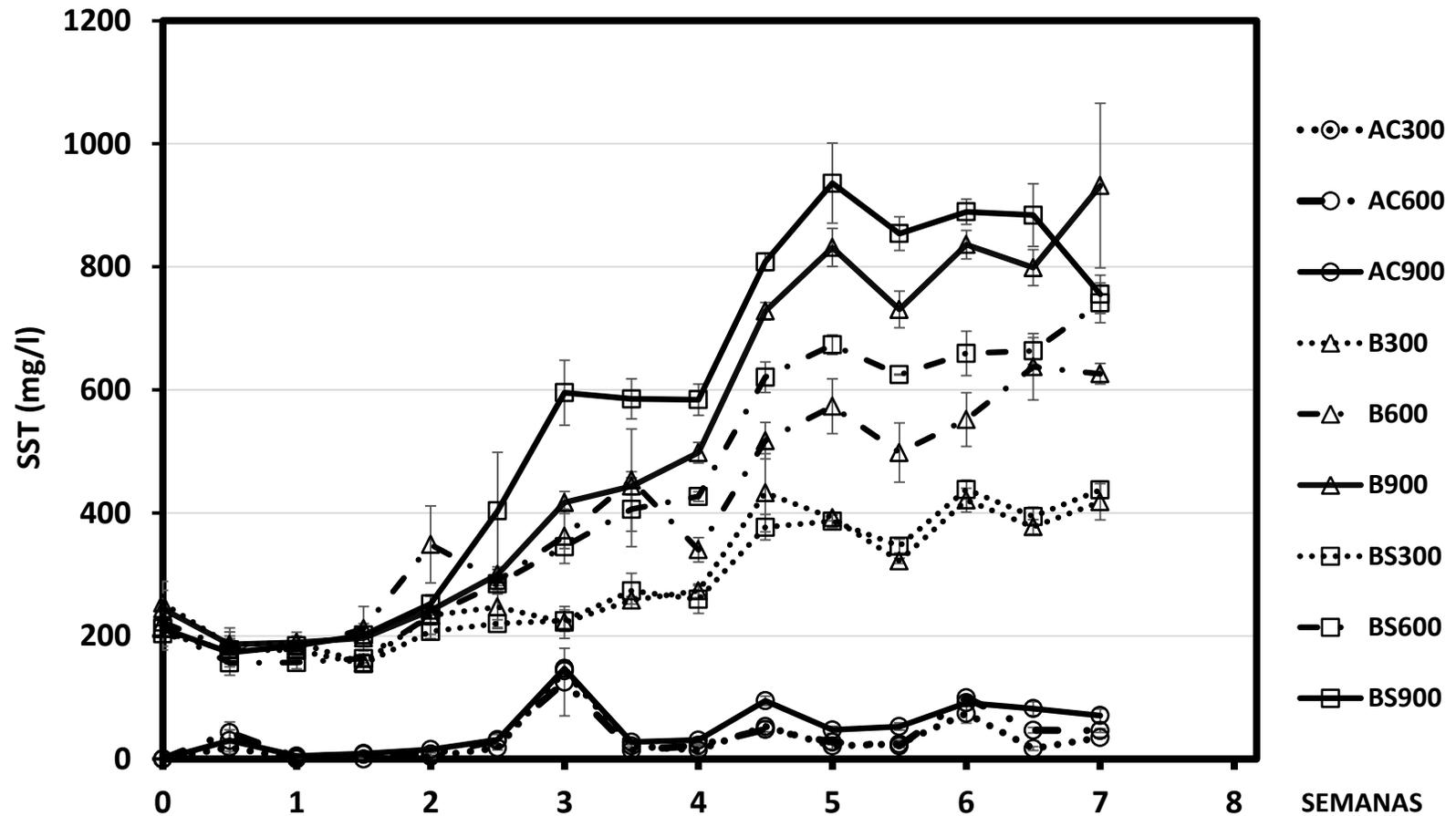
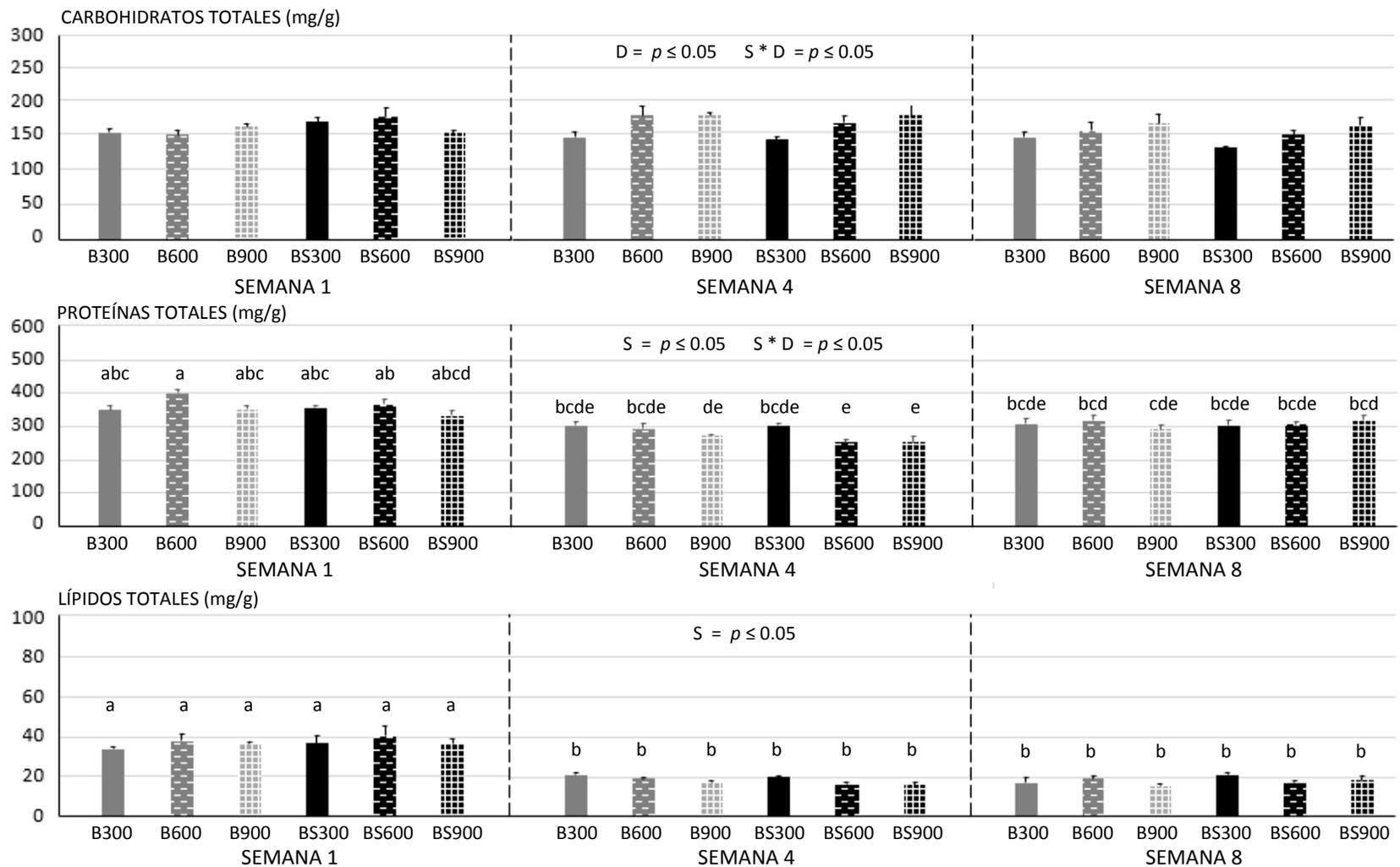


Figura 17. Concentraciones de sólidos suspendidos totales (SST) durante el bioensayo. Los símbolos indican los promedios y las barras representan el error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. Tamaño de muestras: n = 3.

La composición de los flóculos biológicos, cuyos resultados se presentan en la figura 18, no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el contenido de carbohidratos entre el inicio (semana 1), mitad (semana 4) y final del experimento (semana 8). No obstante, se observó una concentración de carbohidratos significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en los flóculos biológicos (B y BS) de los tratamientos con 600 y 900 org./m<sup>3</sup> ( $159.7 \pm 4.4$  mg/g;  $163.5 \pm 3.8$  mg/g, respectivamente) respecto a los de 300 org./m<sup>3</sup>. Así mismo, los flóculos biológicos de los tratamientos con y sin sustratos a densidades de 600 y 900 org./m<sup>3</sup> mostraron un decremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en sus concentraciones de proteínas en la semana 4. Al final del experimento, solamente los flóculos con sustratos en ambas densidades recuperaron los niveles iniciales de proteína. La concentración de lípidos en los flóculos de todos los tratamientos fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) al principio del bioensayo, comparándola con las concentraciones de las semanas 4 y 8, las cuales no mostraron diferencias entre sí.



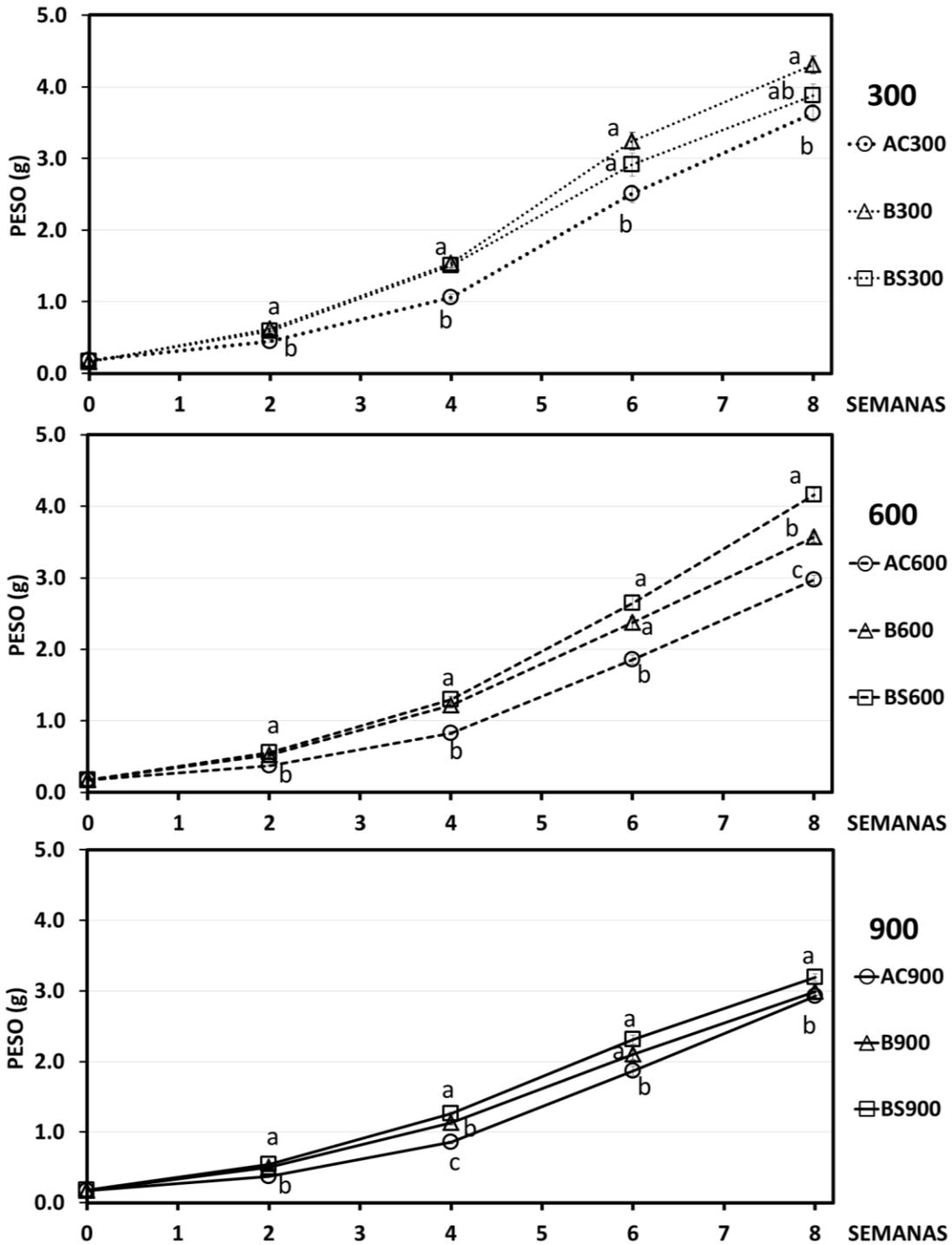
**Figura 18. Cambios en la composición de los flóculos biológicos a la 1<sup>ra</sup>, 4<sup>ta</sup> y 8<sup>va</sup> semana del experimento.** Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. Las letras diferentes indican grupos estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, D: densidad, S: semana y S\*D: interacción semana y densidad. Tamaño de muestras: n = 3.

## 7.2 Desempeño biológico

### a. Crecimiento

En la figura 19, se muestran las curvas de crecimiento por densidad de siembra, resultado de las biometrías realizadas cada 15 días. Para cada una de las densidades, se observó que a partir de la segunda semana los organismos cultivados en flóculos biológicos con y sin sustratos mostraron un crecimiento significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) que aquellos cultivados en agua clara. Esta tendencia se mantuvo a lo largo del experimento, con excepción de la última semana donde los camarones del tratamiento B900 tuvieron un peso no significativamente diferente ( $p > 0.05$ ) a AC900, pero ambos significativamente menores ( $p \leq 0.05$ ) a los organismos del tratamiento BS900.

En la figura 20, el crecimiento de los camarones se presenta por condición de calidad de agua. De manera general, se encontró que a la menor densidad usada, los camarones crecieron significativamente más ( $p \leq 0.05$ ) y eso se verificó tanto en los tratamientos de agua clara como de flóculos biológicos con y sin sustratos. En los tratamientos de agua clara, se observó al final de la semana 2 una diferencia significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en el peso de los organismos del tratamiento AC300, respecto a AC600 y AC900. Esa observación permaneció durante todo el bioensayo. Un patrón similar fue encontrado en los tratamientos de flóculos biológicos, con excepción de la última semana donde B600 fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) que B900. En el caso de los tratamientos con flóculos biológicos y sustratos, las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) del peso se notaron al final de la semana 4, donde los organismos de los acuarios BS300 tuvieron un peso ligeramente mayor que los de BS600 y BS900. A partir de la séptima semana, el peso de los camarones de los tratamientos BS300 y BS600 fueron similares, encontrando diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) con los de BS900. Este comportamiento se mantuvo hasta el final del bioensayo. Otro resultado destacable es que el crecimiento de los camarones de los tratamientos AC600 y AC900 no fue significativamente diferente ( $p > 0.05$ ) a lo largo de las ocho semanas del experimento.



**Figura 19. Crecimiento de *L. vannamei* por densidad de siembra durante el experimento.** Los símbolos indican los promedios y las barras representan el error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>.

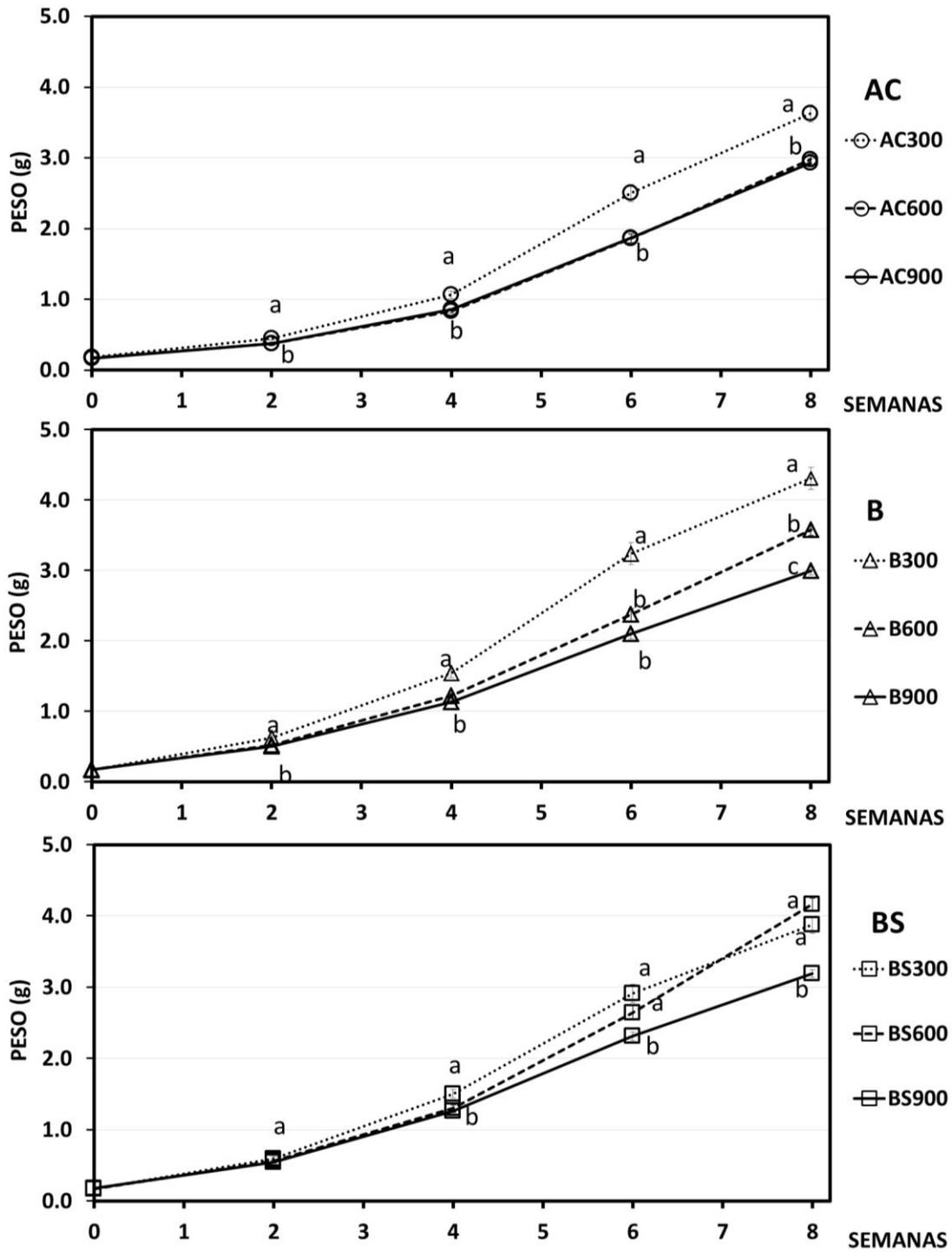


Figura 20. Crecimiento de *L. vannamei* por condición de agua durante el experimento. Los símbolos indican los promedios y las barras representan el error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>.

A partir de los resultados mostrados en la tabla X, se observó que, aunque el peso final más elevado se obtuvo con el tratamiento B300, este no fue significativamente diferente ( $p > 0.05$ ) a BS300 y BS600. Estos tres tratamientos tuvieron los promedios de crecimiento más elevados durante las ocho semanas del experimento y en consecuencia la tasa semanal de crecimiento más alta. Sin embargo, es interesante mencionar que en las dos últimas semanas del experimento, el crecimiento de los camarones BS300 fue aminorado respecto a la tendencia que mantenía en las semanas anteriores. Por otro lado, cabe mencionar que la tasa semanal de crecimiento fue afectada por la condición de cultivo, dado que los organismos en agua clara ( $0.37 \pm 0.01$  g/sem) mostraron un crecimiento significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) a los organismos mantenidos en flóculos biológicos con y sin sustratos ( $0.46 \pm 0.02$  g/sem y  $0.45 \pm 0.02$  g/sem, respectivamente).

#### **b. Supervivencia, factor de conversión alimenticia y biomasa**

La supervivencia durante el experimento varió entre 80% y 94%, sin que se encontraran diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los nueve tratamientos (Tabla X). Los camarones mantenidos en los sistemas de flóculos biológicos con sustratos presentaron un porcentaje de supervivencia ligeramente mayor en comparación con los camarones mantenidos en los sistemas de agua clara y flóculos biológicos sin sustratos, aunque no fue estadísticamente diferente.

En términos de factor de conversión alimenticia, el tratamiento con mejor FCA fue AC600, el cual mostró un promedio de 1.4 g/g y fue solamente significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) de B900.

En promedio, la biomasa final fue mayor en los acuarios del tratamiento BS900, aunque no fue estadísticamente diferente ( $p > 0.05$ ) de la alcanzada en los tratamientos BS600 y B900. Se observó que la biomasa fue directamente relacionada con la densidad de siembra, encontrando que la media global de los tratamientos con 900 org./m<sup>3</sup> ( $128.1 \pm 5.6$  g) fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) a la de los tratamientos con 600 org./m<sup>3</sup> ( $100.8 \pm 6.2$  g), que a su vez

fue significativamente más alta que la de los tratamientos con 300 org./m<sup>3</sup> (58.4 ± 2.1 g).

**Tabla X. Crecimiento, supervivencia, factor de conversión alimenticia y biomasa de *L. vannamei* obtenidos durante el experimento.** Los datos se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. P<sub>I</sub>: peso inicial, S: semana, P<sub>F</sub>: peso final, TSC: tasa semanal de crecimiento, Sup: supervivencia, FCA: factor de conversión alimenticia, AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto ( $p \leq 0.05$ ). Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. Tamaño de muestras: P<sub>F</sub>- AC300 (n = 35); AC600 (n = 77); AC900 (n = 109); B300 (n = 33); B600 (n = 73); B900 (n = 108); BS300 (n = 36); BS600 (n = 78); BS900 (n = 126). TSC, Sup, FCA y Biomasa: n = 3.

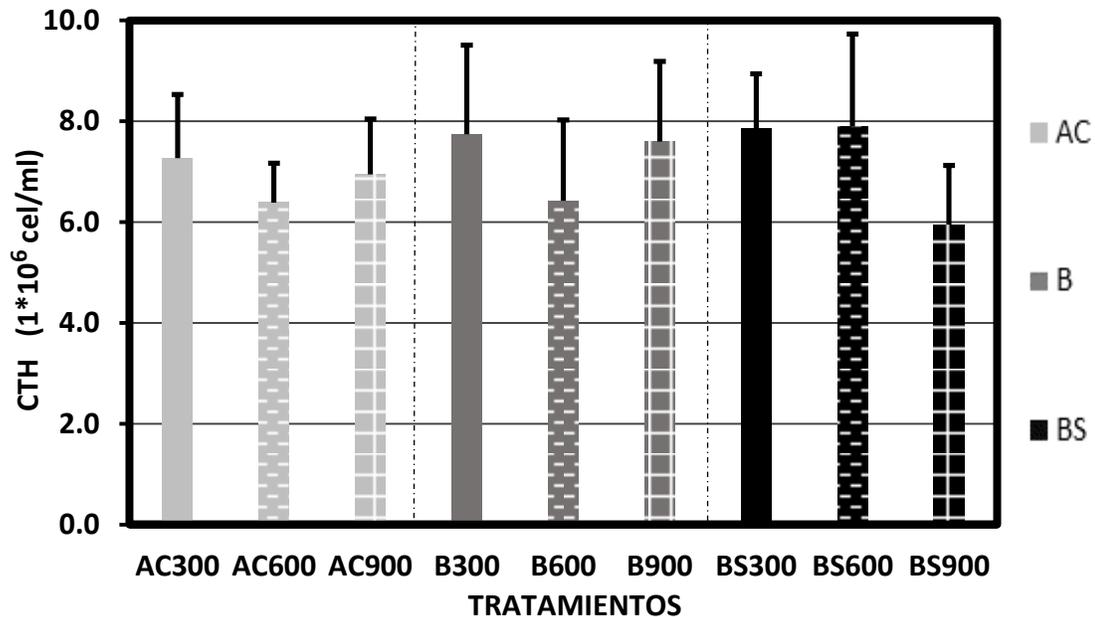
	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300	AC600	AC900	B300	B600	B900	BS300	BS600	BS900	C	D	C*D
P <sub>I</sub> (g)	0.18 $\pm$ 0.0	0.18 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.0	0.16 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.0			
S#2 (g)	0.45 $\pm$ 0.0 <sup>cd</sup>	0.38 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	0.38 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	0.62 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.0 <sup>abc</sup>	0.50 $\pm$ 0.0 <sup>bc</sup>	0.59 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	0.56 $\pm$ 0.0 <sup>abc</sup>	0.54 $\pm$ 0.0 <sup>abc</sup>	•	•	
S#4 (g)	1.06 $\pm$ 0.0 <sup>de</sup>	0.83 $\pm$ 0.1 <sup>f</sup>	0.85 $\pm$ 0.1 <sup>f</sup>	1.54 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.22 $\pm$ 0.0 <sup>cde</sup>	1.13 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>	1.51 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	1.30 $\pm$ 0.0 <sup>abc</sup>	1.27 $\pm$ 0.0 <sup>bcd</sup>	•	•	
S#6 (g)	2.50 $\pm$ 0.1 <sup>bcd</sup>	1.86 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>	1.87 $\pm$ 0.1 <sup>e</sup>	3.24 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.37 $\pm$ 0.1 <sup>bcd</sup>	2.10 $\pm$ 0.1 <sup>ed</sup>	2.91 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	2.65 $\pm$ 0.1 <sup>abc</sup>	2.31 $\pm$ 0.1 <sup>cd</sup>	•	•	•
P <sub>F</sub> (g)	3.63 $\pm$ 0.1 <sup>bcd</sup>	2.97 $\pm$ 0.2 <sup>ef</sup>	2.93 $\pm$ 0.1 <sup>f</sup>	4.31 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.57 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	2.99 $\pm$ 0.1 <sup>ef</sup>	3.88 $\pm$ 0.1 <sup>abc</sup>	4.16 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	3.19 $\pm$ 0.1 <sup>de</sup>	•	•	•
TSC (g/sem)	0.42 $\pm$ 0.0 <sup>cde</sup>	0.36 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>	0.36 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>	0.54 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.0 <sup>bcd</sup>	0.37 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>	0.47 $\pm$ 0.0 <sup>abc</sup>	0.53 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	0.40 $\pm$ 0.0 <sup>de</sup>	•	•	•
Sup (%)	90.2 $\pm$ 2.0	89.9 $\pm$ 7.3	80.7 $\pm$ 5.5	84.3 $\pm$ 3.9	85.9 $\pm$ 6.6	80.0 $\pm$ 2.3	94.1 $\pm$ 3.4	89.9 $\pm$ 4.0	92.0 $\pm$ 1.1			
FCA (g/g)	1.5 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	1.4 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	1.7 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	1.7 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	2.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	1.5 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	1.9 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	•	•	
Biomasa (g)	52.0 $\pm$ 1.0 <sup>e</sup>	87.0 $\pm$ 2.7 <sup>cd</sup>	117.5 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	60.6 $\pm$ 2.0 <sup>de</sup>	100.5 $\pm$ 5.0 <sup>bc</sup>	119.8 $\pm$ 3.0 <sup>ab</sup>	60.4 $\pm$ 1.6 <sup>de</sup>	122.0 $\pm$ 3.4 <sup>ab</sup>	146.8 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>		•	

### 7.3 Respuesta inmune

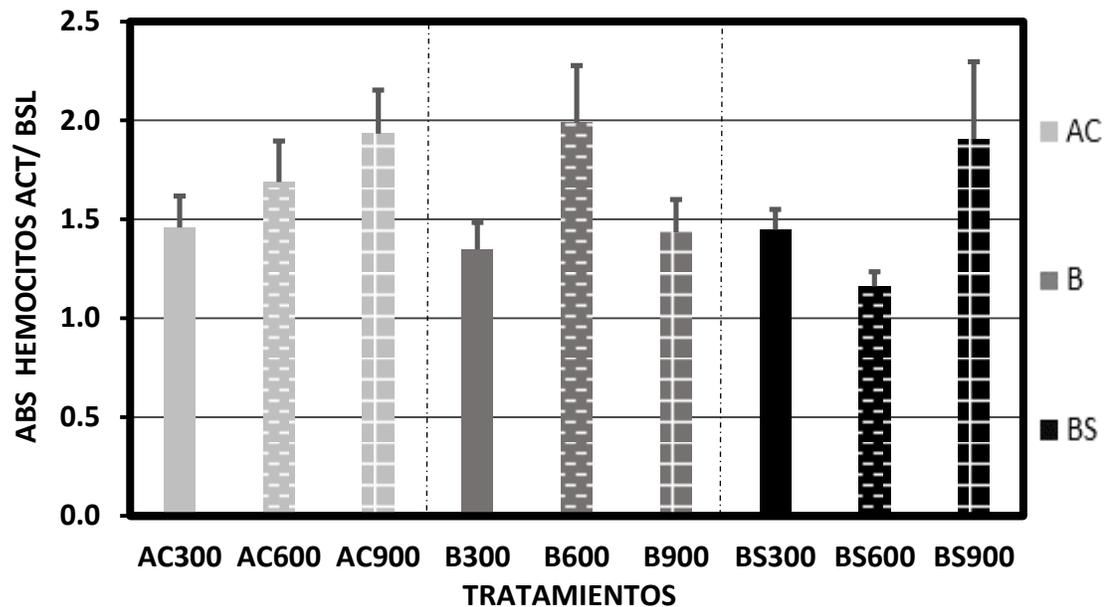
#### a. Conteo total de hemocitos y producción de anión superóxido

Los resultados del conteo total de hemocitos se muestran en la figura 21. No se observaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos experimentales debido probablemente a la amplia variación de los datos.

La cuantificación de anión superóxido tampoco mostró diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los diferentes tratamientos (Figura 22).



**Figura 21. Conteo total de hemocitos en la hemolinfa de *L. vannamei* mantenidos en los tratamientos experimentales.** Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. CTH: conteo total de hemocitos, AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. Tamaño de muestra: n = 9.



**Figura 22. Cuantificación de la producción de anión superóxido en hemolinfa de *L. vannamei* mantenidos en los tratamientos experimentales.** Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. ABS HEMOCITOS ACT/ BSL: absorbancia hemocitos activados/ basales, AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. Tamaño de muestra: n = 9.

## 7.4 Respuesta fisiológica

### a. Condiciones de alta densidad y calidad de agua

Los resultados de las variables fisiológicas que fueron determinadas en plasma, hepatopáncreas y músculo de los camarones mantenidos a diferentes densidades y condición de calidad de agua se muestran en las Tablas XI, XII, XIII y XIV.

#### **Plasma:**

De las variables cuantificadas, solamente se observó una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en los niveles de glucosa, donde los camarones mantenidos en los tratamientos B300 y B900 mostraron niveles más bajos que los organismos del tratamiento AC600 (Tabla XI). Se detectó un efecto de la condición de cultivo sobre la concentración de glucosa plasmática, observando

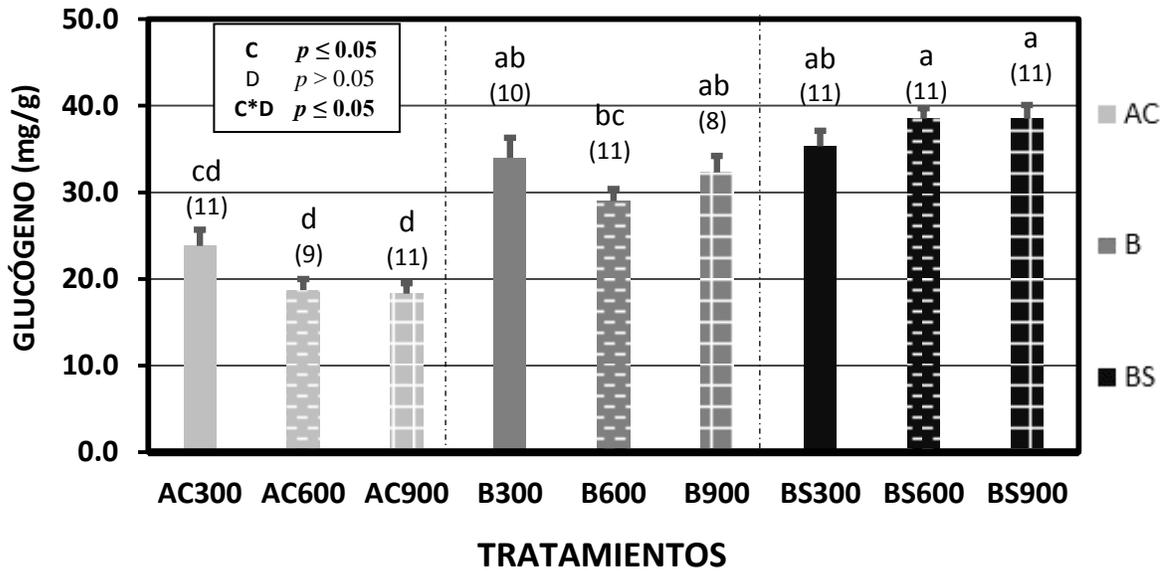
una media global para los organismos mantenidos con flóculos biológicos sin sustratos significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) ( $9.9 \pm 0.7$  mg/dl) a la de los organismos cultivados en sistemas de flóculos biológicos con sustratos y de agua clara ( $13.9 \pm 0.8$  mg/dl y  $14.5 \pm 1.1$  mg/dl, respectivamente).

**Tabla XI. Variables metabólicas medidas en el plasma de los camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.** Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto significativo, Prot.: proteína, Líp.: lípidos. Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. El número de muestras se señala entre paréntesis, para lípidos totales algunos tamaños de muestra fueron diferentes: AC300 (n = 8), AC900 (n = 10), B300 (n = 9), B900 (n = 6), BS300 (n = 10), BS900 (n = 8).

	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300	AC600	AC900	B300	B600	B900	BS300	BS600	BS900	C	D	C*D
	(n = 11)	(n = 9)	(n = 11)	(n = 10)	(n = 11)	(n = 8)	(n = 11)	(n = 11)	(n = 10)			
<b>Prot. totales</b> (mg/ml)	168.1 $\pm$ 14.4	152.3 $\pm$ 11.8	172.2 $\pm$ 11.3	168.3 $\pm$ 12.6	146.0 $\pm$ 10.1	143.0 $\pm$ 20.0	166.8 $\pm$ 11.8	194.5 $\pm$ 16.6	142.9 $\pm$ 10.8			
<b>Hemocianina</b> (mg/ml)	78.7 $\pm$ 5.3	70.4 $\pm$ 5.1	74.0 $\pm$ 3.1	75.3 $\pm$ 4.2	72.2 $\pm$ 4.0	61.3 $\pm$ 6.7	85.4 $\pm$ 5.3	85.2 $\pm$ 4.8	75.2 $\pm$ 4.1			
<b>Líp. totales</b> (mg/dl)	149.2 $\pm$ 12.9	134.3 $\pm$ 14.3	167.7 $\pm$ 16.5	141.1 $\pm$ 10.4	164.3 $\pm$ 23.0	144.6 $\pm$ 13.7	130.5 $\pm$ 11.9	161.1 $\pm$ 16.4	89.8 $\pm$ 25.2			
<b>Triglicéridos</b> (mg/dl)	35.3 $\pm$ 1.6	32.6 $\pm$ 2.2	38.0 $\pm$ 2.6	36.1 $\pm$ 2.8	36.6 $\pm$ 2.1	32.8 $\pm$ 3.9	37.9 $\pm$ 2.7	41.7 $\pm$ 2.3	38.9 $\pm$ 3.5			
<b>Glucosa</b> (mg/dl)	14.8 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	18.1 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	10.1 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	10.6 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	8.9 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	13.4 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	14.2 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	14.0 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	•		
<b>Lactato</b> (mg/dl)	7.8 $\pm$ 0.8	6.9 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.8	7.0 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 0.8	6.5 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.8			

***Hepatopáncreas:***

Como se muestra en la tabla XII y figura 23, se observaron diferencias significativas en distintos parámetros cuantificados en el hepatopáncreas de los organismos. La concentración de triglicéridos fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en los organismos del tratamiento AC300, en comparación con los del tratamiento BS300. Considerando los promedios globales, se observó que los organismos mantenidos en agua clara tuvieron una concentración de triglicéridos significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) ( $66.1 \pm 3.9$  mg/g de peso seco) en comparación con los camarones cultivados con flóculos biológicos y sustratos ( $49.6 \pm 4.0$  mg/g de peso seco), pero ambos no fueron significativamente diferentes de los niveles alcanzados por los organismos de los sistemas con flóculos biológicos sin sustratos ( $59.1 \pm 4.2$  mg/g de peso seco). Para carbohidratos y glucógeno, se observó de manera general que los organismos cultivados en el sistema de agua clara tuvieron una concentración significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) de estos metabolitos, respecto a los organismos mantenidos en los tratamientos con flóculos biológicos con y sin sustratos.



**Figura 23. Concentración de glucógeno en hepatopáncreas de camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.** Los resultados están expresados en peso seco y se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores. El resultado del ANOVA de dos vías se encuentra insertado en la gráfica. Las letras indican grupos significativamente diferentes. El número de muestras se señala entre paréntesis.

**Tabla XII. Variables metabólicas medidas en el hepatopáncreas de los camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.** Los resultados están expresados en peso seco y se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto significativo, Prot.: proteína, Líp.: lípidos, Carb.: carbohidratos. Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. El número de muestras se señala entre paréntesis.

	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300 (n = 11)	AC600 (n = 9)	AC900 (n = 11)	B300 (n = 10)	B600 (n = 11)	B900 (n = 8)	BS300 (n = 11)	BS600 (n = 11)	BS900 (n = 10)	C	D	C*D
<b>Prot. totales</b> (mg/g)	479.3 $\pm$ 11.9	461.4 $\pm$ 16.3	490.1 $\pm$ 17.1	442.7 $\pm$ 19.6	469.7 $\pm$ 13.4	493.7 $\pm$ 19.4	511.7 $\pm$ 9.8	469.4 $\pm$ 17.3	440.4 $\pm$ 25.0			
<b>Líp. totales</b> (mg/g)	268.7 $\pm$ 11.5	232.4 $\pm$ 12.6	270.2 $\pm$ 17.2	216.1 $\pm$ 14.2	240.7 $\pm$ 22.0	248.1 $\pm$ 22.3	225.2 $\pm$ 12.0	241.1 $\pm$ 17.9	226.7 $\pm$ 17.9			
<b>Trigliceridos</b> (mg/g)	70.4 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>	57.9 $\pm$ 7.3 <sup>ab</sup>	68.6 $\pm$ 7.2 <sup>ab</sup>	53.6 $\pm$ 6.0 <sup>ab</sup>	63.6 $\pm$ 6.2 <sup>ab</sup>	59.8 $\pm$ 10.3 <sup>ab</sup>	39.2 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	55.6 $\pm$ 6.2 <sup>ab</sup>	54.6 $\pm$ 8.1 <sup>ab</sup>	•		
<b>Carb. totales</b> (mg/g)	41.8 $\pm$ 4.5 <sup>bc</sup>	45.2 $\pm$ 5.8 <sup>abc</sup>	36.3 $\pm$ 2.8 <sup>c</sup>	57.9 $\pm$ 3.9 <sup>ab</sup>	51.1 $\pm$ 3.9 <sup>abc</sup>	67.1 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	64.5 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	55.7 $\pm$ 4.0 <sup>ab</sup>	64.1 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	•		

**Músculo:**

En el caso de las variables metabólicas medidas en músculo, ninguna mostró diferencias significativas (Tabla XIII). Para las variables energéticas (Tabla XIV), la concentración en AMP de los camarones mantenidos en el tratamiento AC600 fue significativamente mayor a los del tratamiento BS900 ( $p \leq 0.05$ ). El análisis de varianza mostró que la condición de cultivo afectó los niveles de la AMP, observando en los organismos de agua clara, un promedio global ( $1.85 \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$ ) significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con los camarones cultivados en presencia de flóculos biológicos sin y con sustratos ( $1.35 \pm 0.12$  y  $1.27 \pm 0.14 \mu\text{mol/g}$ , respectivamente). Con respecto a la ADP, los camarones cultivados en los tratamientos AC900 y BS600 tuvieron una concentración promedio de  $3.84 \mu\text{mol/g}$ , la cual fue significativamente más alta ( $p \leq 0.05$ ) que la de los camarones del tratamiento BS900. Por otro lado, una tendencia particular observada con el ATP fue que a la densidad de  $600 \text{ org./m}^3$ , los camarones de los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos tuvieron una concentración significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) que los del tratamiento de agua clara. Los organismos mantenidos en agua clara mostraron la menor media global ( $2.48 \pm 0.21 \mu\text{mol/g}$ ), en comparación con aquella para los camarones cultivados en biofloc con y sin sustratos ( $3.86 \pm 0.20 \mu\text{mol/g}$  y  $3.95 \pm 0.35 \mu\text{mol/g}$ , respectivamente).

La suma de AMP, ADP y ATP se muestra en la figura 24 como la concentración de nucleótidos totales y se registraron niveles significativamente más elevados en los organismos de los tratamientos B600 y BS600 en comparación a los de AC300.

Al analizar la CEA y concentración de Arg-F, se observó una relación mutuamente inversa entre los camarones mantenidos en AC600 y BS900, encontrando en ambos casos diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). El promedio global de Arg-F en los organismos cultivados en agua clara ( $14.84 \pm 1.19 \mu\text{mol/g}$ ) fue significativamente mayor a las observadas en los organismos

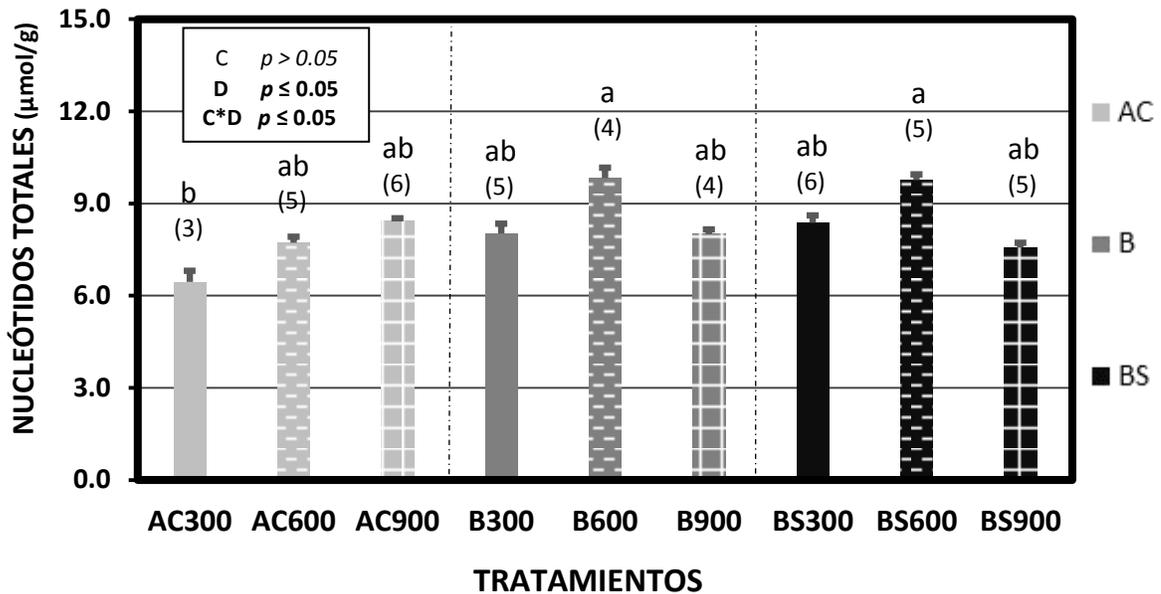
mantenidos en presencia de flóculos biológicos con y sin sustratos ( $10.82 \pm 0.84$   $\mu\text{mol/g}$  y  $10.75 \pm 0.75$   $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente). Se detectó un efecto de la densidad de siembra sobre este parámetro, registrando un promedio global de  $14.30 \pm 1.13$   $\mu\text{mol/g}$  para los camarones cultivados a  $600$   $\text{org/m}^3$ , que fue significativamente mayor a la media observada en los organismos mantenidos a  $900$  y  $300$   $\text{org./m}^3$  ( $10.91 \pm 1.08$   $\mu\text{mol/g}$  y  $11.20 \pm 0.75$   $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente).

**Tabla XIII. Variables metabólicas medidas en el músculo de los camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.** Los resultados están expresados en peso seco y se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto significativo, KW: análisis no-paramétrico de Kruskal-Wallis, Prot.: proteína, Carb.: carbohidratos. Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. El número de muestras se señala entre paréntesis.

	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300	AC600	AC900	B300	B600	B900	BS300	BS600	BS900	C	D	C*D
	(n = 11)	(n = 9)	(n = 11)	(n = 10)	(n = 11)	(n = 8)	(n = 11)	(n = 11)	(n = 10)			
<b>Prot. totales</b> (mg/g)	701.3 $\pm$ 58.4	738.3 $\pm$ 34.2	752.2 $\pm$ 25.9	709.0 $\pm$ 45.1	800.9 $\pm$ 21.4	718.1 $\pm$ 51.4	790.1 $\pm$ 35.1	749.5 $\pm$ 29.4	725.1 $\pm$ 52.2	<b>K W</b>		
<b>Carb. totales</b> (mg/g)	53.7 $\pm$ 6.8	35.0 $\pm$ 3.8	45.1 $\pm$ 4.3	35.6 $\pm$ 3.1	35.2 $\pm$ 3.6	46.0 $\pm$ 5.5	42.8 $\pm$ 4.2	42.1 $\pm$ 3.8	42.0 $\pm$ 3.1			
<b>Glucógeno</b> (mg/g)	8.2 $\pm$ 1.0	9.0 $\pm$ 1.1	9.6 $\pm$ 1.0	10.3 $\pm$ 1.5	10.3 $\pm$ 1.0	8.8 $\pm$ 1.2	8.0 $\pm$ 1.1	9.7 $\pm$ 1.1	7.7 $\pm$ 1.0			
<b>Lactato</b> (mg/g)	2.0 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1			

**Tabla XIV. Variables energéticas medidas en el músculo de los camarones mantenidos a diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.** Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto significativo, KW: análisis no-paramétrico de Kruskal-Wallis. Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. El número de muestras se señala entre paréntesis.

	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300 (n = 3)	AC600 (n = 5)	AC900 (n = 6)	B300 (n = 5)	B600 (n = 4)	B900 (n = 4)	BS300 (n = 6)	BS600 (n = 5)	BS900 (n = 4)	C	D	C*D
<b>AMP</b> ( $\mu$ mol/g)	1.56 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	2.21 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.71 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	1.25 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	1.35 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	1.25 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	1.37 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	1.74 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.85 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	•		
<b>ADP</b> ( $\mu$ mol/g)	2.66 $\pm$ 0.14 <sup>bc</sup>	3.47 $\pm$ 0.08 <sup>abc</sup>	3.74 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.13 <sup>abc</sup>	3.87 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	2.84 $\pm$ 0.30 <sup>abc</sup>	3.39 $\pm$ 0.12 <sup>abc</sup>	3.94 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>			K W
<b>ATP</b> ( $\mu$ mol/g)	2.23 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	2.04 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	2.99 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	3.48 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	4.60 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	3.91 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	3.61 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	4.07 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	3.98 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	•		
<b>CEA</b>	0.55 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.66 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.67 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.63 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.62 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.71 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>			K W
<b>Arg-F</b> ( $\mu$ mol/g)	13.40 $\pm$ 1.39 <sup>ab</sup>	17.51 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>	13.32 $\pm$ 0.67 <sup>ab</sup>	10.27 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	11.16 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>	10.95 $\pm$ 0.91 <sup>ab</sup>	10.86 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup>	13.61 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>	7.27 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	•	•	



**Figura 24. Concentración de nucleótidos totales en músculo de los camarones mantenidos en diferentes condiciones de densidad y calidad de agua.** Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores. El resultado del ANOVA de dos vías se encuentra insertado en la gráfica. Las letras indican grupos significativamente diferentes. El número de muestras se señala entre paréntesis.

### b. Condición aguda de hipoxia

Los resultados de las variables fisiológicas determinadas en plasma, hepatopáncreas y músculo a los camarones que fueron sometidos a una condición aguda de hipoxia se muestran a continuación:

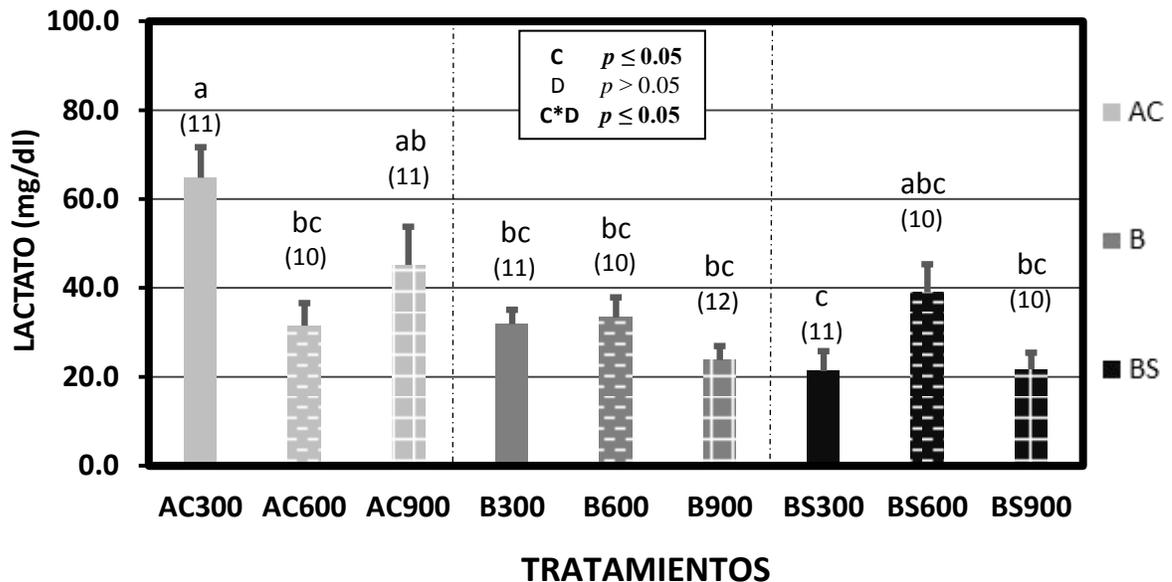
#### **Plasma:**

Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en distintas variables fisiológicas cuantificadas en el plasma de los camarones (Tabla XV, Figuras 25, 26 y 27). En el caso de la hemocianina, se observó que ante una misma condición de agua, los camarones de densidad 300 org./m<sup>3</sup> mostraron una concentración significativamente mayor a la de los camarones de las densidades

600 y 900 org./m<sup>3</sup> (Tabla XV). También se encontró que los organismos mantenidos en los sistemas de flóculos biológicos con sustratos presentaron niveles significativamente más bajos ( $p \leq 0.05$ ;  $57.9 \pm 2.8$  mg/ml) que aquellos mantenidos en agua clara ( $70.4 \pm 3.1$  mg/ml) y en flóculos sin sustratos ( $74.7 \pm 3.3$  mg/ml). La concentración de glucosa de los camarones mantenidos en el tratamiento de flóculos biológicos con sustratos fue significativamente más baja ( $p \leq 0.05$ ;  $33.2 \pm 3.1$  mg/dl) que la obtenida en los organismos de los tratamientos de agua clara ( $51.6 \pm 2.7$  mg/dl) y flóculos biológicos sin sustratos ( $44.4 \pm 3.1$  mg/dl). Los niveles de glucosa también fueron afectados por la densidad de siembra, encontrando que a 300 org./m<sup>3</sup> la concentración fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ;  $54.0 \pm 3.7$  mg/dl) que a 600 org./m<sup>3</sup> ( $40.3 \pm 3.0$  mg/dl) y 900 org./m<sup>3</sup> ( $35.6 \pm 2.8$  mg/dl). En los camarones del tratamiento BS600 se encontró la concentración de glucosa más baja, la cual fue significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) a la obtenida en todos los organismos mantenidos en agua clara y en los animales de los tratamientos B300 y B600. La concentración de lactato (Figura 25) en los camarones de los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos fue significativamente más baja ( $p \leq 0.05$ ) a la encontrada en los camarones del tratamiento AC300.

**Tabla XV. Variables metabólicas medidas en el plasma de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto significativo, Prot.: proteínas. Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. El número de muestras se señala entre paréntesis. Para proteínas totales BS600 (n = 11).

	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300 (n = 11)	AC600 (n = 12)	AC900 (n = 11)	B300 (n = 11)	B600 (n = 10)	B900 (n = 12)	BS300 (n = 11)	BS600 (n = 10)	BS900 (n = 10)	C	D	C*D
<b>Prot. totales</b> (mg/ml)	214.7 $\pm$ 14.4	172.1 $\pm$ 15.2	246.9 $\pm$ 21.3	206.6 $\pm$ 22.6	229.8 $\pm$ 20.2	208.1 $\pm$ 22.8	185.3 $\pm$ 16.8	249.0 $\pm$ 12.7	186.6 $\pm$ 18.2			
<b>Hemocianina</b> (mg/ml)	90.3 $\pm$ 3.7 <sup>ab</sup>	60.6 $\pm$ 2.0 <sup>cd</sup>	61.3 $\pm$ 4.3 <sup>cd</sup>	91.8 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	74.3 $\pm$ 3.7 <sup>bc</sup>	59.5 $\pm$ 4.7 <sup>cd</sup>	72.1 $\pm$ 3.6 <sup>c</sup>	51.5 $\pm$ 3.3 <sup>d</sup>	47.3 $\pm$ 4.3 <sup>d</sup>	•	•	
<b>Glucosa</b> (mg/dl)	67.4 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	44.5 $\pm$ 1.8 <sup>abc</sup>	43.4 $\pm$ 4.0 <sup>bc</sup>	56.5 $\pm$ 5.5 <sup>ab</sup>	45.8 $\pm$ 4.6 <sup>abc</sup>	31.9 $\pm$ 3.1 <sup>cd</sup>	38.1 $\pm$ 5.3 <sup>cd</sup>	23.6 $\pm$ 2.1 <sup>d</sup>	30.3 $\pm$ 4.9 <sup>cd</sup>	•	•	

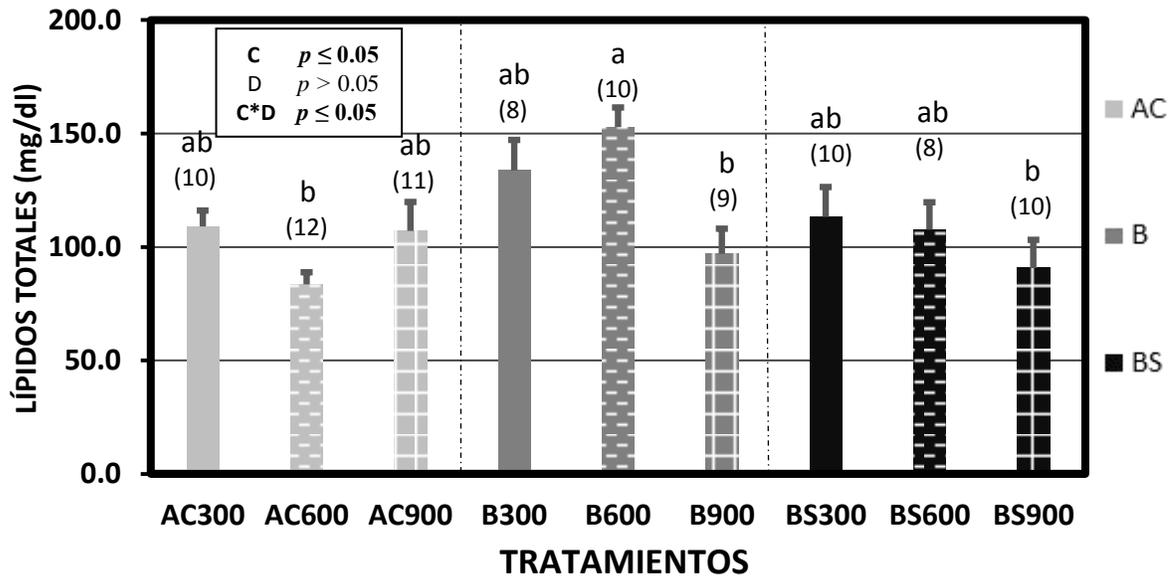


**Figura 25. Concentración de lactato en el plasma de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. AC = agua clara, B = biofloc, BS = biofloc con sustratos, 300 = 300 org./m<sup>3</sup>, 600 = 600 org./m<sup>3</sup>, 900 = 900 org./m<sup>3</sup>. C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores. El resultado del ANOVA de dos vías se encuentra insertado en la gráfica. Las letras indican grupos significativamente diferentes. El número de muestras se señala entre paréntesis.

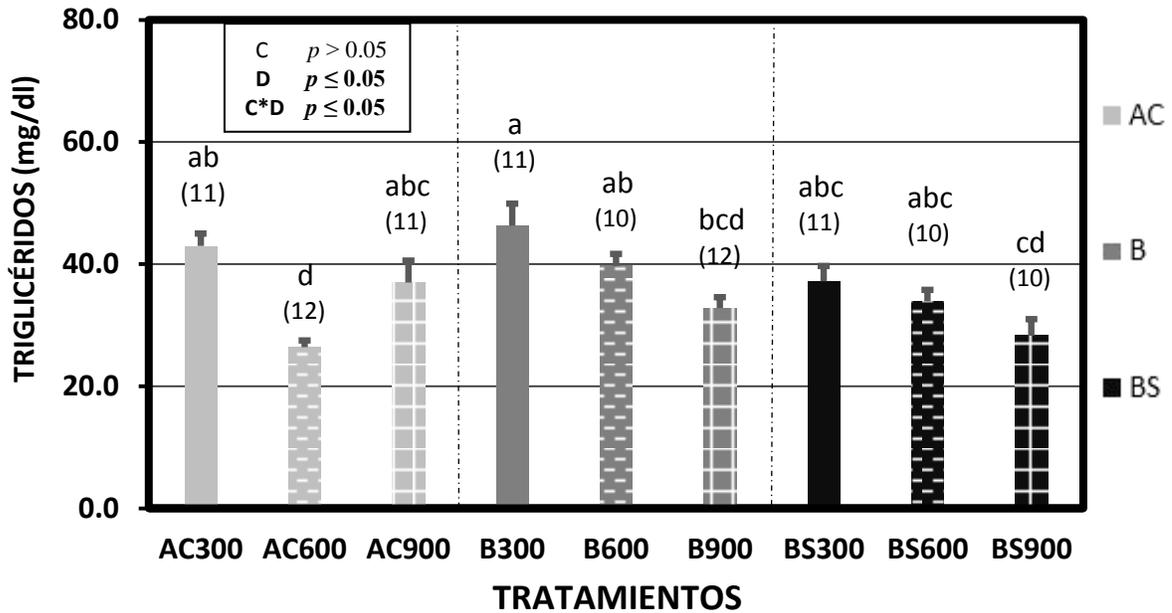
Para la concentración de lípidos totales (Figura 26), se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los organismos del tratamiento B600 con respecto a los camarones mantenidos en AC600, B900 y BS900.

En el caso de la concentración en triglicéridos (Figura 27), el mayor promedio se obtuvo en los animales del tratamiento B300, encontrando diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) también con los camarones de los tratamientos AC600, B900 y BS900. Con respecto a las medias globales, la observada a 300 org./m<sup>3</sup> fue significativamente más alta ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a la observada a 600 org./m<sup>3</sup> y 900 org./m<sup>3</sup> ( $42.2 \pm 1.7$  mg/dl,  $34.9 \pm 2.4$  mg/dl y

33.2 ± 1.7 mg/dl, respectivamente). Adicionalmente se detectó una interacción entre los factores densidad de siembra y condición de cultivo ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 26. Concentración de lípidos totales en el plasma de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados se muestran como promedio ± error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores. El resultado del ANOVA de dos vías se encuentra insertado en la gráfica. Las letras indican grupos significativamente diferentes. El número de muestras se señala entre paréntesis.



**Figura 27. Concentración de triglicéridos en el plasma de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores. El resultado del ANOVA de dos vías se encuentra insertado en la gráfica. Las letras indican grupos significativamente diferentes. El número de muestras se señala entre paréntesis.

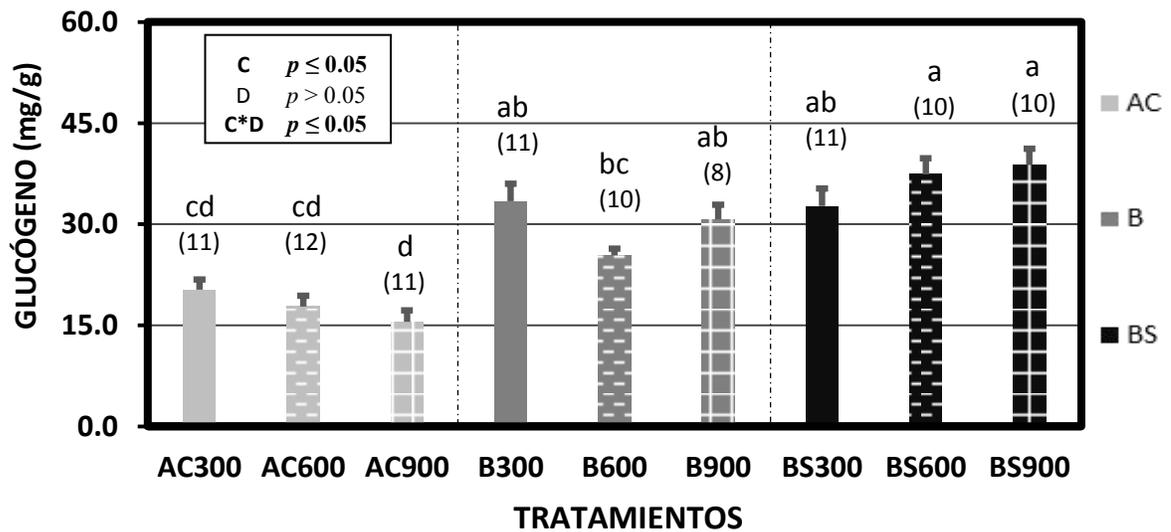
### **Hepatopáncreas:**

Diferencias significativas fueron encontradas en algunas variables medidas en el hepatopáncreas después de exponer a los camarones a la condición aguda de hipoxia (Tabla XVI). La concentración en lípidos totales para los camarones del tratamiento AC900 fue significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) a la obtenida en los organismos de los tratamientos BS300 y BS600.

Se observaron también concentraciones en triglicéridos dos veces más altas y significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) en el hepatopáncreas de los camarones de los tratamientos B300 y B600 respecto a aquellos de los tratamientos BS300 y BS600. Se detectó que estos niveles fueron afectados significativamente ( $p \leq 0.05$ ) por la condición de agua, encontrando que los

organismos de flóculos biológicos sin sustratos presentaron mayores niveles que aquellos cultivados en agua clara y flóculos biológicos con sustratos ( $47.9 \pm 3.5$  mg/g de peso seco,  $36.7 \pm 2.9$  mg/g de peso seco y  $28.2 \pm 2.2$  mg/g de peso seco, respectivamente).

Las concentraciones en carbohidratos totales (Tabla XVI) y glucógeno (Figura 28) de los camarones mantenidos en los tratamientos de flóculos biológicos con sustratos fueron relativamente más altas y significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) de los organismos cultivados en los sistemas de flóculos biológicos sin sustratos, que a su vez fueron significativamente más altas ( $p \leq 0.05$ ) que en los camarones mantenidos en agua clara.



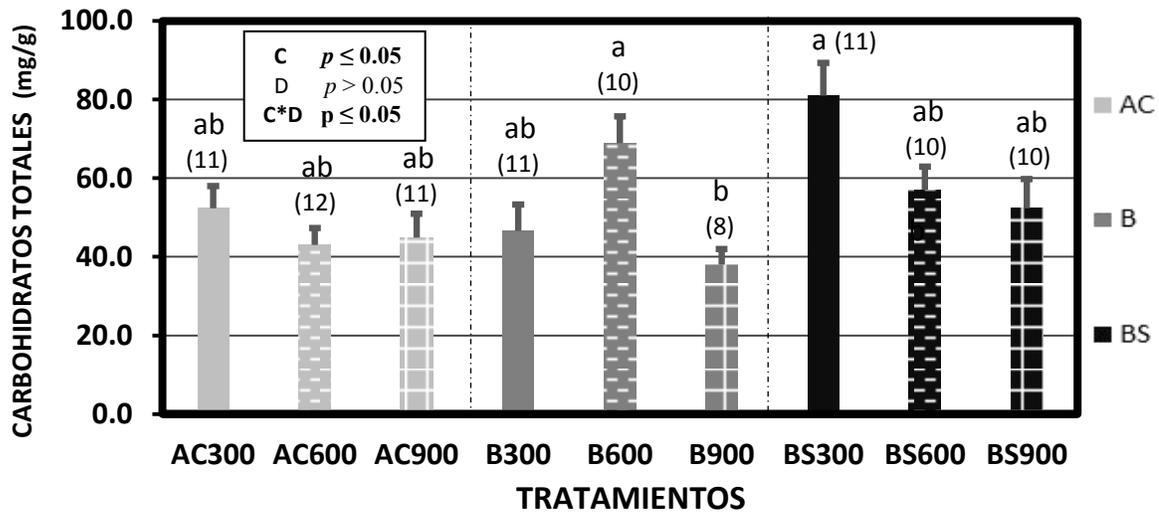
**Figura 28. Concentración de glucógeno en el hepatopáncreas de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados están expresados en peso seco y se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores. El resultado del ANOVA de dos vías se encuentra insertado en la gráfica. Las letras indican grupos significativamente diferentes. El número de muestras se señala entre paréntesis.

**Tabla XVI. Variables metabólicas medidas en el hepatopáncreas de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados están expresados en peso seco y se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto significativo, KW: análisis no-paramétrico de Kruskal-Wallis, Prot.: proteína, Líp.: lípidos, Carb.: carbohidratos. Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. El número de muestras se señala entre paréntesis.

	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300	AC600	AC900	B300	B600	B900	BS300	BS600	BS900	C	D	C*D
	(n = 11)	(n = 12)	(n = 11)	(n = 11)	(n = 10)	(n = 8)	(n = 11)	(n = 10)	(n = 10)			
<b>Prot. totales</b> (mg/g)	523.1 $\pm$ 20.7	532.0 $\pm$ 14.5	555.4 $\pm$ 31.6	502.0 $\pm$ 17.3	491.4 $\pm$ 15.0	564.7 $\pm$ 15.6	548.4 $\pm$ 18.7	555.1 $\pm$ 22.2	554.6 $\pm$ 33.4			
<b>Líp. totales</b> (mg/g)	172.5 $\pm$ 24.3 <sup>abc</sup>	143.8 $\pm$ 11.4 <sup>abc</sup>	234.0 $\pm$ 10.1 <sup>a</sup>	174.6 $\pm$ 21.7 <sup>abc</sup>	195.4 $\pm$ 13.6 <sup>ab</sup>	173.6 $\pm$ 10.9 <sup>ab</sup>	135.3 $\pm$ 14.7 <sup>bc</sup>	107.8 $\pm$ 3.7 <sup>c</sup>	150.1 $\pm$ 21.8 <sup>abc</sup>	<b>K W</b>		
<b>Triglicéridos</b> (mg/g)	45.2 $\pm$ 6.2 <sup>abc</sup>	27.7 $\pm$ 2.3 <sup>bcd</sup>	38.2 $\pm$ 4.8 <sup>abcd</sup>	49.3 $\pm$ 6.5 <sup>ab</sup>	50.4 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	44.6 $\pm$ 5.0 <sup>abc</sup>	27.1 $\pm$ 3.4 <sup>cd</sup>	24.7 $\pm$ 1.7 <sup>d</sup>	34.5 $\pm$ 6.2 <sup>abcd</sup>	•		
<b>Carb. totales</b> (mg/g)	42.0 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>	47.8 $\pm$ 3.0 <sup>bc</sup>	42.4 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>	67.9 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	54.6 $\pm$ 2.5 <sup>abc</sup>	62.1 $\pm$ 4.1 <sup>ab</sup>	67.5 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	76.0 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	76.6 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	•		

**Músculo:**

Los resultados de las variables medidas en el músculo de los camarones expuestos a la condición de hipoxia aguda se muestran en la tabla XVII. Solamente las concentraciones en proteínas totales (Tabla XVII) y carbohidratos totales (Figura 29) mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). En los camarones del tratamiento BS600, se encontró una concentración en proteínas totales significativamente más alta ( $p \leq 0.05$ ) que en los camarones del tratamiento AC600. La concentración en carbohidratos totales de los organismos mantenidos en los tratamientos BS300 y B600 fueron aproximadamente más de dos veces mayores y significativamente más altos que la medida en los camarones del tratamiento B900. La media global observada en los organismos bajo flóculos biológicos con sustratos ( $64.3 \pm 4.6$  mg/g de peso seco) fue significativamente más alta ( $p \leq 0.05$ ) que la observada para los organismos mantenidos en flóculos biológicos sin sustratos y agua clara ( $50.5 \pm 4.1$  mg/g de peso seco y  $46.7 \pm 2.7$  mg/g de peso seco, respectivamente).



**Figura 29. Concentración de carbohidratos totales en el músculo de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados están expresados en peso seco y se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>. C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores. El resultado del ANOVA de dos vías se encuentra insertado en la gráfica. Las letras indican grupos significativamente diferentes. El número de muestras se señala entre paréntesis.

El estatus energético encontrado en los camarones después del estrés agudo de hipoxia se muestra en la tabla XVIII. La concentración en ADP fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en los camarones del tratamiento BS900 respecto a los del tratamiento AC300. Adicionalmente, se observó que los organismos mantenidos a 600 org./m<sup>3</sup> mostraron niveles significativamente menores ( $3.03 \pm 0.09 \mu\text{mol/g}$ ) a los organismos a 900 org./m<sup>3</sup> ( $3.46 \pm 0.11 \mu\text{mol/g}$ ). Con respecto a los niveles de ATP, los organismos mantenidos en el tratamiento B600 tuvieron una concentración significativamente más alta ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con todos los animales de los sistemas de agua clara. La misma tendencia se observó haciendo la suma de los NT, teniendo en los organismos del tratamiento B600 el promedio más alto y significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) de los animales de los tratamientos AC300 y AC600. La

suma de NT se vio afectada por la condición de agua, siendo los organismos mantenidos en flóculos biológicos sin sustratos los que registraron medias globales significativamente mayores ( $p \leq 0.05$ ;  $8.31 \pm 0.22 \mu\text{mol/g}$ ) a las observada en agua clara ( $6.96 \pm 0.23 \mu\text{mol/g}$ ). La CEA mostró niveles significativamente más altos ( $p \leq 0.05$ ) para los organismos mantenidos en flóculos biológicos sin sustratos ( $0.64 \pm 0.01$ ) con respecto a los organismos cultivados en agua clara ( $0.55 \pm 0.02$ ) o bajo flóculos biológicos con sustratos ( $0.58 \pm 0.01$ ). Finalmente para el caso de la Arg-F, la mayor concentración se obtuvo en el músculo de los organismos del tratamiento AC900 y fue significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) a los camarones de los tratamientos B600 y BS600. Se detectó un efecto de la condición de cultivo y la densidad de siembra, siendo que los camarones en agua clara mostraron en promedio niveles significativamente mayores ( $p \leq 0.05$ ) a los mantenidos en flóculos biológicos sin sustratos ( $13.00 \pm 0.95 \mu\text{mol/g}$  y  $9.54 \pm 0.64 \mu\text{mol/g}$ , respectivamente). Los organismos sembrados a  $600 \text{ org./m}^3$  mostraron niveles significativamente menores ( $p \leq 0.05$ ) a los mantenidos a  $300 \text{ org./m}^3$  y  $900 \text{ org./m}^3$  ( $9.62 \pm 0.65 \mu\text{mol/g}$ ,  $11.95 \pm 0.80 \mu\text{mol/g}$  y  $12.41 \pm 1.09 \mu\text{mol/g}$ , respectivamente).

**Tabla XVII. Variables metabólicas medidas en el músculo de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados están expresados en peso seco y se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto significativo, KW: análisis no-paramétrico de Kruskal-Wallis, Prot.: proteínas. Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. El número de muestras se señala entre paréntesis.

	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300 (n = 11)	AC600 (n = 11)	AC900 (n = 11)	B300 (n = 12)	B600 (n = 10)	B900 (n = 10)	BS300 (n = 11)	BS600 (n = 8)	BS900 (n = 10)	C	D	C*D
<b>Prot. totales</b> (mg/g)	694.6 $\pm$ 35.7 <sup>ab</sup>	673.4 $\pm$ 22.1 <sup>b</sup>	757.5 $\pm$ 29.9 <sup>ab</sup>	700.2 $\pm$ 36.5 <sup>ab</sup>	759.9 $\pm$ 42.8 <sup>ab</sup>	759.7 $\pm$ 23.6 <sup>ab</sup>	754.2 $\pm$ 29.6 <sup>ab</sup>	840.3 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>	821.7 $\pm$ 49.0 <sup>ab</sup>	<b>K W</b>		
<b>Glucógeno</b> (mg/g)	7.9 $\pm$ 1.4	6.3 $\pm$ 1.4	6.1 $\pm$ 1.1	7.2 $\pm$ 1.1	8.3 $\pm$ 1.3	7.1 $\pm$ 1.2	9.8 $\pm$ 1.3	5.2 $\pm$ 0.6	6.9 $\pm$ 1.2			
<b>Lactato</b> (mg/g)	0.9 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2			

**Tabla XVIII. Variables energéticas medidas en el músculo de los camarones sometidos a una condición aguda de hipoxia al final del experimento.** Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. AC: agua clara, B: biofloc, BS: biofloc con sustratos, 300: 300 org./m<sup>3</sup>, 600: 600 org./m<sup>3</sup>, 900: 900 org./m<sup>3</sup>, C: factor condición de agua, D: factor densidad de siembra, C\*D: interacción de factores, •: efecto significativo. Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. El número de muestras se señala entre paréntesis.

	AGUA CLARA			BIOFLOC			BIOFLOC CON SUSTRATOS			EFECTO		
	AC300 (n = 3)	AC600 (n = 6)	AC900 (n = 6)	B300 (n = 5)	B600 (n = 6)	B900 (n = 4)	BS300 (n = 6)	BS600 (n = 4)	BS900 (n = 4)	C	D	C*D
<b>AMP</b> ( $\mu$ mol/g)	1.66 $\pm$ 0.16	1.49 $\pm$ 0.03	1.84 $\pm$ 0.11	1.33 $\pm$ 0.06	1.32 $\pm$ 0.08	1.30 $\pm$ 0.07	1.72 $\pm$ 0.08	1.31 $\pm$ 0.08	1.62 $\pm$ 0.07			
<b>ADP</b> ( $\mu$ mol/g)	2.40 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	2.99 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	3.28 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	3.23 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	3.06 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	3.54 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	3.32 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	3.02 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	3.62 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>		•	
<b>ATP</b> ( $\mu$ mol/g)	2.15 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	2.39 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	2.72 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.31 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	4.16 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	3.67 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	2.67 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	3.36 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	3.02 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	•		
<b>NT</b> ( $\mu$ mol/g)	6.20 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	6.86 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>	7.84 $\pm$ 0.15 <sup>abc</sup>	7.87 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>	8.54 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	8.52 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	7.72 $\pm$ 0.13 <sup>abc</sup>	7.69 $\pm$ 0.35 <sup>abc</sup>	8.26 $\pm$ 0.14 <sup>abc</sup>	•		
<b>CEA</b>	0.54 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.01	0.67 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01	•		
<b>Arg-F</b> ( $\mu$ mol/g)	12.04 $\pm$ 1.22 <sup>ab</sup>	11.64 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	14.83 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	10.11 $\pm$ 0.44 <sup>ab</sup>	8.80 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	9.94 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>	13.43 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>	7.82 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	11.47 $\pm$ 0.68 <sup>ab</sup>	•	•	

## 8. DISCUSIÓN.

### 8.1 Calidad de agua

#### a. Desechos nitrogenados

La concentración en desechos nitrogenados durante el experimento estuvo dentro de los niveles recomendados para el cultivo del camarón blanco del Pacífico (Frías-Espericueta y Páez-Osuna, 2001; Lin y Chen, 2003; Cohen *et al.*, 2005). Las altas concentraciones de NAT que se observaron al inicio del bioensayo en los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos provienen del incremento en la concentración de estos compuestos, el cual se presenta usualmente en forma de pico entre 10 y 15 días después de iniciar un sistema de flóculos biológicos (Azim y Little, 2008; Azim *et al.*, 2008; Avnimelech, 2012). Cuando se empezó el bioensayo, el agua empleada en los tratamientos con flóculos biológicos fue tomada de un sistema que tenía 15 días de preparación, por lo que los altos niveles que se reportaron al principio del bioensayo corresponden al decremento del pico mencionado.

El uso de flóculos biológicos permitió mantener buenas condiciones en la calidad de agua. A partir de la tercera semana de experimentación, se evidenció que los flóculos biológicos ayudaron a sostener niveles bajos de NAT en cada una de las densidades experimentadas, aun cuando el recambio de agua fue mínimo. Dicha observación ha sido comúnmente señalada en sistemas con flóculos biológicos y es una comprobación del buen funcionamiento de ellos (Avnimelech, 1999; Krummenauer *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2011; Emerenciano *et al.*, 2013). Asimismo, se observó que los flóculos biológicos fueron más efectivos para mitigar la acumulación de nitritos y nitratos en los tratamientos a las densidades de 600 y 900 org/m<sup>3</sup>, en comparación con los de 300 org/m<sup>3</sup>, en los cuales se observó una ligera acumulación. Dichos resultados sugieren que en los tratamientos de las densidades más elevadas, el carbono orgánico fue agregado en exceso, lo que aseguró que predominara una asimilación heterótrofa del nitrógeno amoniacal y evitó su nitrificación a nitritos y nitratos. Por

el contrario, en la densidad más baja, la cantidad de carbono adicionada pudo haber sido ligeramente deficiente (aunque para las tres densidades se usó la misma fórmula de cálculo), lo que permitió una mayor participación de bacterias nitrificantes que produjeron nitritos y nitratos. Esto concuerda con lo observado por Samocha y colaboradores (2007), así como Gao y colaboradores (2012), quienes intencionalmente agregaron carbono orgánico en exceso en sistemas de flóculos biológicos y observaron menores niveles de nitritos. En el presente trabajo, el exceso de carbono orgánico a altas densidades puede deberse a que la fórmula usada para mantener la relación C:N (20:1) es teórica y se basa en varios supuestos que favorecieron de alguna manera a dichas densidades. La imprecisión de las diferentes fórmulas que se emplean para calcular el carbono orgánico por adicionar fue evidenciada en varios trabajos, donde se observó que en ocasiones hay una predominancia de la asimilación heterótrofa (Ray, 2008; Crab *et al.*, 2010a; Kuhn *et al.*, 2010) o de la nitrificación (Azim y Little, 2008; Nootong *et al.*, 2011; Krummenauer *et al.*, 2014) en función de la disponibilidad de dicho elemento.

En los sistemas de agua clara, se observó la acumulación de nitritos y nitratos, sin detectar previamente altos niveles de amonio. Este resultado quizás se debió a una alta tasa de oxidación del amonio, la cual ocasionó una rápida transformación a nitritos, así como a una menor tasa de oxidación de nitritos, la cual favoreció las elevadas concentraciones de nitritos y nitratos. Al respecto, se ha observado que cambios en la temperatura, oxigenación o movimiento del agua afectan las tasas de oxidación de los compuestos mencionados, lo que puede producir distintos patrones de acumulación de desechos nitrogenados (Boyd y Tucker, 1998). Dado que las bacterias oxidantes de amonio son menos sensibles a cambios ambientales, posiblemente los recambios diarios realizados en los tratamientos de agua clara afectaron principalmente la tasa de oxidación de nitritos y por ello se produjo su acumulación (Yu *et al.*, 2004; Gaona *et al.*, 2013; Sudarno, 2011). Otra posible explicación puede ser que la intensa aireación presente en las unidades experimentales favoreció la transformación

de amonio a nitrito. El incremento simultáneo en las concentraciones de nitritos y nitratos hace suponer que las bacterias oxidantes de nitritos actuaron en cuanto tuvieron un sustrato inorgánico disponible para su metabolismo y no necesitaron de la acumulación de nitritos para desarrollarse. De manera similar, varios trabajos han observado este comportamiento (Bratvold y Browdy, 2001; Azim y Little, 2008; Arnold *et al.*, 2009; Martínez-Antonio, 2014); aunque otros trabajos describen una acumulación de nitratos posterior a la previa acumulación y disminución de nitritos (Boyd, 2007; Ray *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2013). Gross y colaboradores (2003) señalaron que los patrones de acumulación de compuestos nitrogenados varían de acuerdo a la condición experimental, alimentación, densidad de organismos, recambios de agua y manejo de la relación C:N, entre otros. Por último, cabe señalar que las concentraciones de nitritos y nitratos obtenidas al final del experimento no parecen haber afectado el crecimiento de los camarones, si comparamos el peso final de los organismos mantenidos en agua clara a 900 org/m<sup>3</sup> con los cultivados en flóculos biológicos con y sin sustratos a la misma densidad. Al respecto, Lin y Chen (2003), así como Cohen y colaboradores (2005) establecieron que una concentración de nitritos por debajo de aproximadamente 26.0 mg/l, no afecta el crecimiento de *L. vannamei*. Sin embargo, se ha observado que la tolerancia del organismo a este compuesto nitrogenado varía de acuerdo a su peso, la salinidad del agua de cultivo y el tiempo de exposición (Frías-Espericueta y Páez-Osuna, 2001; Gross *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos demostraron que el uso de sustratos artificiales no influyó la concentración de desechos nitrogenados en el agua del cultivo. Las bacterias de los flóculos biológicos y de las paredes de los acuarios parecen haber sido la principal fuente de remoción de los compuestos nitrogenados, lo que concuerda con Anand y colaboradores (2012) y con Schweitzer y colaboradores (2013). En contraste, en otro trabajo se reportó un decremento en los niveles de nitritos al usar simultáneamente flóculos biológicos y sustratos artificiales, aunque la diferencia fue mínima (Asaduzzaman *et al.*, 2008). De la

misma manera, Arnold y colaboradores (2009) observaron menores niveles de NAT, nitritos y nitratos al emplear flóculos y sustratos al mismo tiempo, aunque la relación C:N usada en dicho experimento fue de 12:1. Esta proporción de C:N pudo haber propiciado una menor cantidad de bacterias heterótrofas en los flóculos del agua y permitir que las bacterias nitrificantes desarrolladas sobre los sustratos tuvieran una mayor influencia en la remoción de los desechos.

### **b. Sólidos suspendidos totales**

En los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos, se observó un incremento de SST conforme al aumento de las densidades de organismos experimentadas, lo cual se explica por la mayor cantidad de alimento comercial suministrado y el mayor contenido en carbono orgánico adicionado en dichos tratamientos. Varios trabajos de investigación han reportado una acumulación de SST hacia el final del cultivo, por encima de 700 mg/L (Samocha *et al.*, 2007; Vinatea *et al.*, 2010; Krummenauer *et al.*, 2014). Esto denota la importancia del manejo de ellos en los cultivos con flóculos biológicos, dado que su exceso puede afectar el crecimiento de las especies en cultivo (Liltved y Cripps, 1999; Brune *et al.*, 2003; Hargreaves, 2006).

Los porcentajes de carbohidratos, lípidos y proteínas encontrados en los flóculos biológicos de los tratamientos experimentales coinciden con los reportados en otros trabajos (Emerenciano *et al.*, 2011; Becerra-Dórame *et al.*, 2012; Maicá *et al.*, 2012; Ekasari *et al.*, 2014a). En la presente investigación, la concentración en carbohidratos no cambió a lo largo del cultivo; mientras que la concentración de los lípidos disminuyó en la mitad del experimento y hasta el final del mismo en aproximadamente un 50%. Dicho resultado se debe probablemente a que los flóculos biológicos fueron preparados a la intemperie y permitió el desarrollo de microalgas conformando un sistema foto-heterótrofo. Al iniciar el experimento en condiciones cerradas de laboratorio, la población de microalgas disminuyó, propiciando un sistema principalmente heterótrofo sin gran aporte de lípidos (Emerenciano *et al.*, 2011). Respecto a los porcentajes de

proteínas, se registró una tendencia hacia una mayor concentración de ellas al principio del experimento, aunque no fue diferente en comparación con las observaciones realizadas a la mitad y al final del experimento. Azim y colaboradores (2008) encontraron diferencias significativas en la composición de los flóculos biológicos durante un periodo de 8 semanas de experimentación. Dichos autores reportaron una mayor cantidad de proteínas al inicio del experimento y la menor cantidad de lípidos hacia el final del mismo, lo que coincide con lo observado en el presente estudio.

## **8.2 Desempeño biológico**

El uso de flóculos biológicos favoreció el crecimiento de los organismos desde la segunda semana del bioensayo en todas las densidades experimentales respecto a los animales cultivados en agua clara. De manera particular, el uso de flóculos biológicos junto con sustratos artificiales permitió que el peso final y la tasa semanal de crecimiento de los camarones cultivados a 300 y 600 org/m<sup>3</sup> no fueran diferentes entre ellos pero estadísticamente mayores que los cultivados a 900 org/m<sup>3</sup>. Dicho resultado no es trivial y puede ser interesante para los productores ya que les permite duplicar la densidad de organismos sin afectar el crecimiento. Esta observación no se encontró para los organismos cultivados solamente con flóculos biológicos o en agua clara, lo que muestra que el uso de estas dos tecnologías conjuntamente puede disminuir el efecto adverso de la alta densidad en el crecimiento de los organismos, al menos a las tallas experimentadas en este estudio. Los tratamientos de agua clara no mostraron una buena capacidad para soportar altas densidades; el no observar una diferencia del peso final entre los camarones cultivados a 900 org./m<sup>3</sup> y 600 org./m<sup>3</sup> indica una forma de saturación del sistema a esta última densidad. En contraste, en los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos, se observaron pesos menores a una densidad de 900 org./m<sup>3</sup> pero sin que se pudiera apreciar esta saturación.

Ha sido ampliamente documentado que la densidad de siembra en un cultivo de camarones afecta al crecimiento de los animales (Allan y Maguire, 1992; Arnold *et al.*, 2006; Carvajal-Valdes *et al.*, 2012). Sturmer y Lawrence (1987) reportaron un peso final significativamente mayor en camarones mantenidos en maternización a 500 org./m<sup>2</sup> respecto a aquellos cultivados a una densidad de 1000 org./m<sup>2</sup> después de 42 días de experimentación, utilizando una dieta alta en proteína suplementada con nauplios de *Artemia* y sustratos artificiales. Con un sistema de flóculos biológicos, Krummenauer y colaboradores (2011) no detectaron diferencias significativas en el peso final de organismos cultivados a 150 y 300 org./m<sup>3</sup>, pero ambos pesos fueron significativamente mayores (aproximadamente un 50%) que el de los animales mantenidos a 450 org./m<sup>3</sup>. Asimismo, en un trabajo donde se empleó un sistema de flóculos biológicos con sustratos, se encontró que a densidades de 238 y 473 org./m<sup>3</sup>, el peso final de los organismos solo disminuía en un 10% en los de alta densidad, mientras que sin sustratos, el peso disminuyó un 23% (Schveitzer *et al.*, 2013). Estos últimos dos trabajos muestran también que se puede incrementar la densidad de siembra sin afectar el crecimiento pero hasta cierto límite (Wyban *et al.*, 1988; Van Khoi y Fotedar, 2010; Sookying *et al.*, 2011) como sucedió en el presente estudio.

El peso final de los organismos del presente experimento fue ligeramente menor al observado en otros trabajos. En un estudio, Samocha y colaboradores (2007) lograron hacer crecer postlarvas de *L. vannamei* de 0.0008 g a 2 g en un lapso de 8.5 semanas, a una densidad de 1,830 org./m<sup>3</sup> en un sistema de flóculos biológicos. Asimismo, Wasielesky y colaboradores (2006) empleando también flóculos biológicos obtuvieron un incremento en peso de 1.8 g a 5.4 g en 3 semanas, utilizando una densidad de 880 org./m<sup>3</sup>. Estos notables crecimientos se pueden atribuir a ciertos factores como son la calidad de la postlarva, el uso de un alimento que contiene 45% de proteínas formulado especialmente para esta edad temprana del camarón y condiciones de salinidad más bajas. Cabe señalar que en la presente investigación, no se empleó un alimento

especializado para precría o cultivo superintensivo de camarón y el alimento suministrado contenía 35% de proteínas. De igual manera, la salinidad fue mayor que la de los trabajos mencionados arriba.

A pesar de la diferencia que se encontró en el crecimiento de los camarones del presente estudio *versus* la literatura, se considera que los pesos finales obtenidos son satisfactorios y similares a los reportados en algunos experimentos, como es el caso de Moss y Moss (2004). Estos autores registraron un crecimiento de 0.01 g a 2.10 g en 6 semanas, usando una densidad de 1000 org./m<sup>3</sup> en un sistema con flóculos biológicos y sustratos artificiales. La supervivencia obtenida fue del 93%. De igual manera, Martínez-Antonio (2014) mostró un incremento en el peso de camarones de 0.6 g a 5.3 g en 10 semanas de experimento, empleando una densidad de 300 org./m<sup>3</sup> y en presencia de microbiota en el agua de cultivo. La sobrevivencia reportada por dicho autor fue de aproximadamente 65% y un FCA de 3.

En el presente estudio, los tratamientos de flóculos biológicos con y sin sustratos no mostraron menores FCAs que los tratamientos de agua clara, a diferencia de otros trabajos (Wasielesky *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2009; Megahed, 2010). Dicho resultado se puede atribuir a los ajustes de la ración de alimento que se hicieron semanalmente en función de las biometrías y proyecciones de crecimiento. Las raciones de alimento se calculaban al principio de cada semana en función de la biomasa presente en cada acuario. A una unidad experimental con menor biomasa, se le suministraba menor cantidad de alimento y *vice-versa*. Si se hubieran realizado estos ajustes de una forma menos continua, posiblemente se hubieran detectado diferencias significativas. Es importante mencionar que otros trabajos similares en etapas de maternización y precría han reportado FCAs de entre 0.7 y 1.2. Sin embargo, la alimentación empleada en dichos trabajos contenía un mayor porcentaje de proteínas (entre 40 y 52%) o implicó el uso de charolas de alimentación, lo que facilita la evaluación del alimento consumido (Moss y Moss, 2004; Wasielesky *et al.*, 2006; Godoy *et al.*, 2011). En el presente trabajo, al utilizar un alimento

formulado con un porcentaje de proteína de 35% se pretendía observar la funcionalidad de los flóculos biológicos como un adecuado sustituto de la proteína contenida en el alimento comercial (Megahed, 2010; Xu *et al.*, 2012).

La supervivencia de los organismos no fue influenciada por la aplicación de flóculos biológicos o sustratos artificiales como se ha documentado en otros estudios (Wasielesky *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Schweitzer *et al.*, 2013). Se esperaba una mayor supervivencia en los tratamientos con sustratos y que éstos podían ayudar a mitigar el efecto de las altas densidades. En un trabajo realizado por Otoshi y colaboradores (2006), se observó un ligero incremento de entre 1.5 y 6% (no significativo) en la supervivencia de los camarones, utilizando sustratos a razón de 2.42 m<sup>2</sup> por metro cúbico de estanque y una densidad de 200 org./m<sup>3</sup>. Bratvold y Browdy (2001) señalaron también un incremento del 15% en la supervivencia de camarones, empleando sustratos en su sistema de cultivo (3.4 m<sup>2</sup> de sustratos por metro cúbico de estanque) y una densidad de aproximadamente 680 org/m<sup>3</sup>. Cabe destacar que los dos sustratos colocados en los acuarios del presente trabajo representaban una superficie de 7.2 m<sup>2</sup> por metro cúbico de la unidad experimental.

Por último, cabe mencionar que para el presente estudio, el tratamiento de flóculos biológicos con sustrato y sembrado con camarones a una densidad de 600 org./m<sup>3</sup> presentó el mejor desempeño biológico por su crecimiento y biomasa generada, así como la supervivencia y FCA obtenidos. Esto indica que a 600 org./m<sup>3</sup>, la aplicación de sustratos artificiales en un sistema de flóculos biológicos permite disminuir el efecto adverso que genera la alta densidad. No obstante, a 900 org./m<sup>3</sup> el efecto negativo de la densidad de siembra es tan grande que nulifica el beneficio que los sustratos pudiesen otorgar a los camarones.

### **8.3 Respuesta inmune**

El conteo total de hemocitos y la cuantificación de anión superóxido en la hemolinfa de los camarones no fueron afectados por las diferentes densidades

ni por las condiciones de agua. En un estudio similar, estos dos parámetros inmunológicos no mostraron diferencias significativas entre camarones cultivados con flóculos biológicos generados por diferentes fuentes de carbono y camarones mantenidos en agua clara (Ekasari *et al.*, 2014b). Sin embargo, después de retar los camarones con el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV, por sus siglas en inglés), la concentración de anión superóxido fue mayor en los camarones de los tratamientos con flóculos biológicos, mostrando una mayor capacidad de respuesta del sistema inmune. En cambio, Xu y Pan (2013) observaron un aumento del CTH en organismos cultivados con flóculos biológicos respecto a aquellos mantenidos en agua clara. En este mismo trabajo, se encontró una mayor respuesta fagocítica de los hemocitos de los camarones cultivados con flóculos biológicos, sin observar diferencias significativas en la respuesta bacteriolítica o antibacteriana.

Se esperaba que los flóculos biológicos tuvieran un efecto inmunoestimulante en los camarones dado que este efecto ha sido observado cuando diversos microorganismos (ej. bacterias o levaduras), como los encontrados en flóculos biológicos, han sido incorporados a la dieta o el medio de cultivo de los camarones (Li *et al.*, 2008b; Liu *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012). Aunque el efecto inmunoestimulante no fue observado en los parámetros cuantificados, los flóculos biológicos han podido beneficiar a algunos componentes del sistema inmune (ej. actividad del sistema profenoloxidasa y actividad fagocítica de los hemocitos) (Gullian *et al.*, 2004; Ekasari *et al.*, 2014b) que no fueron medidos en la presente investigación. En este sentido, Tseng y colaboradores (2008) tampoco observaron diferencias significativas en el CTH y la capacidad de los hemocitos en producir anión superóxido después de suministrar a camarones un alimento que contenía *Bacillus subtilis*. Sin embargo, registraron un incremento significativo en la actividad del sistema profenoloxidasa y fagocítica de los hemocitos. En el presente estudio, posiblemente los parámetros analizados resultaron ser poco sensibles para determinar un efecto inmunoestimulante. Se recomienda en un futuro emplear

más componentes del sistema inmune, tanto humorales como celulares, y usar herramientas moleculares para estudiar la expresión de genes que codifican las proteínas involucradas en la actividad inmune. En este sentido, algunos estudios mostraron un incremento de la expresión de genes relacionados al sistema profenoloxidasa en camarones cultivados con flóculos biológicos (Jang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014). Por otro lado, es importante mencionar que los mecanismos de estimulación ejercidos por los flóculos biológicos no han sido aun totalmente esclarecidos (Ekasari *et al.*, 2014b). Dichos flóculos no solo actúan como inmunoestimulantes, sino que pueden propiciar la exclusión competitiva, interrupción de comunicación bacteriana o la generación de compuestos antimicrobianos (Defoirdt *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2008; Crab *et al.*, 2010b, 2012).

#### **8.4 Respuesta fisiológica.**

##### **a. Condiciones de alta densidad y condición de agua**

La presencia de flóculos biológicos mejoró en cierta medida la condición fisiológica de los camarones, siendo una fuente adicional y continúa de alimento para los organismos, lo que les permitió almacenar un excedente energético en forma de glucógeno y carbohidratos en su hepatopáncreas. Martínez-Antonio (2014) registró de igual manera una mayor concentración de glucógeno hepatopancreático en camarones cultivados en presencia de microbiota en comparación con animales mantenidos en agua clara. Algunos trabajos han mostrado que los crustáceos almacenan reservas energéticas (principalmente en forma de glucógeno), una vez satisfechas las necesidades de su metabolismo basal y después de haber dirigido energía hacia su crecimiento (Gibson y Barker, 1979; Chang y O'Connor, 1983; Cuzon *et al.*, 2000). Dichas reservas pueden ser usadas cuando exista una escasez de alimento o en periodo de muda (Smith y Dall, 1991; Cuzon *et al.*, 2004), y otorgan a los crustáceos una mejor capacidad para sintetizar quitina (Omondi y Stark, 1996; Sánchez-Paz *et al.*, 2006). También, aumentan la capacidad de los animales a hacer frente a

condiciones energéticamente demandantes (Nelson y Cox, 2005; Hill *et al.*, 2006), como puede ser un evento de muda (Galindo *et al.*, 2009), una condición estresante provocada por la interacción física de organismos mantenidos a altas densidades (Aguilar *et al.*, 2012), altas temperaturas (Pascual *et al.*, 2003b), disminución de niveles de oxígeno (Pérez-Rostro *et al.*, 2004), persecución (Aparicio-Simón *et al.*, 2010) o una manipulación (Mercier *et al.*, 2006). Duan y colaboradores (2014) observaron una disminución significativa de los niveles de glucógeno hepatopancreático en camarones *L. vannamei* sometidos a un estrés por fatiga natatoria de 10 minutos. Adicionalmente, en la langosta *Nephrops norvegicus* se ha observado cierta relación entre el decremento en la concentración de glucógeno muscular y la condición de estrés causada por la captura (Ridgway *et al.*, 2006).

Por lo anteriormente mencionado, los camarones cultivados con flóculos biológicos del presente estudio, tuvieron probablemente una mejor aptitud a contrarrestar la condición de estrés provocada por las densidades de siembra y parecen haber requerido movilizar menos sustratos energéticos (glucógeno y carbohidratos totales) para el mantenimiento de su homeostasis que los de agua clara. Los resultados de las concentraciones en glucosa plasmática en los camarones cultivados con flóculos biológicos fueron ligeramente menores (promedio global B y BS: 11.8 mg/dl) que las de los animales mantenidos en agua clara (promedio global AC: 14.7 mg/dl), por lo que se puede concluir que fueron menos sensibles a la condición de estrés crónico generado por las densidades. Este punto tiene que ser manejado con cautela ya que la concentración en glucosa plasmática resultó menor solamente para los camarones de los tratamientos B300 y B900 en comparación con los animales del tratamiento AC600. Dado que los flóculos biológicos crean una condición de turbidez en el agua, se puede suponer que ayudan a disminuir la interacción física entre los camarones y posiblemente la percepción del estímulo estresor de densidad. La investigación futura deberá elucidar este tema.

La tendencia de una menor CEA en los organismos mantenidos en agua clara soportan la idea de que los tratamientos sin flóculos biológicos ofrecieron condiciones más estresantes que los tratamientos conteniéndolos; sin embargo, solamente se registró una diferencia significativa entre los tratamientos AC600 y BS900. Martínez-Antonio (2014) observó también valores de CEA inferiores en animales cultivados en agua clara en comparación con aquellos mantenidos en agua con microbiota. Dado que la cuantificación de la CEA es sensible a la captura y manipulación de los organismos (Zamora-Méndez, 2012; Robles-Romo, 2014), posiblemente la falta de significancia estadística se debió al procedimiento de toma de los camarones que pudo haber disminuido los valores para los animales de dichos tratamientos. Cabe mencionar que la captura de camarones fue más laboriosa en las unidades experimentales con flóculos biológicos debido a la turbidez del agua. Los niveles de Arg-F encontrados en los animales de dichos tratamientos también tendieron a ser menores a los observados en camarones cultivados en agua clara. Esta tendencia se puede atribuir al gasto energético de escape que pudieron presentar los organismos durante el muestreo. En este sentido, Zamora-Méndez (2012) mostró una disminución significativa de la CEA y concentración en Arg-F en camarones sujetos al muestreo por atarraya. Por último, cabe mencionar que los niveles de CEA observados en el presente estudio (de 0.52 a 0.71) concuerdan con los valores encontrados por Martínez-Antonio (2014) en condiciones de laboratorio. Sin embargo, fueron menores a los valores observados por Zamora-Méndez (2012) en condiciones óptimas en estanques o por Robles-Romo (2014) en laboratorio.

#### **b. Condición aguda de hipoxia**

Ante una misma condición de agua, el estímulo estresor de hipoxia parece haber afectado de manera diferencial a los camarones provenientes de las densidades 600 y 900 org./m<sup>3</sup>, comparando con los que procedían de los tratamientos de 300 org./m<sup>3</sup>. Este efecto fue principalmente observado en la concentración de hemocianina, la cual fue menor en los camarones de las dos

más altas densidades, haciendo suponer que dichos animales tuvieron una menor capacidad en el transporte de oxígeno a sus tejidos durante el evento de hipoxia. Varios trabajos han reportado una variación en los niveles de hemocianina en crustáceos sometidos a una baja concentración de oxígeno. Gómez-Jiménez y colaboradores (2002) observaron un incremento de la concentración en hemocianina en camarones *L. vannamei* cuando estos fueron previamente mantenidos bajo una hipoxia aguda (0.8 mg/l) por 90 minutos. Por otro lado, Qiu y colaboradores (2011) reportaron un decremento en los niveles de hemocianina del cangrejo *Eriocheir sinensis* mantenido en bajas concentraciones de oxígeno (0.45 mg/l) por dos horas. Una ligera disminución en la concentración de hemocianina, aunque no significativa, fue también registrada en *L. vannamei* al someterlo a hipoxia (2-2.6 mg/L) durante 3 días; no obstante, un incremento significativo de este metabolito fue observado cuando los animales fueron mantenidos a la misma hipoxia por 2 semanas (Racotta *et al.*, 2002). A la fecha, el presente trabajo parece ser el único en el que se determinan los niveles de hemocianina en camarones sometidos a hipoxia aguda bajo distintas densidades de siembra.

Una tendencia hacia un mayor nivel de glucosa plasmática se registró también en los animales provenientes de los tratamientos de 300 org./m<sup>3</sup>, ante una misma condición de agua. El incremento en la concentración de glucosa plasmática ha sido observado en crustáceos sometidos a hipoxia (Santos y Keller, 1993; Zou *et al.*, 1996; Chung y Zmora, 2008; Da Silva-Castiglioni *et al.*, 2010). Dicho incremento puede alcanzar niveles de hasta 3 o 4 veces más que los valores registrados antes del evento de hipoxia (Hall y Van Ham, 1998; Racotta *et al.*, 2002; Soñanez-Organis *et al.*, 2010; Shinji *et al.*, 2012) y esta movilización de glucosa es para satisfacer la demanda de sustratos para la glucólisis anaerobia, dando como producto final el lactato (Taylor y Whiteley, 1989; Nelson y Cox, 2005; Hill *et al.*, 2006). En el presente estudio, la tendencia observada a nivel de glucosa plasmática hace suponer que los organismos provenientes de la menor densidad de siembra fueron más susceptibles a la

hipoxia. Una explicación a los menores niveles de glucosa en los animales de los tratamientos de 600 y 900 org./m<sup>3</sup> podría estar basada en que los animales estuvieron más “familiarizados” con una condición estresante de alta densidad durante las ocho semanas del bioensayo. Posiblemente durante este periodo, los mecanismos fisiológicos de los organismos se mantuvieron constantemente activos para tratar de mantener una homeostasis, lo que les confirió una mayor capacidad para hacer frente a estímulos estresores posteriores.

Otra respuesta fisiológica muy característica ante una condición de hipoxia es el incremento en los niveles de lactato plasmático. Soñanez-Organis y colaboradores (2010) observaron que en *L. vannamei* sometidos a una hipoxia aguda (1.5 mg/l, por 1 y 24 horas), la concentración de lactato incrementó al doble de los niveles observados bajo condiciones de normoxia. De manera similar, Duan y colaboradores (2014) registraron una concentración de lactato plasmático 3 veces mayor en camarones mantenidos bajo hipoxia (1.9 mg/l) por 5 días, en comparación a organismos que no fueron sometidos a esta condición de estrés. En la jaiba *Callinectes sapidus*, se encontró que la aplicación de un estrés de hipoxia aguda (0.5 mg/l) por 1 hora provocó que los niveles de lactato incrementaran hasta 10 veces (Chung y Zmora, 2008). De manera general, los camarones peneidos no poseen una gran capacidad fisiológica para soportar bajas concentraciones de oxígeno disuelto y cuentan con una limitada capacidad energética anaerobia (Rosas *et al.*, 1998; Racotta *et al.*, 2001; Mugnier *et al.*, 2008), siendo la concentración de oxígeno disuelto uno de los factores críticos en los cultivos de camarón. En la presente investigación, se vio claramente la activación del metabolismo anaerobio ya que los niveles de lactato incrementaron entre dos y seis veces más, comparando con las concentraciones registradas en los camarones antes de la hipoxia.

Los camarones cultivados con flóculos biológicos mostraron niveles de glucógeno y carbohidratos hepatopancreáticos mayores a los observados en organismos mantenidos en agua clara, como se mencionó anteriormente para los camarones muestreados previo al estímulo estresor de hipoxia. De manera

comparativa, los valores de glucógeno encontrados en los camarones muestreados antes y después de aplicar la hipoxia fueron semejantes, lo que puede indicar que la duración e intensidad del estrés no fue suficiente para que los organismos recurrieran a estas reservas energéticas para satisfacer la demanda. Esta observación también fue encontrada por Aparicio-Simón (2009), quien no observó diferencias en los niveles de carbohidratos en músculo y hepatopáncreas de *L. vannamei* sometidos a una hipoxia aguda intensa (1.0 mg/l) de distintas duraciones (10, 30, 60, 120, 240 y 480 minutos). Al parecer, la movilización de las reservas de glucógeno y carbohidratos depende de varios factores como son intensidad del estresor, la especie y las condiciones en las que son mantenidos los organismos. Cabe mencionar que otros trabajos han observado la disminución de carbohidratos o glucógeno muscular y hepatopancreático en diversos crustáceos por efecto de una hipoxia (Gäde, 1984; Pérez-Rostro *et al.*, 2004; Abe *et al.*, 2007).

Finalmente, se observó de igual manera una tendencia en valores de CEA ligeramente mayores en organismos mantenidos con flóculos biológicos respecto a los cultivados en agua clara, sin que se pudieran apreciar diferencias significativas. Se puede suponer que la CEA no es un indicador sensible a una condición aguda de hipoxia que tuvo una breve duración de 20 minutos. De forma comparativa, el efecto de la hipoxia sobre la CEA y concentración de Arg-F resultó en una ligera disminución de ambos indicadores energéticos en comparación a los valores observados en condiciones de normoxia. Cabe señalar que la respuesta no fue homogénea para todos los tratamientos y algunos mostraron un ligero incremento, situación que denota la irregularidad que puede existir en la respuesta fisiológica de estos indicadores ante condiciones estresantes. Esta observación fue señalada por Ivanovici (1980a) y Marazza y colaboradores (1996). A pesar de esta variabilidad, se ha establecido que las reservas de Arg-F disminuyen bajo condiciones estresantes, permitiendo a los organismos mantener altos niveles de CEA y ATP (Ellington, 2001; Abe *et al.*, 2007; Hand y Holman, 2009).

## 9. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente estudio son las siguientes:

- El uso de sistemas de flóculos biológicos con y sin sustratos permitió mantener una mejor calidad de agua en los tratamientos a altas densidades.
- El uso de flóculos biológicos con sustratos permitió duplicar la densidad de organismos de 300 a 600 org./m<sup>3</sup> sin afectar el crecimiento, supervivencia, FCA, TSC, y obteniendo el doble de la biomasa.
- El uso de sistemas de flóculos biológicos con y sin sustratos parece aminorar el efecto del estrés por altas densidades, ya que los camarones mostraron mayores niveles de CEA. Ante la condición de hipoxia aguda, el mismo efecto fue observado en los tratamientos de flóculos biológicos sin sustratos.
- Los camarones mantenidos en los tratamientos con flóculos biológicos con y sin sustratos sometidos a altas densidades e hipoxia aguda mostraron mayores niveles de carbohidratos y glucógeno en hepatopáncreas, lo que les otorga una mayor capacidad de respuesta ante condiciones energéticamente demandantes.
- Ante un estrés de hipoxia aguda, los animales mantenidos en los sistemas de flóculos biológicos con sustratos mostraron una concentración de lactato y glucosa en hemolinfa significativamente menor, lo que muestra una menor susceptibilidad a la condición de estrés.
- Los animales mantenidos a una densidad de 300 org./m<sup>3</sup> mostraron una mayor capacidad de respuesta a la hipoxia aguda, al tener niveles de hemocianina significativamente mayores en comparación con los camarones de densidades 600 y 900 org./m<sup>3</sup>.
- De acuerdo a la metodología empleada en el presente trabajo, el uso de sistemas de flóculos biológicos, con y sin sustratos, no parece haber favorecido la capacidad de respuesta inmune de los camarones cultivados

a altas densidades. Sin embargo, es necesario considerar el uso de metodologías alternas para elucidar este punto.

## 10. RECOMENDACIONES

Como adecuaciones al diseño experimental del presente trabajo y perspectivas futuras, se propone lo siguiente:

- Incluir un tratamiento que provea a los camarones de un ambiente de cultivo fotoautótrofo o de “agua verde”. Sería interesante comparar su efecto con los sistemas de flóculos biológicos, dado que presentan cualidades diferentes en términos de calidad de agua y aporte nutricional.
- Incrementar la densidad de siembra a 1,500-2,000 org./m<sup>3</sup> ya que esta densidad es similar a las empleadas en precrías comerciales y tratar de definir la capacidad de carga de las unidades experimentales ante la aplicación de los flóculos biológicos y sustratos artificiales.
- Emplear un alimento especializado de precria intensiva en sustitución del alimento de cultivo semi-intensivo para la alimentación de los camarones, con el objetivo de lograr un mayor crecimiento y un mayor aprovechamiento del alimento.
- Buscar reducir la relación C:N empleada durante el experimento para evitar la sobreproducción de SST, verificando su efecto sobre la calidad del agua.
- Para realizar un análisis más profundo del efecto de los flóculos biológicos sobre el sistema inmune del camarón, se recomienda medir diferentes componentes del sistema inmune, así como la expresión de genes involucrados en dicho sistema. Adicionalmente se podría realizar un reto bacteriano o viral y medir el efecto de los flóculos sobre la respuesta de los organismos.
- Previo al inicio del experimento, probar varios sustratos artificiales y emplear aquel que sea más propicio para el desarrollo del perifiton.
- Cuantificar a lo largo del cultivo, el efecto del uso de los flóculos biológicos sobre la alcalinidad del agua, puesto que se ha observado que esta disminuye con el transcurso del cultivo.

## 11. LITERATURA CITADA

- Abe, H., S. Hirai, y S. Okada. 2007. Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 146(1):40-46.
- Aguilar, V., I. Racotta, E. Goytortúa, M. Wille, P. Sorgeloos, R. Civera, y E. Palacios. 2012. The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquaculture Nutrition*. 18(3):258-271.
- Allan, G.L. y G.B. Maguire. 1992. Effects of stocking density on production of *Penaeus monodon* Fabricius in model farming ponds. *Aquaculture*. 107(1):49-66.
- Anand, P., S. Kumar, A. Panigrahi, T.K. Ghoshal, J. Dayal, G. Biswas, J.K. Sundaray, D. De, R. Raja, A. D. Deo, S.M. Pillai, y P. Ravichandran. 2012. Effects of C:N ratio and substrate integration on periphyton biomass, microbial dynamics and growth of *Penaeus monodon* juveniles. *Aquaculture International*. 21(2):511-524.
- Aparicio-Simón, B. 2009. Respuestas neuroendocrina y metabólica de estrés por manipulación e hipoxia en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 106 p.
- Aparicio-Simón, B., M. Piñón, R. Racotta, y I. S. Racotta. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture*. 298(3-4):308-314.

- Aragón-Noriega, E., J. Córdova-Murueta, C. Arámburu-Adame, y H. Trías-Hernández. 1999. Precría intensiva de camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) a bajas temperaturas. *Revista de Investigaciones Marinas*. 20(1-3):89-93.
- Arnold, S.J., M.J. Sellars, P.J. Crocos, y G.J. Coman. 2006. An evaluation of stocking density on the intensive production of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*). *Aquaculture*. 256(1-4):174-179.
- Arnold, S.J., F.E. Coman, C.J. Jackson, y S.A. Groves. 2009. High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: an evaluation of artificial substrates and stocking density. *Aquaculture*. 293(1-2):42-48.
- Arredondo-Figueroa, J. 2002. El cultivo de camarón en México, actualidades y perspectivas. *Contactos*. 43:41-54.
- Arredondo-Vega, B. y D. Voltolina. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Primera edición. La Paz, México. 97 p.
- Asaduzzaman, M., M.A. Wahab, M.C.J. Verdegem, S. Huque, M.A. Salam, y M.E. Azim. 2008. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture*. 280(1-4):117-123.
- Atkinson, D. y G. Walton. 1967. Adenosine triphosphate in metabolic regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 242:3239-3241.
- Avnimelech, Y., M. Kochva, y S. Diab. 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. 46:119-131.

- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. 176(3-4):227-235.
- Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*. 264(1-4):140-147.
- Avnimelech, Y., M.C.J. Verdegem, M. Kurup, y P. Keshavanath. 2008. Sustainable land-based aquaculture : rational utilization of water, land and feed resources. *Mediterranean Aquaculture Journal*. 1(1):45-54.
- Avnimelech, Y. 2012. *Biofloc technology - A practical guide book*. The World Aquaculture Society. Segunda Edición. Baton Rouge, USA. 272 p.
- 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):29-35.
- Azim, M.E., D.C. Little, y J.E. Bron. 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology*. 99(9):3590-3599.
- Babior, B. 1984. The Respiratory burst of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 73(3):599-601.
- Bachère, E., E. Mialhe, y J. Rodríguez. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. *Fish and Shellfish Immunology*. 5(8):597-612.
- Bachère, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191(1-3):3-11.

- Bachère, E., D. Destoumieux, y P. Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*. 191(1-3):71-88.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M. González, J. De Lorgeril, J. Garnier, y B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*. 198(1):149-168.
- Barnes, H. y J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for 'total' lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 12(1): 103-118.
- Becerra-Dórame, M., M. Martínez-Porchas, L. Martínez-Córdova, M. Rivas-Vega, A. López-Elías, y M. Porchas-Cornejo. 2012. Production response and digestive enzymatic activity of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) intensively pregrown in microbial heterotrophic and autotrophic-based systems. *The Scientific World Journal*. 2012:1-6.
- Becerra-Dórame, M., L. Martínez-Córdova, M. Martínez-Porchas, J. Hernández-López, J. López-Elías, y F. Mendoza-Cano. 2014. Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. *Aquaculture Research*. 45(5):944-948.
- Bligh, E.G. y W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(8):911-917.
- Bosma, R.H. y M.C.J. Verdegem. 2011. Sustainable aquaculture in ponds: principles, practices and limits. *Livestock Science*. 139(1-2):58-68.

- Boyd, C. 2007. Nitrification important process in aquaculture. *Global Aquaculture Advocate*. 10(3):64-66.
- Boyd, C. y C. Tucker. 1998. *Pond aquaculture water quality management*. Springer. Primera Edición. New York, USA. 700 p.
- Bratvold, D. y C.L. Browdy. 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*. 195(1-2):81-94.
- Bridson, P. y I. Tetrault. 2010. *Seafood report. Farmed Pacific white shrimp*. Monterey Bay Aquarium. México. 82 p.
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R. Subasinghe, y M. Phillips. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO RAP publication 10. Bangkok, Tailandia. 32 p.
- Brown, R., K. Jarvis, y K. Hyland. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry*. 180(1):136-139.
- Brugère, C. y N. Ridler. 2004. *Global aquaculture outlook in the next decades: an analysis of national aquaculture production forecasts to 2030*. FAO Fisheries Circular 1001. Roma, Italia. 47 p.
- Brune, D., G. Schwartz, A.G. Eversole, J.A. Collier, y T.E. Schwedler. 2003. Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic systems. *Aquacultural Engineering*. 28(1-2):65-86.

- Burford, M., P.J. Thompson, R.P. McIntosh, R.H. Bauman, y D.C. Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*. 219(1-4):393-411.
- Burford, M., 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.
- Burge, E.J., D.J. Madigan, L.E. Burnett, y K.G. Burnett. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish and Shellfish Immunology*. 22(4):327-339.
- Burnett, L. y W. Stickle. 2001. Physiological responses to hypoxia. En: Rabalais, N. y R. Turner (eds.). *Coastal hypoxia: consequences for living resources and ecosystems*. American Geophysical Union. Washington, USA. 463 p.
- Carvajal-Valdes, R., E. Arjona, y G. Bueno. 2012. Feeding rate and stocking density in semi-intensive *Litopenaeus vannamei* culture with moderate periodic fertilization. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 7(11):899-904.
- Cerenius, L., B.L. Lee, y K. Söderhäll. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*. 29(6):263-271.
- Cerenius, L., P. Jiravanichpaisal, H.P. Liu, y I. Söderhäll. 2010. Crustacean immunity. En: Söderhäll, K. (ed.). *Invertebrate immunity*. Springer. New York, USA. 316 p.
- Chang, E. y J. O'Connor. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. En: Mantel, L.H. (ed.). *The Biology of Crustacea: 5. Internal anatomy and physiological regulation*. Academic Press. New York, USA. 263-287 p.

- Chen, J., C. Chen, y S. Cheng. 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Marine Ecology Progress Series*. 110(1):85-94.
- Chen, J.C. y S. Cheng. 1995. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Journal of Comparative Physiology B*. 164(7):530-535.
- Cheng, W., C.H. Liu, C.M. Kuo, y J.C. Chen. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 18(1):1-12.
- Chrousos, G.P. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews. Endocrinology*. 5(7):374-381.
- Chung, J. y N. Zmora. 2008. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus* - the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. *The FEBS Journal*. 275(4):693-704.
- Claybrook, D.L. 1983. Nitrogen metabolism. En: Mantel, L. H. (ed.). *The Biology of Crustacea: 5. Internal anatomy and physiological regulation*. Academic Press. New York, USA. 163-213 p.
- 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(3-4):425-442.

- CONAPESCA. 2005. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2005. Mazatlán, México. 400 p.
- CONAPESCA. 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011. Mazatlán, México. 305 p.
- Crab, R., B. Chielens, M. Wille, P. Bossier, y W. Verstraete. 2010a. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*. 41(4):559-567.
- Crab, R., Lambert, T. Defoirdt, P. Bossier, y W. Verstraete. 2010b. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology*. 109(5):1643-1649.
- Crab, R., T. Defoirdt, P. Bossier, y W. Verstraete. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 356-357(1):351-356.
- Cuzon, G., C. Rosas, G. Gaxiola, G. Taboada, y A. Van Wormhoudt. 2000. Utilization of carbohydrates by shrimp. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M, Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Mérida, México. 328-339 p.
- Cuzon G., A. Lawrence, G. Gaxiola, C. Rosas, y J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*. 235(1-4): 513-551.
- Da Silva-Castiglioni, D., G. Oliveira, y L. Backup. 2010. Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda,

- Parastacidae) to hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 156(4):436-444.
- Dall, W., J. Hill, P. Rothlisberg, y D. Staples. 1990. The biology of penaeidae. En: Blaxter, J., Southward A. (eds.). *Advances in Marine Biology*. Academic Press. Nueva York, USA. 489 p.
- De Schryver, P., R. Crab, T. Defoirdt, N. Boon, y W. Verstraete. 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*. 277(3-4):125-137.
- Defoirdt, T., D. Halet, H. Vervaeren, N. Boon, T. Van De Wiele, P. Sorgeloos, P. Bossier, y W. Verstraete. 2007. The bacterial storage compound poly-beta-hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology*. 9(2):445-452.
- Destoumieux-Garzón, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodríguez, P. Bulet, M. Comps, y E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*. 113(3):461-469.
- Destoumieux-Garzón, D., D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet, y E. Bachère. 2001. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(50):47070-47077.
- DeWalt, B., J. Ramírez-Zavala, L. Noriega, y R. González. 2002. Shrimp aquaculture, the people and the environment in coastal México. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO consortium program on shrimp farming and the environment. Pittsburgh, USA. 73 p.

- Duan, Y., X. Zhang, X. Liu, y D. Thakur. 2014. Effect of dissolved oxygen on swimming ability and physiological response to swimming fatigue of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Ocean University of China. 13(1):132-140.
- DuBois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28(3):350-356.
- DuRant, E., J. Haveman, J. Brunson, y J. Leffler. 2011. Wadell mariculture center continues research on biofloc-based shrimp culture. The Global Aquaculture Advocate. 14(3):28-30.
- Ebeling, J.M., M.B. Timmons, y J.J. Bisogni. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture. 257(1-4):346-358.
- Ekasari, J., D. Angela, S.H. Waluyo, T. Bachtiar, E.H. Surawidjaja, P. Bossier, y P. De Schryver. 2014a. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. Aquaculture. 426-427:105-111.
- Ekasari, J., M. Azhar, E.H. Surawidjaja, S. Nuryati, P. Bossier, y P. De Schryver. 2014b. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. Fish and Shellfish Immunology. 41(2):332-339.
- Ellington, W.R. 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Annual Review of Physiology. 63(1):289-325.
- Emerenciano, M., E.L. Ballester, R.O. Cavalli, y W. Wasielesky. 2011. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp

*Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture International*. 19(5):891-901.

Emerenciano, M., G. Gaxiola, y G. Cuzon. 2013. Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. En: Darko-Matovik M. (ed.). *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. InTech Publisher. Rijeka, Croatia. 302-328 p.

FAO. 2003. Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (*Penaeus vannamei*) hatcheries in Latin America. FAO Fisheries Technical Paper. No. 450. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 62 p.

FAO. 2006. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es)

FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura - 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 209 p.

FAO, WFP e IFAD. 2012. The state of the food insecurity in the world. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 62 p.

FAO. 2014. Worldwide shortfall of farmed shrimp supply, record high export prices and lesser imports in traditional markets for 2013. Shrimp market report - March 2014. <http://www.globefish.org/shrimp-april-2014.html>

Fast, A. y L. Lester. 1992. Marine shrimp culture: principles and practices. Elsevier. Primera Edición. Amsterdam, Holanda. 862 p.

- Fotedar, S. y L. Evans. 2011. Health management during handling and live transport of crustaceans: a review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 106(1):143-152.
- Frías-Espericueta, M. y F. Páez-Osuna. 2001. Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones. En: Páez-Osuna F. (ed.). *Camaronicultura y Medio Ambiente*. El Colegio de Sinaloa. Primera Edición. México, D.F. 253-276 p.
- Furtado, P., L. Poersch, y W. Wasielesky. 2011. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*. 321(1-2):130-135.
- Gäde, G. 1984. Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology*. 77(3):495-502.
- Galindo, C., G. Gaxiola, G. Cuzon, y X. Chiappa-Carrara. 2009. Physiological and biochemical variations during the molt cycle in juvenile *Litopenaeus vannamei* under laboratory conditions. *Journal of Crustacean Biology*. 29(4):544-549.
- Gao, L., H. Shan, T. Zhang, W. Bao, y S. Ma. 2012. Effects of carbohydrate addition on *Litopenaeus vannamei* intensive culture in a zero-water exchange system. *Aquaculture*. 342-343(1):89-96.
- Gaona, C., P. Furtado, F. Serra, L. Poersch, y W. Wasielesky. 2013. Suspended solids effects in shrimp biofloc systems. *The Global Aquaculture Advocate*. 16(6):38-39.
- Gervais, N. y T. Zeigler. 2014. Hyper-intensive nursery systems offer advantages for shrimp culture. *Global Aquaculture Advocate*. 17(1):26-29.

- Gibson, R. y P. Barker. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review*. 17:285-346.
- Gilles, R. 1977. Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology*. 56(2):109-114.
- Gillett, R. 2008. Global study of shrimp fisheries. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Technical paper 475. Roma, Italia. 331 p.
- Godoy, L.C., C. Odebrecht, E. Ballester, T.G. Martins, y W. Wasielesky. 2011. Effect of diatom supplementation during the nursery rearing of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a heterotrophic culture system. *Aquaculture International*. 20(3):559-569.
- Gómez-Jiménez S., M. Lugo-Sánchez, A. Guzmán-Partida, G. García-Sánchez, y R. Barraza-Guardado. 2002. Nitrogen and anaerobic metabolism and hemocyanin levels in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to short-term hypoxia. En: Thurston, R. (ed.). *Proceedings of the sixth international symposium on fish physiology, toxicology, and water quality*. U.S. Environmental protection agency. Athens, USA. 21-29 p.
- Gross, A., A. Nemirovsky, D. Zilberg, A. Khaimov, A. Brenner, E. Snir, Z. Ronen, y A. Nejidat. 2003. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. *Aquaculture*. 223(1-4):51-62.
- Gross, A., S. Abutbul, y D. Zilberg. 2004. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35(3):315-321.

- Gulec, A. y O. Aksu. 2012. Effects of handling on physiological profiles in turkish crayfish, *Astacus leptodactylus*. World Journal of Fish and Marine Sciences. 4(6):684-688.
- Gullian, M., F. Thompson, y J. Rodríguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 233(1-4):1-14.
- Gyalog, G., L. Váradi, y D. Gál. 2011. Is intensification a viable way for pond culture in central and eastern Europe? International Journal of the Bioflux Society. 4(5):584-589.
- Hall, M. y E. Van 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.
- Hargreaves, J. y C. Tucker. 2004. Managing ammonia in fish ponds. Southern Regional Aquaculture Center. Stoneville, USA. Publication 4603. 7 p.
- Hargreaves, J.A. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacultural Engineering. 34(3):344-363.
- Hargreaves, J.A. 2013. Biofloc production systems for aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. Stoneville, USA. Publication 4503.12 p.
- Haslun, J., E. Correia, K. Strychar, T. Morris, y T. Samocha. 2012. Characterization of bioflocs in a no water exchange super-intensive system for the production of food size Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. International Journal of Aquaculture. 2(6):29-39.

- Hawkes, C. 2006. Uneven dietary development: linking the policies and processes of globalization with the nutrition transition, obesity and diet-related chronic diseases. *Globalization and Health*. 2:4.
- Hernández-López, J., y F. Vargas-Albores. 2003. A microplate technique to quantify nutrients ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) in seawater. *Aquaculture Research*. 34(13):1201-1204.
- Hill, R., G. Wyse, y M. Anderson. 2006. *Fisiología animal*. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. Madrid, España. 655 p.
- Hochachka, P. y G. Somero. 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press. Primera Edición. Oxford, Inglaterra. 466 p.
- Holman, J.D. y S.C. Hand. 2009. Metabolic depression is delayed and mitochondrial impairment averted during prolonged anoxia in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt, 1935). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 376(2):85-93.
- Hsieh, S.L., Y.H. Ruan, Y.C. Li, P.S. Hsieh, C.H. Hu, y C.M. Kuo. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*. 275(1-4):335-341.
- Hose J.E., G. Martin, V. Nguyen, J. Lucas, y T. Rosenstein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. *The Biological Bulletin*. 173(1):178-187.
- Ivanovici, A.M. 1980a. Application of adenylate energy charge to problems of environmental impact assessment in aquatic organisms. *Helgoland Marine Research*. 33(1):556-565.

- Ivanovici, A.M. 1980b. The adenylate energy charge in the estuarine mollusc *Pyrazus ebenius*. laboratory studies of responses to salinity and temperature. *Comparative Biochemical Physiology - Part A: Physiology*. 66(1):43-55.
- Jang, I.K., Z. Pang, J. Yu, S.K. Kim, H.C. Seo, y Y.R. Cho. 2011. Selectively enhanced expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *BMC Immunology*. 12(1):70.
- Johansson, M.W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana, y K. Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191(1-3):45-52.
- Johansson, M.W. y K. Söderhäll. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*. 5(6):171-176.
- Kim, S.K., Z. Pang, H.C. Seo, Y.R. Cho, T. Samocha, y I.K. Jang. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*. 45(2):362-371.
- Kearney, J. 2010. Food consumption trends and drivers. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences*. 365(1554):2793-2807.
- Kent, M., C.L. Browdy, y J.W. Leffler. 2011. Consumption and digestion of suspended microbes by juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 319(3-4):363-368.
- Kitani, H. 1986. Larval development of the White shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931 reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 52:1131-1139.

- Kongnum, K. y T. Hongpattarakere. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish and Shellfish Immunology. 32(1):170-177.
- Krummenauer, D., S. Peixoto, R. Cavalli, L. Poersch, y W. Wasielesky. 2011. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern brazil at different stocking densities. Journal of the World Aquaculture Society. 42(5):726-733.
- Krummenauer, D., T. Samocha, L. Poersch, G. Lara, y W. Wasielesky. 2014. The reuse of water on the culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. Journal of the World Aquaculture Society. 45(1):3-14.
- 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.
- Le Moullac, G., G. Le Groumellec, M. Ansquer, D. Froissard, S. Levy, y P. Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology. 7(4):227-234.
- Le Moullac, G., C. Soyeze, D. Saulnier, D. Ansquer, J.C. Avarre, y P. Levy. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish and Shellfish Immunology. 8(8):621-629.
- Le Moullac, G. y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture. 191(1-3):121-131.

- Lesser, M. 2006. Oxidative stress in marine environment: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*. 68:253-278.
- Li, C.C., S.T. Yeh, y J.C. Chen. 2008a. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish and Shellfish Immunology*. 25(6):853-860.
- Li, J., B. Tan, K. Mai, Q. Ai, Q. Zhang, Z. Liufu, y W. Xu. 2008b. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 39(4):477-489.
- Lightner, D. V. 2011. Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. En: Bondad-Reantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. y Aoki T. (eds.). *Diseases in Asian aquaculture VII*. Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 121-133.
- Liltved, H. y S.J. Cripps. 1999. Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquaculture Research*. 30(6):445-450.
- Liu, C.H. y J.C. Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 16(3):321-334.
- Liu, K.F., C.H. Chiu, Y.L. Shiu, W. Cheng, y C.H. Liu. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*. 28(5-6):837-844.
- Lin, Y.C. y J.C. Chen. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*. 224(1-4):193-201.

- Liu, H. y L. Wang. 1998. On the ultrastructure and classification of the hemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). 16(4):333-338.
- Lowry, O.H., N. Rosebrough, A. Farr, y R. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry.193(1): 265-275.
- Lucas, A. 1996. Bioenergetic of aquatic animals. Taylor and Francis. Primera Edición. London, Inglaterra. 169 p.
- Luo, G., Y. Avnimelech, Y. Pan, y H. Tan. 2013. Inorganic nitrogen dynamics in sequencing batch reactors using biofloc technology to treat aquaculture sludge. Aquacultural Engineering. 52:73-79.
- Maicá, P., M. de Borba, y W. Wasielesky. 2012. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. Aquaculture Research. 43(3):361-370.
- Magallón-Barajas, F.J., H. Villarreal-Colmenares, F. Arcos-Ortega, S. Avilés-Quevedo, R. Civera-Cerecedo, P. Cruz-Hernández, A. González-Becerril, V. Gracia-López, A. Hernández-Llamas, J. Hernández-López, A. M. Ibarra-Humphries, C. Lechuga-Devèze, J.M. Mazón-Suáztegui, A.F. Muhlia-Melo, J. Naranjo-Páramo, R. Pérez-Enríquez, M. Porchas-Cornejo, G. Portillo-Clark y J.C. Pérez-Urbiola. 2007. Orientaciones estratégicas para el desarrollo sustentable de la acuicultura en México. Publicaciones especiales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Cámara de Diputados. LX Legislatura. La Paz, México. 256 p.

- Marazza, D., P. Bornens, y Y. Le Gal. 1996. Effect of ammonia on survival and adenylate energy charge in the shrimp *Palaemonetes varians*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 34(2):103-108.
- Marsh, J.B. y D.B. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 7(4):574-576.
- Martin, G.G., J. Hose, S. Omori, C. Chong, T. Hoodbhoy, y N. McKrell. 1991. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Comparative Biochemistry*. 100(3): 517-522.
- Martínez-Antonio, E. 2014. 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 de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México. 113 p.
- Martínez-Córdova, L. 1994. Camaronicultura: bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. Editorial AGT, México, D.F. 233 p.
- Martínez-Córdova, L., M. Martínez-Porchas, y E. Cortés-Jacinto. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante?. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25(3):181-196.
- McIntosh, R. 2000. Changing paradigms in shrimp farming: V. establishment of heterotrophic bacterial communities. *The Global Aquaculture Advocate*. 3(6): 52-54.
- Mcneil, R. 2000. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. *The Global Aquaculture Advocate*. 3(6):72-76.

- Megahed, M. 2010. The effect of microbial biofloc on water quality , survival and growth of the green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* ) fed with different crude protein levels. I: sustainable solution to the dependency on fish oil , fishmeal and environmental problems. The Journal of the Arabian Aquaculture Society. 5(2):119-142.
- Mendoza, R. 1992. Etude de la vitellogenèse et de sa stimulation chez les crevettes péneidés par des facteurs hétérologues et homologues. Tesis de Doctorado. Université de Bretagne Occidentale. Brest, Francia. 200 p.
- Mercier, L., E. Palacios, A. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramirez, R. Hernández-Herrera, y I. Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture. 258(1-4):633-640.
- Mercier, L., I. Racotta, G. Yépiz-Plascencia, A. Muhlia-Almazán, R. Civera, M. Quiñones-Arreola, M. Wille, P. Sorgeloos, y E. Palacios. 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. Aquaculture Research. 40(16):1849-1863.
- Moal, J., J. Le Coz, J. Samain, y J. Daniel. 1989. Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Comparative Biochemistry. 93(2): 307-316.
- Molina-Poveda, C. y H. Villarreal-Colmenares. 2008. Estrategias de alimentación en la etapa de engorda del camarón. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., CYTED y PRONACA. La Paz, México. 110 p.

- Monroy-Dosta, M., R. Lara-Andrade, J. Castro-Mejia, G. Castro-Mejia, y M. Emerenciano. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 48(3):511-520.
- Morris, A. y P. Riley. 1963. The determination of nitrate in sea water. *Analytica Chimica Acta*. 29(C):272-279.
- Moss, K. y S. Moss. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35(4):536-542.
- Mugnier, C. y C. Justou. 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 309(1):35-46.
- Mugnier, C., E. Zipper, C. Goarant, y Lemonnier, H. 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(2):398-407.
- Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. Van Der Knaap, E. Mialhe, y E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191(1-3):89-107.
- Muñoz, M., F. Vandebulcke, D. Saulnier, y E. Bachère. 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *European Journal of Biochemistry*. 269(11):2678-2689.

- NACA. 2012. Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS). Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific. Bangkok, Thailand. 131 p.
- Nelson, D. y M. Cox. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman Publisher. Quinta Edición. New York, USA. 1100 p.
- Nickerson, K.W. y K.E. Van Holde. 1971. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin I. circular dichroism and absorption spectra. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Comparative Biochemistry*. 39(4):855-872.
- Nootong, K., P. Pavasant, y S. Powtongsook. 2011. Effects of organic carbon addition in controlling inorganic nitrogen concentrations in a biofloc system. *Journal of the World Aquaculture Society*. 42(3):339-346.
- Omondi, J. y J. Stark. 1996. In vitro carbohydrate digestibility tests in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*.139(3): 315-328.
- Omori, S.A., G.G. Martin, y J.E. Hose. 1989. Morphology of hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*. *Cell and Tissue Research*. 255(1):117-123.
- Otoshi, C., A. Montgomery, E. Matsuda, y S. Moss. 2006. Effects of artificial substrate and water source on growth of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 37(2):210-213.
- Páez-Osuna, F., A. Gracia, L.F. Flores-Verdugo, R. Lyle-Fritch, A. Alonso-Rodríguez, A. Roque, y A. Ruiz-Fernández. 2003. Shrimp aquaculture

- development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin*. 46(7):806-815.
- Páez-Osuna, F., S. Guerrero-Galván, A. Ruiz-Fernández, y R. Espinoza-Angulo. 1997. Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in north-western México. *Marine Pollution Bulletin*. 34(5):290-297.
- Pan, L.Q., F.W. Hu, F.T. Jing, y H.J. Liu. 2008. The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 25(1-2):137-142.
- Panjaitan, P. 2011. Effect of C:N ratio levels on water quality and shrimp production parameters in *Penaeus monodon* shrimp culture with limited water exchange using molasses as a carbon source. *Ilmu Kelautan*. 16(1):1-8.
- Pascual, C., G. Gaxiola, y C. Rosas. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*. 142(4):735-745.
- Pascual, C., A. Sánchez, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, y C. Rosas. 2003b. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*. 218(1):637-650.
- Pascual, C., A. Sánchez, E. Zenteno, G. Cuzon, G. Gabriela, R. Brito, R. Gelabert, E. Hidalgo, y C. Rosas. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 251(2-4):416-429.

- Passano, L. 1960. Molting and its control. En: Waterman T. (ed.). Physiology of Crustacea. Academic Press. New York, USA. 473-536 p.
- Paul, R. y R. Pirow. 1997. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. *Zoology*. 100(4):298-306.
- Perazzolo, L.M., R. Gargioni, P. Ogliari, y M.A. Barracco. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*. 214(1-4):19-33.
- Pérez Farfante, I. 1967. A new species and two new subspecies of shrimp of the genus *Penaeus* from the western Atlantic. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 80:83-100.
- Pérez-Jar, L., T. Rodríguez-Ramos, L. Ramos, Y. Guerra-Borrego, y I.S. Racotta. 2006. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture*. 252(2-4):591-597.
- Pérez-Rostro, C., I. Racotta, y A. Ibarra. 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 302(2):189-200.
- Piedrahita, R.H. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*. 226(1):35-44.
- Racotta, I. y E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 29(3):351-356.

- Racotta, I.S. y R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 125(4):437-443.
- Racotta, I., 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.
- Ray, A.J. 2008 .The effects of simple management techniques on microbial community dynamics within biofloc-based culture systems and the relationship to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production. Tesis de Maestría. The College of Charleston. Charleston, USA. 124 p.
- Ray, A.J., B.L. Lewis, C.L. Browdy, y J.W. Leffler. 2010a. 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.
- Ray, A.J., G. Seaborn, J.W. Leffler, S.B. Wilde, A. Lawson, y C.L. Browdy. 2010b. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture*. 310(1-2):130-138.
- Ray, A.J., K.S. Dillon, y J.M. Lotz. 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquacultural Engineering*. 45(3):127-136.
- Regnault, M. 1981. Respiration and ammonia excretion of the shrimp *Crangon crangon* L.: metabolic response to prolonged starvation. *Journal of Comparative Physiology*. 141(4):549-555.

- Ridgway, I., A. Taylor, R. Atkinson, E. Chang, y D. Neil. 2006. Impact of capture method and trawl duration on the health status of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 339(2):135-147.
- Robertson, L., W. Bray, J. Leung-Trujillo, y A. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *The Journal of the World Aquaculture Society*. 18(3):150-158.
- Robles-Romo, A. 2014. Estado energético del camarón *Litopenaeus vannamei* en la respuesta de escape hasta un estado de agotamiento. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México. 117 p.
- Robles-Romo, A., O. Arjona, y I. Racotta. 2014. Influence of sampling, storage, processing, and optimal experimental conditions on adenylate energy charge in penaeid shrimp. *Archives of Biological Sciences*. 66(2):651-666.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*. 172(1-2):125-145.
- Rocha, A., P. Abreu, W. Wasielesky, y M. Tesser. 2012. Avaliação da formação de bioflocos na criação de juvenis de tainha *Mugil cf. hospes* sem renovação de água. *Atlantica (Rio Grande)*. 34(1):63-74.
- Rosas, C., E. Martinez, G. Gaxiola, R. Brito, E. Díaz-Iglesia, y L.A. Soto. 1998. Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of *Penaeus setiferus* juveniles. *Marine Ecology Progress Series*. 174:67-75.
- Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, Y. Le Priol, C. Pascual, J. Rossignol, F. Contreras, A. Sánchez, y A. Van Wormhoudt. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary

carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 259(1):1-22.

Rosas, C., C. Pascual, N. López, y A. Sánchez. 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, México. 54-72 p.

Rosas, C., E.L. Cooper, C. Pascual, R. Brito, R. Gelabert, T. Moreno, G. Miranda, y A. Sánchez. 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Marine Biology*. 145(2):401-413.

SAGARPA. 2013. Suspende SAGARPA importación de camarón de naciones asiáticas para proteger producción del país. Comunicado de prensa num. 229/13.  
<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/2013/abril/Documents/2013B229.pdf>

Samocha, T., A. Davis, A. Lawrence, C. Collins, y P. Van Wyk. 2001. Intensive and superintensive production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in greenhouse-enclosed raceway systems. En: *Aquaculture 2001. Book of abstracts*. The World Aquaculture Society, Lake Buenavista, USA. 573 p.

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(2):184-191.

- Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, y C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*. 198(1-2):13-28.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, A. Muhlia-Almazán, A. Peregrino-Uriarte, J. Hernández-López, y G. Yépiz-Plascencia. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36(4):241-249.
- Santos, E. y R. Keller. 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology*. 106(2):343-347.
- Schock, T.B., J. Duke, A. Goodson, D. Weldon, J. Brunson, J.W. Leffler, y D.W. Bearden. 2013. Evaluation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) health during a superintensive aquaculture growout using NMR-based metabolomics. *Plos one*. 8(3):1-13.
- Schrader, K.K., B.W. Green, y P.W. Perschbacher. 2011. Development of phytoplankton communities and common off-flavors in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquacultural Engineering*. 45(3):118-126.
- Schveitzer, R., R. Arantes, P.F.S. Costódio, C.M. do Espírito-Santo, L.V. Arana, W.Q. Seiffert, y E.R. Andreatta. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering*. 56:59-70.
- SEMARNAP. 2000. Anuario Estadístico de Pesca 1999. México, D.F. 271 p.

- Shinji, J., B.J. Kang, T. Okutsu, K. Banzai, T. Ohira, N. Tsutsui, y M.N. Wilder. 2012. Changes in crustacean hyperglycemic hormones in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* subjected to air-exposure and low-salinity stresses. *Fisheries Science*. 78(4):833-840.
- Smith, D.M. y W. Dall. 1991. Metabolism of proline by the tiger prawn *Penaeus esculentus*. *Marine Biology*. 110(1):85-91.
- Smith, V.J. y J.R.S. Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. *Fish and Shellfish Immunology*. 2(1):1-31.
- Snieszko, S.F. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*. 6(2):197-208.
- Söderhäll, K., V. Smith, y M. Johansson. 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Research*. 245(1):43-49.
- Söderhäll, K. y L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 10(1):23-28.
- Song, Y.L. y Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*. 18(3):201-209.
- Soñanez-Organis, J.G., I.S. Racotta, y G. Yépez-Plascencia. 2010. Silencing of the hypoxia inducible factor 1-HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp

*Litopenaeus vannamei*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 393(1-2): 51-58.

Sookying, D., F.S. Silva, D. Davis, y T. Hanson. 2011. Effects of stocking density on the performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured under pond and outdoor tank conditions using a high soybean meal diet. Aquaculture. 319(1-2):232-239.

Sritunyalucksana, K., W. Gangnonngiw, S. Archakunakorn, D. Fegan, y T.W. Flegel. 2005. Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. 63(1):89-94.

Stevenson, J. 1985. Dynamics of the integument. En: Bliss D. (ed.). The Biology of Crustacea. Academic Press. New York, USA. 250-255 p.

Stuck, K., S. Watts, y S. Wang. 1996. Biochemical responses during starvation and subsequent recovery in postlarval Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Marine Biology. 125(1):33-45.

Sturmer, L. y A. Lawrence. 1987. Intensive pond management strategies for nursery production of *Penaeus vannamei* juveniles. Journal of the World Aquaculture Society. 18(1):28.

Sudarno, U. 2011. Nitrification in fixed bed reactors treating saline wastewater. Tesis de Doctorado. Karlsruher Institut für Technologie. Karlsruhe, Alemania. 173 p.

Tacon, A.G.J., S.F. Nates, y R.J. Mcneil. 2004. Dietary feeding strategies for marine shrimp: a review. En: Cruz-Suarez, L., Ricque-Marie, D., Nieto-Lopez, M., Villarreal, D., Scholz, U. G. (eds.). Avances en nutrición acuícola

- VII. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo. 695-706 p.
- Taw, N. 2010. Biofloc technology expanding at white shrimp farms. *The Global Aquaculture Advocate*. 13(3):20-22.
- Taw, N. 2011. Strategies for managing large integrated shrimp farms. *The Global Aquaculture Advocate*. 14(5):32-35.
- Taw, N. 2012. Recent developments in biofloc technology in shrimp culture and its economics. En: *Aquaculture America 2012. Book of abstracts*. The World Aquaculture Society. Las Vegas, USA. Abstract 27.
- Taylor, E. y N. Whiteley. 1989. Oxygen transport and acid-base balance in the haemolymph of the lobster, *Homarus gammarus*, during aerial exposure and resubmersion. *The Journal of Experimental Biology*. 144(1):417-436.
- Terwilliger, N. 2007. Hemocyanins and the immune response: defense against the dark arts. *Integrative and Comparative Biology*. 47(4):662-665.
- Thibodeaux, L. 2008. Respiration and energy metabolism during exercise in *Callinectes sapidus*, the atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. Tesis de Doctorado. The College of Charleston. Charleston, USA. 171 p.
- Thompson, F.L., P.C. Abreu, y W. Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*. 203(3-4):263-278.
- Tseng, I.T. y J.C. Chen. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*. 17(4):325-333.

- Tseng, D.Y., P. Ho, S.Y. Huang, S.C. Cheng, Y. Shiu, C.S. Chiu, y C.H. Liu. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shellfish Immunology*. 26(2):339-344.
- Tsing, A., J.M. Arcier, y M. Brehélin. 1989. Hemocytes of Penaeid and Palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53(1):64-77.
- Tucker, C., J. Hargreaves, y C. Boyd. 2009. Aquaculture and the environment in the United States. En: Tucker, C. y J. Hargreaves. (eds.). *Environmental Best Management Practices for Aquaculture*. Blackwell Publishing Professional. Ames, USA. 3-54 p.
- Qiu, R., Y. Cheng, X. Huang, X. Wu, X. Yang, y R. Tong. 2011. Effect of hypoxia on immunological, physiological response, and hepatopancreatic metabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture International*. 19(2):283-299.
- Vargas-Albores, F., M. Guzmán, y J. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology*. 106(2):299-303.
- Vargas-Albores, F., T. Gollas-Galván, y J. Hernández-López. 2005. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. *Aquaculture Research*. 36(4):352-360.
- van de Braak, C.B., M.H. Botterblom, W. Liu, N. Taverne, W.P. van der Knaap, y J.H. Rombout. 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte

- production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish and Shellfish Immunology*. 12(3):253-272.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*. 11(2): 256-265.
- Van Khoi, L. y R. Fotedar. 2010. Effects of stocking density on the nutrient budget and growth of the western king prawn (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye) in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*. 41(10):624-633.
- Van Wyk, P. 1999. Farming marine shrimp in freshwater systems: an economic development strategy for Florida. Harbor Branch Oceanographic Institution. Fort Pierce, USA. 32 p.
- Vázquez, L., J. Alpuche, G. Maldonado, C. Agundis, A. Pereyra-Morales, y E. Zenteno. 2009. Review: Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*. 15(3):179-188.
- Vernberg, F.J. 1983. Respiratory Adaptations. En: Vernberg F.J. y W. Vernberg (eds.). *Biology of Crustacea*. Academic Press. New York. 1-42 p.
- 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: Biomedical Sciences and Applications*. 765(1):107-111.
- Vinatea, L., A.O. Gálvez, 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(1):17-24.

- Wang, J.K. y J. Leiman. 2000. Optimizing multi-stage shrimp production systems. *Aquacultural Engineering*. 22(4):243-254.
- Wang, W.N., A.L. Wang, L. Chen, Y. Liu, y R.Y. Sun. 2002. Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles. *Aquatic Toxicology*. 60(1-2):75-83.
- 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(1-4):396-403.
- Wasielesky, W., C. Froes, G. Fóes, D. Krummenauer, G. Lara, y L. Poersch. 2013. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: The effect of stocking densities and compensatory growth. *Journal of Shellfish Research*. 32(3):799-806.
- Wu, J. y H. Chen. 2005. Effects of cadmium and zinc on the growth, food consumption, and nutritional conditions of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 74(2):234-241.
- Wu, R., P. Lam, y K. Wan. 2002. Tolerance to, and avoidance of, hypoxia by the penaeid shrimp (*Metapenaeus ensis*). *Environmental Pollution*. 118(3):351-355.
- Wyban, J., J.N. Sweeney, y R.A. Kanna. 1988. Shrimp yields and economic potential of intensive round pond systems. *Journal of Shellfish Research*. 19(4):210-217.

- 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, D.H. Zhao, y J. Huang. 2012. Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture*. 350-353:147-153.
- Yancey, P. 2001. Water stress, osmolytes and proteins. *American zoologist*. 41(4):699-709.
- Yoganandhan, K., S. Thirupathi, y A.S. Sahul Hameed. 2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*. 221(1-4):1-11.
- Yu, D., Y. Peng, y K. Zhang. 2004. Effects of seawater salinity on nitrite accumulation in short-range nitrification to nitrite as end product. *Journal of Environmental Science*. 16(2):247-251.
- Zamora-Méndez, S. 2012. Evaluación de las respuestas fisiológicas y estatus energético del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, por efecto de distintos procedimientos de muestreo en cultivo intensivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México. 113 p.
- Zarain-Herzberg, M. y F. Ascencio-Valle. 2001. Taura syndrome in México: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*. 193(1-2):1-9.
- Zhang, B., W. Lin, Y. Wang, y R. Xu. 2010. Effects of artificial substrates on growth, spatial distribution and non-specific immunity factors of *Litopenaeus*

- vannamei* in the intensive culture condition. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 10 (4):491-497.
- Zhang, Z.F., M. Shao, y K. Ho Kang. 2006. Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. Fish and Shellfish Immunology. 21(2):159-69.
- Zhao, H.X., J.M. Cao, A.L. Wang, Z.Y. Du, C.X. Ye, Y.H. Huang, H.B. Lan, T.T. Zhou, y G.L. Li. 2012. Effect of long-term administration of dietary B-1,3-glucan on growth, physiological, and immune responses in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture International. 20(1):145-158.
- Zhou, M., A.L. Wang, y J.A. Xian. 2011. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: effects of continuous cold stress. Aquaculture. 317(1-4):182-186.
- Zhu, C., S. Dong, F. Wang, y G. Huang. 2004. Effects of Na/K ratio in seawater on growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 234(1-4):485-496.
- Zou, E., N. Du, y W. Lai. 1996. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Physiology. 114(2):105-109.

## 12. ANEXOS

### **Anexo I.- Procedimiento para el cálculo de la cantidad de melaza a adicionar a los acuarios de flóculos biológicos (B) y flóculos biológicos con sustratos artificiales (BS).**

El cálculo estima una cantidad determinada de melaza de caña necesaria para mantener una relación C:N de 20:1, en base a la cantidad de nitrógeno amoniacal liberado al agua de cultivo proveniente de la alimentación diaria. A continuación se explica el procedimiento con una alimentación de 1 g de alimento comercial CAMARONINA 35 (Agribands Purina de México S. de R.L. de C.V.) con 35% de proteína:

1. Se calculan los gramos de proteína (35%) en la alimentación diaria:  
 $1 \text{ g} \times 0.35 = 0.35 \text{ g}$
2. Se calculan los gramos de nitrógeno (16%) en los gramos de proteína en la alimentación:  
 $0.35 \text{ g} \times 0.16 = 0.056 \text{ g}$
3. Se calculan los gramos de nitrógeno no asimilados por los camarones (75%), los cuales son liberados al agua de cultivo en forma de nitrógeno amoniacal total:  
 $0.056 \text{ g} \times 0.75 = 0.042 \text{ g}$
4. Se multiplica por 20 a los gramos de nitrógeno amoniacal total en el agua de cultivo para establecer la cantidad de carbono necesaria para mantener una relación 20:1:  
 $0.042 \text{ g} \times 20 = 0.84 \text{ g}$
5. Se determinan los gramos de carbono suministrados en la ración diaria de alimento de la siguiente manera: gramos de alimento (1 g)  $\times$  peso seco del alimento (0.88)  $\times$  contenido aproximado de carbono en el alimento peso seco (0.5)  $\times$  porcentaje de asimilación de carbono (0.8)  
 $1 \text{ g} \times 0.88 \times 0.5 \times 0.8 = 0.352 \text{ g}$

6. A los gramos de carbono necesarios para mantener una relación 20:1 se restan los gramos de carbono aportados por la alimentación diaria, para obtener los gramos de carbono faltantes para mantener una relación 20:1:  
 $0.84 \text{ g} - 0.352 \text{ g} = 0.488 \text{ g}$
7. Se determina la cantidad necesaria de melaza para obtener 0.488 g de carbono, en base al contenido de carbono de la melaza de caña (31%):  
 $0.488 / 0.31 = 1.57 \text{ g de melaza de caña}$

## **Anexo II.- Técnica de determinación de nitrógeno amoniacal total en agua de mar.**

Para la preparación de la solución estándar de nitrógeno amoniacal total, se utiliza cloruro de amonio (Sigma Aldrich, A9434). Se ubica el punto más alto de la curva a 4 mg/l y se realizan diluciones sucesivas para obtener una curva de calibración. Se realiza una regresión lineal con los valores de la concentración de la curva y las lecturas de densidad óptica.

1. Se adicionan 20  $\mu$ l de una solución de fenol al 10% (Fermont, 30402) en etanol al 95% (Fermont, 06065) al pozo de una microplaca.
2. Se adicionan 100  $\mu$ l de agua desionizada al pozo de la microplaca.
3. Se adicionan 150  $\mu$ l de la muestra al pozo de la microplaca.
4. Se adicionan 20  $\mu$ l de nitroprusiato de sodio al 0.5% (Sigma Aldrich, S0501) en agua desionizada al pozo de la microplaca.
5. Se adicionan 30  $\mu$ l de solución alcalina al pozo de la microplaca: (15 g de citrato de sodio (Fermont, 22901) y 0.75 g de hidróxido de sodio (Fermont, 36902) en 50 ml de agua desionizada con 2.5 ml de hipoclorito de sodio).
6. Se incuba la microplaca en oscuridad por 60 minutos a temperatura ambiente.
7. Se determina la densidad óptica de la muestra a una absorbancia de 655 nm utilizando un lector de microplaca.
8. Con el valor de la pendiente de la regresión y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de NAT en la muestra.

**Anexo III.- Técnica de determinación de nitritos:**

Para la preparación de la solución estándar de nitritos se utiliza nitrito de sodio (Sigma Aldrich, 237213), previamente secado en un horno a 110 °C durante 60 minutos. Se prepara una curva de calibración de nitritos con el punto más alto en 1.84 mg/l. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. En un pozo de una microplaca se colocan 10 µl de una solución de sulfanilamida: (0.5 g de sulfanilamida (Sigma Aldrich, S9251) en 5 ml de ácido clorhídrico concentrado (Fermont, S30055), aforado a 50 ml con agua desionizada).
2. Se adicionan 250 µl de la muestra al pozo de la microplaca.
3. Se adicionan 10 µl de clorhidrato N-naftil etilendiamina al pozo de la microplaca: (0.05 g de clorhidrato de N-naftil etilendiamina en 50 ml de agua desionizada).
4. Se incuba la microplaca por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se determina la densidad óptica de la muestra a una absorbancia de 550 nm utilizando un lector de microplaca.
6. Con el valor de la pendiente de la regresión y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de nitritos en la muestra.

#### **Anexo IV.- Técnica de determinación de nitratos**

La determinación de los nitratos se realiza de acuerdo al método de Morris y Riley (1963) adaptado para el espectrofotómetro automático Quickchen 8000 (Lacchat Instruments). La técnica utiliza la reducción de nitratos a nitritos por medio de una columna de cadmio activado. Se preparan las soluciones: hidróxido de sodio 15 N, buffer cloruro de amonio pH: 8.5, sulfanilamida (0.5 g de sulfanilamida Sigma Aldrich, S9251 en 5 ml de HCl concentrado) y N-naftil etilendiamina (0.05 g en 50 ml de agua desionizada). Para el estándar de la solución de nitratos se utiliza nitrato de potasio (Sigma Aldrich 221295) a 200 mg/l y se prepara una curva con el punto más alto a 20 mg/l.

1. Se toman 15 ml de la muestra y se colocan en el automuestreador aleatorio.
2. Se conectan los matraces con las soluciones correspondientes y la columna de cadmio al equipo.
3. Se inicia la corrida cuando la línea base del espectrofotómetro es estable.
4. Con el valor de la pendiente de la regresión y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de nitratos en la muestra.

**Anexo V.- Técnica de determinación de sólidos suspendidos totales:**

1. Se secan los filtros (Whatman, 1.2 µm) hasta peso constante, utilizando un horno de secado (Terlab, MAH700) a 105 °C por 2 horas.
2. Se retiran los filtros del horno y son mantenidos en un desecador con arena sílica seca, por 30 minutos. Enseguida, los filtros se pesan.
3. Se toman 50 ml de agua de cultivo de cada acuario y se filtran por medio de un equipo de filtración y una bomba de vacío, enjuagando cada filtro con agua desionizada para remover la sal.
4. Se colocan los filtros en un horno a 105 °C por 2 horas para evaporar la humedad. Se retiran los filtros del horno, se colocan en un desecador por 30 minutos y se pesa nuevamente cada filtro.
5. Se utiliza la siguiente fórmula para obtener la cantidad de SST en mg/l :

$$\frac{\text{Peso de filtro seco con muestra (g)} - \text{Peso de filtro seco sin muestra (g)}}{50} \times 20,000^*$$

$$= \text{SST (mg/l)}$$

\* Debido a que deseamos expresar el resultado en mg/l, el peso de la muestra seca se multiplica por 20,000 porque la muestra tiene un volumen de 50 ml y el peso del filtro está expresado en gramos.

## **Anexo VI.- Determinación de carbohidratos totales en los flóculos biológicos.**

Para la obtención de las muestras de los flóculos biológicos para la determinación de carbohidratos, proteínas y lípidos, se toma 1 litro del agua de cultivo, se coloca en un cono Imhoff graduado y se espera 20 minutos a que los sólidos sedimenten. Los flóculos biológicos son recuperados en un tubo Falcon de 15 ml. Para la determinación se siguió la metodología descrita por DuBois y colaboradores (1956) con algunas modificaciones realizadas por Arredondo-Vega y Voltolina (2007).

1. Se pesan aproximadamente 5 mg de materia orgánica liofilizada y se colocan en un tubo de vidrio. Se agrega 1 ml de ácido sulfúrico (Fermont, 01601) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1 M y se sonicán por 5 min.
2. Se agregan 4 ml de ácido sulfúrico y los tubos se incuban a 100 °C en un baño maría por 1 hora. Los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente.
3. Los tubos son centrifugados a 4000 rpm por 15 min a 10 °C. Se recupera el extracto ácido (sobrenadante) con una pipeta Pasteur, se registra el volumen del extracto y se coloca en otro tubo limpio.
4. Se toman 0.1 ml del extracto ácido y se mezclan con 0.9 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y 1 ml de fenol 5% en otro tubo de vidrio. Se dejan reposar 40 minutos.
5. Se agregan 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y se dejan enfriar a temperatura ambiente.
6. Se mide la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 485 nm, tomando como blanco 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M. Se emplea la pendiente de la regresión lineal de una curva de calibración a partir de una solución madre de glucosa a 120  $\mu\text{g/ml}$  para el cálculo del porcentaje de carbohidratos en las muestras.

**Anexo VII.- Determinación de proteínas totales en los flóculos biológicos.**

Se siguió la metodología descrita por Lowry y colaboradores (1951) con algunas modificaciones realizadas por Arredondo-Vega y Voltolina (2007).

1. Se pesan aproximadamente 5 mg de materia orgánica liofilizada y se colocan en un tubo de vidrio. Se agrega 5 ml de hidróxido de sodio (Fermont, S30815) (NaOH) 0.1 N.
2. Las muestras se incuban a 100 °C en un baño maría por 1 hora. Los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente.
3. Los tubos son centrifugados a 3000 rpm por 15 min a 10 °C. Se recupera el extracto alcalino (sobrenadante) con una pipeta Pasteur, se registra el volumen del extracto y se coloca en otro tubo limpio.
4. Se prepara una solución 50:1 de carbonato de sodio anhidro (Fermont, 17902) (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 2% con una solución de sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>) al 5% y tartrato de potasio (Favela Pro, 2355) (KOCO(CHOH)<sub>2</sub>COOK) al 1%.
5. Se toman 0.15 ml del extracto alcalino y se mezclan con 0.85 ml de NaOH 0.1 N.
6. Se agregan 5 ml de la solución de tartrato de potasio al extracto alcalino con NaOH. Se agitan las muestras y se dejan reposar por 15 min.
7. Se agregan 0.5 ml de una solución 1:1 Folin:agua destilada, se agitan y se dejan reposar por 40 min.
8. Se mide la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 750 nm, tomando como blanco 1 ml de NaOH 0.1 N. Se emplea la pendiente de la regresión lineal de una curva de calibración a partir de una solución madre de albumina sérica bovina a 300 µg/ml para el cálculo del porcentaje de proteína en las muestras.

**Anexo VIII.- Determinación de lípidos totales en los flóculos biológicos.**

Se siguió la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959) y por Marsh y Weinstein (1966) con algunas modificaciones realizadas por Arredondo-Vega y Voltolina (2007).

1. Se pesan aproximadamente 20 mg de materia orgánica liofilizada y se colocan en un tubo de vidrio. Se agregan 3 ml de una mezcla cloroformo: metanol (1:2). Se agregan 5 µl de butilhidroxitolueno (Sigma Aldrich, 47168) (BHT) como antioxidante.
2. Se sonicán las muestras en 3 ciclos de 15 minutos cada uno. Se incuban los tubos en oscuridad por 24 horas a 4 °C.
3. Nuevamente se sonicán las muestras en 3 ciclos de 15 minutos cada uno. Se centrifugan las muestras a 5000 rpm por 20 min a 5 °C. Se agregan 1.5 ml de la mezcla cloroformo: metanol (1:2) y los tubos son nuevamente centrifugados bajo las mismas condiciones. Se obtiene el extracto lipídico y se transfiere a otro tubo de vidrio.
4. Se agregan 2 ml de agua destilada a las muestras y los tubos son nuevamente centrifugados bajo las mismas condiciones. Se extrae la fase lipídica con una pipeta Pasteur y se coloca en otro tubo de vidrio.
5. Se agregan 1 ml de la mezcla cloroformo: metanol (1:2) y se evapora el extracto a 60 °C por 12 horas.
6. Se agrega 1 ml de cloroformo a los tubos y se toma una alícuota de 0.15 ml en otro tubo. Se agregan 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y los tubos se tapan con papel aluminio.
7. Se calientan los tubos a 200 °C por 15 minutos y después se agregan 3 ml de agua destilada y se agitan las muestras.
8. Se mide la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 375 nm, tomando como blanco 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

### Anexo IX.- Técnica de determinación de hemocianina en hemolinfa

1. La muestra de hemolinfa se centrifuga a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
2. Se toman 20 µl del sobrenadante de la muestra y se diluyen con 580 µl de solución isotónica para crustáceos (Mendoza, 1992).
3. Se toma una alícuota de 200 µl y se deposita en una microplaca para ser leída en un espectrofotómetro de absorción a 335 nm.
4. Se utiliza el coeficiente de extinción de una solución de hemocianina al 1% (Nickerson y Van Holde, 1971) en la siguiente fórmula para calcular la concentración de hemocianina en la muestra:

$$\frac{\text{absorbancia a 335 nm} \times \text{factor de dilución (30)} \times \text{corrección(10)} *}{\text{Coeficiente de extincion(2.83)}} \\ = \text{Hemocianina (mg/ml)}$$

\* Debido a que deseamos expresar el resultado en mg/ml, se multiplica la lectura de absorbancia por un factor de corrección (10).

**Anexo X.- Técnica de determinación de proteínas totales en hemolinfa.**

Se utilizó la técnica del ácido bicinconínico (Brown *et al.*, 1989). Se prepara una solución estándar de proteína con albumina bovina a 5 mg/ml y diluciones sucesivas para preparar una curva de calibración. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. La muestra de hemolinfa se centrifuga a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
2. Se toman 20 µl del sobrenadante de la muestra y se diluyen con 580 µl de solución isotónica para crustáceos (Mendoza, 1992). De esta dilución se toma una alícuota de 20 µl y nuevamente se adicionan 200 µl de solución isotónica para crustáceos.
3. Se toma una alícuota de 25 µl y se deposita en una microplaca. Se adicionan 200 µl de solución reactiva de ácido bicinconínico (BCA; Sigma Aldrich, B 9643) (50 ml de ácido bicinconínico con 1 ml de sulfato cúprico (Fermont, 63411).
4. Se incuba la mezcla a 60 °C por 15 minutos y se mide la densidad óptica a 562 nm utilizando un lector de microplaca.
5. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de proteínas totales en la muestra.

**Anexo XI.- Técnica de determinación de glucosa en hemolinfa.**

Para la determinación de glucosa se utilizó el kit comercial marca Randox basado en el método GOD-PAP. El reactivo enzimático oxida a la glucosa presente en la muestra, reacción que libera peróxido de hidrógeno, mismo que reacciona con fenol y aminofenazona para producir una coloración roja intensa. Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar contenida en el kit, con el punto más alto en 100 mg/dl. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. La muestra de hemolinfa se centrifuga a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
2. Se toman 20 µl del sobrenadante de la muestra y se depositan en una microplaca. Se adicionan 200 µl de solución reactiva del kit.
3. Se incuba la mezcla por 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la densidad óptica a 490 nm utilizando un lector de microplaca.
4. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de glucosa en la muestra.

**Anexo XII.- Técnica de determinación de triglicéridos en hemolinfa.**

Para la determinación de triglicéridos se utilizó el kit comercial marca Randox (Tr 1697) basado en el método GPO-PAP. El reactivo enzimático consiste de lipasas que actúan sobre los triglicéridos presentes en la muestra, reacción que libera peróxido de hidrógeno, reacción que produce una coloración roja intensa. Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar contenida en el kit, con el punto más alto en 200 mg/dl. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. La muestra de hemolinfa se centrifuga a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
2. Se toman 20 µl del sobrenadante de la muestra y se depositan en una microplaca. Se adicionan 200 µl de solución reactiva del kit.
3. Se incuba la mezcla por 20 minutos a temperatura ambiente y se mide la densidad óptica a 590 nm utilizando un lector de microplaca.
4. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de triglicéridos en la muestra.

**Anexo XIII.- Técnica de determinación de lípidos totales en hemolinfa.**

Para la determinación de lípidos totales se utilizó el método basado en Barnes y Blackstock (1973), en el cual el reactivo fosfovainillina reacciona con los lípidos de la muestra, produciendo una coloración roja intensa. Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar contenida en el kit Sigma Lipid Lintról, con el punto más alto en 12 mg/ml. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. La muestra de hemolinfa es centrifugada a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
2. Se toman 25  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra de hemolinfa o de hepatopáncreas y se depositan en microtubos.
3. Se adicionan 250  $\mu$ l de ácido sulfúrico concentrado, se homogeniza y se calienta a 90 °C en baño maría por 10 minutos.
4. Inmediatamente después se enfrían las muestras por medio de un baño en hielo.
5. Se toman 20  $\mu$ l de la mezcla ácido sulfúrico/muestra y se depositan en una microplaca.
6. Se adicionan 200  $\mu$ l de fosfovainillina y se incuba la mezcla por 40 minutos a temperatura ambiente. Se mide la densidad óptica a 540 nm utilizando un lector de microplaca.
7. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de lípidos totales en la muestra.

**Anexo XIV.- Determinación de lactato en hemolinfa.**

Para la determinación de lactato se utilizó un kit comercial marca Randox (LC 2389). El reactivo enzimático oxida al lactato y produce peróxido de hidrógeno que es nuevamente oxidado por una peroxidasa en presencia de aminofenazona. Esta última reacción produce una coloración roja intensa. Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar contenida en el kit, con el punto más alto en 20 mg/dl. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. La muestra de hemolinfa es centrifugada a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
2. Se toman 20 µl del sobrenadante de la muestra y se depositan en una microplaca. Se adicionan 200 µl de solución reactiva del kit.
3. Se incuba la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente y se mide la densidad óptica a 540 nm utilizando un lector de microplaca.
4. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de lactato en la muestra.

## **Anexo XV.- Técnica de determinación de glucógeno en músculo y hepatopáncreas.**

Para la determinación de glucógeno se utilizó el método de antrona (Van Handel, 1965). Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar, considerando el punto más alto en 2.5 mg/ml. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. Se toman 100  $\mu$ l de la muestra hidratada de cada tejido y se colocan en tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 0.6 ml. Se adicionan 100  $\mu$ l de ácido tricloroacético TCA al 20% a cada tubo y se homogeniza la muestra.
2. Se centrifuga el tubo Eppendorf<sup>®</sup> a 1300 g por 10 minutos a 4 °C. Se toman 25  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra y se depositan en microtubos.
3. Se adicionan 500  $\mu$ l de alcohol etílico y se homogeniza. Se centrifuga la muestra a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
4. Se remueve el sobrenadante de alcohol por medio de evaporación a 70 °C en un horno. Una vez que las muestras estén secas, se hidratan con 25  $\mu$ l de agua desionizada.
5. Se agregan 250  $\mu$ l de la solución de antrona (0.001 g/ml en ácido sulfúrico al 76%) al microtubo y se calienta a 85 °C en baño maría, de 4 a 10 minutos.
6. Inmediatamente después se enfrían las muestras por medio de un baño en hielo.
7. Se toman 200  $\mu$ l de la muestra con antrona y se depositan en una microplaca.
8. Se mide la densidad óptica a 630 nm utilizando un lector de microplaca.
9. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de glucógeno en la muestra.

## **Anexo XVI.- Técnica de determinación de carbohidratos totales en músculo y hepatopáncreas.**

Para la determinación de carbohidratos se utilizó el método de antrona (Van Handel, 1965). Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar, considerando el punto más alto en 2.5 mg/ml. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. Se toman 100  $\mu$ l de la muestra hidratada de cada tejido y se colocan en tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 0.6 ml. Se adicionan 100  $\mu$ l de ácido tricloroacético TCA al 20% a cada tubo y se homogeniza la muestra.
2. Se centrifuga el tubo Eppendorf<sup>®</sup> a 1300 g por 10 minutos a 4 °C. Se toman 25  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra y se depositan en microtubos.
3. Se agregan 250  $\mu$ l de la solución de antrona (0.001 g/ml en ácido sulfúrico al 76%) al microtubo y se calienta a 85 °C en baño maría, de 4 a 10 minutos.
4. Inmediatamente después se enfría la muestra por medio de un baño en hielo.
5. Se toman 200  $\mu$ l de la muestra con antrona y se depositan en una microplaca.
6. Se mide la densidad óptica a 630 nm utilizando un lector de microplaca.
7. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de carbohidratos en la muestra.

### **Anexo XVII.- Determinación de lactato en músculo.**

Para la determinación de lactato se utilizó un kit comercial marca Randox (LC 2389). El reactivo enzimático oxida al lactato y produce peróxido de hidrógeno que es nuevamente oxidado por una peroxidasa en presencia de aminofenazona. Esta última reacción produce una coloración roja intensa. Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar contenida en el kit, con el punto más alto en 20 mg/dl. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. Se toman 100  $\mu$ l de la muestra hidratada de cada tejido y se colocan en tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 0.6 ml. Se adicionan 100  $\mu$ l de ácido tricloroacético TCA al 20% a cada tubo y se homogeniza la muestra.
2. La muestra de tejidos con TCA se centrifuga a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
3. Se toman 20  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra y se deposita en una microplaca. Se adicionan 200  $\mu$ l de solución reactiva del kit.
4. Se incuba la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente y se mide la densidad óptica a 540 nm utilizando un lector de microplaca.
5. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de lactato en la muestra.

### **Anexo XVIII.- Técnica de determinación de proteínas totales en músculo y hepatopáncreas.**

Se utilizó la técnica del ácido bicinconínico (Brown *et al.*, 1989). Se prepara una solución estándar de proteína con albumina bovina a 5 mg/ml y diluciones sucesivas para preparar una curva de calibración. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. Se toman 25  $\mu$ l de la muestra de tejido hidratado y se colocan en microtubos. Se adicionan 500  $\mu$ l de NaOH (0.1 M) y se mantienen así por 2 horas.
2. Se toma una alícuota de 25  $\mu$ l y se deposita en una microplaca. Se adicionan 200  $\mu$ l de solución reactiva BCA (Sigma Aldrich, B9643) (50 ml de ácido bicinconínico y 1 ml de sulfato de cobre).
3. Se incuba la mezcla a 60 °C por 15 minutos y se mide la densidad óptica a 562 nm utilizando un lector de microplaca.
4. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de proteínas totales en la muestra.

## **Anexo XIX.- Técnica de determinación de lípidos totales en hepatopáncreas.**

Para la determinación de lípidos totales se utilizó el método basado en Barnes y Blackstock (1973), en el cual el reactivo fosfovainillina reacciona con los lípidos de la muestra, produciendo una coloración roja intensa. Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar contenida en el kit Sigma Lipid Lintrol, con el punto más alto en 12 mg/ml. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. Se toman 25  $\mu$ l de la muestra de tejido hidratado y se colocan en microtubos.
2. Se adicionan 250  $\mu$ l de ácido sulfúrico concentrado, se homogeniza y se calienta a 90 °C en baño maría por 10 minutos.
3. Inmediatamente después se enfría la muestra por medio de un baño en hielo.
4. Se toman 20  $\mu$ l de la mezcla ácido sulfúrico/muestra y se depositan en una microplaca.
5. Se adicionan 200  $\mu$ l de fosfovainillina y se incuba la mezcla por 40 minutos a temperatura ambiente. Se mide la densidad óptica a 540 nm utilizando un lector de microplaca.
6. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de lípidos totales en la muestra.

**Anexo XX.- Técnica de determinación de triglicéridos en hepatopáncreas.**

Para la determinación de triglicéridos se utilizó el kit comercial marca Randox (Tr 1697) basado en el método GPO-PAP. El reactivo enzimático consiste de lipasas que actúan sobre los triglicéridos presentes en la muestra, reacción que libera peróxido de hidrógeno, reacción que produce una coloración roja intensa. Se prepara una curva de calibración a partir de la solución estándar contenida en el kit, con el punto más alto en 200 mg/dl. Se realiza una regresión lineal a partir de los valores de concentración de la curva y sus lecturas correspondientes de densidad óptica.

1. La muestra de tejido hidratado se centrifuga a 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
2. Se toman 20 µl del sobrenadante de la muestra y se deposita en una microplaca. Se adicionan 200 µl de solución reactiva del kit.
3. Se incuba la mezcla por 20 minutos a temperatura ambiente y se mide la densidad óptica a 590 nm utilizando un lector de microplaca.
4. Con el valor de la pendiente de la regresión lineal y la densidad óptica del blanco, se determina la concentración de triglicéridos en la muestra.

### **Anexo XXI.- Técnica de determinación Conteo Total de Hemocitos (CTH).**

1. Con una micropipeta con punta esterilizada, se toman 50 µl de la mezcla de hemolinfa y anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Se deposita la muestra en un tubo de vidrio esterilizado que contiene 300 µl de anticoagulante con formol al 4%.
2. Se toma una pipeta Pasteur esterilizada con una propipeta, se homogeniza el contenido del tubo de vidrio y se deposita 1 gota en cada cuadrícula de la cámara Neubauer (Marienfeld, Mod. 06400610).
3. Se coloca la cámara Neubauer en un microscopio, se enfoca con el lente 40x y se cuentan los 25 cuadrantes de la primera cuadrícula, de forma descendente de izquierda a derecha, iniciando con el cuadro del borde superior izquierdo. Se cuenta la segunda cuadrícula de la cámara Neubauer (réplica) usando el mismo procedimiento y se obtiene el promedio de estas dos mediciones.
4. Se emplea la siguiente fórmula para obtener el CTH:

$$\frac{\text{Promedio de hemocitos} \times \text{factor de dilución de hemolinfa}}{\text{área de la cámara observada (1 mm}^2\text{)} \times \text{profundidad de la cámara (0.1 mm)}} = \text{CTH (células/ml)}$$

**Anexo XXII.- Técnica de determinación de producción de anión superóxido.**

1. De cada muestra, se colocan 100 µl de hemolinfa con anticoagulante en un tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 0.6 ml rotulado como "A" (activado) y 100 µl de hemolinfa con anticoagulante en otro tubo rotulado como "B" (basal), utilizando un micropipeta con puntas esterilizadas.
2. Se centrifuga la muestra a 800 g por 5 minutos a 4 °C y se remueve el sobrenadante.
3. Se agregan a cada tubo 100 µl de anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993), se homogenizan y se centrifugan a 800 g por 5 minutos a 4 °C. Se remueve el sobrenadante.
4. Se adicionan 50 µl de laminarina (2 mg/ml) (Sigma, L 9634) en Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma H 8264) al tubo "A", 50 µl de Hank's Balanced Salt Solution sin laminarina al tubo "B" y 50 µl de NBT (Sigma N 6876) en HBSS (0.3%) a los tubos "A" y "B". Se homogenizan las muestras y se incuban por 30 min a 37 °C. Se centrifugan las muestras a 800 g por 5 minutos a 4 °C y se remueve el sobrenadante. Se añaden 100 µl de metanol absoluto (Fermont, 06125) y se homogenizan las muestras.
5. Se centrifugan las muestras a 800 g por 5 minutos a 4 °C y se remueve el sobrenadante.
6. Se añaden 100 µl de metanol al 70% y se homogenizan las muestras.
7. Se centrifugan las muestras a 800 g por 5 minutos a 4 °C y se remueve el sobrenadante. Se secan los tubos con una pistola de aire caliente hasta evaporar el líquido. Se adicionan 120 µl de KOH (2 M) y 140 µl de DMSO (Sigma D-8779) a cada tubo.
8. Se transfieren 200 µl de cada muestra a una microplaca y se mide la absorbancia utilizando un lector de microplaca ajustado a 630 nm.
9. Con las absorbancias obtenidas, se calcula la relación de la absorbancia del tubo A (hemocitos activados) entre la absorbancia del tubo B

(hemocitos basales), con la cual se cuantifica la producción de anión superóxido.

### **Anexo XXIII.- Procesamiento de muestras y determinación de CEA y fosfato de arginina.**

Se siguió la metodología descrita por Moal y colaboradores (1989) con algunas modificaciones realizadas por Robles-Romo y colaboradores (2014).

#### Procesamiento de muestras:

1. Se disecta el primer segmento abdominal del camarón congelado a  $-76^{\circ}\text{C}$  sobre una placa metálica fría y se tritura en nitrógeno líquido con un homogeneizador criogénico (MM400, Retsch) por 2 minutos a 25 rpm.
2. Se toman aproximadamente 150 mg del homogenizado y se colocan en un tubo de ensayo con 1.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0.5 M a  $4^{\circ}\text{C}$  y son mezclados con un homogeneizador eléctrico por 30 segundos.
3. El homogenizado obtenido se centrifuga a 3,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Se recuperan 500  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se le adicionan 1.3 ml de una mezcla de trioctilamina: diclorometano 1:5. Se agita la mezcla mediante un vórtex por 30 s y se centrifuga nuevamente a 2,000 rpm por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. Se verifica que el pH del sobrenadante obtenido este entre 6 y 7 con papel indicador de pH.
5. El sobrenadante resultante se separa en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  y estas son almacenadas a  $-76^{\circ}\text{C}$  hasta su inyección en el HPLC.

#### Cuantificación de nucleótidos.

La cuantificación se realizó por un sistema HPLC de fase reversa de intercambio iónico (modelo 1100, Agilent Technologies). Se empleó una columna Hyperclone ODS (C18) de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula, con dimensiones de 150 mm de largo y 4.3 mm de ancho (Phenomenex). Como fase móvil, se utilizó una solución de fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.15 M, tetrabutilamonio 0.003 M y 8% de metanol, con pH ajustado a 6. El tiempo de inyección de cada muestra fue de 20 min, a un flujo de 0.8 ml/min. La lámpara

del espectrómetro del HPLC fue ajustada a 254 nm. Las muestras fueron descongeladas a 4 °C, 2 horas antes de su inyección.

Para el cálculo de la concentración de nucleótidos se utilizaron estándares elaborados a partir de una solución madre de cada nucleótido (0.5 mg/ml). Cada solución madre fue diluida 1:100 con fase móvil. Se mezclaron 200 µl de cada nucleótido de adenosina (ATP, ADP y AMP) con 100 µl de cada nucleótido de guanosina (GTP y GDP) y se dividió la mezcla en alícuotas de 100 µl, que fueron almacenadas en viales ámbar a -76 °C hasta el día de su uso. Cada alícuota fungió como un estándar, de los cuales se inyectaron 25 µl en el HPLC.

#### Cuantificación de fosfato de arginina.

Para la cuantificación de fosfato de arginina se siguieron las indicaciones descritas por Viant y colaboradores (2001). La cuantificación se realizó por HPLC utilizando una columna SphereClone<sup>®</sup> NH<sub>2</sub> de 5 µm de diámetro de partícula, con 250 mm de largo por 4.6 mm de ancho (Phenomenex). Se empleó una fase móvil de fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 20 mM ajustada a pH 2.6, con acetonitrilo en una proporción 72:28. El tiempo de inyección de cada muestra fue de 20 min a un flujo de 1.0 ml/min. La lámpara del espectrómetro del HPLC fue ajustada a 205 nm. Las muestras fueron llevadas a 4 °C, 2 horas antes de su inyección.

Para el cálculo de la concentración de fosfato de arginina se utilizó un estándar elaborado a partir de una solución madre de 5 mg/ml de fosfato de arginina (Santa Cruz Biotechnology), que fue diluida con fase móvil 1:30. Se tomaron alícuotas de 100 µl para ser empleadas como estándares y se almacenaron en viales ámbar a -76 °C. De cada estándar se inyectaron 5 µl en el HPLC.