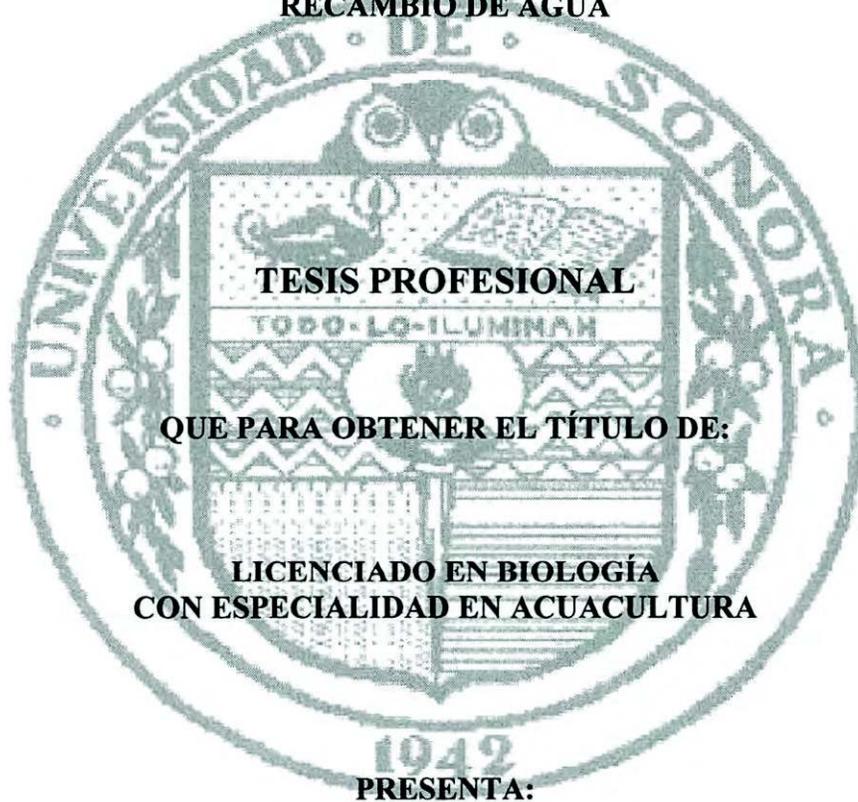


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

BACTERIAS CULTIVABLES Y TOTALES PRESENTES EN UN CULTIVO  
COMERCIAL DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) CON BAJO  
RECAMBIO DE AGUA



**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
CON ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA**

**PRESENTA:**

**MARÍA TERESITA SALCIDO REAL**

Hermosillo, Sonora, México

Junio del 2012

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

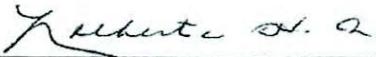
## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de María Teresita Salcido Real la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Acuicultura.



---

Dr. Marco Antonio López Torres  
Director de Tesis



---

cDr. Nolberta Huerta Aldaz  
Sinodal secretario



---

Dr. José Antonio López Elías  
Sinodal



---

cDr. Ramón Héctor Barraza Guardado  
Suplente

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo primero que todo a mis padres, **María Teresa Real Carpio y Rodrigo Salcido Ruelas** por su paciencia y apoyo en todo momento de mi vida. Ustedes me enseñaron que todo lo podía lograr y gracias a ustedes he llegado hasta aquí, los AMO.

A mis hermanas **Rocío y Omara** por todos los momentos compartidos y hasta las peleas las quiero, a ti **Oliver** porque me enseñaste que cuando se quiere se puede, te quiero. **Liz**, desde que nos conocimos nos convertimos en grandes amigas y hermanas ahora, gracias por tu paciencia.

A mi abuelita **María Jesús Ruelas mi “nana chu”** porque siempre estás ahí cuando te busco, te adoro, y a mis tías hermosas que siempre han estado conmigo y apoyado siempre en todo momento, **Marcela, Cande, Tita, Pola**, gracias por siempre estar conmigo.

A mis pedacitos de cielo que me alegran cada día los AMO **Alejandra, Regina y Arturito** son lo mejor que me ha pasado. Siempre están en mi corazón espero que si algún día llegan a leer estas líneas, sepan que los adoro.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) por permitirme concluir mis estudios y darme las herramientas para concluir este proyecto.

Al **Dr. Marco Antonio López Torres** por su apoyo y paciencia durante todo el desarrollo de mi tesis, usted siempre me enseñó que hay que ser constantes y dedicados al realizar las cosas, muchas gracias.

A la **cDr. Nolberta Huerta Aldaz** profa mil gracias por su paciencia, usted siempre estuvo conmigo, las mejores tazas de café las tomé con usted, muchas gracias por su amistad, gracias por esas largas pláticas de las cuales aprendí mucho, por sus consejos y apoyo, la quiero mucho.

Agradezco al **cDr. Ramón Héctor Barraza Guardado** por todo su apoyo y ayuda durante la revisión y escrituración de la tesis.

Al **Dr. José Antonio López Elías** por sus consejos y su buena disposición para ayudarme, muchísimas gracias.

A **M.C. Manuel Juárez** por a ver me apoyado en la colecta durante los muestreos.

Se agradece a la **Ing. en Ac. Rosa María Barragán Olavarría** y **Q.F.B. Ulisa Arnold**, técnicas del proyecto y personal de la granja por haber participado durante los muestreos y por llevar a cabo los análisis de bacterias cultivables.

Al personal de la granja Acuícola "Polo", especialmente a **Ulises Omar Plascencia Saavedra**, **Biol. Antonio Juvera Hoyos** y **Jesús Roberto Kawaminami Meléndrez**.

A todos mis compañeros del Z10 y Especialidad: **Nayeli, Martita, Diana, Martín, Cristian**, en especial a **Nidya Arce Castillo, Alejandra López Vásquez** desde el primer día gracias por estar siempre hasta hoy y hasta siempre, se que la amistad que nació perdurará, muchas gracias las adoro con el corazón.

A **Irais Trujillo Villalba** muchas gracias por todos esos momentos que pasamos muy divertidos, por esas largas pláticas de todo y de nada, ha pero como aprendimos, Te quiero.

A ti por todos los momentos que pasamos, las risas, consejos, enojos, me divertí demasiado, ningún amigo como tu **Sergio David Moreno Velásquez**, te quiero.

A **Liliana Isabel Otorga Falcón** “mi amiwa” gracias porque a pesar del tiempo nuestra amistad es constante, gracias por quererme y entenderme como soy.

Esta tesis se desarrolló dentro del proyecto: “Estudio sobre el Balance de Masas de Nitrógeno en una Granja Semiintensiva de Camarón Operada Bajo un Sistema de Cultivo Semicerrado”. Clave: ICDSI0902V, responsable **cDr. Ramón Héctor Barraza Guardado**. La información de calidad de agua y bacterias cultivables fueron proporcionadas del proyecto.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>APROBACIÓN</b>	i
<b>DEDICATORIA</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
II.2. Importancia de las Bacterias en los Sistemas Acuícolas	5
II.3. Efluentes en Acuicultura	6
II.3.1. Toxicidad de amonio en los sistemas de cultivo	8
II.3. 2. Sistemas de cultivo de camarón	8
II.4. Hibridación in situ Fluorescente (FISH)	10
II. 4.1. 16S rRNA como marcador molecular	12
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	13
<b>IV. HIPOTESIS</b>	14
<b>V. OBJETIVOS</b>	15
V.1 OBJETIVO GENERAL	15
V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
<b>VI. METODOLIGÍA</b>	16
VI.1.Área de Estudio	16
VI.2. Diseño Experimental	16
VI.3. Colecta de Muestras de Agua y Medición de Parámetros in situ	18
VI.4. Colecta de Muestras de Agua	18
VI.5. Siembra de Bacterias Cultivables y Fijación de muestra para Epifluorescencia	18
VI.6. Bacterias Totales (BT) con Naranja de Acridina	19
VI.7. Hibridación Fluorescente in situ (FISH)	19

VI.7.1. Sondas Filogenéticas	19
VI.7.2 Procedimiento para FISH	20
VI.8. Determinación de Parámetros Fisicoquímicos	21
VI.9. Análisis Estadístico	21
<b>VII. RESULTADOS</b>	22
VII.1. Bacteriología	22
VII.1.1. Bacterias cultivables (BHV y BTV)	22
VII.1.2. Bacterias totales (BT)	25
VII.1.3. Bacterias metabólicamente activas (BMA)	26
V. II.2. Parámetros Fisicoquímicos	29
VII.2.1. Temperatura	29
VII.2.2. Oxígeno disuelto (OD)	30
VII.2.3. Salinidad.	31
<b>VIII. DISCUSIONES</b>	33
VIII. 1. Bacterias Cultivables (BHV y BTV)	33
VIII. 2. Bacterias Totales (BT)	34
VIII. 3. Bacterias Metabólicamente Activas (BMA)	35
VIII. 4. Parámetros Fisicoquímicos	36
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	38
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	39
<b>XI. LITERATURA CITADA</b>	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Producción de camarón en Sonora (COSAES 2011).	4
Figura 2	Principio de la técnica hibridación <i>in situ</i> fluorescente.	11
Figura 3	Ubicación geográfica de la granja “Acuícola Polo”.	16
Figura 4	Representación esquemática de los módulos 5 y 6A utilizados durante el cultivo en la granja Acuícola Polo. Se indica la toma de agua (EB), reservorio, canal secundario y el flujo de agua entre los estanques interconectados. Los estanques con números indican los que fueron monitoreados.	17
Figura 5	Concentración promedio de bacterias heterótrofas viables (BHV) en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	22
Figura 6	Concentración promedio de bacterias tipo <i>Vibrio</i> (BTV) que presentaron coloración amarilla (CA) y color verde (CV) en TCBS, en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	24
Figura 7	Concentración promedio de bacterias tipo <i>Vibrio</i> (BTV) en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	24
Figura 8	Concentración promedio de bacterias totales (BT) en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	25
Figura 9	Concentración promedio de bacterias metabólicamente activas (BMA) en las distintas zonas de cada módulo y entradas de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	27
Figura 10	Concentración promedio de BTV, BHV, BMA y BT, en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	28

Figura 11	Comportamiento promedio ( $\pm$ DE) de la temperatura en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	29
Figura 12	Comportamiento promedio ( $\pm$ DE) del oxígeno disuelto en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	31
Figura 13	Comportamiento promedio ( $\pm$ DE) de la salinidad en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.	32

## RESUMEN

El cultivo de camarón utilizando un bajo recambio de agua es una alternativa que puede ser evaluada e implementarse en un futuro. En la presente investigación se evaluó un sistema de bajo recambio de agua con estanques interconectados. El objetivo fue determinar el comportamiento de bacterias heterótrofas viables (BHV), tipo *Vibrio* (BTV), totales (BT) y metabólicamente activas (BMA) durante el desarrollo de un cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Se utilizaron dos módulos (M5 y M6A). Los monitoreos se realizaron en 7 estanques para el M5 y en 5 estanques para el M6A. Se realizaron comparaciones entre módulos y zonas de cada módulo para ello se agruparon los estanques en: entrada, parte media y final. Las BHV mantuvieron concentraciones promedio iguales entre módulos ( $P > 0.05$ ), pero significativamente más altas que en el agua de entrada (EA). Las BTV también registraron entre módulos valores promedio significativamente iguales ( $P > 0.05$ ), sin embargo, se encontró que dentro del sistema las colonias amarillas dominaron ya que este grupo alcanzó promedios más altos ( $P < 0.05$ ) que las colonias verdes. Las BT en el M6A presentaron concentraciones más altas con respecto al M5 ( $P < 0.05$ ), este grupo mantuvo promedios en la EA más bajos ( $P > 0.05$ ) con respecto a ambos módulos. Las BMA en el M5 presentaron los promedios significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) con respecto al M6A, al igual que las BT este grupo presentó los valores más bajos en la EA ( $P > 0.05$ ). Los parámetros fisicoquímicos (temperatura, oxígeno disuelto y salinidad) presentaron condiciones muy homogéneas entre las zonas de cada módulo y con rangos similares a los cultivos tradicionales. En general los grupos bacterianos estudiados mantuvieron valores comparables con los encontrados en cultivos tradicionales y las concentraciones de bacterias patógenas se mantuvieron bajas, lo que indica que este sistema mantiene condiciones sanitarias favorables para el cultivo de camarón. Los parámetros fisicoquímicos mostraron condiciones favorables para desarrollo bacteriano dentro del sistema.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la acuicultura es la actividad agroindustrial de mayor desarrollo a nivel mundial, con un volumen global de 51.7 millones de toneladas y un valor de alrededor de 78,800 millones de dólares, con lo que contribuye en un 42% a la producción de organismos acuáticos (FAO, 2008). Esto la convierte en una actividad muy importante para el abastecimiento de productos acuáticos para consumo humano, así como una industria que genera un porcentaje alto de empleos.

Sin embargo, la rápida expansión e intensificación de la acuicultura ha generado una creciente preocupación en relación a su impacto sobre los cuerpos de agua debido principalmente a la descarga de sus efluentes, por lo que es necesario el desarrollo e implementación de políticas ambientales (Caffey et al., 1996; Lawrence, 1996 y Velasco et al., 1996). Los grandes volúmenes de descarga sin tratamiento previo constituyen una fuente de contaminación hacia el sistema marino y sin un eficiente manejo al interior de las granjas es un medio de transmisión de vectores que inciden en los aspectos sanitarios en esa actividad y de los ecosistemas acuáticos adyacentes (Chamberlain, 2002).

Diversos autores coinciden al mencionar que los principales componentes en el agua que es descargada por las granjas camaroneras son el nitrógeno y fósforo, los sólidos suspendidos y bacterias patógenas y no patógenas, generando la eutrofización o nitrificación de los sistemas receptores, debido a la gran cantidad de materia orgánica que es descargada (Boyd, 1990; Hopkins et al., 1993; Brock y Main, 1995; Cook y Clifford, 1998; Barraza-Guardado et al., 1999; Páez-Osuna, 2001c; Boyd, 2001; González-Félix y Pérez-Velázquez, 2006; Casillas-Hernández et al., 2006; Miranda-Baeza et al., 2007).

El cultivo de camarón utilizando un bajo recambio de agua es una alternativa que puede ser evaluada e implementarse en un futuro. Desde el punto de vista biológico es factible ya que la pérdida de nitrógeno en un sistema de bajo o mínimo recambio se ve considerablemente reducida (Thakur y Lin, 2003). Al minimizar el recambio de agua, los nutrientes no consumidos, así como los metabolitos de desecho son retenidos dentro del sistema y promueven el desarrollo de la productividad primaria, ya que son incorporados por

bacterias, fitoplancton y zooplancton, que a su vez constituyen una fuente de alimento suplementario para el camarón (Tacon et al., 2002).

Las bacterias llevan a cabo diferentes funciones en los ecosistemas acuáticos, mantienen interacciones con otros microorganismos como las microalgas y junto con ellos, forman parte de los componentes básicos del ecosistema. Uno de los papeles que desempeñan las bacterias en el medio marino, es el reciclamiento o remineralización de la materia orgánica. Dentro de estas, las bacterias nitrificantes y desnitrificantes, así como el fitoplancton, juegan un papel muy importante en la reutilización del nitrógeno y en reducir su pérdida (Buford et al., 2002). Además, tienen la capacidad de absorber nutrientes desde el océano y hacer circular fuentes de carbono mediante diversas interacciones ecológicas (Riquelme y Avendaño, 2003).

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar las cargas de bacterias cultivables y no cultivables en estanques de un sistema novedoso de bajo recambio de cultivo de camarón, con el propósito de determinar la importancia de los microorganismos sobre el comportamiento del sistema.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Acuicultura

Se define a la acuicultura como el cultivo de recursos hidrobiológicos en ambientes físicos controlados en reemplazo y en mejora de los organismos que se encuentran en condiciones naturales (Saldías et al., 2004).

La producción mundial de organismos acuáticos en 2008 fue de alrededor de 142,287,124 millones de toneladas con un valor superior a los 70 mil millones de dólares; de este total, poco más de 60 millones de toneladas las contribuyó la acuicultura (FAO, 2009).

Los principales países que destacaron durante 2004 en la producción acuícola fueron China, Estados Unidos, Tailandia, Norteamérica, India, Vietnam, Indonesia, Bangladesh, Japón, Chile, Noruega y Filipinas (FAO, 2008). Sin embargo, nuevos países han surgido en los últimos años en esta importante industria, tales como: Egipto, Myanmar, Irán, República de Corea, Islas Feroes, México, Brasil, Rusia, Taiwán y Canadá (Martínez-Córdova y Enríquez-Ocaña, 2007).

En México, la acuicultura ha adquirido mayor importancia en los últimos años, arrojando beneficios sociales y económicos los cuales a su vez se han traducido en una fuente de alimentación con un elevado valor nutricional. Los principales cultivos en México, específicamente en Sonora, son los crustáceos en donde se cultiva el camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*); en cuanto a moluscos bivalvos las especies de mayor manejo comercial son *Crassostrea gigas* (ostión japonés) y *Crassostrea corteziensis* (ostión de mangle) (COSAES, 2009).

Sonora ocupa el primer lugar a nivel nacional en la producción de camarón de cultivo, representando aproximadamente el 60% de la producción nacional con un aporte de más de 81,000 toneladas en el 2009, por lo cual este sector productivo es base de una enorme generación de empleos directos e indirectos y una derrama económica muy importante para el Estado, alcanzando en el 2010 se obtuvo una producción de 49, 400,147 toneladas (COSAES, 2010).

Hasta hace dos años en el estado de Sonora no se habían reportado casos de gravedad sobre el virus de la mancha blanca, fue en el 2009 cuando empezó en el sur del Estado y se fue

extendiendo hasta llegar a la zona de Bahía de Kino, Sonora. Para el 2010, en el ciclo productivo se tuvo la presencia del virus en todo el Estado, ésto ocasionó una reducción importante del 40% de la producción con respecto al 2009. En la Figura 1 se muestra el comportamiento de la producción de camarón del Estado (COESAES, 2011).

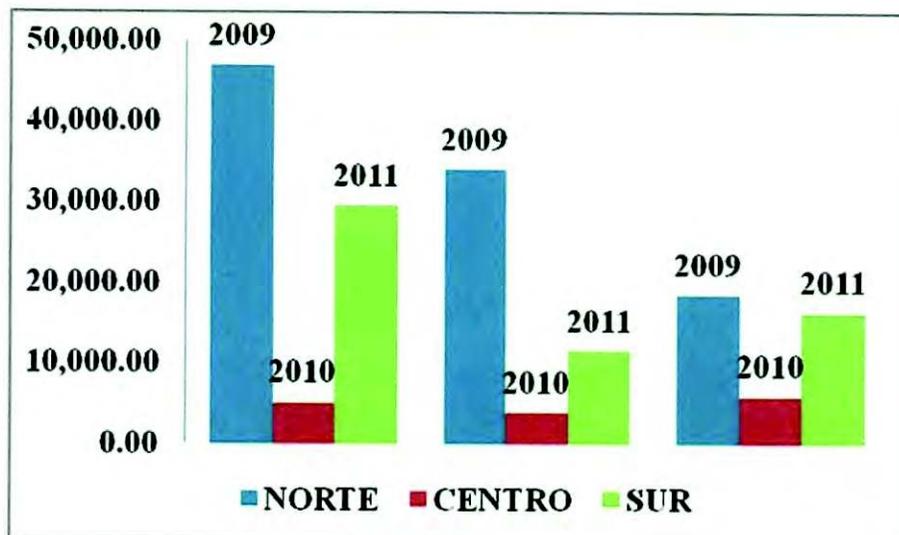


Figura 1. Producción de camarón en Sonora (COESAES, 2011).

La acuicultura mundialmente, ha sido catalogada como una actividad poco sustentable que ocasiona importantes impactos ambientales (Páez-Osuna, 2001), ya que trae consigo la destrucción de manglares, ecosistemas muy importante para el desarrollo de miles de especies juveniles, además de la contaminación de fuentes de agua para consumo humano, la eutrofización de las áreas de descarga de efluentes y la aparición de enfermedades por la poca eficiencia en el manejo de los sistemas (Martínez-Córdova et al., 2008).

Es por esta razón que se deben de llevar a cabo nuevos diseños para el desarrollo de los sistemas acuícolas que sean amigables con el ambiente, el mejoramiento de las prácticas de manejo en las granjas y que sean redituables para los productores (Páez-Osuna, 2001; Olguín et al., 2007).

## II.2. Importancia de las Bacterias en los Sistemas Acuícolas

Un estanque de engorda de camarón es un sistema muy dinámico en donde interactúan estrechamente diversos factores como salinidad, pH, temperatura, oxígeno disuelto, así como diversos nutrientes orgánicos e inorgánicos. Las enfermedades en los organismos está relacionado con el sistema de cultivo, es decir, entre más intensivo es el cultivo, mayor es el riesgo debido a la mayor densidad de siembra y por lo tanto, una mejor facilidad para que ocurra una transmisión de la enfermedad. Las comunidades microbianas presentes en los estanques, son susceptibles a las fluctuaciones e interacciones que se dan entre diversos factores, debido a ello, modifican su composición y número. Por ejemplo, variables como pH, temperatura y salinidad tienen diversos valores óptimos para las distintas especies, por lo cual, sus cambios pueden favorecer a determinados grupos, y así se rompe el equilibrio y dinámica del sistema permitiendo, en algunos casos, la predominancia de organismos patógenos, los cuales podrían crecer desproporcionadamente (Martínez-Córdova., 1999).

Se sabe en la actualidad que los géneros de bacterias que son dominantes en las aguas marinas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Spirillum*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, entre otras, de las cuales el 99.9% de las bacterias naturales del medio marino no pueden ser cultivados en agar marino (Eilers et al., 2000).

Uno de los grupos de bacterias más importantes dentro de los cultivos acuícolas es el género *Vibrio*, son consideradas como patógenos oportunistas, localizadas principalmente en el tracto digestivo, branquias y cutícula de camarones peneidos, ya que en presencia de otros factores estresantes, pueden desencadenar el desarrollo de infecciones. Las especies causantes de altas mortalidades en las granjas camaronícolas son: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *Photobacterium damsela* y las especies que tienen cepas patógenas reportadas en los laboratorios causantes de mortalidades en larvas y postlarvas son *V. harveyi*, *V. splendidus* y *Vibrio* sp. (Almanza et al., 2008).

Las enfermedades de origen bacteriano se consideran secundarias, éstas son resultado de otras enfermedades o cambios en el funcionamiento del sistema condiciones del cultivo y

diversos factores como las fluctuaciones de oxígeno y otros parámetros, como la sobrealimentación, pueden causar la aparición de éstas. De ahí la importancia de los monitoreos constantes de la carga poblacional de bacterias (Paéz-Osuna, 2001).

Dentro de los grupos de bacterias presentes en ecosistemas marinos, existe un grupo de bacterias aeróbicas estrictas que poseen enzimas catalíticas, las cuales son apropiadas para efectuar la oxidación de los compuestos nitrogenados (Brock, 1999). Estas bacterias son comúnmente conocidas como bacterias nitrificantes y son bacterias quimiolitautótrofas de crecimiento lento; son proteobacterias de diferentes subclases que habitan en ambientes marinos con pH alcalino y altos niveles de amonio (Campbell, 2005).

Los géneros más importantes de estas bacterias son *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*; las cuales son Gram-negativo, autótrofas facultativas, móviles por flagelo polar o lateral o inmóviles (Prescott, 2004). Otra característica importante en estas bacterias es su necesidad de oxígeno para oxidar y transformar sucesivamente el amonio en nitritos y nitratos. Existen también bacterias heterótrofas capaces de oxidar el amonio como son *Aerobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Aerobacter* sp. (Prescott, 2004) y algunos géneros de hongos como *Aspergillus flavus*, *Penicillium*, es decir, que si se logra manipular a los microorganismos dentro de los sistemas acuícolas representa un gran avance para la eliminación de compuestos tóxicos.

### **II.3. Efluentes en Acuicultura**

La Acuicultura tiene como objetivo principal la producción de especies acuáticas bajo condiciones controladas o semicontroladas. Para optimizar el crecimiento de los organismos en granjas de cultivo se utiliza alimento balanceado y fertilizantes, principales agentes que afectan la calidad del agua en los cultivos (Saldias et al., 2004), en la mayoría de los casos el agua que se encuentra en los efluentes que son descargados directamente al mar en zonas cercanas a la costa, son incapaces de transformar dichos desechos.

En las últimas décadas, la acuicultura ha tenido diferentes retos en lo que concierne al diseño de sistemas de cultivo más tecnificados, sobre todo en lo referente al cultivo de camarón, en los últimos años se ha visto afectado por enfermedades infecciosas debido, principalmente, al mal manejo de los cultivos desde el punto de vista sanitario (Martínez-Córdova, 2002).

Actualmente una de las alternativas desarrolladas para la tecnificación de los cultivos es el uso y manejo de sistemas cerrados y semicerrados. Este sistema viene a beneficiar dos puntos muy importantes dentro del cultivo: la alimentación de los organismos como el elemento más caro y el desarrollo de comunidades bacterianas y fitoplanctónicas que sirven como alimento aún en las fases de engorda, así como la reducción de las descargas de efluentes, lo que beneficia tanto al medio ambiente como al ahorro económico en el proceso debido a que el recambio de agua también es costoso (Wang, 2003). En este tipo de sistemas son muy importantes las bacterias nitrificantes y los filtros utilizados, ya que el objetivo principal es que no haya renovación de agua, desarrollando ciclos de cero recambios con el uso de bacterias nitrificantes y contrarrestar los efectos causados por los metabolitos nitrogenados producidos por los organismos (Puigcerver y Tort, 1997).

De acuerdo con las investigaciones que se han realizado de este tipo de sistemas se ha encontrado que la eliminación de los compuestos nitrogenados está dada en casi el 70% por los microorganismos que se encuentran adheridos a las superficies del sistema formando aglomeraciones de microorganismos como son microalgas, bacterias, protozoarios, etc. (Ingle de la Mora et al., 2003). En este contexto Puigcerver y Tort, (1997), realizaron una investigación donde evaluaron dos medios bacterianos: uno era medio bacteriano líquido y un medio bacteriano liofilizado, Los dos productos contenían una mezcla de bacterias heterótrofas de los géneros *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *Escherichia hermannii*, que se encargaron de reducir el exceso de materia orgánica. Además, la mezcla que contenía *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp. que redujeron los compuestos nitrogenados tóxicos en nitrato-aceleradores del proceso de nitrificación y encontraron que el tiempo de establecimiento de los microorganismos en los biofiltros, varía según las variables implicadas, tipo de filtro utilizado, el sustrato filtrante, temperatura, salinidad e incluso la especie y densidad de carga del cultivo. Estos autores concluyen que existen parámetros que influyen directamente en el establecimiento de la población bacteriana como son la

temperatura, tipo de sustrato y oxigenación. Asimismo, infirieron que el establecimiento del biofiltro era independiente del desarrollo de la población bacteriana ya que ésta es de desarrollo más lento.

### **II.3.1. Toxicidad de amonio en los sistemas de cultivo**

El amoníaco es el principal metabolito de excreción de los crustáceos, que es producido por la descomposición del material orgánico que contiene oxígeno principalmente producido por bacterias anaeróbicas. Los productos nitrogenados son el resultado del poco cuidado que se tiene en las estrategias de alimentación de los cultivos, debido a que la sobrealimentación origina la acumulación excesiva de los compuestos nitrogenados en el medio, lo cual perjudica los organismos provocando diversos efectos fisiológicos, principalmente a nivel celular ocasionando un gasto excesivo de energía (ATP) lo que afecta directamente a la reproducción, crecimiento y osmoregulación (Gross et al., 2003).

Algunos otros problemas que puede causar el exceso de amonio en los organismos es con relación a la tasa de excreción de nitrógeno y esto ocurre cuando la cantidad de amonio es tan grande que los niveles en la hemolinfa y los tejidos aumenta, lo que provoca que los organismos dejen de comer y el transporte de oxígeno se hace deficiente. Estos problemas son más frecuentes en los organismos adultos aunque su efecto puede ser más letal en larvas, ya que son más susceptibles a altas concentraciones de amonio (Frías y Páez, 2001a).

### **II.3. 2. Sistemas de cultivo de Camarón**

Para que un cultivo produzca organismos acuáticos con éxito va a depender un 100% del entendimiento del acuicultor acerca de los sistemas de producción empleados, sean éstos de tipo extensivo, semi-intensivo o intensivo; en este caso hay que tomar en cuenta que a medida que se avanza con el tipo de sistema empleado es decir, desde el más simple (extensivo o artesanal) hasta el más complejo (intensivo) aquí las tecnologías son más sofisticadas y deben

ser bien comprendidas antes de iniciar el cultivo. Los sistemas semi-intensivos e intensivos en acuicultura, deben ser muy bien regulados en lo que respecta al mantenimiento de la calidad de agua, de tal forma que los organismos mantengan su bienestar en cautiverio y obtener productos finales de alta calidad. Además no deben ocasionar pérdidas al productor que hagan fracasar su negocio, ya que la acuicultura es un negocio y como tal debe obtenerse rentabilidad (Boyd y Tucker 1998).

En la práctica de la acuicultura se utilizan grandes cantidades de agua (Saldias et al., 2004). La disminución de la calidad del agua generalizada ha abierto la posibilidad de realizar una acuicultura de alta densidad a través de la reutilización de agua, para lo cual se utilizan sistemas cerrados con recirculación. A pesar de que este tipo de tecnología es más costosa, la alta rentabilidad potencial ha captado la atención de nuevos productores y ha hecho atractivos los cultivos altamente intensivos. No obstante, la mayor densidad del cultivo en organismos marinos conlleva a una mayor producción de desechos que se acumulan y degradan la calidad del agua de cultivo. Entre estos desechos están el amoníaco, anhídrido carbónico, material fecal y otros provenientes del metabolismo propio de los animales, además de los desperdicios del alimento ofrecido (Frías-Espericueta et al., 1999).

La materia orgánica (heces) al degradarse produce una cantidad apreciable de amoníaco, nitritos y nitratos, elementos tóxicos para los organismos a concentraciones tan bajas como  $0.5 \text{ mg/L}^{-1}$  (miligramos por litro) de  $\text{NH}_3\text{-N}$ . Los niveles elevados de amoníaco causan daños en los organismos cultivados principalmente a tejidos, especialmente branquias y riñones, desequilibrio físico, disminución del apetito, reducción en la resistencia a enfermedades y finalmente la muerte. En los sistemas típicos de recirculación, se debe recambiar diariamente una pequeña cantidad de agua, por agua nueva que entra al sistema, procediendo así al control de los compuestos nitrogenados al reemplazar el agua que se evapora y lavando los filtros. Las opciones para ello son numerosas y se ejercen por medio de procesos de naturaleza física, química y biológica. Los principales procesos utilizados en los tratamientos a efectuar en este tipo de sistema son: utilización de filtros, sedimentación, filtración media granular, filtración biológica, aireación y desinfección (Kinne et al., 2001).

#### **II.4. Hibridación in situ Fluorescente (FISH)**

Para el estudio de la ecología microbiana se han desarrollado diferentes técnicas para la identificación y control de microorganismos. La problemática de los métodos tradicionales de identificación radica principalmente en que en la técnica de cultivo, morfología y pruebas bioquímicas sólo reflejan aproximadamente el 1% de las bacterias presentes en el ambiente son las que se pueden cultivar (Amann et al., 1990a), además, estos métodos no establecen la abundancia, estructura y distribución real de los microorganismos. En la actualidad se han probado diferentes técnicas de tipo moleculares para la identificación de microorganismos no cultivables, una de estas técnicas utilizadas en la actualidad para la caracterización de bacterias es la hibridación in situ fluorescente (FISH por sus siglas en inglés). Ésta es una técnica desarrollada recientemente para la identificación de microorganismos en su hábitat natural. Con esta técnica se han realizado las determinaciones de bacterias específicas y la organización de una comunidad microbiana marcando su material genético por hibridación (Amann et al., 1990b y Olmos, 2003).

Las sondas para una especie permiten visualizar la distribución de esa especie en particular. Esta técnica, por tanto, puede servir para identificar entidades de bacterias de tipo filogenético tales como género, familia o subclase (Padilla-Sánchez, 2005 y Sousa et al., 2007). En este estudio serán utilizadas para contabilizar bacterias. El principio de FISH es someter la muestra a calor, para que la doble cadena de ADN se abra y entonces se hibride con la sonda y se detecte la fluorescencia que ésta emite. La sonda es una secuencia de ADN/ARN homóloga a la región de ADN o ARN que se requiere localizar y se construye usando nucleótidos que se marcan con moléculas fluorescentes. Cuando el ADN abierto se pone en contacto con la sonda, se une antes que la propia cadena y así el material genético queda marcado y puede ser visualizado a través de microscopía de epifluorescencia (Cottrell y Kirchman, 2000). En la Figura 2 se puede observar el principio de FISH.

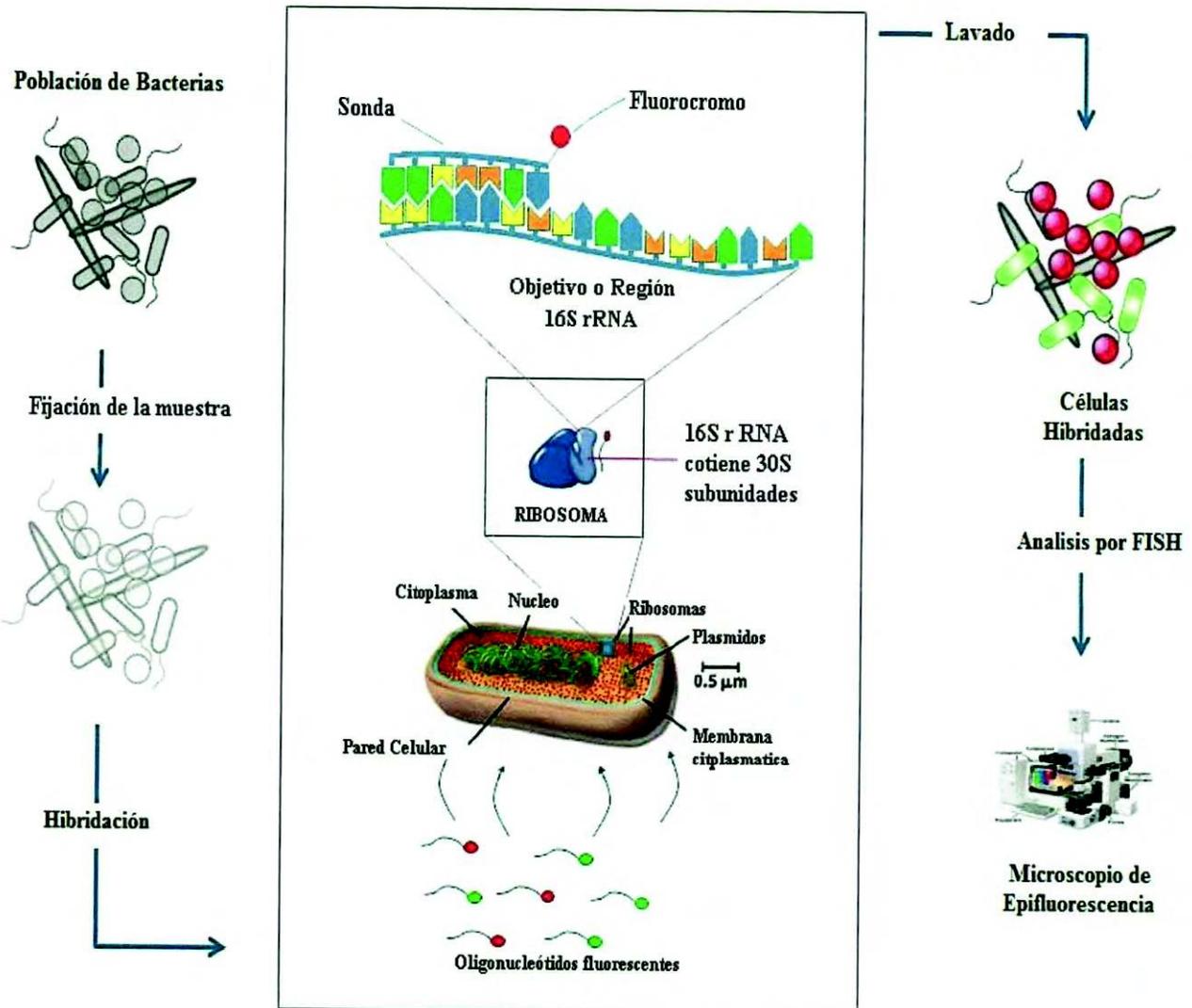


Figura 2. Principio de la técnica hibridación in situ fluorescente.

#### **II. 4.1. 16S rRNA como marcador molecular**

Las pruebas que se utilizan en la actualidad para la identificación de comunidades de bacterias no reflejan en su totalidad la información completa sobre su origen, es decir, las relaciones evolutivas de una especie a otra, simplemente las identifica a nivel evolutivo, clase, subclase o género (Olsen et al, 1986). La subunidad 16S rRNA ha sido ampliamente utilizada para la identificación de microorganismos no cultivables, así como para ver las relaciones evolutivas dentro de comunidades de bacterias. Esta subunidad presenta muchas ventajas para su utilización, una de las más importantes es la ocurrencia es decir, la cantidad de copias que pueden existir en una célula; si existen de 1,000 a 10,000 ribosomas por célula se dice que esa bacteria se encuentra metabólicamente activa, otra razón por la que es utilizado, es que presenta secuenciaciones universales y variables entre especie o grupos de bacterias (Amann et al., 1995).

### III. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura se ha convertido en la actividad de producción de alimentos para consumo humano con mayor crecimiento a nivel mundial. La importancia de cubrir las necesidades alimentarias de la población aumenta rápidamente y con ello, la necesidad de hacerlo de una manera sustentable. En el ámbito económico, la acuicultura representa una actividad de gran importancia, ya que genera empleo y es una fuente de divisas (FAO, 2003).

En la actualidad el cultivo de camarón ha tenido grandes avances en los sistemas de producción como lo son los sistemas de bajo recambio de agua y el uso de probióticos. El empleo de probióticos ha demostrado ventajas en la producción controlada de organismos acuáticos en diversas etapas de su desarrollo larval y juvenil, pero por desgracia constantemente aparecen más bacterias con carácter etiológico infeccioso que se deben atacar, por lo que la búsqueda de nuevos probióticos más eficaces serían un recurso potencial en la acuicultura marina (Castro-Mejía, 2005), de ahí la importancia de conocer y caracterizar a los microorganismos existentes en los sistemas de producción y buscar la promoción del crecimiento de bacterias benéficas dentro de los sistemas y así mantener interacciones entre microorganismos ya que forman parte de los componentes básicos del ecosistema.

En la acuicultura se han utilizado métodos para la cuantificación e identificación de bacterias las cuales permiten conocer el número aproximado de bacterias en una muestra, empleando técnicas de microbiología convencional tales como el aislamiento en cultivos puros o enriquecimiento selectivo de los microorganismos de interés, sin embargo, actualmente diversos estudios han establecido que dichas técnicas presentan varias desventajas y sesgos en cuanto a los resultados obtenidos (Amman, 1995). En la actualidad la biología molecular es una herramienta muy importante en el estudio de microorganismos (Velásquez-Aragón, 2005), su importancia radica en que es capaz de detectar grupos microbianos específicos presentes en los sistemas de producción que pueden dañar los cultivos. De igual forma permite cuantificar las poblaciones totales de bacterias que proliferan en los cultivos de camarón.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las bacterias en un sistema de cultivo de bajo recambio de agua, favorecen condiciones de buena calidad de agua y controlan la proliferación de especies patógenas, mientras que en los tradicionales, los recambios fuertes no permiten el establecimiento de bacterias benéficas, ya que la entrada y salida de estas no favorecen la maduración del sistema en términos de comunidad microbiana.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el comportamiento bacteriano espacial y temporal durante el desarrollo de un cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) utilizando un sistema de bajo recambio de agua.

### **V.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Determinar las concentraciones de bacterias cultivables durante del desarrollo del cultivo del camarón como son: bacterias heterótrofas viables y bacterias tipo *Vibrio*.

Determinar la población bacteriana total y bacterias metabólicamente activas.

Caracterizar la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto para establecer su relación con el crecimiento bacteriano.

## VI. METODOLOGÍA

La presente investigación se realizó en la granja “Acuícola Polo”, ubicada en el ejido Viva México a aproximadamente 120 km al noroeste de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México (Figura 2).



Figura 3. Ubicación geográfica de la granja “Acuícola Polo.”

### VI.2. Diseño Experimental

Se utilizaron dos módulos; módulo 5 (M5) y módulo 6A (M6A), donde se llevó a cabo un cultivo de camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*), el cual duró 187 días. Cada módulo constó de una batería de estanques donde el M5 estuvo conformado por 34 estanques de 1 ha y el M6A por 10 estanques de 3 ha (Figura 4).

El sistema a evaluar consistió en utilizar un bajo recambio de agua 1% y manejar estanques interconectados de tal manera que el agua solamente entrara por el primer estanque y saliera por el último. El flujo de agua entre los estanques se hizo por medios de tubos de plástico corrugado.

Al módulo M5 se suministró agua a través de un canal secundario (CS). El M6A se estableció directamente del canal reservorio (RE) se bombeó agua con una toma directa de mar abierto.

Los monitoreos se realizaron en 7 estanques para el caso de M5 (E1, E7, E12, E22, E27 y E34) y 5 estanques para el M6A (E1, E3, E5, E9 y E10), en ambos módulos se consideraron el primero y el último estanque.

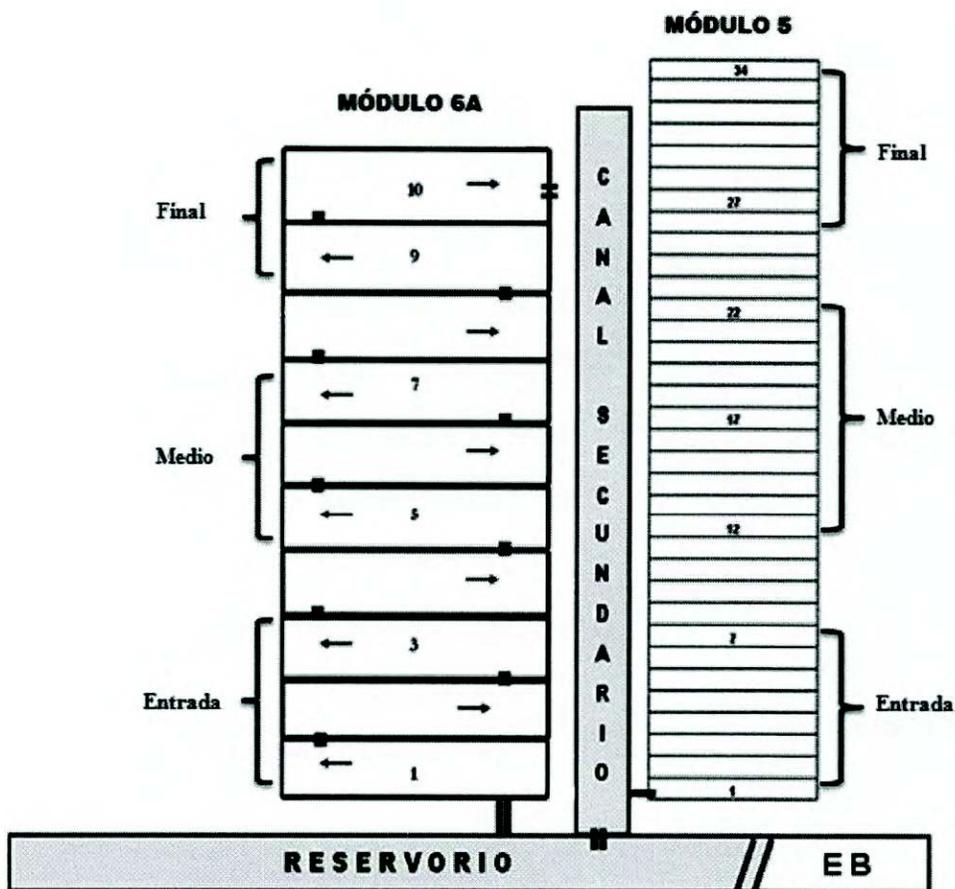


Figura 4. Representación esquemática de los módulos 5 y 6A utilizados durante el cultivo en la granja Acuícola Polo. Se indica la toma de agua (E.B.), reservorio, canal secundario y el flujo de agua entre los estanques interconectados. Los estanques con números indican los que fueron monitoreados.

### **VI.3. Colecta de Muestras de Agua y Medición de Parámetros in situ**

La colecta de muestras y medición de parámetros se realizó de manera mensual hasta finalizar el cultivo de camarón, los sitios de muestreo fueron: del M5 los estanques E1, E7, E12, E22, E27 y E34; para el M6A los estanques E1, E3, E5, E9 y E10 incluyendo la entrada de agua a los estanques # 1 de cada módulo, salida de agua de todos los estanques estudiados, incluyendo también la salida del estanque # 1 de cada módulo. Se monitoreo también la estación de bombeo (EB), reservorio (RE), canal secundario (CS).

### **VI.4. Colecta de Muestras de Agua**

En cada estanque o lugar de muestreo se tomaron muestras de agua, para análisis de bacterias heterótrofas viables (BHV) y bacterias tipo *Vibrio* (BTV), así como bacterias totales (BT) y bacterias metabólicamente activas (BMA). Las muestras fueron colectadas en bolsas de plástico estériles WIRLPACK de un volumen de 120 mL, las cuales se conservaron en frío y oscuridad hasta su siembra y fijación en el laboratorio.

### **VI.5. Siembra de Bacterias Cultivables y Fijación de Muestra para Epifluorescencia**

La siembra para bacterias se realizó por medio de la técnica de siembra en superficie (APHA, 1992), a partir de diluciones seriadas, dependiendo de la carga bacteriana esperada del punto de muestreo. Se sembraron por duplicado 0.1 mL de la dilución correspondiente para cada muestra en placas de Agar Marino para BHV y en agar Tiosulfato-citrato-sales biliares (TCBS) para BTV. Las placas inoculadas se incubaron a  $30\pm 2$  °C por  $48\pm 2$  horas, en ambos medios de cultivo. Al término de la incubación se contabilizaron las colonias y se procedió a realizar los cálculos, los cuales se expresan en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) (Vargas-Cárdenas y Lizárraga-Partida, 1997). Para el caso del agar TCBS se

tomaron en cuenta el número de colonias amarillas y verdes por separado. Para bacterias totales y metabólicamente activas se fijó un volumen de 50 mL de las muestras colectadas en formol filtrado por 0.22 micras a una concentración final del 6%, las cuales se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis (López-Torres y Lizárraga-Partida, 2007).

## **VI.6. Bacterias Totales (BT) con Naranja de Acridina**

De las muestras fijadas con formol se centrifugaron 12 mL de cada una de ellas para concentrarlas en alícuotas de 2 mL por 5 minutos a 5000 RPM; al final de los 12 mL el botón con bacterias se lavó dos veces con 1 mL buffer de fosfato salino (PBS) cada una. Finalmente se conservaron en PBS y etanol al 99% en una proporción de 1:1 (0.5 mL de cada reactivo). Estas se mantuvieron en frío hasta su análisis por microscopía de epifluorescencia (López-Torres y Lizárraga-Partida, 2007).

De las muestras lavadas se aplicaron 6 µl de muestra por duplicado en un pozo de 6 mm de diámetro de un porta objetos recubierto con teflón. Las bacterias se tiñeron con 3 µl de solución de naranja de acridina (SIGMA) al 10% por 5 minutos en la oscuridad. Cada portaobjeto se lavó con agua destilada y secó al aire. Posteriormente a cada pozo con muestra se le añadió una gota de aceite de inmersión de baja fluorescencia y se le colocó un cubreobjetos para su observación al microscópico de epifluorescencia (Labomed LX 400) con un filtro adecuado al fluorocromo utilizado para contabilizar las bacterias en 30 campos.

## **VI.7. Hibridación Fluorescente in situ (FISH)**

### **VI.7.1. Sondas filogenéticas**

En esta parte del estudio se utilizó una sonda para contabilizar bacterias metabólicamente activas, designada como EUB338 (GCT GCC TCC CGT AGG AGT) dirigida al 16S del

rRNA, de uso generalizado para la mayoría de las Eubacterias (Amman, 1990). Esta sonda fue elaborada por Genosys-Sigma (México) y se marcó con el fluorocromo 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA) etiquetada en la posición 5' durante su síntesis por Genosys-Sigma (México).

#### **VI.7.2. Procedimiento para FISH**

Para la preparación portaobjetos se impregnaron con una solución de gelatina de bovino (SIGMA) al 1% y 0.1% de sulfato de cromo y potasio (SIGMA) a una temperatura de 70°C introduciéndolos a la solución para posteriormente dejar secar en posición horizontal a temperatura ambiente. En el montaje de la muestra se colocó 6 µl de muestra en pozos por duplicado de un portaobjetos (igual al empleado para conteos totales) y se dejó secar al aire. Posteriormente se deshidrataron las muestras en secuencias de alcohol etílico a 50, 80 y 98 % por tres minutos en cada solución y nuevamente se dejó secar a temperatura ambiente en la oscuridad. Se preparó el buffer de hibridación (BH) a un volumen final de 2 mL y con una concentración final de 0.9 M de NaCl, 0.01 % de dodecyl sulfato de sodio (SDS) y 20 Mm de Tris/HCl a un pH de 7.2 y 25% de formamida. A cada pozo con muestra se aplicó 1 µL de la sonda (concentración final 25ng/ µL y 8 µL de BH se colocó el portaobjetos en una cámara de hibridación (tubo de 50mL) humedecido con el BH y se hibridó a 46 ±0.5°C por 12 horas en una incubadora. Posteriormente los portaobjetos se lavaron con búfer de lavado (que contenía 700 µL de NaCl, 1mL de TRIS-HCL, 50 µL SDS y se llevo hasta 50 Ml con agua milli-Q) por 10 minutos a 48°C y secaron a temperatura ambiente y en oscuridad para finalmente colocar una gota de solución antiblanqueo, citifluor A87 y se observaron al microscopio de epifluorecencia (LaboMed LX400) utilizando el filtro de excitación verde para el fluorocromo. Se contabilizaron las bacterias en 30 campos por duplicado y se calculó la concentración total de bacterias/ mL.

## **VI.8. Determinación de Parámetros Fisicoquímicos**

En cada estación se midió directamente la temperatura, oxígeno disuelto y salinidad utilizando un oxímetro de campo marca YSI 85 (YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio 45387 USA).

## **VI.9. Análisis Estadístico**

Todos los datos observados de bacterias y calidad de agua fueron graficados por módulos y entradas de agua, con su respectivos promedios y desviación estándar mediante figuras de cajas y bigotes. Para el caso de los conteos bacterianos, los datos fueron normalizados transformándolos al logaritmo base 10.

Se graficó datos de las concentraciones de bacterias por secciones de cada módulo. Para ellos se agruparon los datos de los estanques de la sección de la entra, parte media y final de cada modulo. Ésto con el propósito de determinar el comportamiento de las bacterias a través del sistema. El agrupamiento se hizo de la siguiente manera: entrada (M5:E1 y E7; M6A: E1 y E3), parte media (M5: E12, E17 y E22; M6A: E5 y E7) y final (M5: E27 y E34; M6A: E9 y E10).

Se aplicó un análisis de varianza de una vía con su respectiva prueba a posteriori con el propósito de determinar la diferencia de concentraciones de bacterias y calidad de agua entre módulos, entre zonas por módulos y entre los diferentes lugares de las entradas de agua. Se empleó el paquete estadístico PROSTAT versión 3.0.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Bacteriología

#### VII.1.1. Bacterias cultivables (BHV y BTV)

Los resultados obtenidos de bacterias heterótrofas viables (BHV) se presentan en la Figura 5, la cual incluye los conteos para las distintas zonas de ambos módulos y entradas de agua.

Se encontraron rangos promedios de BHV en el M5 que variaron entre las zonas de  $3.30 \times 10^3$  a  $5.48 \times 10^3$  UFC/mL. Los rangos promedios en el M6A fueron de  $1.11 \times 10^4$  a  $1.39 \times 10^4$  UFC/mL y en la entrada de agua fue de  $7.92 \times 10^2$  a  $1.37 \times 10^3$  UFC/mL. Las concentraciones de BHV fueron comparadas entre módulos y el resultado análisis de varianza determinó que no existieron diferencias significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ).

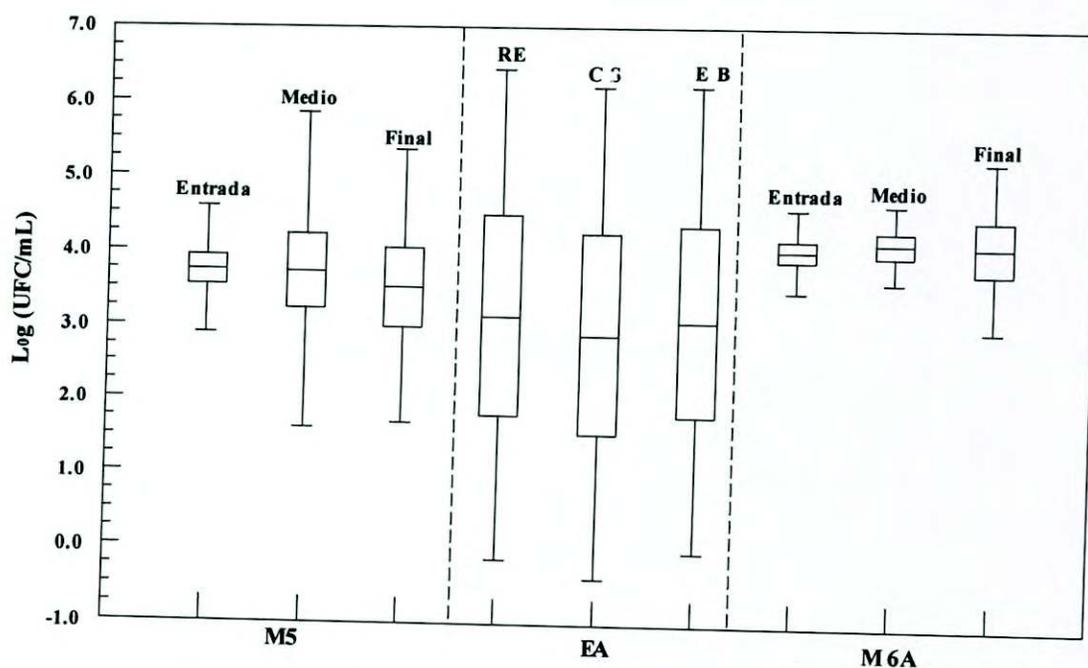


Figura 5. Concentración promedio bacterias heterótrofas viables (BHV) en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

Los datos individuales de los conteos de las colonias amarillas (CA) y verdes (CV) que se desarrollaron en agar TCBS en agua de estanques de ambos módulos, así como para el agua de entrada se encuentran en la Figura 6. El rango promedio para las CA y CV en el M5 fue de  $5.37 \times 10^1$  a  $8.64 \times 10^1$  y de  $1.78 \times 10^1$  a  $3.11 \times 10^1$  UFC/mL respectivamente. EL rango promedios para las CA y CV en el M6A fue de  $1.38 \times 10^2$  a  $2.10 \times 10^2$  y de  $1.05 \times 10^1$  a  $1.74 \times 10^1$  UFC/mL respectivamente. Se encontraron valores promedios significativamente más altos de CA en todas las zonas de ambos módulos ( $P > 0.05$ ) con respecto a las CV. No hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los conteos realizados entre zonas de cada módulo tanto para CA como para CV.

En el agua de entrada (EA) los conteos tanto de CA como de CV se mantuvieron con valores de  $9.5 \times 10^1$  a  $1.2 \times 10^2$  y de  $7.5 \times 10^1$  a  $8.0 \times 10^1$ . En general se observó que los conteos de las BTV entre los módulos y agua de entrada mantuvieron concentraciones similares. La diferencia fue que en el interior de los estanques las CA se cuantificaron con mayores abundancias que las CV. Este comportamiento se observa más claramente en la Figura 7. En esta figura se encuentra graficado las BTV (CA + CV) promedio encontradas en las distintas zonas de ambos módulos y EA donde se aprecia que no hay diferencia estadística entre ellos ( $P > 0.05$ ).

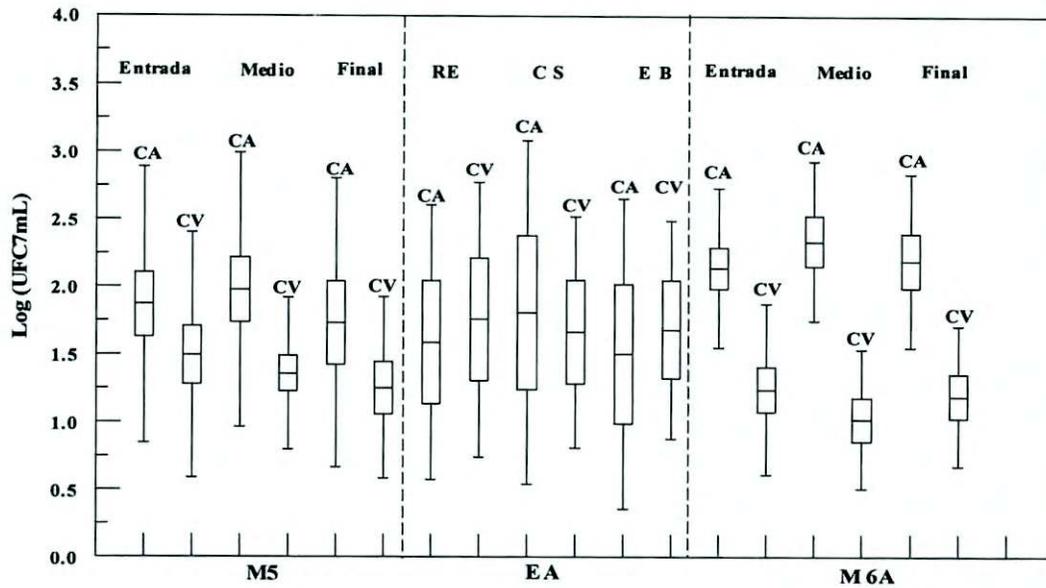


Figura 6. Concentración promedio de bacterias tipo *Vibrio* (BTV) que presentaron coloración amarilla (CA) y color verde (CV) en agar TCBS, en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

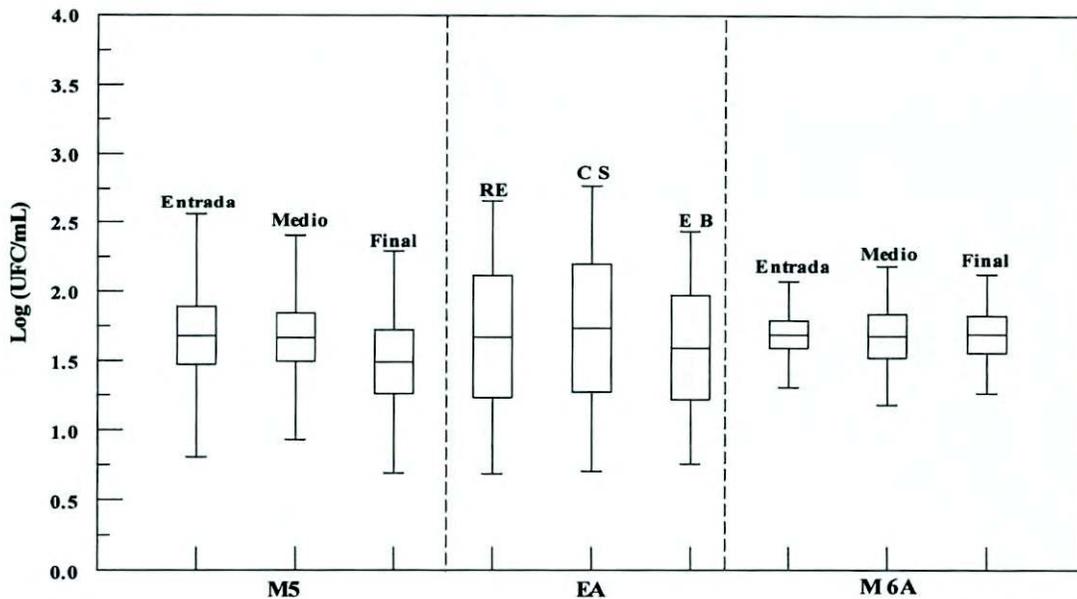


Figura 7. Concentración promedio de bacterias tipo *Vibrio* (BTV) en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

R.TI'60179

### VII.1.2. Bacterias totales (BT)

Los resultados obtenidos de BT se presentan en la figura 8 para las distintas zonas de cada módulo y entradas de agua. Se encontraron valores promedios iguales entre las zonas del M5 y para el M6A, así mismo entre las distintas zonas de las entradas de agua. El rango promedio para las BT en el M5 y M6A fue de  $1.02 \times 10^7$  a  $4.9 \times 10^8$  Cel/mL y de  $4.9 \times 10^8$  a  $3.25 \times 10^9$  Cel/mL respectivamente. Para el caso de entrada de agua el rango obtenido fue de  $2.07 \times 10^6$  a  $2.61 \times 10^6$  Cel/mL.

No se encontró diferencia estadística entre las zonas (entrada, medio y final) del M5, M6A y EA ( $P > 0.05$ ). Al comparar estadísticamente las concentraciones de BT entre los módulos, el análisis de varianza determinó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores promedios más altos se registraron en los estanques del M6A. Se encontró también que el agua de entrada (EA) presentó los valores promedios significativamente más bajos ( $P < 0.05$ ). Lo que indica que una vez que ingresó el agua a los estanques de los dos módulos, las bacterias se incrementaron significativamente (Figura 8).

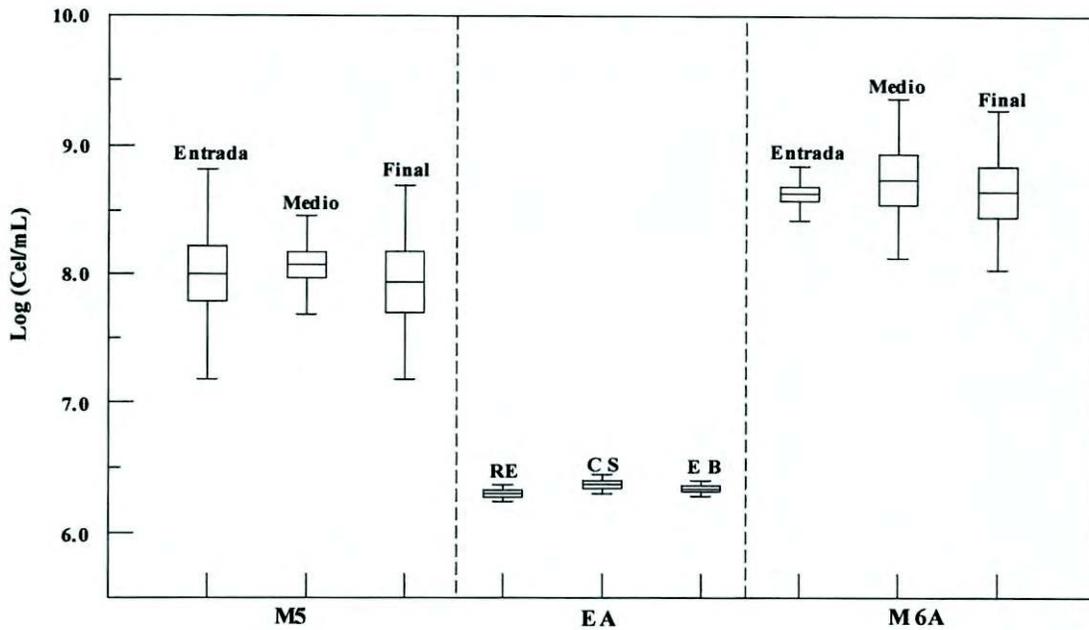


Figura 8. Concentración promedio de bacterias totales (BT) en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

### VII. 1.3. Bacterias metabólicamente activas (BMA)

Los resultados obtenidos de las bacterias metabólicamente activas (BMA) se muestran en la Figura 9. Estos resultados se especifican para las distintas zonas de cada módulo y para las entradas de agua. Los rangos promedios de las BMA en el M5 y M6A fueron de  $1.2 \times 10^6$  a  $1.72 \times 10^6$  y de  $1.15 \times 10^6$  a  $1.38 \times 10^6$  cel/mL. El rango promedio para el agua de entrada fue de  $8.9 \times 10^5$  a  $9.42 \times 10^5$  cel/ mL.

El análisis de varianza entre las zonas de cada módulo de estanques así como entre las diferentes zonas del agua de entrada determino que no existieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las zonas de cada módulo tampoco entre las diferentes zonas del agua de entrada. Los resultados estadísticos de las comparaciones entre los módulos y entrada de agua indicaron que existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Estas diferencias fueron de la siguiente manera: se encontraron valores promedios significativamente más altos de BMA ( $P < 0.05$ ) en el M5 (excepto para la zona media) con respecto al M6A.

El agua de entrada mantuvo concentraciones iguales ( $P > 0.05$ ) comparado con los conteos de ambos módulos (excepto que el reservorio presentó un promedio más alto con la entrada y parte final del M6A). Esto indica que las BMA se incrementaron significativamente en los estanques durante el cultivo.

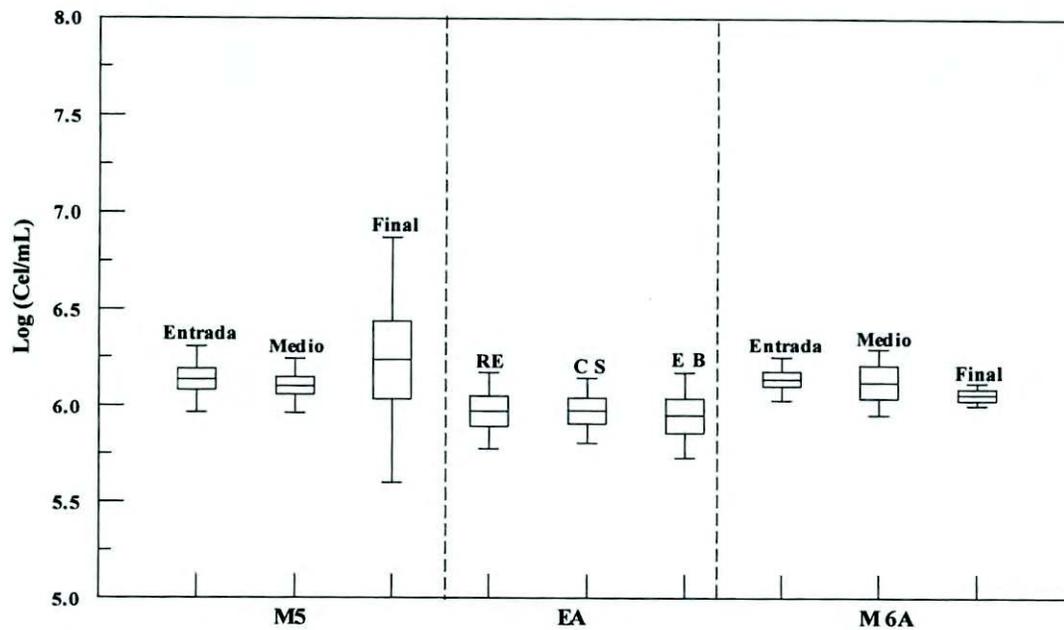


Figura 9. Concentración promedio de bacterias metabólicamente activas (BMA) en las distintas zonas de cada módulo y entradas de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

En la Figura 10, se puede observar un resumen de los resultados obtenidos de todos los grupos de bacterias que fueron estudiados en ambos módulos y entrada de agua (EA) durante el periodo de cultivo. Se observó que las concentraciones más bajas fueron registradas por las bacterias cultivables y las más altas por las BT. El ciclo ascendente se presentó de la siguiente manera; primero las bacterias tipo *Vibrio* (BTV) luego las bacterias heterótrofas viables (BHV), seguidas de metabolitamente activas (BMA) y totales (BT)

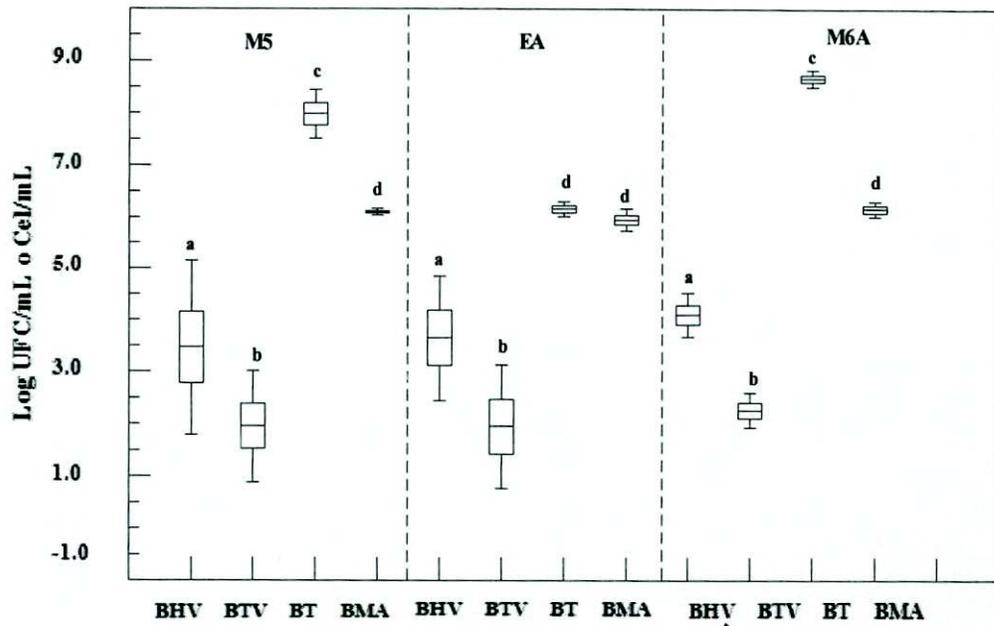


Figura 10. Concentración promedio de BTV, BHV, BMA y BT, en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

## VII.2. Parámetros Físicoquímicos

### VII.2.1. Temperatura

La temperatura del agua entre las distintas zonas de cada módulo y entradas de agua varió durante el desarrollo del cultivo sin que se registraran diferencias significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ). Se registraron condiciones de temperatura iguales durante la mañana en todas las zonas de los módulos y entradas de agua, y lo mismo fue observado durante la tarde. Los valores promedios durante los registros de la mañana y tarde para el M5 variaron de 27.96 a 28.03 y de 30.56 a 30.65 °C, en el M6A de 28.48 a 28.71 y de 30.44 a 30.76 °C y para las entradas de agua de 28.35 a 28.46 y de 30.56 a 30.70 °C, respectivamente (Figura 11).

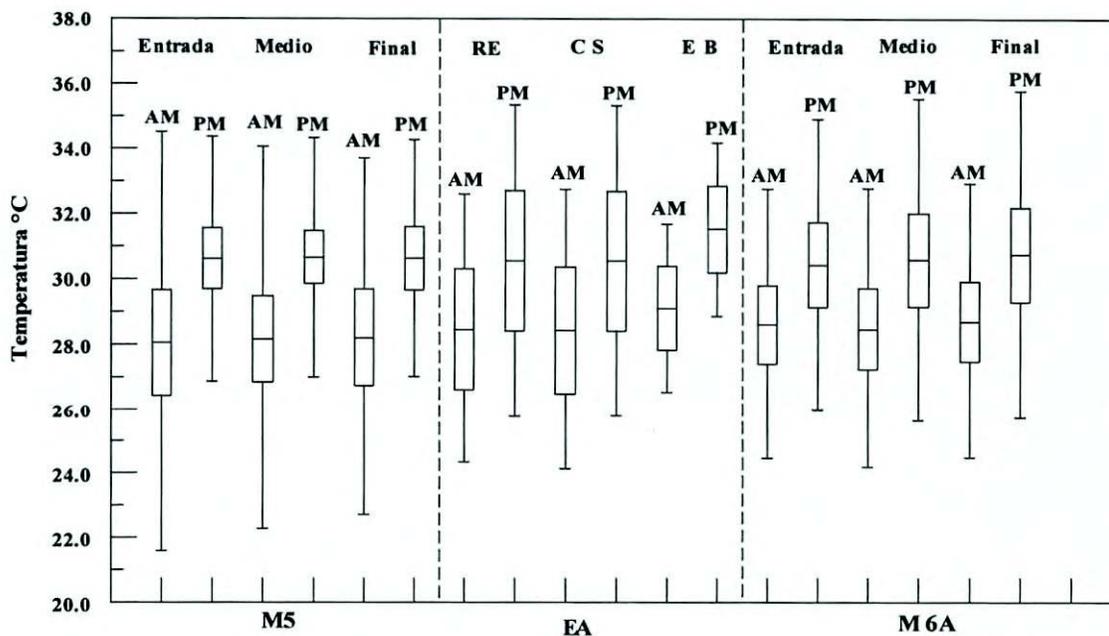


Figura 11. Comportamiento promedio ( $\pm$ DE) de la temperatura en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

### VII.2.2. Oxígeno disuelto (OD)

El OD entre las distintas zonas de cada módulo y entradas de agua, presentó un comportamiento donde las concentraciones variaron con valores promedios iguales ( $P > 0.05$ ). Esto se observó tanto para la mañana como para la tarde al comparar los valores de cada horario, ya que el OD durante la mañana mantuvo concentraciones iguales entre zonas de ambos módulos y entre las entradas de agua, lo mismo fue observado durante la tarde. Los estanques interconectados con un flujo de agua semiestático mantuvieron concentraciones de OD muy similares (Figura 11).

Los valores promedios durante los registros de la mañana y tarde para el M5 variaron de 3.30 a 3.84 y de 5.10 a 5.38 mg/L, en el M6A de 2.84 a 3.39 y de 4.27 a 4.58 mg/L y para las entradas de agua de 2.82 a 3.02 y de 4.94 a 5.09 mg/L, respectivamente (Figura 11).

Durante los registros de la mañana, algunos valores observados en el M6A y en las entradas de agua mantuvieron concentraciones demasiado bajas ( $\approx 1.0$  mg/L) (Figura 11).

Durante las mediciones diarias de temperatura y OD se observó que los valores más altos siempre se registraron durante la tarde y los más bajos durante la mañana. Sin embargo, al agrupar los datos de los registros de todo el período de cultivo, el análisis de varianza realizado indicó que no existieron diferencias ( $P > 0.05$ ).

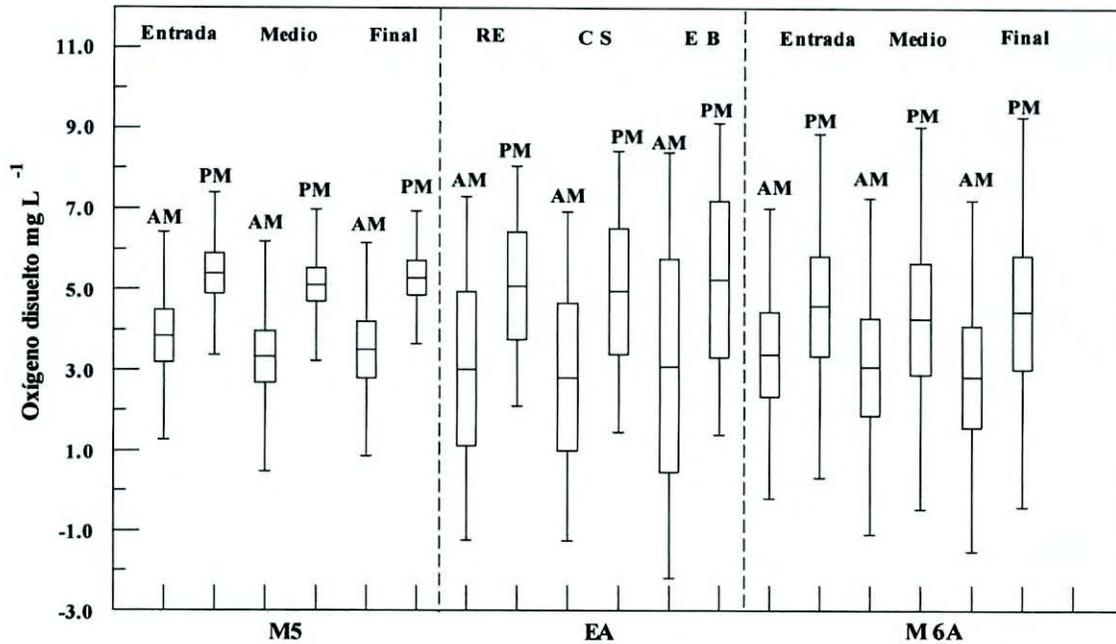


Figura 12. Comportamiento promedio ( $\pm$ DE) del oxígeno disuelto en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

### VII.2.3. Salinidad

La salinidad registrada en el agua de ambos módulos de estanques y EA se encuentra en la figura 13. Se encontró que los valores promedio más bajos se dieron en las entradas de ambos módulos (M5:  $36.1 \pm 1.8$  ‰; M6A:  $38.2 \pm 1.5$  ‰) y las más altas en la parte final (M5:  $42.5 \pm 5.9$  ‰; M6A:  $45.9 \pm 5.6$  ‰). La salinidades más bajas se encontraron entre las zonas de la entrada de agua con concentraciones iguales de (35.5 a 36.8 ‰).

Lo anterior indica que los estanques interconectados con un bajo recambio presentaron un comportamiento donde hubo diferencias de salinidad con tendencia a incrementarse hacia la parte final de ambos módulos.

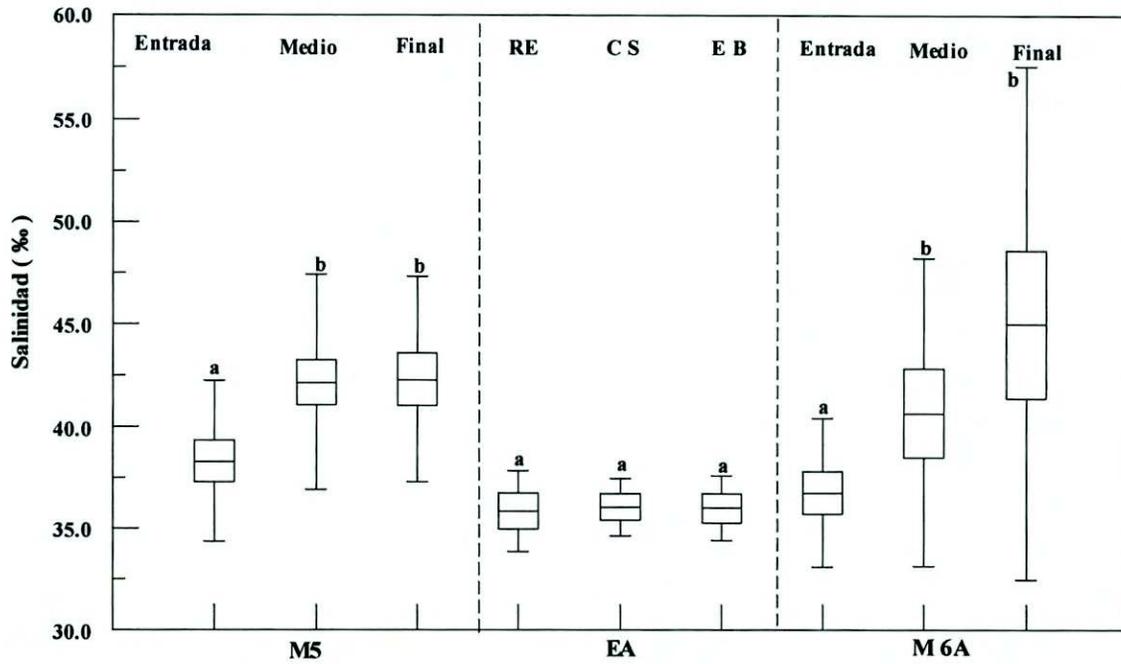


Figura 13. Comportamiento promedio ( $\pm$ DE) de la salinidad en las distintas zonas de cada módulo y entrada de agua durante el cultivo de camarón, en una granja con bajo recambio de agua en la costa de Sonora.

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII. 1. Bacterias Cultivables (BHV y BTV)

Uno de los aspectos fundamentales para mantener un cultivo en óptimas condiciones es la calidad de agua, ya que cuando se utilizan formas de energía extras como son el uso de alimentos balanceados y la fertilización, es conveniente conocer las concentraciones de nutrientes adicionados ya que de eso dependerá el adecuado desempeño de los organismos cultivados (Almanza et al., 2008).

De los alimentos balanceados es recomendable realizar un estudio riguroso del contenido químico del alimento y las raciones utilizadas, ya que de ello depende que la calidad de agua del sistema se mantenga de forma óptima para el crecimiento de los organismos (Almanza et al., 2008). La sobrealimentación es uno de los casos más graves por los que se desarrollan enfermedades, en este contexto es importante conocer el número de microorganismos presentes en los estanques de cultivo. Al respecto, los valores promedio encontrados en este estudio para BHV fueron de  $1.3 \times 10^4$  UFC/mL se encuentran en un orden mayor a lo que reporta Lizárraga-Partida et al. (1997) en sistemas de cultivo de camarón en el noroeste de México, en el que reportaron concentraciones promedio de  $1.3 \times 10^3$  UFC/mL, un orden de magnitud menor a la que se encontró en este estudio, sin reporte de enfermedades aparentes.

En cuanto a las BTV se obtuvieron resultados en los que se apreció disminución considerable de colonias verdes (CV) en comparación con la concentración de colonias amarillas desarrolladas en el medio TCBS durante todos los muestreos. Las CA presentaron los valores más altos en la parte final del módulo M6A con un valor promedio  $2.1 \times 10^2$  UFC/mL. Algunas investigaciones han reportado que el uso de probióticos durante el ciclo de cultivo puede inhibir el crecimiento de algunas especies del género *Vibrio* (Gullian et al., 2001), algunos de los géneros bacterianos más utilizados como probiótico en estanques es *Bacillus*, así como algunas levaduras utilizadas en su mayoría en la etapa larvaria para promover el crecimiento y supervivencia de los organismos (Decam et al., 2008 y Tovar-Ramírez et al., 2008). En esta investigación la diferencia en el crecimiento de CV y CA en los datos obtenidos en este trabajo

puede estar relacionado ya que la granja empleó un probiótico durante el ciclo de producción (Gómez-Gil, 2006).

El valor promedio más elevado de BTV  $2.2 \times 10^2$  UFC/mL encontrados en este estudio coinciden con los valores presentados por Cádiz-Figueroa (2011), en un sistema cerrado en esta misma granja, cuyo valor promedio para BTV fue de  $3.3 \times 10^2$  UFC/mL.

## VIII. 2. Bacterias Totales (BT)

La importancia del uso de esta técnica, es poder contabilizar de una manera directa una población de microorganismos comparadas con la microbiología tradicional donde cultivos en agar sólo se contabilizan aquellos microorganismos con capacidad de desarrollarse en los medios de cultivo utilizados, lo que representa una baja proporción de la totalidad de las bacterias. Según Amann (1995) se estima que menos del 1% del total de las bacterias son las que crecen bajo condiciones de laboratorio, en cambio con esta técnica para BT por epifluorescencia se pueden visualizar microorganismos aunque no tengan la capacidad de desarrollarse en los agares. Cádiz-Figueroa en 2011, realizó un estudio en esta misma granja en donde caracterizó fisicoquímica y bacteriológicamente un sistema completamente cerrado y encontró que las concentraciones más altas de BT fueron de  $1.3 \times 10^6$  cel/mL y los más bajos fueron de  $1.0 \times 10^5$  cel/mL, lo cual indicó que los niveles se mantuvieron estables a lo largo del cultivo. Al comparar los resultados obtenidos en este estudio se tiene que el valor promedio más alto fue de  $5.58 \times 10^8$  cel/mL dos potencias más arriba, esto pudo deberse a la diferencia del sistema cerrado a semicerrado, lo cual no significa necesariamente que el mayor número de bacterias sea generador de enfermedades (López-Torres, 2005), sino que puede ser considerado como un factor de estabilidad para los estanques ya que no se reportaron casos de mortalidad en todo el ciclo de cultivo. Las diferencias encontradas entre los módulos y las entradas de agua, (ésta última significativamente inferior), pudiera indicar que las condiciones de nutrientes y factores ambientales dentro de los estanques favorecieron su proliferación.

### VIII. 3. Bacterias Metabólicamente Activas (BMA)

Este grupo de bacterias nos indica qué cantidad de bacterias en un momento dado están en proceso de división y crecimiento activo dentro de los estanques, lo cual da una idea de las condiciones nutricias existentes. Con base a los resultados obtenidos de las BMA, las concentraciones más elevadas de bacterias fueron de  $1.3 \times 10^6$  cel/mL, sin diferencias significativas entre módulos y entradas de agua. En acuicultura no existe mucha información sobre este estado bacteriano aunque es de suma importancia, pues las bacterias que en verdad importan en cualquier sistema son las que están metabólicamente activas. Dentro de los escasos trabajos en acuicultura, García-Triana (2007), realizó un estudio para conocer específicamente los grupos bacterianos predominantes en los estadios larvarios nauplio, zoea, mysis y postlarva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* usando las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), para cuantificar bacterias metabólicamente activas. Los estudios mostraron que en la mayoría de las muestras, las BMA representan del  $20.8 \pm 3.4$  a  $69.3 \pm 9.7$  % del total de las bacterias (BT), mientras que en este estudio la relación varió desde 0.3% hasta el 39.8%, difiriendo notablemente del estudio anterior, lo cual puede atribuirse al sistema de cultivo evaluado. Otros estudios en donde se utilizó la metodología de FISH utilizando sondas específicas para el 16S rRNA han demostrado la abundancia y dominio de bacterias y bacterioplancton marino en aguas superficiales de las costas (Matthew et al., 2000; Eillers et al., 2000).

Es importante entonces enfatizar que una buena calidad de agua, es necesaria para evitar la abundancia de bacterias patógenas con requerimientos específicos de crecimiento y favorecer la elevada proporción de bacterias heterótrofas con capacidad superior de colonización lo que puede restringir la acción patógena de los grupos menores de bacterias.

Con base a lo anterior se puede mencionar que el sistema con bajo recambio de agua estudiado, mantuvo condiciones adecuadas en la abundancia de la biota bacteriana y un equilibrio en las concentraciones de bacterias patógenas, condiciones comparables a las reportadas dentro de los cultivos tradicionales. Esto indica que este tipo de sistema mantiene condiciones sanitarias adecuadas para el cultivo de camarón.

#### VIII. 4. Parámetros Físicoquímicos

Dentro de la calidad de agua en los sistemas de cultivo es muy importante controlar las variables físicoquímicas, ya que la mayoría de los parámetros están en sinergia unos con otros (Arredondo-Figueroa y Ponce-Palafox, 2008), y si uno de ellos es alterado afecta directamente a todos los demás. En los sistemas convencionales de cultivo en donde el sistema de circulación del agua es completamente abierto, como son la mayoría de las granjas en Sonora (COSAES 2009), es muy fácil que alguna de estas variables se altere, el uso de sistemas cerrados o con bajo recambio de agua (utilizado ya por otros países, la mayoría orientales), han comprobado que además de que es más fácil controlar las variables físicoquímicas en estos sistemas e evita el arribo de enfermedades ya sea por bacterias o virus al reducir la entrada de vectores potenciales.

Juárez-García (2010), realizó un estudio en un sistema de bajo recambio de agua en Sonora en donde analizó la eficiencia del uso de nitrógeno y encontró que en este tipo de sistemas el oxígeno es un parámetro limitante. Cárdenas-Figueroa (2011), estudió un sistema completamente cerrado y reportó fluctuaciones de oxígeno muy grandes de 0.5 a 5.48 mg/L.

La salinidad también incrementó notablemente y reportó valores de salinidad de hasta 38.7‰ muestra que la temperatura se mantuvo estable, a pesar de ello el rendimiento del camarón fue el mismo que en los sistemas tradicionales en la región.

Estudios realizados en cultivo de otros organismos acuáticos como el caso de Tilapia del Nilo en sistemas cerrados, se ha encontrado que las condiciones de cultivo con diferente biomasa las concentraciones de oxígeno tienden a bajar hasta 1.7 mg/L (Ingle de la Mora et al., 2003), la temperatura sin embargo se mantuvo de manera constante durante todo el ciclo de cultivo. Realizando una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo, el oxígeno se comportó de manera similar con variantes en su concentración pero no salió fuera de los estándares reportados fueron de 7.5 a 5.48 mg/L siendo por la mañana donde se cuantificaron los valores más bajos durante todo el ciclo de cultivo. La temperatura, al igual que el oxígeno, tuvo el mismo comportamiento con valores bajos por la mañana de hasta 18.29 °C y las más altas por la tarde de hasta 30.64 °C.

En cuanto a salinidad, se encontró un incremento notable en los módulos estudiados en la parte de la entrada donde se registró un promedio de 23.65 ‰, mientras que en la parte final del sistema se obtuvo un valor promedio de hasta 44.74 ‰. Se puede observar de acuerdo a los resultados obtenidos, que los tres parámetros monitoreados responden a las condiciones ambientales-estacionales, principalmente a la irradiación solar, pues a mayor irradiación mayor temperatura y salinidad, producto de la evaporación, y menor concentración de oxígeno, relacionado al comportamiento de los gases y el calor. Como se puede ver, los valores fisicoquímicos encontrados en el estudio fueron los normales para esta zona de México.

## **IX. CONCLUSIONES**

El sistema de cultivo de camarón con bajo recambio de agua mantuvo condiciones en abundancia bacteriana que permitieron un desempeño positivo del camarón con concentraciones similares a las reportadas para los cultivos tradicionales.

El sistema mantuvo concentraciones más bajas de bacterias patógenas, lo que indica que este sistema puede mantener condiciones sanitarias adecuadas para el crecimiento y supervivencia del camarón durante su cultivo.

Los parámetros fisicoquímicos mostraron condiciones favorables para el desarrollo bacteriano dentro del sistema cultivo.

La cuantificación de bacterias y el monitoreo de parámetros fisicoquímicos evaluados no fueron relacionados con pérdidas en el cultivo.

## **X. RECOMENDACIONES**

Es conveniente realizar más estudios sobre las poblaciones de bacterias en estanques utilizando otros métodos moleculares.

Evaluar la eficiencia de los sistemas semicerrados en la exclusión de vectores de agentes patógenos para el cultivo.

Realizar prácticas de manejo en la producción de camarón que sean más amigables con el ambiente como son el uso de filtros y biopelículas que favorezcan la proliferación de bacterias benéficas.

Es recomendable llevar a cabo más estudios sobre los sistemas de bajo recambio de agua y al mismo tiempo ver la rentabilidad que tiene este tipo de sistemas a comparación de los sistemas convencionales de cultivo de camarón.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Amann, R., Fuchs, B. M. y Behrens S. 1990a. The identification of microorganisms by fluorescent *in situ* hybridization. *Curr. Opin. Biotech.* 12:231-266.
- Amann, R., Krumholz, L. y Stahl, D. 1990b. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172:762-770.
- Amann, R., Ludwig, W. y Schleifer, K. 1995. Phylogenetic identificación and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143- 169 p.
- Giovannoni, S., DeLong, E., Olsen, G. y Pace, N. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170:720-726.
- Almanza, M. J., Barracco, M. A., Cuéllar, J., Lightner, D. V., Shinozaki, E., Lemos, A. M., Morales-Covarrubias M. S., Pantoja C., Perazzolo, L. M., Diego-Rosa R., Saborio, A., Vasconcelos, T. C. 2008. Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos. 120-125.
- Barraza-Guardado, R. H., Ochoa-Landín M. E. y Velázquez-Sánchez C. J. 1999. Estudio básico previo al diseño y establecimiento de un sistema de tratamiento de aguas residuales del parque acuícola “ La Atanasia”. *Informe Técnico Final*. Clave: DICME98-13I. DICTUS-UNISON-Parque Acuícola La Atanasia.
- Boyd, C. E. 1990. *Water Quality in Ponds for Aquaculture*. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama., USA.
- Brock, J. A. y Main, K. L. 1995. Guía de los problemas comunes y las enfermedades del cultivo de Camarón *Penaeus vannamei*. *Boletín Nicovita*. 3(1). Enero de 1998.
- Boyd, C. E. 2001. *Prácticas de manejo para reducir el impacto ambiental del cultivo del camarón*. Department of Fisheries and Allied Aquacultures. Imprenta Universitaria UCA. Managua, Nicaragua.
- Boyd C.E. y Tucker, C. S. 1998. *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Iuwert Academic Publishers, Boston, EE.UU.

- Buford, M. A., N. P. Preston, P. M. Glibert y W. C. Dannison. 2002. Tracing the fate of  $^{15}\text{N}$ -enriched feed in an intensive shrimp system. *Aquaculture* 206: 199-216.
- Caffey, R. H., R. F., Kazmierczak, J., Avault, W. y Romaine, R. P. 1996. An evolving definition and index for sustainable aquaculture. Paper presented at the 27th Annual Conference of the World Aquaculture Society. Bangkok, Thailand, January 29-February 2.
- Casillas-Hernández, R., Magallón-Barajas F., Portillo., C. G. y Páez-Osuna F. 2006. Nutrient mass balance in semi-intensive shrimp ponds from Sonora, México using two feeding strategies: Trays and mechanical dispersal. *Aquaculture*, 258:289-298.
- Campbell, R. 2005. *Ecología Microbiana*. Editorial Limusa. Blackwell Cientific Publications. Mexico D.F.
- Cañes-Figueroa F. J. 2011. Caracterización Físicoquímica y Bacteriológica de un sistema cerrado de producción de camarón en la costa de Hermosillo, Sonora, Tesis de Maestría, Universidad de Sonora.
- Cook, C. I. y Clifford, H. C. 1998. Fertilización de estanques de cultivo de camarón y tanques de pre-cría. *Boletín Nicovita* 4:2-5.
- Chamberlain, G. 2002. Cultivo sostenible de Camarón: mitos y realidades. Disponible en: <http://www.infopesca.org/articulos/art06.pdf>.
- Cottrell M. T. y Kirchman, D. L. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *In Situ* Hybridization. *Appl. and Environ. Microbiol.* 66(12):5116–5122.
- Comité de Sanidad acuícola del Estado de Sonora, A. C. (COSAES). 2009. Programa de trabajo de sanidad Acuícola del programa de soporte para Camarón. <http://www.COSAES.com>
- Comité de Sanidad acuícola del Estado de Sonora, A. C. (COSAES). 2009. Informe final ciclo 2009 “programa de trabajo de sanidad acuícola del programa de soporte para camarón. <http://www.COSAES.com>

- Comité de Sanidad acuícola del Estado de Sonora, A. C. (COSAES). 2010. Informe final ciclo 2010 “programa de trabajo de sanidad acuícola del programa de soporte para camarón. <http://www.COSAES.com>
- Comité de Sanidad acuícola del Estado de Sonora, A.C (COSAES). 2011. Informe final ciclo 2011 “programa de trabajo de sanidad acuícola del programa de soporte para camarón”. <http://www.COSAES.com>
- Decamp, O., Moriarty, D., y Lavens, P., 2008 Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America , *Aquaculture Research* 39:334-338.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F. O., y Amann, R. 2000. Culturability and *In Situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3044–3051.
- Frias-Espericueta y Paez-Osuna. 2001. Toxicidad de los Compuestos del Nitrógeno en Camarones. *Camaronicultura y medio ambiente.* 253-273  
<http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Camaron/Toxicidad%20de%20los%20compuestos%20del%20nitrogeno%20en%20camarones.pdf>
- Frías-Espericueta, M.G., Harfush-Meléndez, M., Osuna-López, J.I. y Páez-Osuna, F. 1999. Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62:646-652.
- FAO. 2003. Estadísticas de productos de pesca: revisión del estado mundial de la acuicultura., No.886., Rev.2. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y4490s/y4490s00.pdf>
- FAO. 2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250s/i0250s.pdf>
- FAO. 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf>
- García-Triana, A. 2005. Identificación de bacterias en cultivo larvario de camarón (*Litopenaeus vannamei*) mediante la técnica de FISH. Tesis de Maestría. CICESE.

- González-Félix, M. y M. Pérez-Velázquez. 2006. Un panorama de los presupuestos de Nitrógeno para Cultivo de Camarón. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Gross, A., Nemirovsky, A., Zilberg, D., Khaimov, A., Brenner, A., Snir, E., Ronen, Z. y Nejidat, A. 2003. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture *Aquaculture* 223(1-4):51-62.
- Gómez-Gil, Bruno, 2006. Citado en: Morales V. y Cuéllar-Ángel, J.(Editores) 2008:Patología e inmunología de camarones peneidos, Guía Técnica: Enfermedades bacterianas. Capítulo 3. CYTED, Red 11D, Panamá. 117-134.
- Gullian Klanian, 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus Vannamei* Tesis de maestría. Escuela superior politécnica del litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.
- Hopkins, J. S., R. D. Hamilton., P. A. Sandifer., C. L. Browdy y A. D. Stokes. 1993. Effect of water exchange rates on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets in intensive shrimp ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:304-320.
- Ingle de la Mora, G., Delgado-Enrique L., Arredondo-Figueroa J., Ponce-Palafox J., Barriga-Sosa I., 2003. Evaluation of some water quality parameters in a closed aquaculture recirculating-water system, submitted to different loads of fish. *Hidrobiologia*, 13(4):247-253.
- Juárez-García M. J., 2010, Eficiencia del uso del Nitrógeno en un cultivo semiintensivo de camarón blanco *Litopenaeus Vannamei* en módulos de estanques interconectados con bajo recambio de agua. Tesis de Maestría, Universidad de Sonora.
- Kinne, P., T. Samocha, E. Jones y C. Browdy. 2001. Characterization of intensive shrimp pond effluent and preliminary studies on biofiltration. *N. Am. J. Aquacult.*, 63:25-33.
- Lawrence, A. L., 1996. Feed quality and feed management standards for environmentally sound aquaculture. Paper presented at the 27th Annual Conference of the World Aquaculture Society. Bangkok, Thailand, January 29-February 2.
- Lizárraga-Partida M.L., Montoya-Rodríguez L., Gendrop-Funes V. 1997. The use of bacterial count in two mexican shrimp hatcheries. *Ciencias Marinas* 23(1):129-140.

- López-Torres M. A y Lizárraga-Partida M. L. 2007. Characterization by whole-cell hybridization of bacterial populations associated with shrimp hatchery biofilms. *Aquaculture Research*, 38:671-680.
- Martínez-Córdova, L. R. y Enriquez-Ocaña, F. 2007. Study of the benthic fauna in a discharge lagoon of a shrimp farm with special emphasis on polychaeta. *J. of Biol. Sci.* 7(1): 12-1
- Martínez-Córdova, L. R.. 1999. Cultivo de camarones peneidos, principios y prácticas. ED AGT editor, S.A. 1ª ed. México.
- Martínez-Córdova, L.R (editor). 2002. Camaronicultura avances y tendencias. Ed. AGT S.A. México.
- Matthew, T. y Kirchman, D. L., 2000. Community Composition of Marine Bacterioplankton Determined by 16S rRNA Gene Clone Libraries and Fluorescence In Situ Hybridization, *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5116–5122.
- Miranda-Baeza, A., Voltolina, D., M. A. Brambila-Gómez, M. G. Frias-Espiricueta y J. Simental. 2007. Effluent characteristics and nutrient loading of a semi-intensive shrimp farm in NW México. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, 2007, 57 (1/2): 21-27.
- Brock, 1999 *Biología de los microorganismos*, 8 edición, Ed. Pentence Hall, España.
- Olguín, E.J., Hernández, M.E. y Sánchez-Galván, G. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23(3):139-154.
- Olmos, S. J. 2003. Molecular characterization and phylogenetic identification of marine microorganisms. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco. 23-October-2003. México.
- Olsen, G., Lane, D., Giovannoni, S. y Pace, N. 1986. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol* 40:337-65.
- Paéz-Osuna, F. 2001a. The environmental impact of shrimp aquaculture: a global perspective. *Environ. Pollut.* 112:229-231.
- Paéz-Osuna, F. 2001b. Descarga de nutrientes procedente de la camaronicultura, agricultura y las aguas municipales en la zona costera del Golfo de California. En: *Camaronicultura y Medio Ambiente*. Federico Páez Osuna (Ed.). UNAM y El Colegio de Sinaloa, México, D.F.

- Padilla-Sánchez M., 2005. Caracterización de la comunidad bacteriana presente en cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*, utilizando hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y PCR. Tesis de Maestría, CICESE.
- Prescott H. K. 2004. Microbiología, 5ta edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana, Aracabaca Madrid.
- Puigcerver y Tort. 1997. Evaluación de dos medios bacterianos aceleradores del proceso de nitrificación en filtros biológicos de cultivos marinos. Orsis 12:7-14.
- Riquelme C. y Avendaño-Herrera R. 2003. Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environment and their potential use in aquaculture Revista Chilena de Historia Natural 76:725-736.
- Saldias, C., Sonnenholzner, S., Massaut, L. 2004. Balance de nitrógeno y fósforo en estanques de producción de camarón en Ecuador., contribuciones en el congreso VI Ecuatoriano de acuicultura.17-19.  
[http://www.researchgate.net/publication/41020130\\_Balance\\_de\\_nitrgeno\\_y\\_fsforo\\_en\\_estanques\\_de\\_produccion\\_de\\_camarn\\_en\\_Ecuador](http://www.researchgate.net/publication/41020130_Balance_de_nitrgeno_y_fsforo_en_estanques_de_produccion_de_camarn_en_Ecuador)
- Souza, V., Escalante., A E., Noguez, A M., Espinoza, L. y Eguiarte, L E., 2007. Ecología microbiana: una nueva ciencia para un nuevo siglo.  
<http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap5.html>
- Tacon, G. J., Cody, L. D. Conquest, S., Divakaran, L. P., Forster y Decamp, O. D. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white *litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition 8: 121-137.
- Thakur, P. D., y Lin., C. K. 2003. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture system. Aquacultural Engineering, 27: 159-176.
- Tovar-Ramires, D., Reyes-Becerril, M. C., Guzmán-Villanueva, L., Gleaves-López, V., Cevera-Cerecedo, R., Ascencio-Valle, F., Gracia-Lopez, V. Barbosa Solomieu, U. Gisbert-Casas, E., Andre, K. B., Álvarez-Gonzales, C. A., Moxano-López, F. J., Ortiz-Galindo, J. L., Hinojosa-Baltazar, P., Gutiérrez-Rivera, J. N., Millán-Martínez, A. A. y Linares-Aranda, M. 2008, Probióticos en Acuicultura: avances recientes del uso de levaduras en peces marinos, IX simposio Internacional de Nutrición Acuícola Noviembre. 237-257.

- Velasco, M., A. L. Lawrence y W. H. Neill. 1996. Effects of dietary protein and phosphorous on aquacultural water quality. Tercer simposium internacional de nutrición acuícola. 11-13 Nov. 1996. México. 1-21.
- Velázquez-Aragón, J. A. 2005. Determinación de la comunidad microbiana en biorreactores mediante técnicas de biología molecular. Tesis de Maestria., universidad autónoma metropolitana. <http://148.206.53.231/UAMI14145.PDF>
- Wang J. K. 2003. Conceptual design of a microalgae-based recirculating oyster and shrimp system *Aquacultural Engineering* 28(1-2):37-46.