



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO DE LOS SISTEMAS BIOFLOC
SOBRE LA PRESENCIA DE BACTERIAS DEL GÉNERO *Vibrio*,
CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA Y ESTADO DE SALUD EN EL CAMARÓN
BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MVZ DIANA AGUILERA RIVERA

Director de tesis: DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS

FACULTAD DE CIENCIAS

Comité tutorial: DR. BRUNO GÓMEZ GIL RODRÍGUEZ SALA

DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ

DRA. MARÍA DE JESÚS FERRARA GUERRERO

DRA. SONIA ARACELI SOTO RODRÍGUEZ

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

México, D.F. a Agosto del 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COMITÉ DE TESIS

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Bruno Gómez-Gil Rodríguez Sala (CIAD-Mazatlán)	PRESIDENTE
Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés (UMDI, UNAM-Sisal)	SECRETARIO
Dra. María Cristina Chávez Sánchez (CIAD-Mazatlán)	VOCAL
Dra. María de Jesús Ferrara Guerrero (UAM-Distrito Federal)	SUPLENTE
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez (CIAD-Mazatlán)	SUPLENTE

ASESORES EXTERNOS

Dra. Alejandra Prieto Davo (UMDI, UNAM-Sisal)
Mtra. Karla Susana Escalante Herrera (UMDI, UNAM-Sisal)

DEDICATORIA

Para ti mami, Mari y Honey ...
porque siempre han sido mi motor y mi inspiración.
Por ser siempre mi guía y darme la fortaleza
cuando más lo he necesitado, porque siempre
hemos sido un gran equipo y nos hemos apoyado
para lograr nuestras metas.

Las amo.

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco infinitamente a la vida por brindarme nuevamente la oportunidad de seguir creciendo profesional y personalmente en el hermoso puerto de Sisal, Yucatán (al que tanto quiero), ahora con un trabajo de investigación a nivel maestría.

A mi mamá, mi hermana, mi papá y mi bebé que siempre me han apoyado y han estado conmigo en las buenas y en las malas, siempre haciéndome sentir en casa a pesar de la distancia, haciéndome ver que mi esfuerzo tarde o temprano tendría su recompensa. A la familia Chimal por estar también pendientes de mis aventuras y mis logros.

A todos mis amigos sisaleños, en especial a Deniel, su hija Julietita, Kory, Héctor, Omar, Ana, José Luis, Itzel, Luisao, Rox, Maritza y Roger. A las nuevas amistadas que hice durante mis estancias de investigación: en Mazatlán a Cathy, África, Elda, Daniel, Covantes y al grupo de maestría; y en Hermosillo a Lulú, Rocío, Alejandro y Sammy. Gracias a todos por su apoyo y por permitirme conocerlos, ser y seguir siendo su amiga.

A mi familia sisañeña: Boso, Clau y sus hijos; y a mis parientes: doña Gaby, don Giovanni y sus hijas. Gracias por la convivencia y por estar pendientes siempre de mí, haciéndome parte de su familia y compartir la mesa conmigo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría y por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto (No. 167670).

A mi directora de tesis, la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, por haber creído nuevamente en mí y por darme la confianza para sacar adelante este trabajo de investigación, por estar siempre pendiente y por darme la libertad de ir a otros lugares a conocer otras formas de trabajo y aprender nuevas cosas que me hicieron crecer más como profesionalista, gracias mamá Gaby!!!!!!!!!!!!

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Cristina Chávez, Dra. Sonia Soto, Dra. María de Jesús Ferrara y Dr. Bruno Gómez Gil, por todos sus comentarios, consejos y aportaciones para mi trabajo de investigación.

A mis asesoras externas: la Dra. Alejandra Prieto Davo y Mtra. Karla Escalante, por todos sus consejos, paciencia, el tiempo dedicado y sus aportaciones hechas para mi tesis.

Al Dr. Gerard Cuzon, que siempre estuvo pendiente de mis avances, haciendo en todo momento aportaciones tanto para mi trabajo de tesis, como para mi artículo.

Al personal del Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología: Dra. Gloria Villaclara, M. en C. Diana Juárez, Mtra. Chantal Ruíz, Guadalupe Godoy y Gabriela Almaraz.

Al equipo de trabajo de la Unidad Académica Sisal-UNAM, en especial al M. en C. Miguel Arévalo, M. en C. Manuel Valenzuela, M. en C. Gabriela Palomino, Técnico Patricia Balám, Ing. Adriana Paredes, Dr. Juan Carlos Maldonado, M. en C. Carmen Galindo, M. en C. Nancy Herrera, Moises Cab y a los estudiantes que conforman el “Programa Camarón”, en especial a Alejandra Arbeláes, Elisa Chan y Edén Magaña.

A los responsables de mi desempeño escolar durante mis dos estancias de investigación. En el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD-Mazatlán), a la Dra. Cristina Chávez y M. en C. Selene Abad, por el entrenamiento dado para la realización del análisis histopatológico de mi trabajo de tesis. En el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR-Hermosillo), al Dr. Jorge Hernández y MVZ Fernando Cano, por el curso de capacitación para evaluar parámetros fisiológicos e inmunológicos en camarón.

Quienes de alguna forma estuvieron involucrados en esta aventura: Dr. Omar Calvario (CIAD), MVZ Rodolfo Lozano (CIAD), Dr. Arturo Sánchez (CIBNOR), Tania (CIBNOR).

UN MILLON DE GRACIAS,

SI SE PUDO!!!

ÍNDICE

COMITÉ DE TESIS.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	26
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	28
EXPERIMENTO 1: IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE VIBRIO PRESENTES EN SISTEMAS DE AGUA CLARA Y BIOFLOC.....	29
INTRODUCCIÓN.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	42
EXPERIMENTO 2: COMPARACIÓN ENTRE COMUNIDADES MICROBIANAS DEL BIOFLOC VS. UN PROBIÓTICO COMERCIAL SOBRE LAS ESPECIES DE VIBRIO Y ESTADO DE SALUD EN LITOPENAEUS VANNAMEI	43
INTRODUCCIÓN.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
RESULTADOS.....	52
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIONES.....	75
CONSIDERACIONES FINALES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	78
ANEXOS.....	102
ANEXO 1: OBTENCIÓN DE COLONIAS VIBRIO A PARTIR DE MUESTRAS DE HEPATOPÁNCREAS Y AGUA.....	103
ANEXO 2: CRITERIOS DE SELECCIÓN DE COLONIAS DE VIBRIO A PARTIR DE SU MORFOLOGÍA.....	104
ANEXO 3: EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE LA TÉCNICA DE ADSORCIÓN EN SÍLICE (ROJAS-HERRERA ET AL., 2008).....	108
ANEXO 4: AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S	109
ANEXO 5: PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PRC.....	110
ANEXO 6: INCLUSIÓN DEL PROBIÓTICO ALTAI® EN EL ALIMENTO BALANCEADO.....	111
ANEXO 7: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN FIJADORA DE DAVIDSON (ALCOHOL-FORMALINA-ÁCIDO ACÉTICO).....	112
ANEXO 8: FIJACIÓN DE MUESTRAS DE CAMARÓN PARA ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	113

REPORTE DE ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA ESTANCIA EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE (CIBNOR)	115
---	------------

RESUMEN

Debido a la problemática que actualmente enfrenta la acuicultura a causa de enfermedades virales y bacterianas, diversas son las opciones que se han experimentado para controlarlas y erradicarlas. Sin embargo, éstas persisten, provocando elevadas tasas de mortalidad y pérdidas económicas.

En este estudio, las ventajas de la tecnología biofloc sobre los sistemas de agua clara fueron analizadas. Primero, juveniles de *Litopenaeus vannamei* mostraron un mayor CDC y supervivencia bajo condiciones de biofloc. Posteriormente, un probiótico comercial fue adicionado en el alimento, provocando que la supervivencia en ambos sistemas aumentara significativamente, mientras que el CDC fue mayor por el efecto del biofloc, mas no por el del probiótico.

La identificación de bacterias *Vibrio* en hepatopáncreas y agua de ambos sistemas no mostró diferencia alguna; la adición del probiótico tampoco tuvo efecto sobre estas comunidades. No obstante, un grupo de cepas de *Vibrio* fue identificado exclusivamente en biofloc, sin importar la presencia o ausencia del probiótico en el alimento.

La ausencia de lesiones con alto grado de severidad observadas en el hepatopáncreas de los camarones en biofloc sugiere que estas cepas podrían tener un efecto homeostático sobre las comunidades de este género bacteriano, previniendo brotes de patógenos oportunistas durante eventos de estrés.

INTRODUCCIÓN

La camaronicultura es un sistema de producción que durante los últimos años ha adquirido gran importancia, sobre todo en Asia y América Latina (LEYVA-ORDÁZ GA, 2010 #132), gracias a las fuentes de empleo que genera en países desarrollados o en vías de desarrollo (Leyva-Ordáz *et al.*, 2010). No obstante, las enfermedades (Jory, 1998), la presencia de fauna nociva, contaminación por aumento en los residuos generados y la resistencia a agentes antimicrobianos utilizados incorrectamente, son algunos inconvenientes que afectan a este sistema de manera negativa (Arthur *et al.*, 2009). En el caso de las enfermedades (principalmente las de tipo viral y bacteriano) las consecuencias pueden ser devastadoras, ya que ocasionan pérdidas en los cultivos, provocando una disminución en las fuentes de empleo e ingresos por caídas en la producción.

Por lo tanto, es importante tener conocimiento de los agentes infecciosos más comunes en las regiones donde se realizan actividades de tipo acuícola, con el objetivo de llevar a cabo medidas de bioseguridad como parte de un manejo preventivo (Morales-Covarrubias, 2008). Aunque los virus son los principales causantes de las altas mortalidades en granjas de camarón, también las bacterias pueden llegar a ocasionar eventos con consecuencias tan devastadoras como los primeros. Un claro ejemplo son las enfermedades causadas por bacterias del género *Vibrio* (Roque *et al.*, 2001; Alavandi *et al.*, 2004; Jayaprakash *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2006).

Estas bacterias, al igual que otros géneros, son habitantes nativas de los ecosistemas acuáticos y de los estanques utilizados en acuicultura, por lo que su presencia no necesariamente es causa de enfermedad en los organismos que ahí habitan (Sung *et al.*, 1999). Sus funciones en estos ambientes son diversas, como mantener el suelo y agua en óptimas condiciones, ya que algunas de ellas se encargan de la degradación de los detritos y materia orgánica y otras del reciclamiento de nutrientes (Ducklow, 2000), la producción y consumo de oxígeno, eliminación de productos que pueden ser tóxicos (amonio, nitritos y sulfatos de hidrógeno), se consideran hasta cierto punto fuente de alimento para animales acuáticos, además de que algunas de ellas pueden producir sustancias de tipo inhibitorio contra patógenos (Gatesoupe, 1999).

El desarrollo y presencia de ciertas cepas bacterianas patógenas puede llegar a causar enfermedades y la muerte de animales. Ejemplos son especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Lagenidium*, *Edwardsiella* y *Vibrio* (Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2011), las cuales pueden llegar a ser problemáticas cuando hay un aumento en la concentración de materia orgánica presente en los estanques de cultivo. Las especies de *Vibrio*, como todas las bacterias oportunistas, pueden multiplicarse rápidamente en las condiciones no favorables para los camarones cultivados, como una baja concentración de oxígeno disuelto, aumento en la temperatura (LeMoullac & Haffner, 2000; Cheng *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2010), pH (Li & Chen, 2008), salinidad (Wang & Chen, 2005, 2006; Joseph & Philip, 2007) y altas concentraciones de amonio en los estanques (Cheng & Chen, 2002; Liu & Chen, 2004), haciendo a los camarones más susceptibles a las enfermedades infecciosas. Es por ello que la presencia y densidad de vibrios es monitoreada en cultivos de peces, crustáceos y moluscos, tratando de evitar pérdidas económicas importantes debidas a las altas mortalidades que genera y a los tratamientos inadecuados que se utilizan para combatirla.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el objetivo principal de este estudio se divide en dos fases: la primera es identificar las especies del género *Vibrio* presentes en sistemas de cultivo convencionales (agua clara) y sistemas biofloc; mientras que la segunda fase consiste en comparar el efecto de tipo probiótico de este último sistema contra un probiótico comercial en el cultivo de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

ANTECEDENTES

Composición de la flora microbiana en crustáceos

La composición de la microflora digestiva en crustáceos dependerá de diversos factores, tales como: bacterias presentes en el agua que son ingeridas por los animales (Austin & Austin, 1989); características fisicoquímicas del sistema digestivo (Hood *et al.*, 1971; Huq *et al.*, 1986; Griffin *et al.*, 1987; Harris *et al.*, 1991); condiciones medioambientales (Sugita *et al.*, 1987; Prieur *et al.*, 1990; Straub & Dixon, 1993); tipo de dieta (Sochard *et al.*, 1979; Campbell y Buswell, 1983); condición fisiológica del hospedero (Yasuda y Kitao, 1980); tipo de hábitat (Sakata, 1989; Harris, 1993) y las prácticas de manejo que se dan en el caso de los sistemas de cultivo convencionales (Prieur *et al.*, 1990; Strom & Olafsen, 1990).

Es indispensable que las granjas acuícolas busquen mantener el ambiente de los estanques lo más estable posible, para así evitar que los organismos se estresen y sean susceptibles a la acción de las bacterias oportunistas o patógenas, mismas que se convierten en un problema cuando la composición del ecosistema bacteriano cambia, por lo que algunas especies bacterianas empiezan a dominar y alterar la microflora digestiva de los animales, lo que se traduce en un desequilibrio, y es ahí donde las especies oportunistas pueden causar mortalidades importantes. Por ello, se considera que el ambiente en el que éstos se desarrollan es clave para determinar el tipo de microflora presente en su tracto digestivo (Lynch & Hobbie, 1988; Van Der Waiij, 1992).

Ante todos estos escenarios, diversas investigaciones se han enfocado en el estudio de la flora microbiana de los crustáceos, con el fin de monitorear el estado de salud de los mismos a nivel cultivo; además de identificar cambios de composición en la microflora, mismas que pueden ser indicio de enfermedades que provoquen su muerte. De ahí la importancia de conocer los requerimientos, interacciones y competencia de las comunidades bacterianas nativas en el agua y de los organismos en general, para que de esta manera puedan utilizarse las herramientas adecuadas de diagnóstico que nos lleven a obtener resultados más certeros.

A nivel fenotípico, Davis & Sizemore (1982) identificaron a *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus* en la hemolinfa y caparazón del cangrejo azul *Callinectes sapidus* que habita en la Bahía de Galveston, Texas. Más adelante, Grodner y Hinton (1988) reportaron a *Vibrio parahaemolyticus* como la especie más dominante en la hemolinfa de este animal. Scott & Thune (1986) determinaron la flora bacteriana a partir del análisis de la hemolinfa del cangrejo rojo del pantano *Procambarus clarkii*, en granjas comerciales. Las bacterias aisladas en este estudio incluyeron los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Diggles *et al.* (2000) diagnosticaron la causa de las mortalidades generadas en larvas de langosta *Jasus verreauxi* y concluyeron que la causa principal era la elevada densidad de *Vibrio harveyi* en el intestino y hepatopáncreas de estos. Por su parte, Raissy *et al.*, (2011) identificaron por métodos bioquímicos y moleculares las especies de *Vibrio* presentes en la langosta *Panulirus homarus*, a partir de la hemolinfa de las mismas, y encontraron a *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio mimicus*.

Moss *et al.* (2000) reportaron que el 85% de la flora bacteriana del intestino de *Litopenaeus vannamei* estaba formada por *Vibrio* y *Aeromonas*, mientras que Gómez-Gil *et al.* (1998) encontraron que la flora de esta misma especie de camarón (sanos) estaba compuesta en su mayoría por *Vibrio*. En granjas de Nayarit, Sinaloa y Sonora, se estudió la presencia de patógenos en hemolinfa, hepatopáncreas y lesiones externas en juveniles de *Litopenaeus vannamei* (sanos y enfermos), encontrando en ambos casos densidades de diversas especies de *Vibrio*, entre las que se incluyeron a *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* y *Vibrio proteolyticus* (Vandenberghé *et al.*, 1999). Este trabajo se contrastó con otro hecho a partir de *Litopenaeus vannamei* silvestres que habitaban en el Caribe colombiano, donde se encontró la presencia de *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio damsella*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* (Álvarez-León, 2009). En *Penaeus merguensis*, se han encontrado poblaciones de *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Esta última fue la más dominante, destacando las especies de *Vibrio gazogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* (este último considerado uno de los vibrios más problemáticos en camarón) (Oxley *et al.*, 2002).

El género *Vibrio* en acuicultura

Los vibrios pertenecen a la familia *Gammaproteobacteria*, son bacterias Gram negativas, mótils, mesófilas y quimioorganotróficas; tienen un metabolismo fermentativo facultativo, se encuentran en hábitats terrestres y acuáticos y en asociación con eucariontes. Al aislarlos en condiciones de laboratorio, son capaces de crecer en agar marino o en medios selectivos como agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), y la mayoría son oxidasa positivo (Thompson *et al.*, 2004). Abundan en ambientes acuáticos, incluyendo estuarios, costas, sedimentos y sistemas de cultivo (Urakawa *et al.*, 2000; Denner *et al.*, 2002; Heidelberg *et al.*, 2002a; Potasman *et al.*, 2002; Baffone *et al.*, 2003). Al ser habitantes naturales en el agua, es común encontrarlos en organismos marinos, por ejemplo: corales (Rosenberg & Ben-Haim, 2002), peces (Huys *et al.*, 2001), moluscos (Sawabe *et al.*, 2003), esponjas, camarones (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Vandenberghe *et al.*, 1998, 1999, 2003) y zooplancton (Suantika *et al.*, 2001; Heidelberg *et al.*, 2002b).

Algunas especies de *Vibrio* relacionadas con enfermedades y mortalidades observadas en sistemas de cultivo de peneidos incluyen algunas cepas de *Vibrio alginolyticus* (Jayasree *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2007), *Vibrio campbelli* (De la Peña *et al.*, 2001; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006a, 2006b) y *Vibrio parahaemolyticus* (Roque *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta la fecha solamente se reconocen como altamente virulentas a cepas de *Vibrio harveyi* en *Litopenaeus vannamei* (Soto-Rodríguez *et al.*, 2012), *Vibrio nigripulchritudo* en *Litopenaeus stylirostris* (Goarant & Merien, 2006) y *Vibrio penaeicida* en *Penaeus japonicus* y *Litopenaeus stylirostris* (Saulnier *et al.*, 2000a, 2000b).

El efecto oportunista de este género bacteriano puede verse reflejado en el estado de salud de los camarones, los cuales son susceptibles a presentar enfermedades que muchas veces resultan mortales. Entre las más importantes para camarones cultivados se encuentran:

- Vibriosis: enfermedad causada por bacterias del género *Vibrio*, y causante de mortalidades en cultivos de camarón en México (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006a). Puede afectar a todas las especies de camarón cultivable, ya que éstos son más susceptibles de infectarse debido a las condiciones de estrés a las que están expuestos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010). Afecta al hepatopáncreas, corazón, branquias, órgano linfoide y músculo, donde se observan agregados bacterianos,

además de diversas lesiones como necrosis, inflamación y melanizaciones (Peddie & Wardle, 2005, Soto-Rodríguez *et al.*, 2010).

- Erosión bacteriana del caparazón (manchas cafés): se presenta en todas las especies de peneidos tanto juveniles como adultos. Se caracteriza por la presencia de manchas cafés o negras en áreas erosionadas por la acción de bacterias quitinolíticas (e.g. *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Spirillum* sp. y *Flavobacterium* sp.). Es una enfermedad autolimitante, ya que cuando los camarones mudan, las lesiones presentes en el exoesqueleto desaparecen. Sin embargo, si no es controlada puede causar una infección sistémica (Lightner, 1996).
- Síndrome de Zoea II: asociado a especies de vibrios luminiscentes, causando mortalidades en larvas cuando pasan del estadio de Zoea I a Zoea II; se observa la presencia de luminiscencia en las larvas afectadas, además de disminución en el crecimiento, nado lento, reducida respuesta de escape y aumento en las mortalidades (Lightner, 1996).
- Bolitas blancas: se cree que es causada por *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio harveyi* (Vandenbergh *et al.*, 1999); se observa inflamación del epitelio de los túbulos del hepatopáncreas y contracción de los lóbulos, tracto digestivo vacío, retraso en el crecimiento y presencia de “células redondas ó bolitas” (células descamadas del hepatopáncreas o hepatocitos hipertrofiados) en el lumen de los tubulos e intestino anterior. Se cree que estas bolitas se forman por la presencia de toxinas producidas principalmente por *Vibrio* spp. o por metales pesados (Gómez-Gil *et al.*, 2001).
- Enfermedad de las patas rojas: causada principalmente por *Vibrio parahaemolyticus* (Alapide-Tendencia & Dureza, 1997); se observa una coloración roja en apéndices y branquias de camarones adultos y juveniles, altas mortalidades durante el verano y necrosis ocular causada por *Vibrio cholerae*, provocando que los globos oculares se vean color marrón y se caigan, por lo que la mortalidad se presenta en pocos días (Chen, 1992). Además, *Vibrio harveyi* y *Vibrio splendidus* causan luminiscencia, la cual es visible durante la noche en postlarvas, juveniles y adultos infectados (Ruby *et al.*, 1980; Lightner *et al.*, 1992).

- Vibriosis luminiscente: causada por cepas de *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii* y *Vibrio splendidus*, las cuales causan luminiscencia que es visible durante la noche, en postlarvas, juveniles y adultos infectados (Ruby *et al.*, 1980; Lightner *et al.*, 1992; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006b). A nivel histológico se observa la colonización masiva de bacterias en la región oral del camarón (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990), así como atrofia y necrosis de los túbulos hepatopancreáticos (Robertson *et al.*, 1998).
- Síndrome de Rojos Vivos (BRS): causada por una cepa muy virulenta de *Vibrio harveyi*, siendo *Litopenaeus vannamei* la especie más susceptible. Ha sido reportada en granjas del Noroeste de México, donde los camarones presentan signos de letargia, anorexia, cuerpo flácido con zonas de manchas decoloradas en el área abdominal, y en ocasiones erosiones melanizadas alrededor de estas manchas (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010, 2012).
- Síndrome de Verano: causado por vibriosis sistémica debido a la presencia de *Vibrio nigripulchritudo* y reportada en cultivos de *Litopenaeus stylirostris* en Nueva Caledonia (Goarant *et al.*, 2006). Su agente etiológico ha sido identificado a partir de muestras de agua, sedimento y camarones de cultivo, y en muestras de zooplancton de las lagunas, principalmente cuando la temperatura de los estanques y en ambientes acuáticos naturales supera los 25°C (Goarant *et al.*, 2004)
- Síndrome del 93: identificado en cultivos de *Litopenaeus stylirostris* en Nueva Caledonia por la presencia de *Vibrio penaeicida* (Saulnier *et al.*, 2000a), principalmente durante la temporada de invierno, donde la temperatura ambiental disminuye provocando mortalidades importantes en los sistemas de cultivo (Goarant & Merien, 2006). Los animales infectados se observan nadando en la superficie de los estanques, su exoesqueleto se vuelve suave y sin brillo, el músculo se observa blanquecino y la hemolinfa disminuye su tiempo de coagulación (Mermoud *et al.*, 1998).
- Síndrome de la Muerte Temprana (EMS): aunque la información en relación con este síndrome aún no es publicada de manera oficial, se cree es provocada posiblemente por una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* que es infectada por un fago

que provoca que esta cepa produzca una toxina que es mortal para el camarón (Lightner, *datos no publicados*). La bacteria se transmite de forma oral, llegando así hasta el tracto digestivo donde libera esta toxina que provoca la degeneración de los tejidos y del hepatopáncreas, principalmente, debido a la falta de actividad mitótica de las células E, disminución en el funcionamiento de las células B, F y R, aumentando así la posibilidad de infecciones bacterianas secundarias (Flegel, 2012).

Ante toda esta problemática, es de vital importancia adoptar medidas preventivas, tales como el monitoreo en la calidad del agua de los estanques, sobre todo en la concentración de oxígeno disuelto, salinidad y temperatura, que al encontrarse en condiciones sub-óptimas provocan la inmunosupresión del animal y lo hacen más susceptible a las enfermedades (Le Moullac & Haffner, 2000; Baffone *et al.*, 2003; Páez-Osuna *et al.*, 2003). Algunos autores mencionan que debe aumentarse la tasa de recambio de agua para evitar el aumento en la concentración de materia orgánica que favorezca el afloramiento de agentes infecciosos, además de que debe disminuirse la cantidad de organismos en los estanques (Anderson *et al.*, 1988) para evitar estrés en los mismos (Lightner, 1993) y pérdidas por el aumento en las mortalidades. Sin embargo, algunos estudios han concluido que el recambio exagerado del agua en los estanques, acompañado de malas técnicas empleadas por los camaronicultores, como el uso de antibióticos y alimentos con un alto nivel de proteína, favorecen la proliferación de los vibrios y los hacen más virulentos ante los huéspedes que atacan (Thompson *et al.*, 2004).

Uso de antibióticos y probióticos en camarón

Durante muchos años, diversos sistemas de cultivo de camarón han adoptado el uso de antibióticos como medida preventiva y de tratamiento ante la presencia de brotes que puedan poner en riesgo la producción. Pese a los buenos resultados que estos productos tienen al ser usados de manera responsable (Newman, 2007), desafortunadamente aún existe mucha falta de información para los acuacultores en cuanto al tipo de antibiótico, su mecanismo de acción y la manera correcta de utilizarlos, con el fin de evitar abusos que lejos de resultar benéficos, muchas veces causan problemas más graves de los que ya estaban presentes y para los que fueron usados en un inicio.

En farmacología, los antibióticos son definidos como una sustancia química producida por microorganismos, los cuales tienen la capacidad de inhibir o eliminar la presencia de agentes microbianos que pudieran resultar nocivos (Holmstrom *et al.*, 2003; Santiago *et al.*, 2009); no obstante, su uso irresponsable puede provocar problemas de resistencia (Schwarz *et al.*, 2001; Balcázar, 2002; Akinbowale *et al.*, 2006). A pesar de que no se cuenta con la información necesaria, en los ciclos de producción de camarón es muy frecuente el uso de estas sustancias.

En la Tabla 1 se presentan los antibióticos más utilizados en nuestro país (Holmstrom *et al.*, 2003; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006b; Santiago *et al.*, 2009) para este tipo de sistemas de producción.

TABLA 1. Características de los antibióticos más utilizados en acuicultura.

ANTIBIÓTICO	FUNCIÓN
Oxitetraciclina	Con acción bacteriostática, su efecto antimicrobiano es realizado a través de la inhibición de la síntesis proteica, provocando la adición ineficiente de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. Este mecanismo es llevado a cabo sobre bacterias Gram negativas, Gram positivas, rickettsias y micoplasmas. Se utiliza en el tratamiento contra vibriosis, hepatopancreatitis necrotizante (NHP) y furunculosis.
Enrofloxacin	Derivado del ácido nalidíxico. Actúa sobre el núcleo de las células bacterianas Gram positivas y Gram negativas, impidiendo la síntesis de ADN bacteriano por inhibición de la enzima DNA-girasa.
Florfenicol	Derivado del tiamfenicol, con acción bactericida. Inhibe la enzima peptidil-transferasa, por lo que evita la transferencia de los aminoácidos en la formación de cadenas peptídicas y la subsecuente formación de proteínas. Se utiliza en el tratamiento contra <i>Pasteurella piscicida</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> y <i>Edwardsiella tarda</i> .
Norfloxacin	Fluoroquinolona con función bactericida sobre bacterias Gram negativas y algunas bacterias Gram positivas. Actúa intracelularmente inhibiendo la subunidad A de la DNA girasa, alterando la replicación del ADN y llevando eventualmente a la lisis de la célula bacteriana.

Las desventajas que estos productos presentan están relacionadas directamente con la salud de los camarones que están siendo medicados, con el medio ambiente y con la salud humana. Entre estas está la resistencia que desarrollan los agentes patógenos ante el antibiótico utilizado (Defoirdt *et al.*, 2011) a través de mutaciones a nivel cromosómico o mediante la adquisición de plásmidos. En el primer caso, no hay transferencia hacia otras bacterias; sin embargo, los plásmidos sí pueden ser transmitidos y generar resistencia a otras poblaciones bacterianas (Teo *et al.*, 2000, 2002; Balcázar, 2002).

Otro de sus efectos adversos es el aumento en la concentración en los tejidos del camarón (principalmente músculo e intestino) (Gómez-Jiménez *et al.*, 2008), lo que conlleva a problemas de intoxicación en las personas que consumen el camarón como producto alimenticio. También pueden presentarse deformidades en las larvas de camarón (Soto-Rodríguez, 2006b) y en estadios adultos, además de su persistencia en el ambiente acuático que tiene como resultado alteraciones sobre la biogeoquímica del medio (Ma *et al.*, 2006). Su alto costo en el mercado, la falta de conocimiento sobre la dosis adecuada a suministrar y factores externos que afectan su calidad y efecto, como el tipo de almacenamiento, la temperatura del agua, pH, salinidad, etapa de la enfermedad, cambios climáticos y presencia de alimento natural (Hektoen *et al.*, 1995; Capone *et al.*, 1996; Zoukovpa *et al.*, 2011) son otros factores que demeritan la aplicación de estas sustancias a nivel producción.

Ante esta problemática, se ha propuesto como alternativa el uso de probióticos, los cuales son definidos de manera general como *“microorganismos vivos que se utilizan como complemento alimenticio o se adicionan en el agua de los estanques, con el fin de modular la actividad del tracto digestivo, mejorando el funcionamiento del sistema inmune e inhibiendo el crecimiento de patógenos gracias al mantenimiento de la barrera de la mucosa intestinal, proporcionando beneficios nutricionales a los animales”* (Moriarty, 1999; Vaughan *et al.*, 2002).

Los factores a considerar para seleccionar un probiótico son la evaluación de los métodos de colonización, habilidad competitiva contra patógenos y los efectos inmunoestimuladores y de crecimiento en los organismos cultivados (Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000). La colonización de las bacterias probióticas en el huésped está basada en la capacidad de éstas para adherirse a la superficie de la mucosa o al epitelio intestinal, producir metabolitos que inhiban o antagonicen con la flora nativa, e inducir una posterior colonización y proliferación, además de sobrevivir a los riesgos del tránsito a través del tracto intestinal hasta el lugar de la colonización (Conway, 1996; Salminen *et al.*, 1998).

La habilidad competitiva que poseen los probióticos favorece la proliferación de bacterias benéficas para la flora intestinal del camarón a través de la reducción o eliminación de bacterias oportunistas (Balcázar *et al.*, 2006). Por otro lado, la estimulación de la actividad del sistema inmune de los organismos causada gracias a la acción de esta tecnología

microbiana se da por diferentes vías, tales como el aumento de la actividad fagocítica (Sakai *et al.*, 1995) o mediante la activación del sistema celular y humoral (Rengpipat *et al.*, 2000). Además, en términos nutricionales los beneficios se ven reflejados en una mayor digestibilidad y mayor aprovechamiento del alimento (Bomba *et al.*, 2002).

Los principales grupos bacterianos con efecto probiótico en el cultivo de peneidos, cangrejos, moluscos y peces, abarcan tanto a bacterias Gram negativas, Gram positivas y ácido-lácticas, entre las que se incluyen a *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Nitrobacter*, *Cellulomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Acinetobacter* y levaduras (Riquelme *et al.*, 1997; Araya *et al.*, 1999; Ruíz-Ponte *et al.*, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Riquelme *et al.*, 2000; Balcazar, 2002; Castex *et al.*, 2008).

Los primeros estudios que evaluaron el efecto de los probióticos se hicieron en Japón, donde se aislaron cepas bacterianas que disminuían el crecimiento de vibrios patógenos, incrementando así la producción de larvas de cangrejo *Portunus trituberculatus* (Nogami & Maeda, 1992). Rengpipat *et al.* (1998), reportaron el uso de *Bacillus* S11 en cultivos de *Artemia* sp. la cual fue utilizada como alimento para larvas de *Penaeus monodon*. Luego de alimentar a las larvas con la artemia pre-tratada con el probiótico, estas fueron expuestas a *Vibrio harveyi* por inmersión. Después de 10 días, todos los grupos alimentados con la artemia enriquecida mostraron el 100% de supervivencia, un menor tiempo de desarrollo y menos problemas de enfermedades, en comparación al grupo control.

También se han obtenido buenos resultados con respecto al crecimiento y supervivencia utilizando *Lactobacillus plantarum* (como antígeno de *Vibrio harveyi*) bioencapsulado en nauplios de artemia en larvas de *Penaeus indicus* (Uma *et al.*, 1999). Gullian & Rodríguez (2002) estudiaron el efecto de añadir cepas de *Bacillus* sp. en el agua, las cuales son capaces de colonizar el hepatopáncreas de juveniles de *Litopenaeus vannamei*, disminuyendo de esta manera las poblaciones patógenas presentes en este órgano. Otra técnica similar fue aplicada por Vaseeharan & Ramasamy (2003), quienes adicionaron en el agua de los estanques de *Penaeus monodon* bacterias probióticas de *Bacillus subtilis* cepa BT23, para inhibir el crecimiento de *Vibrio harveyi*. El probiótico demostró tener un efecto

inhibitorio sobre el agente patógeno, disminuyendo hasta en un 90% la mortalidad acumulada en un periodo de 15 días.

En el 2003, Balcázar demostró el efecto de cepas bacterianas utilizadas como probióticos (*Bacillus* y *Vibrio*) sobre el sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*, mejorando de esta manera el crecimiento y la supervivencia de estos organismos, además de ofrecer un efecto protector contra cepas patógenas de *Vibrio harveyi*. Gullian *et al.* (2004), probaron el efecto inmunoestimulador de *Bacillus* sp. P64 y el efecto inhibitorio de dos cepas de *Vibrio* sp. P62 y *Vibrio* sp. P63 contra *Vibrio harveyi* (S2), en camarones de *Litopenaeus vannamei*. El efecto inmunoestimulador de esta cepa fue comprobado, mientras que con las otras dos cepas de *Vibrio* sp. se observaron propiedades inhibitorias (antagonismo y colonización del tracto digestivo) a nivel *in vitro*, además de organismos sanos, los cuales no presentaron ningún signo de enfermedad durante el análisis. Al usar *Pediococcus acidilactici* en camarones de *Litopenaeus stylirostris* en el tratamiento del Síndrome de verano causado por *Vibrio nigripulchritudo*, se demostró el efecto de éste en la flora microbiana del tracto digestivo de los camarones al disminuir la concentración de diversas bacterias no benéficas (incluyendo *Vibrio nigripulchritudo*) en el intestino de los organismos (Castex *et al.*, 2008).

El efecto de tipo probiótico entre vibrios también ha sido probado a nivel experimental. Tal es el caso de *Vibrio alginolyticus*, el cual tiene este efecto sobre *Vibrio parahaemolyticus*. Esto fue demostrado en una granja de larvas de camarón en Ecuador, donde se utilizaron de manera exitosa cepas de la primera especie como tratamiento contra las infecciones generadas por *Vibrio parahaemolyticus* (Griffith, 1995). Después, este mismo efecto inhibitorio fue investigado por Austin *et al.* (1995) con *Vibrio alginolyticus* en peces de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), encontrando que este mecanismo era favorable a nivel *in vitro*, además de que se mejoró la supervivencia de los peces gracias a que la bacteria fue capaz de sobrevivir dentro del organismo de los animales en un periodo hasta de 3 semanas.

Pese a estas investigaciones, aún existen algunas limitantes en el uso de bacterias probióticas, ya que al no conocer la dosis exacta que debe ser utilizada (en el caso de camarón) y el manejo durante el cultivo, se pueden aplicar concentraciones muy bajas o muy altas, lo que genera al productor pérdidas económicas, debido a que en muchas ocasiones el probiótico no es capaz de mantenerse por sí mismo bajo condiciones de cultivo

(Vine *et al.*, 2006). Por lo tanto, es importante seleccionar probióticos que tengan más de una característica antagonica contra patógenos, ya que de no ser así, estos últimos podrían desarrollar resistencia ante los compuestos antagonicos producidos por el probiótico, como es el caso de *Vibrio*, que tiende a ser resistente cuando se usan probióticos que solo producen compuestos inhibitorios como único mecanismo de acción (Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006).

Un avance novedoso en acuicultura: Tecnología Biofloc

En la prevención de enfermedades en acuicultura, no solo se debe considerar a los animales en sí, sino también el medio en el que habitan y se desarrollan. En organismos acuáticos debe tomarse mucho interés en la calidad del agua, ya que de ella depende que estos se encuentren en un sistema estable y libre de microorganismos que puedan afectarlos a ellos y al medio ambiente debido a las descargas generadas en el sistema de cultivo. Teniendo en cuenta estos factores se requieren altos niveles de producción en el menor tiempo posible y, de preferencia, con una inversión económica baja.

Esta necesidad provocó que los métodos de producción de camarón sufrieran diversas modificaciones a lo largo del tiempo. El gran salto se dio en la década de los 90's, donde en algunos países se aumentó la densidad de organismos en los estanques y el recambio de agua se hizo nulo (Hopkins *et al.*, 1995; Browdy *et al.*, 2001). Esta técnica se adoptó con el nombre de "BFT" (de sus siglas en inglés "Biofloc Technology") y empezó a realizarse en países como Tahití, Belice, Estados Unidos, Malasia, Israel y Brasil (Emerenciano *et al.*, 2013), donde se comprobó que la producción era superior que al usar las viejas técnicas de cultivo (Cuzon *et al.*, 2004; Panjaitan, 2010).

La tecnología biofloc consiste en un sistema con cero recambio de agua, aireación continua y mezcla permanente, favoreciendo la dominancia de poblaciones de microorganismos heterótrofos (bacterias, flagelados, ciliados, protozoarios). Este sistema tiene como objetivo reducir el impacto ambiental provocado por las descargas generadas, gracias a que los microorganismos ahí presentes son capaces de asimilar los compuestos nitrogenados originados por la excreción de los camarones y el alimento lixiviado, favoreciendo así la calidad del agua de los cultivos y aumentando la densidad de producción a un costo económico bastante viable (Avnimelech, 1999).

El medio heterótrofo generado por este sistema se estimula gracias a la fertilización hecha con fuentes ricas en carbono (*e.g.* melaza) y con altos niveles de oxigenación en el agua, formando de esta manera una biopelícula comúnmente llamada “*floc*”, compuesta por materia orgánica proveniente del fitoplancton (microalgas y cianobacterias), zooplancton, hongos (Zhi *et al.*, 2008; Ladino-Orjuela & Rodríguez-Pulido, 2009), heces, exoesqueletos, restos de organismos muertos, cianobacterias y protozoarios, entre otros (Maillard *et al.*, 2005; Wasielesky *et al.*, 2006a; Sharren *et al.*, 2007). La cantidad de bacterias heterótrofas presentes en el agua de biofloc oscila entre 10^7 - 10^9 células/ml (Burford *et al.*, 2003; De Schryver *et al.*, 2008; Chamberlain *et al.*, 2001; Avnimelech, 2012). Las concentraciones de nitritos, nitratos y amonio son controladas por la adición de la fuente de carbono en el agua (control C/N de 20:1) para mejorar la producción microbiana (Avnimelech, 1999).

Todos estos elementos se generan y desarrollan en un medio coloidal que se conserva bajo condiciones controladas en los estanques de cultivo (De Schryver *et al.*, 2008). Gracias a todas estas propiedades, las ventajas de esta tecnología sobre los organismos cultivados y los sistemas de producción son muy diversas, aunque también presenta algunos inconvenientes (Tabla 2). Las enfermedades que antes eran desconocidas en camaronicultura y que comenzaron a tener consecuencias graves en los sistemas de producción (Síndrome de Taura (Brock *et al.*, 1997), Síndrome de la Mancha Blanca (Lightner, 1999; Avnimelech, 2012) y Mionecrosis (Lightner & Pantoja, 2004; Nunes *et al.*, 2004)) fueron hasta cierto punto frenadas gracias al desplazamiento de las viejas técnicas de manejo, por producciones biofloc con cero recambio de agua en los estanques, probando de esta forma una disminución importante en el riesgo de introducción y propagación de enfermedades, ofreciendo de manera adicional beneficios nutricionales por la generación de alimento 100% natural (McIntosh *et al.*, 2000; Bratvold & Browdy, 2001; Samocha *et al.*, 2001; Moss, 2002; Weirich *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2003). Además, las descargas producidas por las granjas acuícolas son ricas en materia orgánica, por lo que éstas pueden ser utilizadas para producir microorganismos heterotróficos y ricos en proteína que pueden ser consumidos por los animales como una fuente de alimento (Schneider *et al.*, 2006; De Schryver *et al.*, 2008; Ballester *et al.*, 2010).

TABLA 2. Ventajas y desventajas sobre el uso de la tecnología biofloc en acuicultura.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> - Presencia de poblaciones bacterianas con funciones probióticas (Tacon <i>et al.</i>, 2002; Bairagi <i>et al.</i>, 2002, 2004; Kesarcodi-Watson <i>et al.</i>, 2008; Zhi <i>et al.</i>, 2008; Aviles, 2011) que favorecen la salud de los animales a través del fortalecimiento del sistema inmune (Liñán-Cabello <i>et al.</i>, 2002; Burford <i>et al.</i>, 2004a; Nhan <i>et al.</i>; 2010). - Control de la abundancia de bacterias patógenas a través del pastoreo hecho por protozoarios (Thompson <i>et al.</i>, 1999) y consumo de nitrógeno por parte de los microorganismos del floc (Austin & Austin, 1999; Brock & Main, 1994). - Mejor calidad del agua de los estanques a través de la eliminación de nitritos y amonio (Tacon <i>et al.</i>, 2002; Schneider <i>et al.</i>, 2005). - Menor impacto ambiental por la reducción de las altas concentraciones de fósforo (Audelo-Naranjo <i>et al.</i>, 2011), disminuyendo el riesgo de eutrofización (Wetzel, 2001). - Reducción en la introducción y esparcimiento de enfermedades (Crab <i>et al.</i>, 2010a; Vinatea <i>et al.</i>, 2010). - Mejor crecimiento en los organismos cultivados, gracias a la presencia de nutrientes (proteínas, vitaminas, minerales, lípidos y aminoácidos) (Chamberlain <i>et al.</i>, 2001; Epp <i>et al.</i>, 2002; Khatoon <i>et al.</i>, 2007; Crab, 2010; Crab <i>et al.</i>, 2010b; Panjaitan, 2010), disminuyendo así el costo por concepto de alimento (Tacon <i>et al.</i>, 2002; Amaya <i>et al.</i>, 2007; Otoshi <i>et al.</i>, 2011). - Mejor calidad en el camarón como producto final para consumo, gracias a una buena pigmentación (astaxantinas) y sabor (bromofenoles) (Whitfield <i>et al.</i>, 1997; Breithaupt, 2004). 	<ul style="list-style-type: none"> - Costo de inversión inicial elevado (Wasielesky <i>et al.</i>, 2006a). - Manejo riguroso e intensivo (Wasielesky <i>et al.</i>, 2006a). - Costo elevado por el consumo de energía generado por las altas tasas de aireación que deben manejarse en los estanques (Wasielesky <i>et al.</i>, 2006a). - Riesgo latente de proliferación de microorganismos patógenos y posible acumulación de fósforo en el sistema (Wasielesky <i>et al.</i>, 2006a). - Control riguroso de oxígeno disuelto (Wasielesky <i>et al.</i>, 2006a).

Poblaciones microbianas presentes en sistemas Biofloc

Dentro de las comunidades microbianas que se desarrollan en un sistema biofloc se encuentran algunas con funciones benéficas, tanto para el medio acuático de los estanques como para la salud de los organismos. Thompson *et al.* (2002) reportaron la presencia de diversos géneros de diatomeas (*Amphora*, *Campylopyxis*, *Navicula*, *Sinedra*, *Hantzschia* y *Cylindrotheca*), y cianobacterias filamentosas (*Oscillatoria* y *Spirulina*); además de flagelados, ciliados y otras microalgas. Este autor concluyó que la función tanto de las diatomeas como de las cianobacterias en el biofloc es promover el consumo de amonio para producir biomasa y evitar su acumulación en el agua, favoreciendo el crecimiento y la supervivencia de los organismos cultivados (Kuhn *et al.*, 2009; Crab *et al.*, 2012).

Otros estudios han mencionado la capacidad de algunas bacterias nativas del biofloc para producir poli- β -hidroxibutiratos (PHB), de los cuales ya se ha comprobado su efecto positivo al proteger organismos acuáticos de interés comercial ante la presencia de infecciones bacterianas (Defoirdt *et al.*, 2007; Halet *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2010; Dinh *et al.*, 2010; Avnimelech, 2012). Estas moléculas son ácidos grasos de cadena corta insolubles en agua y producidos como material de reserva por especies de *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Alcaligenes* spp., *Azotobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. (Yilmaz *et al.*, 2005). Los ácidos grasos de este tipo identificados en los sistemas biofloc son el ácido butírico, acético, propiónico y valérico (Avnimelech, 2012), mismos que se encuentran en concentraciones de 0.5 hasta 18% de MS de biofloc (De Schryver & Verstraete, 2009; Crab, 2010). Su función consiste en proporcionar al camarón energía (Azain, 2004) y proteger el epitelio intestinal haciéndolo más resistente a infecciones, inhibiendo así el crecimiento de patógenos en el mismo (Marques *et al.*, 2005; Nhan *et al.*, 2010). A pesar de que en acuicultura se ha comprobado su efecto benéfico, su aplicación resulta costosa, por lo que al producirse de manera natural en el agua de biofloc, aumenta la productividad y fortalece el sistema inmune de los organismos cultivados bajo estas condiciones (Weltzien *et al.*, 2000; Defoirdt *et al.*, 2007; Halet *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2010; Nhan *et al.*, 2010).

Aviles (2011) utilizó técnicas moleculares para evaluar las poblaciones bacterianas presentes en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* cultivados en biofloc. Dentro de sus resultados encontró vibrios (*Vibrio campbelli*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio vulnificus*) cuyas

cepas pueden llegar a ser patógenas para el camarón ya que ejercen su acción cuando el camarón se inmunodeprime. En este mismo estudio se encontraron bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus*, *Paenibacillus* y *Weisella*) que a nivel industrial se utilizan para elaborar probióticos. En el caso de *Paenibacillus*, se sabe que su mecanismo de acción incluye la secreción de antibióticos y compuestos antifúngicos, por lo que su función en el agua de los estanques podría ser bloquear la acción de bacterias oportunistas, evitando así su proliferación y dispersión en el agua y en los camarones.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, las técnicas de cultivo convencionales utilizadas en acuicultura han sufrido diversas transformaciones con el objetivo de mejorar la calidad del agua y obtener altas densidades en el menor tiempo posible, con un ahorro importante en términos económicos. Estos cambios se basan, en gran parte, en un programa de bioseguridad que evite la propagación y diseminación de enfermedades (entre ellas, las bacterianas causadas por el género *Vibrio*).

Como parte de todas estas medidas, se ha probado el uso de probióticos añadidos en el alimento o en el agua de los estanques, para establecer una competencia restringida contra microorganismos oportunistas o patógenos, evitando así su efecto negativo en la salud de los camarones y teniendo resultados favorables en la productividad de los mismos. Además, se ha demostrado el efecto inmunológico del biofloc sobre los organismos cultivados bajo estas condiciones, beneficiando las altas tasas de crecimiento y disminuyendo los porcentajes de mortalidades. Por ello, resulta una alternativa altamente competente no solo a nivel nutricional, sino también en la salud de los peneidos, por lo que podría representar una excelente opción para prevenir y controlar el efecto oportunista causado por vibrios con posible efecto patógeno.

HIPÓTESIS

- 1) Las especies de *Vibrio* identificadas por herramientas moleculares en el hepatopáncreas de camarones cultivados en biofloc, son diferentes a las que están presentes en agua clara.
- 2) El efecto de las comunidades microbianas presentes de forma natural en el biofloc sobre la presencia de especies de *Vibrio* potencialmente patógenas es comparable a los probióticos producidos a nivel industrial y utilizados en acuicultura bajo condiciones de agua clara.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar las poblaciones de *Vibrio* presentes en agua clara y biofloc, además de evaluar si la presencia de este género bacteriano en ambos sistemas de cultivo se relaciona con efectos nocivos sobre el estado de salud del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

Paralelamente, comparar los efectos del uso de probióticos en agua clara con el cultivo biofloc sobre las tasas de crecimiento, supervivencia y estado de salud de los camarones (lesiones en hepatopáncreas).

Objetivos específicos

- a) Identificar por métodos moleculares especies de *Vibrio* cultivadas a partir del hepatopáncreas de los camarones cultivados en agua clara y biofloc y de muestras de agua tomadas de ambos sistemas.
- b) Comparar el efecto del biofloc contra un probiótico comercial utilizado en acuicultura sobre el crecimiento y la supervivencia de los camarones bajo condiciones de cultivo tradicionales y con cero recambio de agua.
- c) Evaluar el estado de salud de los camarones cultivados en agua clara y biofloc (con presencia y ausencia de un probiótico comercial en el alimento) a través de la identificación de alteraciones histopatológicas en diferentes tejidos, principalmente en el hepatopáncreas.

EXPERIMENTO 1: IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Vibrio* PRESENTES EN SISTEMAS DE AGUA CLARA Y BIOFLOC

Introducción

Dada la distribución natural de las bacterias del género *Vibrio*, es altamente probable encontrarlas en muestras de hepatopáncreas, branquias, músculo y cutícula de los camarones. Cuando el animal se encuentra en un ambiente estresante, la bacteria es capaz de multiplicarse y perjudicar el sistema inmune (Páez-Osuna *et al.*, 2003) haciéndolo más susceptible a manifestar enfermedades. Aunque su presencia puede ir relacionada a ciertos padecimientos, en otras ocasiones no siempre es el principal agente etiológico causante de enfermedades e incluso de mortalidades en los animales. El efecto provocado por *Vibrio* es el reflejo de desequilibrios en el agua (*e.g.* mala calidad, densidades altas de los camarones, alta temperatura, baja concentración de oxígeno disuelto y bajas tasas de recambio en los estanques) (Kautsky *et al.*, 2000; Le Moullac & Haffner, 2000; Burford *et al.*, 2003). Al alterarse uno o más de estos parámetros, los camarones manifiestan signos clínicos que al no ser detectados a tiempo, pueden provocar consecuencias como las mencionadas en el apartado de antecedentes. Una de las formas en la que este tipo de bacterias se adhiere a su huésped es a través de la formación de “biopelículas” en la superficie del exoesqueleto de los camarones, favoreciendo así su supervivencia en condiciones ambientales adversas y facilitando la absorción de los nutrientes necesarios para su desarrollo (Wai *et al.*, 1999; Lipp *et al.*, 2002). Además, la formación de este tipo de biopelículas permite que *Vibrio* se haga más resistente a los antibióticos y pueda relacionarse con otras bacterias del medio u otros huéspedes (Thompson *et al.*, 2004). *Vibrio* es considerada una bacteria de distribución mundial. Los brotes más importantes de patogenicidad que ha provocado han sido en la región del Indo-Pacífico (*Penaeus monodon*), Japón (*Penaeus japonicus*), Ecuador, Colombia y América Central (*Litopenaeus vannamei*) (Lightner, 1996). Por todo lo anterior, es importante estudiar su dinámica en el agua y en el organismo del camarón para entender hasta qué punto su presencia tiene un efecto perjudicial dentro del ambiente acuático.

Materiales y Métodos

a) Origen de los camarones

Este experimento fue realizado en los meses de octubre a noviembre del 2011. Se utilizaron juveniles de *Litopenaeus vannamei* con un peso promedio inicial de 10.76 ± 1.48 g, los cuales fueron tomados del área de Estanquería de la Unidad Académica Sisal-UNAM (Yucatán, México), donde estuvieron mantenidos en condiciones de cultivo biofloc (Emerenciano *et al.*, 2007) durante los meses de abril a septiembre. Estos organismos fueron transferidos a dos sistemas diferentes (agua clara y un nuevo biofloc) en tinas con una capacidad de 47 L. Los parámetros físico-químicos del agua en ambos sistemas fueron medidos dos veces al día (08:00 y 16:00 hrs.). Para la salinidad se utilizó un refractómetro (Vitalsine® SR-6, Apopka, Florida, EUA); la temperatura y el oxígeno disuelto fueron medidos con un multiparámetro (HACH Co., modelo hqd40, Loveland, Colorado, EUA) con sensibilidad para temperatura de -4 a 40°C y para oxígeno disuelto de 0 a 4 mg/L; mientras que el pH fue monitoreado con un potenciómetro (pHTestr® 30, Vernon Hills, Illinois, EUA). La medición de amonio, nitratos y nitritos se hizo cada tercer día utilizando un kit colorimétrico Saltwater Master (HACH Co., Loveland, Colorado, EUA). El volumen del floc fue medido cada tercer día con un cono Imhoff, buscando una concentración de 5 ml/L (Emerenciano, *com. pers.*) con el fin de evitar un aumento en la concentración de éste que pudiera afectar la salud de las branquias, principalmente.

El área donde los organismos se encontraban alojados tenía un fotoperiodo de 12 horas luz / 12 horas oscuridad. La fase experimental fue de 45 días.

b) Condiciones experimentales

1 Agua clara

Compuesto por un sistema de recirculación cerrado, con recambio continuo cada 24 horas (30%, aproximadamente) y aireación permanente. El sistema tenía tres filtros (30, 10 y 5 µm de apertura de malla), un filtro biológico (rocas) y un filtro de arena; la temperatura del agua se mantuvo estable con la ayuda de un chiller (Aquabone®). El agua utilizada circulaba previamente por un ozonificador (IKAL-HA® modelo 1000, Cuernavaca, Morelos,

México), con el fin de eliminar la carga bacteriana e impedir su paso hacia el agua utilizada en el dispositivo (Figura 1).

1 Biofloc

Formado por un sistema de recirculación cerrado y aireación constante. El recambio de agua fue nulo. El agua que abastecía a las tinas provenía de un mesocosmo instalado fuera del área donde se encontraba el dispositivo experimental (Figura 1). Este mesocosmo fue preparado 20 días previos al inicio de la fase experimental, utilizando 170 camarones /m² (total: 4.90 m²) con el fin de enriquecer el sistema a partir de las heces y exoesqueletos de los animales cultivados. Cada 24 horas se alimentaba a los camarones con un alimento comercial (MaltaCleyton[®], Culiacán, Sinaola, México) con 35% de proteína cruda, determinando la ración a proporcionar a partir del alimento sobrante presente en la charola para alimento. Después de alimentar, se añadía una fuente de carbono (melaza) para mantener la razón C:N en una proporción 20:1, asegurando así el crecimiento óptimo de las bacterias heterotróficas (Avnimelech, 1999). Una vez alcanzado el volumen deseado (5 ml/L) la fuente de carbón dejaba de ser añadida en el agua.

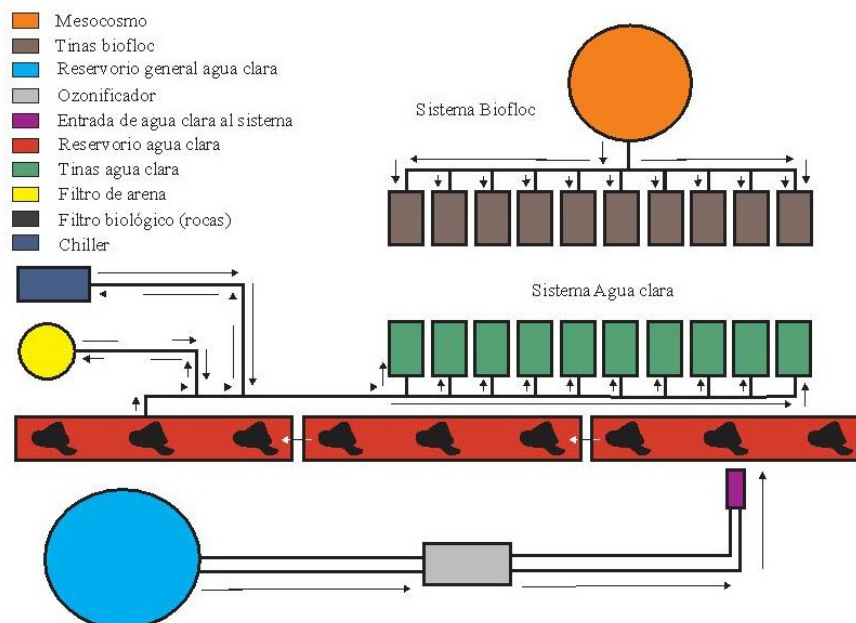


FIGURA 1. Dispositivo experimental. Flechas indican el sentido de circulación del agua, desde el reservorio general (agua clara) y mesocosmo (biofloc).

c) Dietas utilizadas y alimentación

Los animales fueron alimentados al 2% de su peso corporal (ración óptima reportada por Arbelaes, 2010) con una dieta comecial Api-Camarón con 35% de proteína cruda (MaltaCleyton[®], Culiacán, Sinaloa, México). El alimento se proporcionó tres veces al día para cada tina (8:00 am, 2:00 pm y 8:00 pm), utilizando un plato manual para alimento; el sobrante se retiraba todas las mañanas por sifoneo. En tres ocasiones (con intervalos de 15 días) se realizaron biometrías para evaluar el crecimiento de los camarones y ajustar la ración de alimento a proporcionar.

d) Parámetros zootécnicos

Tomando en cuenta el peso inicial y peso final de los organismos cultivados en ambos sistemas, el crecimiento de los mismos se determinó por medio del Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC) en % / mg / día. La fórmula para calcularlo fue la siguiente:

$$\text{CDC} = (\text{Peso final}^{1/3} - \text{Peso inicial}^{1/3}) / \text{No. de días} * 100$$

Para llevar un control de las mortalidades de los organismos, éstas fueron registradas en bitácora a lo largo del experimento. La tasa de supervivencia se determinó a partir de la diferencia entre los organismos sembrados al inicio y al final del experimento, valor expresado en %:

$$\text{Tasa de Supervivencia} = (\text{Número final} / \text{Número inicial}) * 100$$

e) Muestras

Los tratamientos a evaluar fueron agua clara y biofloc. En el día 1 y 45 se extrajeron los hepatopáncreas de un grupo de camarones de cada tratamiento (n=10) (ANEXO 1).

En el día 1, 15, 30 y 45 del experimento se colectaron 250 ml de muestras de agua del mesocosmo, tinas de biofloc y de agua clara, reservorios de agua clara y entrada de agua hacia estos últimos (Figura 2).

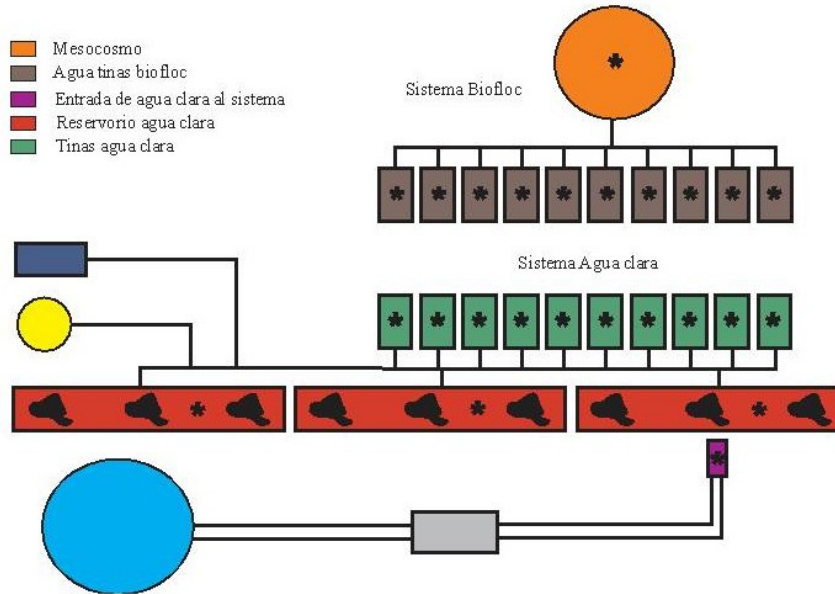


FIGURA 2. Asteriscos indican puntos de muestreo para análisis bacteriológico del agua en sistema biofloc y agua clara.

f) Procesamiento de muestras para identificación de *Vibrio*

Las muestras de hepatopáncreas y agua fueron procesadas de acuerdo a la técnica utilizada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Académica Sisal-UNAM (ANEXO 1). Las colonias obtenidas fueron diferenciadas de acuerdo a su morfología (ANEXO 2), seleccionando de una a dos colonias similares de acuerdo a ese criterio, para después aislarlas y poder extraer su ADN utilizando el método de Adsorción en Sílice (Rojas-Herrera *et al.*, 2008) (ANEXO 3). Se utilizaron los primer's 357F (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3') y 907R (5' CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 3') que incluyen las regiones variables V3-V5 pertenecientes al fragmento de *E. coli* 341-357 y 907-926, respectivamente, y tamaño de fragmento de 580 pb (pares de bases) (Kaksonen *et al.*, 2006), para amplificar el gen ribosomal 16S (ANEXO 4). Los productos del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) fueron purificados utilizando un kit WIZARD® SU Gel and PCR Clean-Up System, de laboratorios PROMEGA (ANEXO 5). Estos productos fueron enviados para su secuenciación por servicio externo al Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) (Morelos, México), donde fueron procesadas en un secuenciador Perkin Elmer/Applied Biosystems®, modelo 3730 (Carlsbad, California, EUA) con 1x de cobertura.

Las secuencias recibidas fueron alineadas con MUSCLE en el programa MEGA[®] 5 (Tamura *et al.*, 2011) junto con las secuencias del 16S ribosomal de las cepas de *Vibrio* obtenidas por blastn de la plataforma EzTaxon[®] server 2.1 (Chun *et al.*, 2007) y que arrojaron un porcentaje de identidad superior a 98%. El tamaño de las secuencias alineadas fue de 540 pb (pares de bases). Finalmente, se generó un árbol filogenético utilizando el método estadístico Neighbor-Joining, apoyado del modelo de sustitución Jukes-Cantor y el método Brootstrap como prueba de soporte de la filogenia.

g) Análisis estadístico

Los datos de CDC fueron transformados a Log10, mientras que los de porcentaje de supervivencia se transformaron a Arcoseno, en ambos casos con el fin de cumplir con el supuesto de normalidad (prueba de Kolmogorov) y homocedasticidad (prueba de Cochran). Una vez hecho esto, se aplicó un Análisis de Varianza de una vía para determinar diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$), donde el factor a evaluar fue el efecto del medio (agua clara vs. biofloc) sobre el crecimiento y supervivencia de los camarones. Se hizo una prueba de Tukey cuando $P < 0.05$. Para cada caso, se utilizaron 10 réplicas con siete organismos cada una (Figura 3). El número total de organismo fue de 140, con una $n=7$ y 10 réplicas/tratamiento. El paquete bioinformático utilizado fue STATISTICA[®] 5.0.

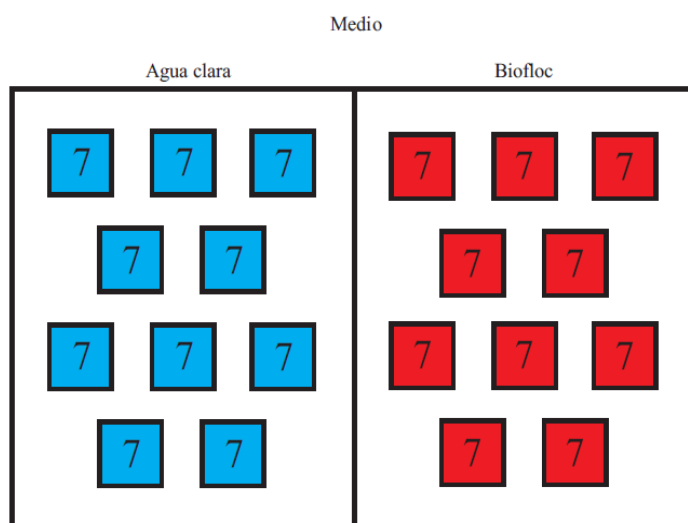


FIGURA 3. Distribución de los organismos en el dispositivo experimental para cada tratamiento.

Resultados

a) Parámetros físico-químicos

El promedio de valores registrados durante la medición de parámetros físico-químicos en agua clara y biofloc son presentados en la Tabla 3.

TABLA 3. Promedio \pm Desviación estándar de parámetros físico-químicos obtenidos en agua clara y biofloc durante 45 días.

PARÁMETRO	AGUA CLARA			BIOFLOC		
	Mín	Prom \pm DesvStd	Máx	Mín	Prom \pm DesvStd	Máx
Salinidad (ppm)	36.0	36.6 \pm 0.53	38.0	37.0	36.8 \pm 0.29	38.0
Temperatura (°C)	26.4	26.4 \pm 1.77	27.0	26.5	26.5 \pm 0.61	26.6
Oxígeno disuelto (mg/L)	5.24	5.11 \pm 0.35	5.37	5.23	4.40 \pm 0.17	5.71
pH	7.60	7.69 \pm 0.18	7.80	7.46	7.86 \pm 0.08	8.07
Amonio total (mg/N/L)	-	0.6	-	-	0.6	-
Nitritos (mg/N/L)	-	0.15	-	-	0.15	-
Nitratos (mg/N/L)	-	10	-	-	10	-
Volumen floc (ml/L)	-	-	-	4.6	6.69	15

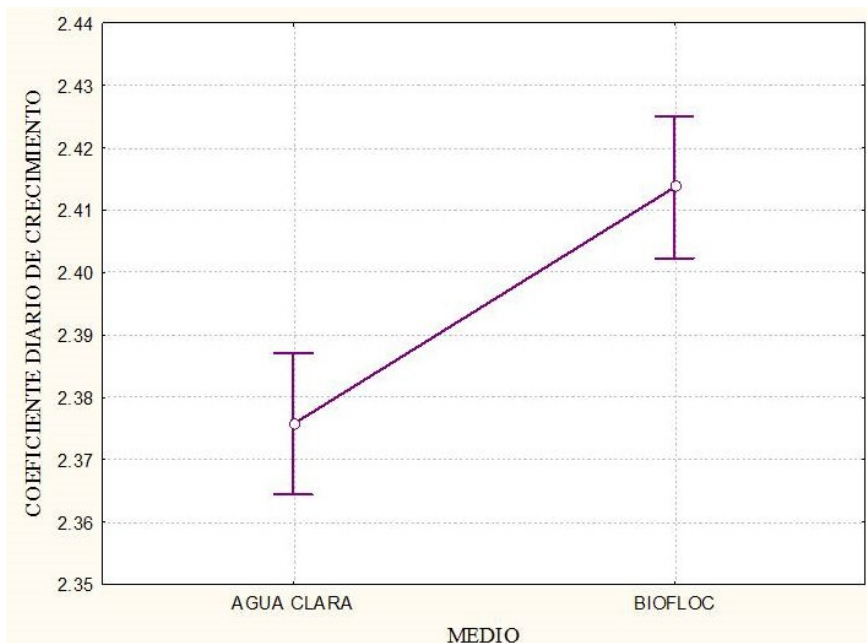
Prom: Promedio

DesvStd: Desviación Estándar

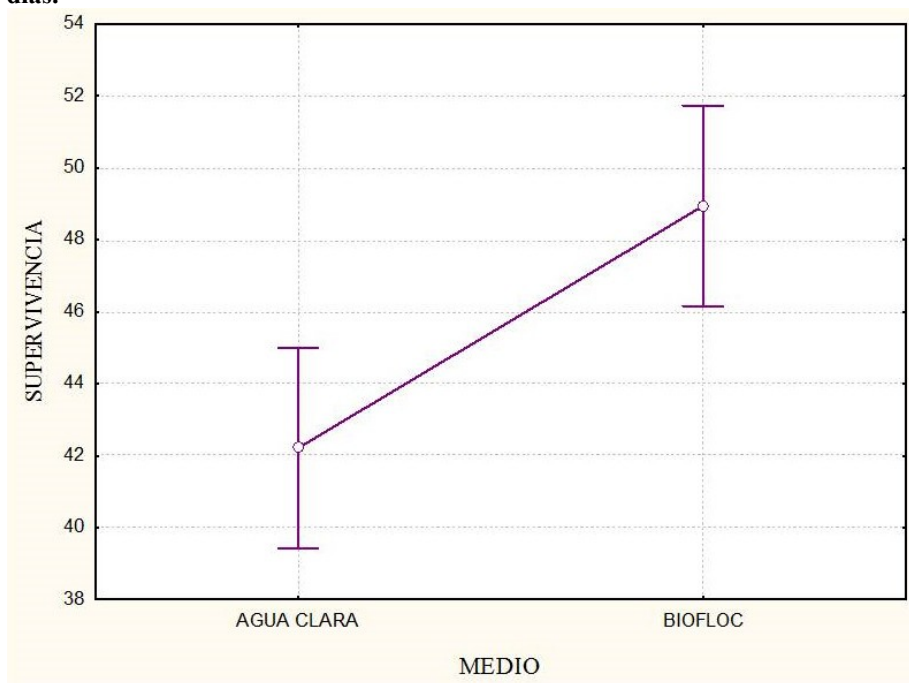
b) Crecimiento y supervivencia

La prueba de Tukey aplicada arrojó diferencias significativas entre los organismos cultivados en agua clara y biofloc (Gráfica 1 y 2), encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos, donde el biofloc tuvo un mayor efecto tanto para el Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC) ($P = 0.0002$), como para el porcentaje de supervivencia ($P = 0.0022$).

GRÁFICA 1. Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC, %/mg/día) obtenido en los camarones cultivados en agua clara y biofloc durante 45 días.



GRÁFICA 2. Porcentaje de supervivencia obtenido en los camarones cultivados en agua clara y biofloc durante 45 días.



En la Tabla 4 se presentan los promedios finales obtenidos para la variable peso (inicial y final), CDC y supervivencia evaluados en este experimento.

TABLA 4: Promedio \pm Desviación estándar obtenidos para las variables evaluadas.

VARIABLE	AGUA CLARA	BIOFLOC
Peso promedio inicial (g)	12.04 \pm 1.18	9.48 \pm 0.68
Peso promedio final (g)	14.14 \pm 0.83 ^b	18.35 \pm 2.05 ^a
CDC (%/mg/día)	0.28 ^b	1.13 ^a
Supervivencia (%)	65.71 \pm 13.49 ^b	87.14 \pm 13.11 ^a

(a , b) Diferencias significativas debidas al factor medio (agua clara vs. biofloc) de acuerdo a la prueba de Tukey, con una $P < 0.05$.

c) Vibrios identificados en agua clara y biofloc

Con base a los resultados arrojados por la plataforma EzTazon[®] server 2.1, las 42 colonias de *Vibrio* aisladas durante los diferentes muestreos de este experimento tuvieron un porcentaje de identidad superior al 98% en sus secuencias del gen 16S ribosomal con *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii*, *Vibrio rotiferianus* y *Vibrio azureus*. No obstante, seis muestras pertenecientes exclusivamente al sistema biofloc arrojaron un porcentaje de identidad menor a 98% con *Vibrio azureus*. En la Tabla 5 se resume las especies de *Vibrio* encontradas en ambos sistemas, mientras que en la Figura 4 se presenta el árbol filogenético generado con el programa MEGA[®] 5, utilizando a *Photobacterium phosphoreum* como grupo externo (secuencia conocida y evolutivamente distante al grupo interno objeto de estudio, en este caso *Vibrio*).

TABLA 5. Número de cepas de las distintas especies de *Vibrio* aisladas en agua clara y biofloc y determinadas por métodos moleculares.

ESPECIE	AGUA CLARA	BIOFLOC	PORCENTAJE DE IDENTIDAD
<i>Vibrio harveyi</i>	6	3	Superior a 98%
<i>Vibrio owensii</i>	4	3	Superior a 98%
<i>Vibrio rotiferianus</i>	6	13	Superior a 98%
<i>Vibrio azureus</i>	-	1	Superior a 98%
<i>Vibrio azureus</i>	-	6	Inferior a 98%

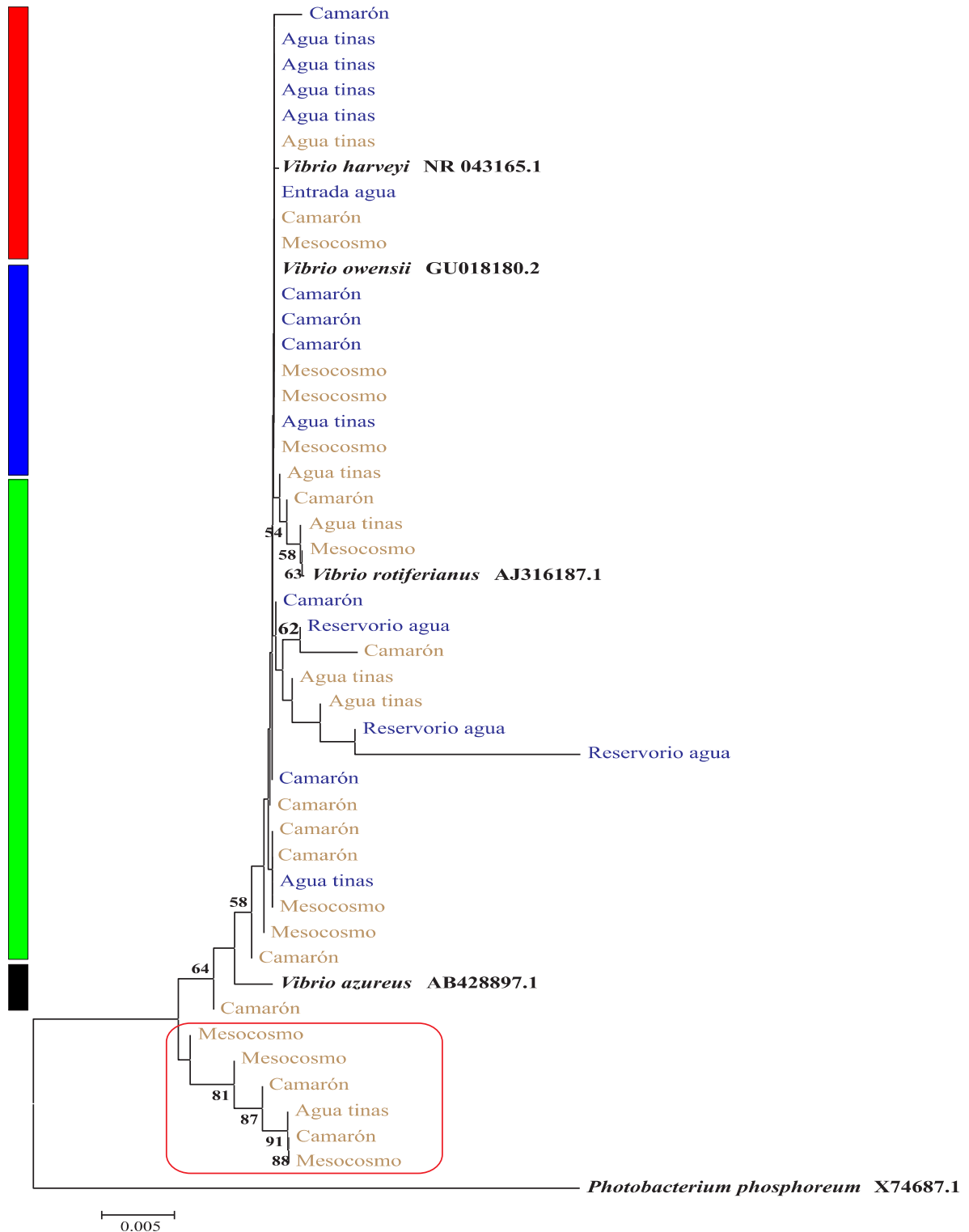


FIGURA 4: Árbol filogenético con las especies de *Vibrio* presentes en agua clara y biofloc. * Color azul indica las muestras tomadas del sistema de agua clara; color café indica las muestras tomadas del sistema biofloc. *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio azureus*. Las muestras enmarcadas en color rojo muestran el grupo con identidad < 98% con las cepas utilizadas.

Discusión

El crecimiento de los camarones fue estadísticamente diferente por efecto del medio, por lo que las propiedades del biofloc a los 45 días fueron benéficas para el crecimiento. Resultados similares sobre estos parámetros se han demostrado también en *Litopenaeus vannamei* cultivados en condiciones con cero recambio de agua. Wasielesky *et al.* (2006b) reportaron para *Litopenaeus vannamei* cultivados en biofloc durante un periodo de 20 días valores estadísticamente superiores ($P > 0.05$) (peso promedio inicial: 1.82 ± 0.71 g; peso promedio final: 5.43 ± 0.36 g) en comparación a condiciones de cultivo en agua clara (peso promedio final: 4.29 ± 0.26 g). Neal *et al.* (2010) publicaron resultados similares en la ganancia de peso en larvas de la misma especie de camarón en un lapso de 20 días de cultivo (peso promedio inicial: 0.40 ± 0.28 g; peso promedio final: 14.5 ± 0.5 g); mientras que Pérez-Velázquez *et al.* (2008) obtuvieron en un periodo de 3 a 4 semanas (también para *Litopenaeus vannamei*) una ganancia de peso hasta de 1.73 ± 0.16 g (peso promedio inicial: 0.35 ± 0.02 g; peso promedio final: 2.09 ± 0.17 g), comprobando así que los beneficios en cuanto a nutrición que posee este ecosistema aumentan el rendimiento de los camarones.

A su vez, la supervivencia bajo estas condiciones también fue superior. La elevada tasa de este parámetro puede ser el reflejo de las propiedades que el biofloc posee, y que como en otros estudios se ha demostrado, tiene beneficios sobre el sistema inmune del camarón, aumentando así la supervivencia de los mismos. Estas propiedades incluyen la presencia de bacterias ácido-lácticas (Aviles, 2011) y de otro tipo de microorganismos con funciones probióticas (Bairagi *et al.*, 2002, 2004; Tacon *et al.*, 2002; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Zhi *et al.*, 2008;), mismos que pudieron ayudar a fortalecer el sistema inmune de los camarones, evitando así tasas de mortalidad importantes durante la fase experimental. Burford *et al.* (2004a) determinaron la retención de nitrógeno en los sustratos suspendidos en biofloc (ricos en bacterias y fitoplancton) en cultivo de *Litopenaeus vannamei*, demostrando que estos sustratos son capaces de retener el nitrógeno derivado de los residuos generados por los camarones (exoesqueletos, animales muertos, heces) y alimento sobrante, evitando así un aumento importante de nitritos y amonio en el agua, favoreciendo así la supervivencia de los camarones (98, 92 y 91% en organismos con un peso de 1, 5 y 9 g, respectivamente).

El mecanismo de acción de tipo *antibiosis* que el biofloc presenta contra algunos patógenos ha sido probado en cultivos de *Artemia franciscana*, donde los microorganismos nativos de este medio lograron inhibir el efecto de una cepa patógena de *Vibrio harveyi* (BB120), probando que este tipo de cultivos son una herramienta potencial que protege a los organismos de infecciones causadas por este género bacteriano (Crab *et al.*, 2010a). Sin embargo, estudios de este tipo en camarones peneidos aún son escasos.

Para que el equilibrio de la interacción ambiente-animal no se vea afectado, es importante evitar la manifestación de los microorganismos del agua con tendencia a presentar efectos oportunistas contra la salud de los camarones. El prevenir esto dependerá del buen manejo que se dé en los sistemas de cultivo (control de desechos, monitoreo de parámetros físico-químicos) y en los animales, además de proporcionar alimento de buena calidad que aporte energía y fortalezca el sistema inmune de los animales, haciéndolos menos susceptibles a las enfermedades.

Las diferencias poblacionales encontradas entre las bacterias del género *Vibrio* aislados de los sistemas de agua clara y biofloc nos permiten especular acerca de los distintos equilibrios ecológicos que se pueden alcanzar en las poblaciones microbianas dentro de ambos sistemas. Así, la presencia de un nuevo grupo de vibrios en el sistema biofloc nos hace suponer que son éstas diferencias de equilibrio las que pueden causar efectos de tipo probiótico, los cuales presentan funciones inhibitorias sobre grupos de vibrios patógenos presentes en el sistema de cultivo. La posibilidad de que la cepa aislada del sistema biofloc tenga estos efectos, los cuales han sido observados con *Vibrio alginolyticus* a nivel experimental con camarones (Griffith, 1995) y peces (Austin *et al.*, 1995), queda abierta. Sin embargo, esta conclusión no es definitiva y debe de comprobarse por experimentación.

La existencia de cualquier especie de *Vibrio* en ambientes acuáticos es natural, ya que es común encontrarlas en el agua y en los organismos que en esta habiten, tanto sanos como enfermos (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Potasman *et al.*, 2002; Oxley *et al.*, 2002), llegando a representar en el primer caso hasta el 30% de la comunidad bacteriana presente en la microflora del camarón (Costa *et al.*, 1998).

La población microbiana del agua se ve reflejada en los animales, ya que se sabe que la composición de la microflora del camarón va a ser similar a la del medio donde éste habita, debido al intercambio de agua que se da a través de las branquias o vía digestiva mediante

su entrada por la boca cuando el camarón se alimenta (Lynch & Hobbie, 1988; Van Der Waiij, 1992). Por ello, al existir un intercambio entre el medio y el camarón, no resulta difícil comprender que las especies de *Vibrio* identificadas fueran similares entre el agua de cada sistema y los camarones cultivados en cada uno de estos.

En el caso de los sistemas de cultivo con cero recambio de agua, ya se ha identificado con anterioridad a *Vibrio campbellii*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio azureus* y *Vibrio harveyi* (Aviles, 2011) como parte de la microbiota digestiva del camarón *Litopenaeus vannamei*. *Vibrio harveyi* es considerada una de las especies bacterianas más problemáticas en acuicultura (Lightner, 1996), ya que algunas cepas han sido reportadas como causantes de elevadas mortalidades, tanto a nivel producción como experimental, sobre todo en *Penaeus monodon* (Karunasagar *et al.*, 1994), *Litopenaeus vannamei* (Vandenberghe *et al.*, 1999; Soto-Rodríguez *et al.*, 2012) y *Penaeus merguensis* (Oxley *et al.*, 2002). Cabe resaltar que en base al gen 16S ribosomal de *Vibrio campbellii* y *Vibrio harveyi*, ambas especies pueden ser filogenéticamente indistinguibles (Gómez-Gil *et al.*, 2004).

El hecho de identificar cepas de microorganismos patógenos en un sistema de cultivo no garantiza que éste se encuentre en peligro de pérdida por mortalidad. De hecho, es sabido que la alta diversidad de microorganismos en el agua de los sistemas biofloc (nemátodos, rotíferos, ciliados, flagelados, bacterias filamentosas, protozoarios) evita el efecto oportunista de cepas patógenas del género *Vibrio* que se manifiesta debido a diferentes factores de estrés (Avnimelech, 2012), además de proporcionar de forma permanente nutrientes de buena calidad, como proteínas, fosfolípidos, colesterol, glucógeno y vitaminas (Chamberlain *et al.*, 2001; Epp *et al.*, 2002; Khatoon *et al.*, 2007; Crab, 2010; Crab *et al.*, 2010b; Panjaitan, 2010; Emerenciano, 2012). La importancia de estos nutrientes sobre la ganancia de peso y supervivencia de *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* (Acuacop, 1992) y *Farfantepenaeus duorarum* ya ha sido comprobada (Emerenciano, 2012) ya que representan una concentración de proteína cruda nativa hasta de 35%, lo cual es evidenciado en la ganancia de peso de los animales, muda, maduración gonadal (Emerenciano *et al.*, 2011), aumento en el aprovechamiento de colesterol y presencia de vitamina E y C (Cuzon, *datos no publicados*).

Conclusiones

El sistema de cultivo biofloc tuvo un efecto favorable sobre el crecimiento y supervivencia de los camarones cultivados en este sistema, en comparación a los de agua clara.

A pesar de compartir algunas especies, la composición poblacional del género *Vibrio* fue distinta entre el sistema agua clara y biofloc, debido a la presencia de una cepa no identificada de *Vibrio* (porcentaje de identidad inferior a 98% a cualquier cepa reportada).

EXPERIMENTO 2: COMPARACIÓN ENTRE COMUNIDADES MICROBIANAS DEL BIOFLOC vs. UN PROBIÓTICO COMERCIAL SOBRE LAS ESPECIES DE *Vibrio* Y ESTADO DE SALUD EN *Litopenaeus vannamei*

Introducción

El uso de probióticos en acuicultura tiene como objetivo incrementar la respuesta inmune de los organismos ante enfermedades (Balcázar, 2002; Vaughan *et al.*, 2002). Su empleo ha demostrado favorecer la producción de organismos acuáticos en sus diversas etapas de desarrollo, ya que reducen y evitan el efecto negativo de las comunidades bacterianas en los estanques (Jory, 1998). Tienen la capacidad de degradar la materia orgánica, reducir las concentraciones de nitrógeno (amonio, nitritos), sulfatos, hidrógeno y fósforo generados en los estanques (Avnimelech, 1999; De Schryver & Verstraete, 2009), disminuyendo el riesgo de eutrofización y proliferación de cianobacterias que pueden producir sustancias tóxicas (Zhi *et al.*, 2008). Por otro lado, el ecosistema natural del biofloc ya ha sido documentado por diversos autores, quienes coinciden que este sistema tiene beneficios no solo nutricionales (De Schryver *et al.*, 2009), sino también de tipo antimicrobiano (Defoirdt *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2008; Nhan *et al.*, 2010; Avnimelech, 2012).

Una forma de evaluar este efecto es a través del uso de técnicas histológicas, como una herramienta auxiliar en el diagnóstico de enfermedades mediante la observación de alteraciones presentes en los tejidos del camarón.

Materiales y Métodos

a) Origen de los camarones

Este experimento fue realizado en los meses de abril y mayo del 2012. Se utilizaron juveniles de *Litopenaeus vannamei*, con un peso promedio inicial de 4.79 ± 0.57 g, los cuales fueron tomados del área de Estanquería de la Unidad Académica Sisal-UNAM (Yucatán, México), donde se encontraban mantenidos en condiciones de cultivo biofloc (Emerenciano *et al.*, 2007) durante los meses de febrero y marzo. Estos organismos fueron transferidos al mismo sistema que se utilizó en el experimento anterior. Los parámetros físico-químicos (salinidad, temperatura, oxígeno disuelto y pH), nutrientes (amonio, nitratos, nitritos) y volumen del floc se midieron de la misma forma descrita en el experimento anterior. El área donde los organismos se encontraban alojados tenía un fotoperiodo de 12 horas luz / 12 horas oscuridad. La fase experimental fue de 45 días.

b) Dispositivo experimental

Los dispositivos experimentales utilizados para el sistema de agua clara y biofloc tuvieron las mismas características que fueron mencionadas en el experimento 1 (Figura 5).

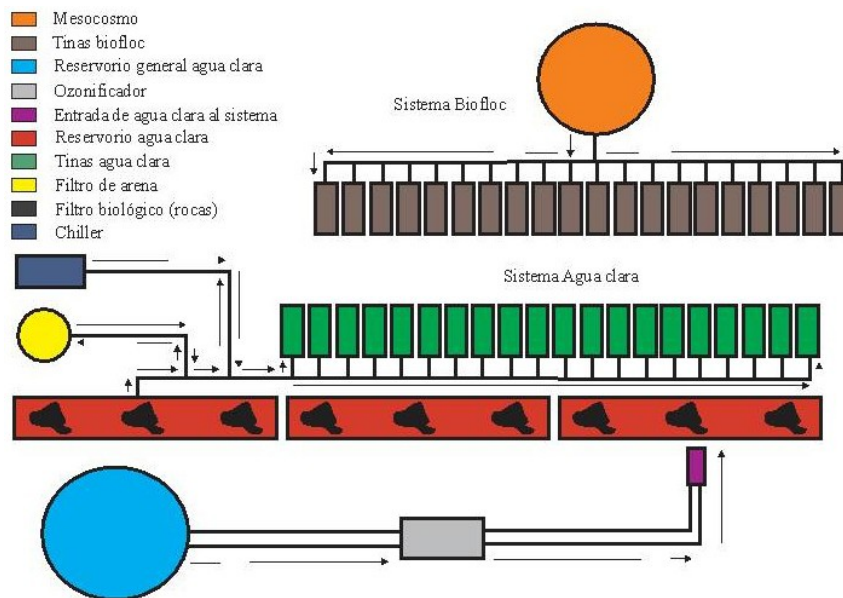


FIGURA 5. Dispositivo experimental del segundo experimento. * Flechas indican el sentido de circulación del agua, desde el reservorio general (agua clara) y mesocosmo (biofloc).

c) Dietas utilizadas y alimentación

Los animales que fueron alimentados sin la suplementación de probiótico recibieron una dieta con fórmula especial Api-Camarón con 35% de proteína cruda (MaltaCleyton[®], Culiacán, Sinaloa, México). Para suplementar la dieta con probiótico se utilizó uno de la marca comercial Altai[®] (Providencia, Santiago, Chile) hecho a base de *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* y *Saccharomyces cerevisiae* (densidad de 10⁹ UFC / g) en la dosis recomendada por el fabricante (2.25 g de probiótico / kg de alimento) (ANEXO 6).

Todos los camarones fueron alimentados al 2% de su peso corporal (ración óptima reportada por Arbeláez, 2010). Se proporcionaron tres tomas al día para cada tina (8:00 am, 2:00 pm y 8:00 pm) utilizando un plato alimentador para evaluar la cantidad consumida por los organismos. El sobrante se retiraba todas las mañanas por sifoneo. Cada 15 días se realizaron biometrías para evaluar el crecimiento de los camarones y ajustar la ración de alimento a proporcionar.

d) Parámetros zootécnicos

Se evaluó el Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC %/mg/día) y porcentaje de supervivencia bajo los mismos criterios descritos en el experimento 1.

e) Muestras

Los tratamientos a evaluar fueron agua clara / con probiótico, agua clara / sin probiótico, biofloc / con probiótico y biofloc / sin probiótico. En el día 1 y 45 se extrajeron los hepatopáncreas de un grupo de camarones de cada tratamiento (n=10) (ANEXO 1).

En el día 1, 15, 30 y 45 se colectaron 250 ml de muestra de agua del mesocosmo, tinas de biofloc y de agua clara, reservorios de agua clara y entrada de agua hacia estos últimos para hacer la misma evaluación que con el hepatopáncreas. (Figura 6).

Otro grupo de camarones (n=10) fueron tomados en el día 1 y 45 para evaluar el estado de salud de cada grupo en base a los hallazgos presentes en los diferentes tejidos, los cuales

fueron procesados en el laboratorio de Histopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Mazatlán, Sinaloa, México.

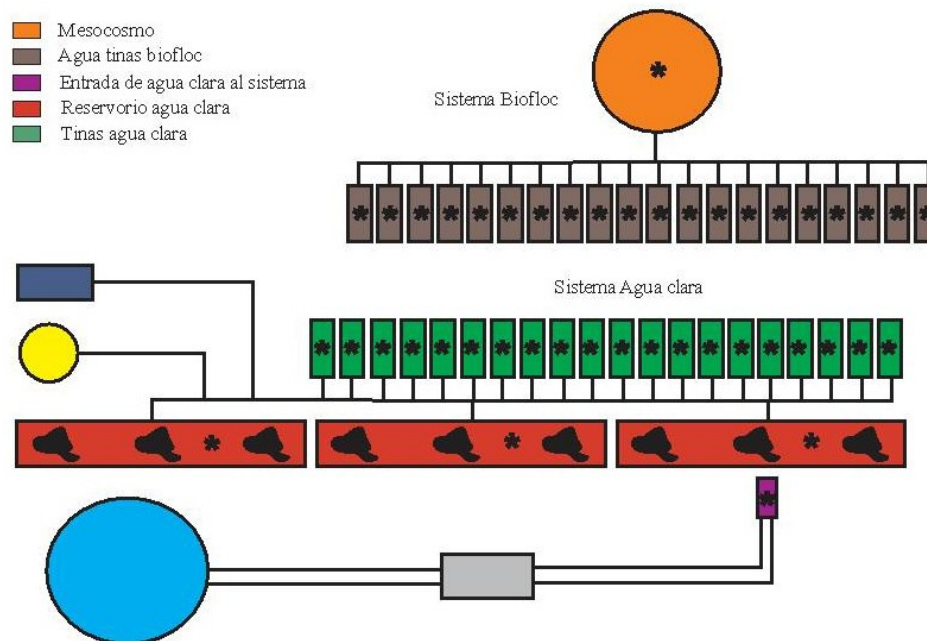


FIGURA 6. Asteriscos indican puntos de muestreo para análisis bacteriológico del agua en sistema agua clara y biofloc.

f) Procesamiento de muestras para el aislamiento de *Vibrio*

Las muestras de hepatopáncreas y agua fueron procesadas utilizando la misma metodología descrita en el experimento 1 (obtención de colonias, aislamiento, extracción de ADN, amplificación del gen 16S ribosomal, purificación de los productos de PCR, secuenciación por servicio externo).

Las secuencias recibidas fueron alineadas con MUSCLE en el programa MEGA[®] 5 (Tamura *et al.*, 2011) bajo los mismos criterios descritos en el experimento 1. En este caso, el tamaño de las secuencias alineadas fue de 470 pb (pares de bases). Nuevamente se generó un árbol filogenético utilizando el método estadístico Neighbor-Joining, apoyado del modelo de sustitución Jukes-Cantor y el método Bootstrap como prueba de soporte de la filogenia.

g) Procesamiento de muestras para análisis histopatológico

‡ Fijación

Los camarones fueron fijados en solución Davidson (ANEXO 7 y 8) durante 48 horas y luego transferidos a una solución de etanol al 70%, de acuerdo al protocolo establecido por Lightner (1996), con el objetivo de evaluar posibles bacteriosis causadas por *Vibrio*, a partir de su análisis en muestras de diferentes tejidos de camarón.

‡ Disección de tejidos

Se fijaron los camarones a partir de cortes longitudinales (Figura 7A), para posteriormente tomar muestras de branquias, estómago, hepatopáncreas, intestino, ciego hepático, músculo, órgano linfoide, glándula antenal, epitelio y tejido conectivo. Todos los tejidos fueron colocados en unicassettes plásticos (Figura 7B) y depositados en alcohol.

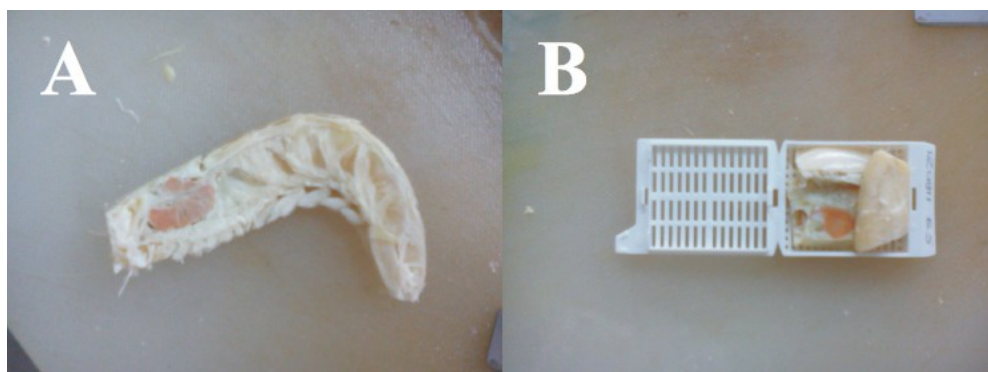


FIGURA 7. Obtención de muestras de tejido de camarón para análisis histopatológico.

‡ Deshidratación

Las muestras insertadas en los unicassettes fueron sometidas a una deshidratación gradual a base de alcohol (concentración al 70%, 80%, 96% y absoluto), sumergidos posteriormente en xilol y finalmente en parafina, con la ayuda de un procesador de tejidos (Tissue-Tek® II modelo 4640-B, Tokio, Japón) (Figura 8A).

‡ **Embebido en parafina**

Las muestras fueron retiradas de los unicassettes y depositadas en un molde para ser embebidas en parafina caliente (Leica® EG116, Nussloch, Alemania) (Figura 8B). Después de que las muestras estuvieran lo suficientemente frías, se retiró el molde para solo conservar el bloque de parafina. Cada bloque fue rebajado en el micrótopo, haciendo sobre éstos un corte de 25 µm, hasta que todos los tejidos quedaran lo suficientemente expuestos.

‡ **Corte de tejidos**

Los bloques de parafina fueron reposados en un reactivo descalcificador para ablandar la quitina presente en las muestras. Después fueron enjuagadas con agua abundante y colocadas en una placa de hielo para enfriarlas lo suficiente y facilitar los cortes en el micrótopo (Leica® 820, Nussloch, Alemania) a un tamaño de 6 µm (Figura 8C). Por cada bloque de parafina se tomaron dos muestras que fueron montadas en un portaobjetos y posteriormente colocadas en una estufa de secado (55°C) para eliminar la humedad.



FIGURA 8. (A) Procesador de tejidos, (B) Embededor de parafina, (C) Microtopo. Laboratorio de Histopatología, CIAD-Mazatlán.

‡ **Tinción Hematoxilina-Eosina Floxina**

Es el método de tinción rutinario más frecuente en tejidos. Sus características químicas permiten diferenciar con mayor claridad las células de los tejidos e identificar si estas son normales o presentan un comportamiento morfológico inusual. El colorante hematoxilina tiene un comportamiento basófilo, por lo que tiñe el núcleo y membrana celular de color azul, mientras que el colorante eosina, al ser de tipo acidófilo, tiñe el citoplasma de las

células de color rosa (Cuéllar-Anjel, 2008). En la Figura 9 se muestra el procedimiento aplicado para la tinción Hematoxilina-Eosina Floxina.

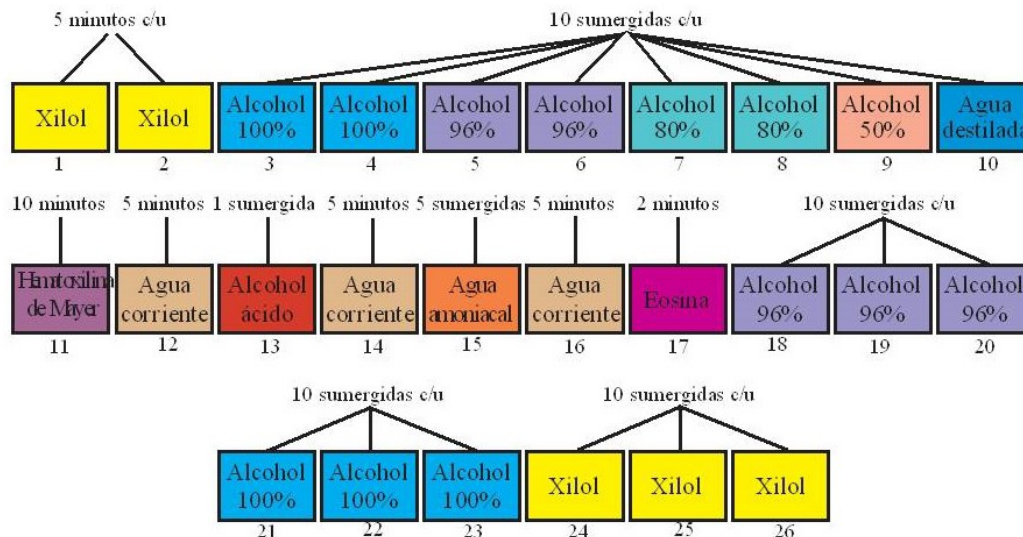


FIGURA 9: Método de Tinción Hematoxilina-Eosina Floxina. Laboratorio de Histopatología, CIAD-Mazatlán.

1 Tinción Giemsa de Price

Es una tinción diferencial que en microbiología permite identificar virus, bacterias, parásitos y hongos. El colorante Giemsa se compone de azures de metileno (A, B y C), eosina y azul de metileno. El azur B y eosina tienen afinidad por la cromatina de las células, dándole a la primera una coloración rojiza, mientras que el citoplasma toma un color azul de metileno, el cual también forma parte de este colorante (Perea-Sasiaín, 2003). En el microscopio se observan las bacterias en una coloración azul oscuro (bacilos y cocos, principalmente). En la Figura 10 se muestra el procedimiento aplicado para la tinción Giemsa de Price:

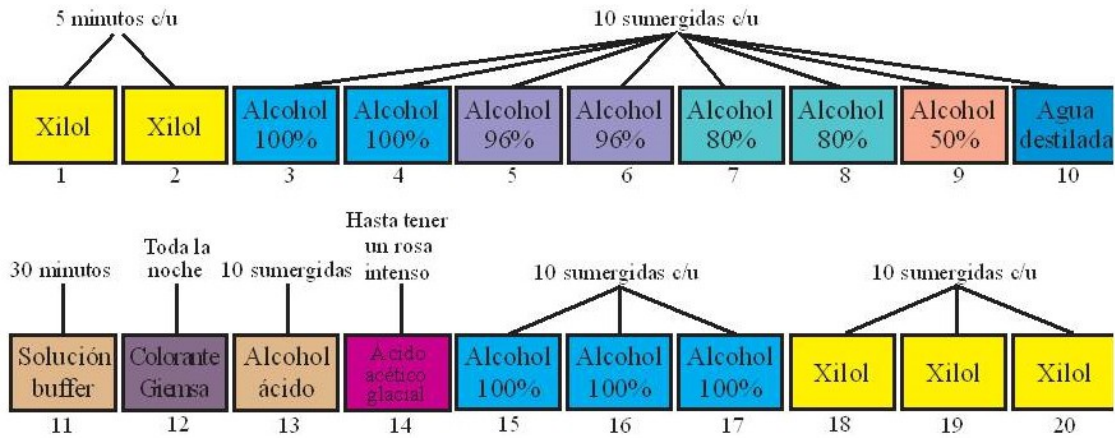


FIGURA 10: Método de Tinción Giemsa de Price. Laboratorio de Histopatología, CIAD-Mazatlán.

1 Montaje, observación e interpretación

Después de las tinciones, cada laminilla fue montada en resina y se le colocó un portaobjetos para proteger el tejido teñido y evitar que se dañara. Al secarse la resina, las laminillas quedaron listas para ser analizadas al microscopio (Olympus® CH30, Melville, NY).

h) Hibridación *in situ* (FISH)

Posterior al análisis histopatológico, un grupo de cinco bloques de parafina (un bloque / tratamiento) fueron enviados al Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona, eligiendo los que presentaron mayor severidad en las lesiones encontradas, con el fin de detectar la presencia de *Candidatus Hepatobacter penaei*, la bacteria causante de la enfermedad conocida como Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP) (Nunan *et al.*, 2013). Los bloques de parafina fueron sometidos a la prueba de FISH con una sonda genética específica para la detección de la bacteria de NHP. Los cortes realizados en cada bloque fueron procesados con la tinción Mayer-Bennet hematoxilina/eosina-floxina (H & E).

i) Análisis estadístico

Los datos de CDC fueron transformados a Log10, mientras que los de porcentaje de supervivencia se transformaron a Arcoseno, en ambos casos con el fin de cumplir con el supuesto de normalidad (prueba de Kolmogorov) y homocedasticidad (prueba de Cochran). Una vez hecho esto, se aplicó un Análisis de varianza bifactorial de 2 x 2 para determinar diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$), en donde los dos factores a evaluar fueron el efecto del medio (agua clara vs. biofloc) y del probiótico (presente / ausente) sobre el crecimiento y supervivencia de los camarones. Se realizó una prueba de Tukey cuando $P < 0.05$. Para cada combinación (resultado de la interacción entre los dos factores) se utilizaron 10 réplicas con siete organismos cada una (Figura 11). El número total de organismos fue de 280, con una $n=7$ y 10 réplicas/tratamiento. Para el análisis se utilizó el paquete bioinformático STATISTICA® 5.0.

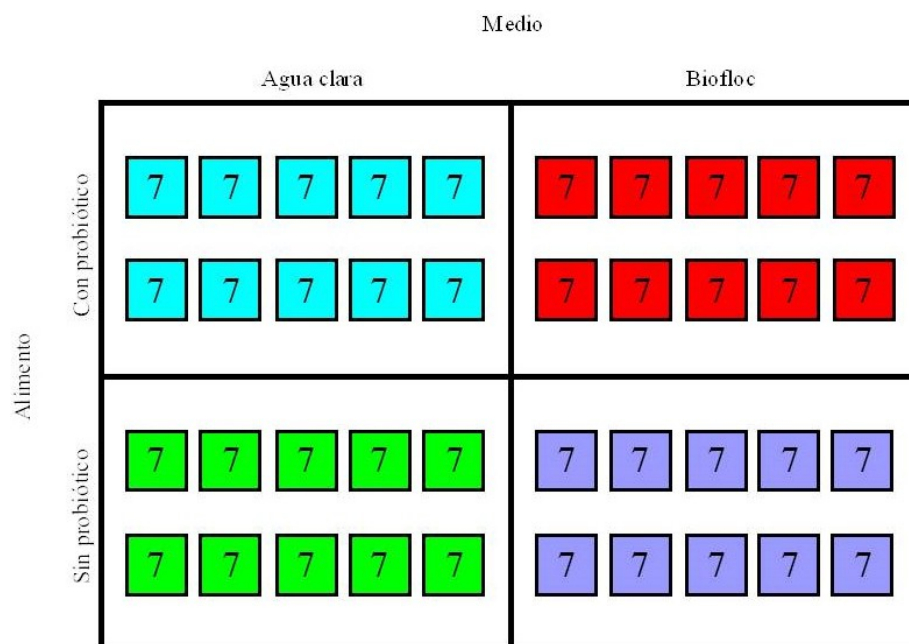


FIGURA 11. Distribución de los organismos en el dispositivo experimental para cada tratamiento.

Resultados

a) Parámetros físico-químicos

El promedio de valores registrados durante la medición de parámetros físico-químicos en agua clara y biofloc, es presentado en la Tabla 6.

TABLA 6. Promedio \pm Desviación estándar de parámetros físico-químicos obtenidos en agua clara y biofloc durante 45 días.

PARÁMETRO	AGUA CLARA			BIOFLOC		
	Mín	Prom \pm DesvStd	Máx	Mín	Prom \pm DesvStd	Máx
Salinidad (ppm)	36.0	37.2 \pm 1.76	38.0	38.0	40.6 \pm 1.38	43.0
Temperatura (°C)	24.4	27.2 \pm 1.13	28.7	24.9	28.0 \pm 1.11	29.5
Oxígeno disuelto (mg/L)	4.96	5.37 \pm 0.35	5.79	4.19	4.77 \pm 0.20	5.11
pH	7.02	7.50 \pm 0.24	7.81	6.71	7.90 \pm 0.18	7.93
Amonio total (mgN/L)	-	0.6	-	-	0.6	-
Nitritos (mgN/L)	-	0.15	-	-	0.15	-
Nitratos (mgN/L)	-	10	-	-	10	-
Volumen floc (ml/L)	-	-	-	4.2	7.33	13

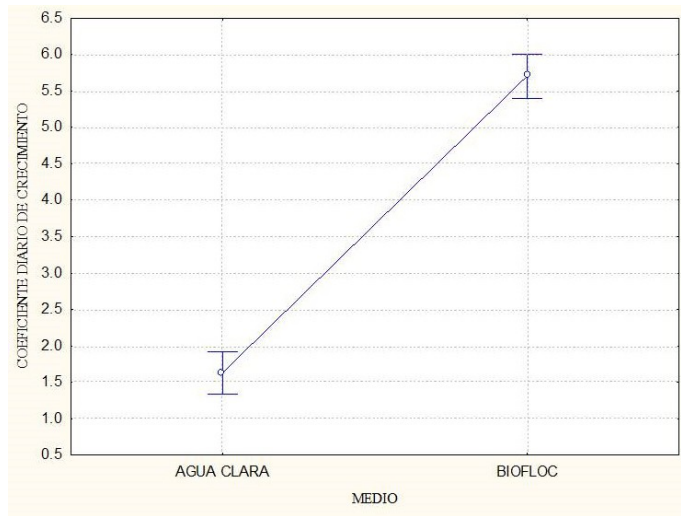
Prom: Promedio

DesvStd: Desviación Estándar

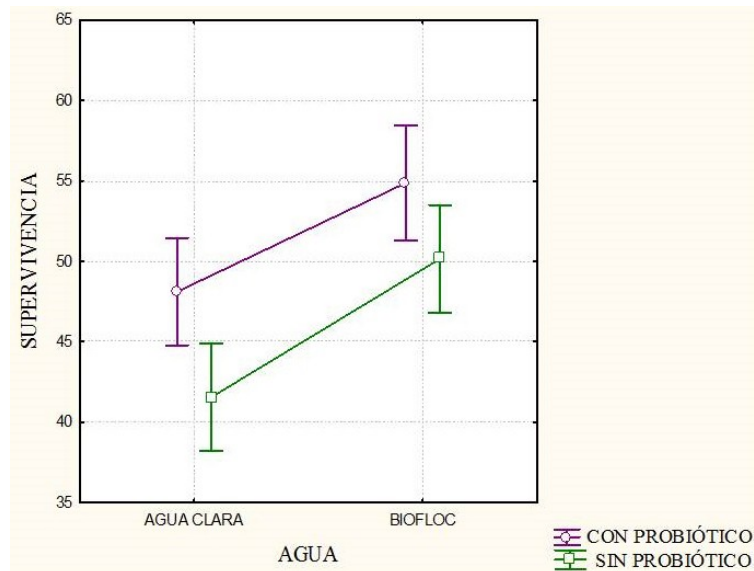
b) Crecimiento y supervivencia

La prueba de Tukey aplicada arrojó diferencias significativas entre los organismos cultivados en agua clara y biofloc (Gráfica 3 y 4), encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos, debidas al factor medio ($P = 0.0001$). Sin embargo, no se encontró efecto por la presencia o ausencia de probiótico sobre este parámetro ($P = 0.7108$).

GRÁFICA 3. Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC, %/mg/día) obtenido en los camarones cultivados en agua clara y biofloc durante 45 días.



GRÁFICA 4. Porcentaje de supervivencia obtenido en los camarones cultivados en agua clara y biofloc durante 45 días.



Para el porcentaje de supervivencia, el ANOVA bifactorial demostró diferencias significativas debidas al efecto del medio, como factor principal y al factor probiótico (Tabla 7). De acuerdo a la prueba de Tukey la supervivencia de los organismos en biofloc fue estadísticamente mayor que en agua clara (Tabla 8). En ambas condiciones el factor

probiótico fue mayor en términos estadísticos, en comparación a ambos tratamientos que no tuvieron el probiótico presente en el alimento (Tabla 8).

TABLA 7. ANOVA bifactorial con diferencias significativas debidas al efecto medio (agua clara vs. biofloc) y probiótico (presente / ausente) para la variable supervivencia.

EFFECTO	<i>P</i>
MEDIO	0.00008
PROBIÓTICO	0.002096

“*P*” indica diferencias significativas entre los componentes de cada efecto.

TABLA 8. Prueba de Tukey aplicada a partir de $P < 0.05$.

FACTOR	1	2
Biofloc	a	
Agua clara		b
Con probiótico		*
Sin probiótico	**	

(a , b) Diferencias significativas debidas al factor medio (agua clara vs. biofloc).

(* , **) Diferencias significativas debidas al factor probiótico (presente / ausente).

En la Tabla 9 se presentan los promedios finales obtenidos para la variable peso (inicial y final), coeficiente diario de crecimiento (CDC) y % de supervivencia evaluados en este experimento.

TABLA 9. Promedio \pm Desviación estándar obtenidos para las variables evaluadas.

Variable	Agua clara / Con probiótico	Agua clara / Sin probiótico	Biofloc / Con probiótico	Biofloc / Sin probiótico
Peso inicial (g)	4.76 \pm 0.20	4.77 \pm 0.28	4.67 \pm 0.15	4.88 \pm 0.26
Peso final (g)	6.69 \pm 1.05 ^b	7.25 \pm 0.85 ^b	12.54 \pm 0.31 ^a	12.41 \pm 0.66 ^a
CDC (%/mg/día)	0.44 ^b	0.55 ^b	1.42 ^a	1.35 ^a
Supervivencia (%)	71.42 \pm 17.07 ^{b*}	53.57 \pm 14.78 ^{b**}	91.83 \pm 7.63 ^{a*}	76.78 \pm 7.39 ^{a**}

(a , b) Diferencias significativas debidas al factor medio (agua clara vs. biofloc), de acuerdo a la prueba de Tukey, con $P < 0.05$.

(* , **) Diferencias significativas debidas al factor probiótico (presente, ausente), de acuerdo a la prueba de Tukey, con $P < 0.05$.

c) **Vibrios identificados en agua clara y biofloc**

Con base a los resultados arrojados por la plataforma EzTazon[®] server 2.1, las 44 colonias aisladas durante los diferentes muestreos de este experimento tuvieron un porcentaje de identidad superior a 98% con las secuencias del gen 16S ribosomal de *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio owensii*, *Vibrio plantisponsor*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio azureus*. No obstante, cinco muestras pertenecientes exclusivamente al sistema biofloc arrojaron un porcentaje de identidad menor a 98% con *Vibrio azureus*. En la Tabla 10 se resume las especies de *Vibrio* encontradas en ambos sistemas, mientras que en la Figura 12 se presenta el árbol filogenético generado con el programa MEGA[®] 5, utilizando a *Photobacterium phosphoreum* como grupo externo (secuencia conocida y evolutivamente distante al grupo interno objeto de estudio, en este caso *Vibrio*).

TABLA 10. Número de cepas de las distintas especies de *Vibrio* aisladas en agua clara y biofloc y determinadas por métodos moleculares.

ESPECIE	AGUA CLARA	BIOFLOC	PORCENTAJE DE IDENTIDAD
<i>Vibrio rotiferianus</i>	2	7	Superior a 98%
<i>Vibrio owensii</i>	8	15	Superior a 98%
<i>Vibrio plantisponsor</i>	4	1	Superior a 98%
<i>Vibrio vulnificus</i>	1	1	Superior a 98%
<i>Vibrio azureus</i>	-	5	Inferior a 98%

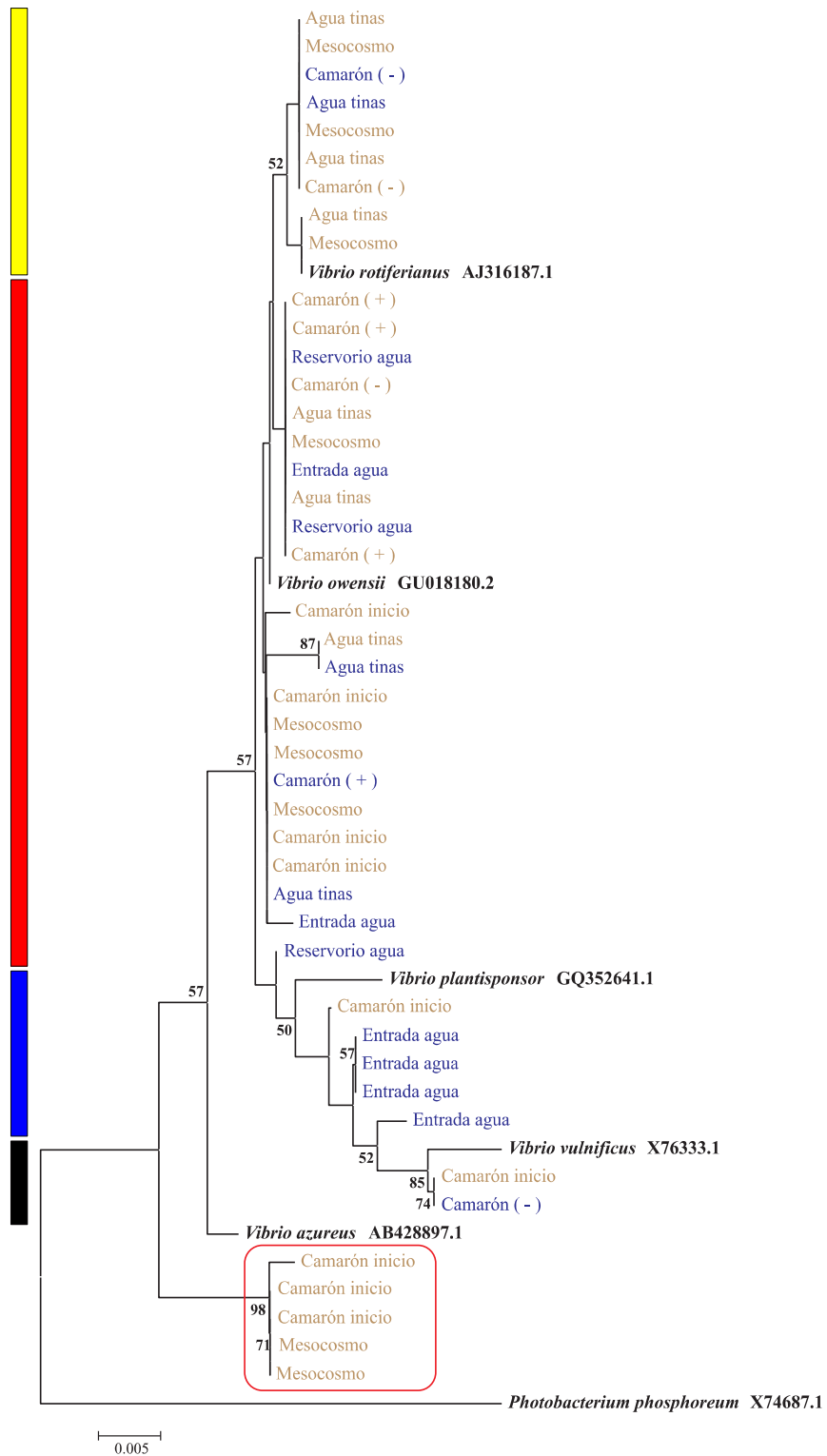


FIGURA 12: Árbol filogenético con las especies de *Vibrio* presentes en agua clara y biofloc. * Color azul, indica las muestras tomadas del sistema de agua clara; color café, indica las muestras tomadas del sistema biofloc. (+), probiótico presente en la dieta; (-), probiótico ausente en la dieta. *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio owensii*, *Vibrio plantisponsor*, *Vibrio vulnificus*. Las cepas enmarcadas en color rojo muestran el grupo con identidad < 98% con las cepas utilizadas.

d) Análisis histopatológico

Las observaciones histopatológicas hechas en los cortes con los diferentes tejidos no indicaron la presencia de alteraciones relacionadas con los tratamientos. No obstante, en el hepatopáncreas de los camarones cultivados en agua clara (alimentados con y sin probiótico) se identificaron varias lesiones en diferentes grados de severidad (Tabla 11).

TABLA 11. Hallazgos histológicos observados en el hepatopáncreas de los organismos de cada tratamiento indicando severidad del daño y frecuencia de ocurrencia. *Cx: Control; AC/SP: agua clara/sin probiótico; AC/CP: agua clara/con probiótico; BFT/SP: biofloc/sin probiótico; BFT/CP: biofloc/con probiótico.

HALLAZGOS	SEVERIDAD	FRECUENCIA DE OCURRENCIA (%)				
		n=10 / tratamiento				
		Cx	AC/SP	AC/CP	BFT/SP	BFT/CP
Degeneración hidrópica	I	70	10	10	10	
	II		10			
	III		10			
Desprendimiento celular	I	60				
	II			10		
	III			10		
Atrofia tubular	I	30	10	40	20	20
	II		10			
	III		10	20		
Disminución en la presencia de células B	I			10		
	II		10	10		
	III		10	10		
Inflamación	I					10
	II		10			
	III			20		
Necrosis focal de túbulos	III		10			
Nódulos hemocíticos	I			10	20	
	II			10		
Nódulos hemocíticos melanizados	I		10	10		10
	II			10		
	III			10		

Severidad I: El patógeno, parásito o epicomensal se encuentra presente pero en cantidades que apenas sobrepasan los límites mínimos de detección. Se observan lesiones características del síndrome, pero la manifestación de la enfermedad es insignificante. La pignosis es insignificante, excepto en causas tempranas de infección por un patógeno altamente virulento.

Severidad II: El patógeno, parásito o epicomensal se encuentra en cantidades pequeñas o moderadas. Se observan lesiones ligeras o moderadas características del síndrome. La prognosis es de posible pérdida en la producción o incremento ligero en la mortalidad, si no se aplica ningún tratamiento (en caso de que la enfermedad sea tratable).

Severidad III: Se observan en cantidades moderadas del patógeno, parásito o epicomensal. Se observan lesiones moderadas o severas características del síndrome. La prognosis es de un efecto potencialmente letal si no se aplica ningún tratamiento (en caso de que la enfermedad sea tratable).

En comparación a un hepatopáncreas sano (Figura 13) es clara la alteración de la morfología de los túbulos hepatopancreáticos de los tratamientos en agua clara, principalmente (Figura 14), en comparación a los organismos del grupo control, biofloc / con probiótico y biofloc / sin probiótico, que aunque también presentaron lesiones, éstas fueron en menor grado de severidad.

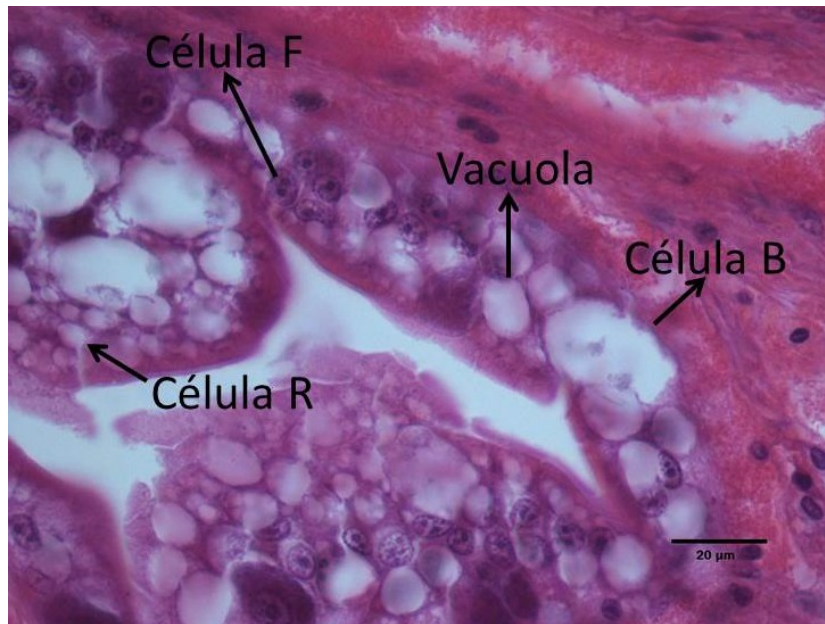


FIGURA 13: Tejido hepatopancreático de un camarón sano distinguiendo claramente los diferentes tipos celulares, barra 20 µm, 40x. Tinción Hematoxilina & Eosina.

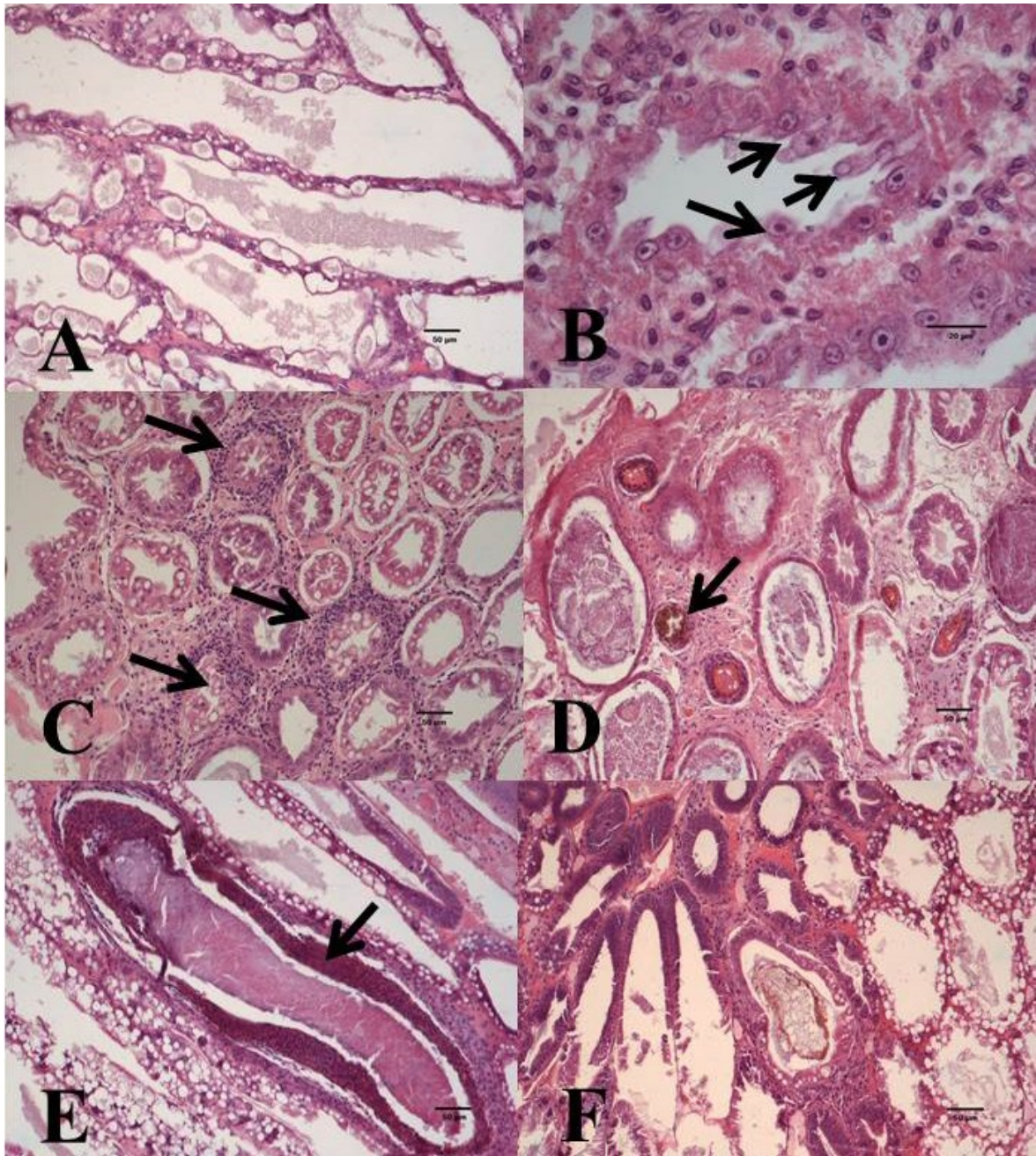


FIGURA 14: Microfotografías de hepatopáncreas de camarones cultivados en agua clara y biofloc. * A: Control, 10x. Atrofia de túbulo, barra 50 μm ; B: Agua clara / sin probiótico, 40x. Túbulo con degeneración hidrópica, flechas indican desprendimiento celular, barra 20 μm ; C: Agua clara / con probiótico, 10x. Flechas señalan la formación de nódulos hemocíticos alrededor de túbulo, barra 50 μm ; D: Agua clara / sin probiótico, 10x. Atrofia de túbulo e inflamación con infiltración hemocítica severa. Flecha indica la presencia de nódulo hemocítico melanizado, barra 50 μm ; E: Agua clara / con probiótico, 40x. Necrosis de túbulo, flecha indica melanización, barra 50 μm ; F: Biofloc / con probiótico, 10x. Túbulo atrofiado, nódulos hemocíticos y melanización, barra 50 μm . Tinción Hematoxilina & Eosina.

Pese a la presencia de las lesiones anteriores, en la tinción de Giemsa no se observó evidencia de grupos bacterianos que pudieran ser causantes de las observaciones en los camarones de agua clara, principalmente. Estos resultados se presentan en la Figura 15.

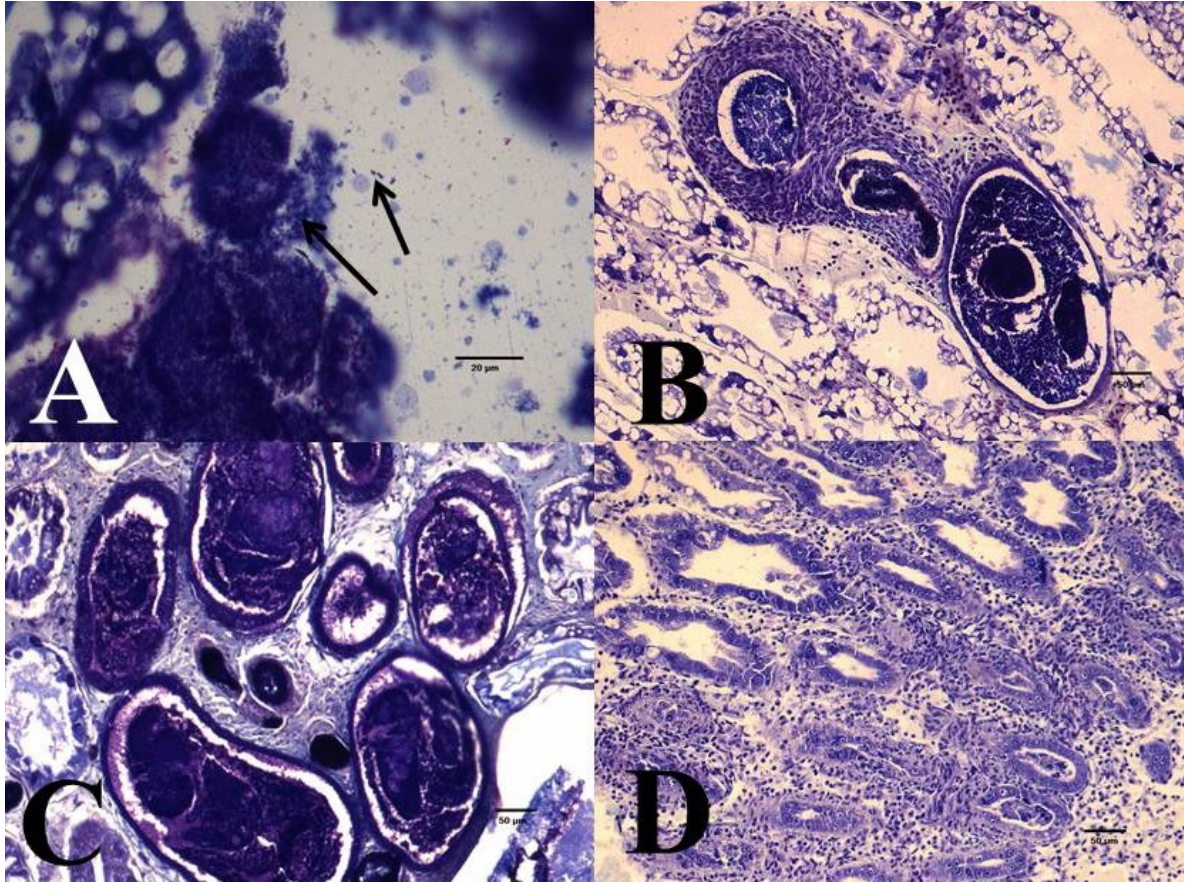


FIGURA 15: Microfotografías de los hallazgos encontrados en el hepatopáncreas de camarones cultivados en agua clara (alimentados con y sin probiótico). A: Control, 40x. Lumen de túbulo hepatopancreático, flechas indican la presencia de algunas bacterias de tipo bacilo, barra 50 µm; B: Agua clara / sin probiótico, 10x. Nódulos hemocíticos, barra 50 µm; C: Agua clara / con probiótico, 40x. Nódulos hemocíticos melanizados, barra 50 µm; D: Agua clara / con probiótico, 10x. Inflamación severa con formación de nódulos, barra 50 µm. Tinción Giemsa de Price.

Otro aspecto importante a destacar en este análisis, fue la presencia de esferoides en el órgano linfoide de algunos camarones (Figura 16), principalmente en los cultivados de los tratamientos en biofloc (Tabla 12). Fuera de este hallazgo, no se presentaron lesiones que indicaran algún daño en este tejido.



FIGURA 16: Microfotografías de órgano linfoide señalando con flechas la presencia de esferoides en el seno hemal, barra 20 µm. * A: Biofloc / con probiótico, 40x; B: Agua clara / sin probiótico, 40x. Tinción Hematoxilina & Eosina.

TABLA 12. Frecuencia de ocurrencia (%) de camarones que presentaron esferoides en el órgano linfoide. * Cx: Control; AC/SP: agua clara/sin probiótico; AC/CP: agua clara/con probiótico; BFT/SP: biofloc/sin probiótico; BFT/CP: biofloc/con probiótico.

FRECUENCIA DE OCURRENCIA (%)				
n=10 / tratamiento				
Cx	AC/SP	AC/CP	BFT/SP	BFT/CP
20	50	30	60	60

e) Hibridación *in situ* (FISH)

De acuerdo a los resultados recibidos por el Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona, no hubo reacción a NHP en la prueba para la detección de *Candidatus Hepatobacter penaei*. Debido a que posiblemente las muestras fueron fijadas de manera inadecuada, la mayoría de los tejidos no pudieron ser examinados de forma adecuada.

Sin embargo, en los resultados se mencionó que estas lesiones son similares a las causadas por Necrosis Hepatopancreática Séptica (SHPN) o Vibriosis, enfermedad causada posiblemente por infección de *Vibrio* sp. de tipo patógeno, o una bacteria similar (Laboratorio de Patología Acuícola, Universidad de Arizona). Los resultados son presentados en la Tabla 13.

TABLA 13. Resultados de la prueba de hibridación *in situ* (FISH) para la detección de *Candidatus Hepatobacter penaei*, bacteria causante de Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP). * H & E: Hematoxilina & Eosina.

MUESTRA	Observaciones H & E	Resultados ISH NHP
Control	No realizada	SIN REACCIÓN La gran mayoría del tejido hepatopancreático permaneció unido, pero no se observó reacción a la prueba de NHP.
Agua clara / con probiótico	Sin lesiones de NHP SHPN por <i>Vibrio</i> sp. Severidad II	SIN REACCIÓN La gran mayoría del tejido hepatopancreático permaneció unido, pero no se observó reacción a la prueba de NHP.
Agua clara / sin probiótico	Sin lesiones de NHP	SIN REACCIÓN La mayoría del tejido hepatopancreático permaneció unido, pero no se observó reacción a la prueba de NHP.
Biofloc / con probiótico	Sin lesiones de NHP SHPN por <i>Vibrio</i> sp. Severidad I	SIN REACCIÓN La gran mayoría del tejido hepatopancreático permaneció unido, pero no se observó reacción a la prueba de NHP.
Biofloc / sin probiótico	Sin lesiones de NHP	SIN REACCIÓN La mayoría del tejido hepatopancreático no permaneció unido, pero no se observó reacción a la prueba de NHP.
Control positivo	Lesiones de NHP Severidad III	REACCIÓN POSITIVA
Control negativo	Sin lesiones de NHP	SIN REACCIÓN

Severidad 0: Sin signos de infección/infestación por patógenos, parásitos o epicomensales presentes.

Severidad I: El patógeno, parásito o epicomensal se encuentra presente pero en cantidades que apenas sobrepasan los límites mínimos de detección. Se observan lesiones características del síndrome, pero la manifestación de la enfermedad es insignificante. La pignosis es insignificante, excepto en causas tempranas de infección por un patógeno altamente virulento.

Severidad II: El patógeno, parásito o epicomensal se encuentra en cantidades pequeñas o moderadas. Se observan lesiones ligeras o moderadas características del síndrome. La prognosis es de posible pérdida en la producción o incremento ligero en la mortalidad, si no se aplica ningún tratamiento (en caso de que la enfermedad sea tratable).

Severidad III: Se observan en cantidades moderadas del patógeno, parásito o epicomensal. Se observan lesiones moderadas o severas características del síndrome. La prognosis es de un efecto potencialmente letal si no se aplica ningún tratamiento (en caso de que la enfermedad sea tratable).

Discusión

En los sistemas de cultivo tradicionales, la concentración de amonio, nitritos y materia orgánica debe ser controlada, por lo que el manejo de recambio de agua dentro de los estanques es de vital importancia para mantener estables los niveles de oxígeno disuelto, mejorar la calidad de la misma y evitar factores de estrés que deriven en problemas de salud en los animales (Kuhn *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha mencionado que con esta práctica existe un mayor riesgo de introducir patógenos a través del agua, además de que el costo por bombeo es alto y las cantidades utilizadas de la misma son muy grandes (Megahed, 2010).

El mal diseño y manejo en los estanques, o incluso la ausencia de sistemas de drenaje en los mismos también afectan la calidad del agua y el estado de salud de los camarones (Panjaitan, 2010). La presencia de contaminantes generados por fuentes antropogénicas provenientes de desechos industriales o acuícolas podrían estar favoreciendo la presencia de focos de infección en ambientes naturales (Páez-Osuna *et al.*, 2003; Bartley *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006) y estos a su vez, a las propias granjas, ya que el agua utilizada en las mismas es tomada del mar a través de sistemas de bombeo que la llevan a reservorios generales para distribuirla entre los estanques.

La eliminación de heces, exoesqueletos, restos de alimento o animales muertos es fundamental para evitar afloramientos de fitoplancton, eutrofización del agua e incluso la prevalencia de enfermedades que pudiesen estar afectando a los animales. Por ejemplo, los animales muertos o incluso sus heces, son un vehículo diseminador de las mismas cuando se presentan casos de canibalismo en el estanque (Lotz & Lightner, 1999). Por esta razón, las mortalidades deben ser monitoreadas permanentemente para estudiar y solucionar el factor detonante del problema.

En el dispositivo de agua clara de este experimento, hubo un estricto control de estos residuos. Aunque en el caso del biofloc no se realizó ningún control sobre los desechos generados, las mortalidades fueron mucho menores a las de los organismos en agua clara, además de que las tallas fueron bastante similares entre ellos. Como ya se mencionó con anterioridad, todos los residuos generados en los sistemas biofloc son “reciclados” por las

bacterias heterótroficas que en él habitan, haciendo que éstos sean aprovechados por los camarones como fuentes nutricionales (principalmente proteína).

Otras prácticas de manejo son usadas de manera complementaria para mantener la calidad del agua, tales como el uso de filtros de arena que estimulen la nitrificación en el agua, el uso de sistemas de esterilización ultravioleta u ozonificadores con mecanismos de desinfección en el agua para eliminar carga microbiana nociva; y el uso de filtros que atrapen sólidos que incluso puedan afectar la salud de las branquias (Liltved & Landfald, 1995; Skjølstrup *et al.*, 2000; Menasveta, 2002; Timmons *et al.*, 2002).

En el sistema de agua clara se instaló un ozonificador, tres filtros de 30, 10 y 5 μm de apertura de malla, un filtro de arena, un sistema de recirculación cerrado y se tuvo un recambio de agua diario del 30%, aproximadamente. Aun así, esto no fue suficiente para que las lesiones presentadas en los hepatopáncreas de los camarones de este tratamiento fueran evidentes al microscopio, mientras que en los camarones en biofloc no hubo una prevalencia importante de las mismas, pese a que en este último no se utilizó ningún aditamento que controlara la calidad del agua, ya que este medio por sí mismo es capaz de controlar todos los factores anteriormente mencionados, actuando como un sistema de biocontrol capaz de disminuir la incidencia y prevalencia de enfermedades en los cultivos (Crab *et al.*, 2012).

En el ambiente biofloc, la interacción entre el agua y los animales fue diferente, ya que la composición de este medio es totalmente distinta a la de un ambiente en agua clara. Esta composición está caracterizada por la presencia de fitoplancton, agregados bacterianos, partículas de materia orgánica y pastoreadores microbianos (rotíferos, ciliados, flagelados y protozoarios) que se encuentran suspendidos en el agua (Decamp *et al.*, 2002; Azim & Little, 2008; Ballester *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2010) y que han demostrado su capacidad para prevenir y reducir la presencia de enfermedades en los estanques (Horowitz & Horowitz, 2001; Cohen *et al.*, 2005; Asaduzzaman *et al.*, 2008). Estos microorganismos son los responsables de detoxificar el medio, además de asimilar el amonio y nitratos para obtener nitrógeno y transformarlo en proteína que más tarde será utilizada por los animales. Esta propiedad pudo verse reflejada en el presente experimento, ya que los valores de amonio, nitritos y nitratos estuvieron dentro de los parámetros permisibles, aunque en el caso del sistema de agua clara, esta misma tendencia también fue observada, posiblemente

al manejo en cuanto a recambio de agua se refiere y al control sobre los restos de alimento, heces y exoesqueletos en las tinas experimentales. Esta tendencia ha sido probada en cultivos biofloc de *Penaeus monodon*, donde la calidad del agua fue favorable en los estanques, viéndose esto reflejado en una mejor ganancia de peso en los camarones, además de que se redujo la pérdida de nutrientes y los impactos ambientales (Thakur & Lin, 2003). La interacción agua-animal es reflejada en la flora microbiana de los camarones. Las características que ésta adquirirá dependerá también del alimento, ya que el aporte nutricional jugará un papel fundamental en el desarrollo y respuesta inmune del camarón ante cualquier agente estresante o enfermedad (Tacon, 2000). La comunidad microbiana que se desarrolla en el agua del biofloc y el sistema digestivo de los camarones bajo estas condiciones tiene efectos similares en la salud de estos, que cuando se suplementa con probióticos (McLean *et al.*, 2006, Kuhn *et al.*, 2009, Moreira de Souza *et al.*, 2012). Este efecto ha sido comprobado con anterioridad en otro tipo de organismos acuáticos. Taoka *et al.* (2006) comprobaron este mecanismo en cultivos de tilapia, demostrando que las bacterias presentes de manera natural en el biofloc tienen un efecto benéfico en la salud de los animales, haciéndolos más resistentes a las enfermedades.

Los tratamientos en agua clara y biofloc que fueron suplementados con el probiótico en el alimento fueron evaluados y comparados con otros grupos control (sin probiótico). Hipotéticamente se pensó que los dos primeros tendrían cierta similitud en la evaluación histopatológica, teniendo resultados positivos en comparación con los controles. Sin embargo, los hepatopáncreas presentaron diversas alteraciones en su estructura y en diferentes grados de severidad, principalmente en los animales en agua clara / con y sin probiótico. Este órgano cumple funciones vitales en el proceso digestivo y fisiológico del camarón, tales como síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de sustancias digeridas, almacenamiento de lípidos (Cahu *et al.*, 1994; Marsden *et al.*, 1997), proteínas (Palacios *et al.*, 2000; Marsden *et al.*, 1997), carbohidratos y carotenoides (Arcos *et al.*, 2003), vitaminas (Shiau & Wu, 2003), aminoácidos y ácidos grasos esenciales (Cahu *et al.*, 1994), distribución de minerales (Gibson & Barker, 1979; Icely & Nott, 1992), procesos de ormorregulación (Cuartas *et al.*, 2003), vitelogénesis, excreción y detoxificación de metales y sustancias orgánicas extrañas (Icely & Nott, 1992). Por lo tanto, la presencia de

alteraciones en su estructura puede acarrear problemas importantes a nivel nutricional y en el estado de salud de los camarones.

La disminución de células B en el hepatopáncreas tiene consecuencias en el estado de salud del camarón. Normalmente, estas células son las encargadas de asimilar los nutrientes de la dieta desde el lumen celular, digerir materiales absorbidos que concentran en vacuolas para finalmente secretar su contenido al final del proceso digestivo (Rosas *et al.*, 2006), e incluso de excretar material extraño derivado de la hemolinfa (Alday-Sanz *et al.*, 2002). También están implicadas en la deposición de material fecal por medio de secreción holócrina siguiendo la etapa de de digestión y absorción intracelular (Vorgt, 1993). Si estas funciones son alteradas, el proceso digestivo del camarón puede verse gravemente afectado, viéndose reflejado en menores tasas de crecimiento.

La atrofia del tejido hepatopancreático (disminución del tamaño celular por pérdida de biomasa) identificada en los tratamientos de agua clara con / sin probiótico, se caracteriza por la ausencia de vacuolas lipídicas y células B ó secretoras (Cotran *et al.*, 1990) y suele afectar el metabolismo de las células provocando que la energía disponible sea utilizada por el camarón como mecanismo de supervivencia. La presencia de este hallazgo en los tratamientos en agua clara pudo ser el reflejo de que los camarones estuvieron expuestos a factores de estrés (variaciones en parámetros físico-químicos, por ejemplo) por lo que la alteración en su metabolismo como mecanismo de supervivencia, también se vió reflejada en el CDC tan bajo registrado en el experimento, en comparación a los tratamientos en biofloc.

Tanto la disminución de células B y atrofia en los túbulos hepatopancreáticos provocan trastornos degenerativos en el tejido, tales como degeneración hidrópica y desprendimiento celular de los mismos. El primero se caracteriza por una disminución del citoplasma de las células, provocando la disminución del tamaño del órgano. Por lo tanto, las células son incapaces de mantener la homeostasis entre iones y líquidos, causando la acumulación intracelular de un mayor volumen de agua, por lo que las células pierden su forma y eventualmente estallan (Esteve & Herrera, 2000a). A consecuencia de esta degeneración, las células comienzan a desprenderse hacia el lumen.

La inflamación hemocítica identificada durante el estudio histopatológico fue la respuesta del sistema inmune del camarón para destruir o mantener localizado al agente patógeno e iniciar una cadena de acontecimientos para restaurar la homeostasis disturbada por factores físicos, químicos, infecciosos, etc., y reconstruir el tejido lesionado (García-Barreno, 2008). Este mecanismo de restauración incluye la formación de nódulos que pueden presentar cierto grado de melanización, mismos que se observan al microscopio como acúmulos de hemocitos que en el centro encapsulan bacterias y detritus.

Todos estos trastornos se vuelven crónicos cuando no se toman las medidas necesarias para corregir el problema causante de las alteraciones. Por ende, el tejido del hepatopáncreas comienza a presentar focos de necrosis, los cuales son resultado de la muerte celular provocada por autodigestión del mismo por acción de enzimas liberadas por la destrucción (Esteve & Herrera, 2000a).

Todas las lesiones mencionadas anteriormente fueron identificadas en ambos tratamientos en agua clara y en diferentes grados de severidad (I, II y III) por un cambio en las características físico-químicas y microbianas del medio, alterando la actividad y composición de su hepatopáncreas. Esto pudo ser consecuencia del cambio repentino que se hizo de los organismos de un sistema biofloc hacia uno de agua clara, sin previa aclimatación. Este problema se ha reportado en el salmón del Atlántico como consecuencia de su traslado de agua dulce hacia agua salada, producto de un problema de no adaptación (Roberts, 1989).

En el caso de los dos tratamientos en agua clara, principalmente, la presencia de necrosis en el tejido hepatopancreático pudo haber sido causado por una falta de adaptación de los camarones al ser llevados de un sistema biofloc hacia uno de agua clara de manera repentina y con condiciones ambientalmente diferentes. Actualmente, no existen reportes que mencionen el efecto que existe en los organismos acuáticos al ser transferidos de un sistema biofloc a uno tradicional (agua clara), manejo que se hace específicamente con reproductores de manera convencional (Gaxiola, *com. pers.*).

Las lesiones presentadas en los tratamientos en biofloc, fueron menores y en grado de severidad I, por lo que la tasa de supervivencia no disminuyó durante la fase experimental.

En un inicio se tuvo la idea de que todas las lesiones mencionadas anteriormente tenían relación con los hallazgos identificados en organismos diagnosticados con Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP), enfermedad que ya ha sido identificada con anterioridad en camarones silvestres del Golfo de México (Río-Rodríguez *et al.*, 2006). Es provocada por *Candidatus Hepatobacter penaei*, perteneciente a la familia α -proteobacteria, Gram negativa, intracelular y similar a las rickettsias, que se aloja y multiplica en las células epiteliales de los túbulos de los hepatopáncreas de camarones infectados (Nunan *et al.*, 2013).

Debido a que no se realizaron análisis para la detección molecular o histológica de los camarones durante la fase experimental, la única alternativa (y sobre todo, la más específica) fue enviar un grupo de muestras en bloques de parafina al Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona solicitando el análisis de hibridación *in situ* (FISH) para confirmar o descartar NHP en los tratamientos de agua clara, principalmente. Como se observó anteriormente, los resultados de la prueba arrojaron negativo a esta enfermedad en todos los tratamientos. No obstante, el laboratorio reportó que los tratamientos Agua clara / con probiótico y Biofloc / con probiótico presentaron lesiones similares que podrían ser presuntivas a SHPN o vibriosis en G2 y G1 (grado 2 y grado 1), respectivamente. La atrofia, formación de nódulos hemocíticos e inflamación del hepatopáncreas son lesiones comúnmente asociadas con esta enfermedad (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010).

En México, la vibriosis ha sido recurrente por años en la etapa de engorda del camarón (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006a), donde la mayoría de las veces depende de la cepa de *Vibrio* presente (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006b). Los brotes de esta enfermedad se dan cuando se presenta un cambio importante en la composición de comunidades de *Vibrio* acompañado con un aumento de comunidades patógenas en el estanque (Sung *et al.* 2001) que no siempre suelen ser virulentas. Las lesiones más frecuentes se presentan en hepatopáncreas, órgano linfoide y músculo, donde se observa la presencia de nódulos hemocíticos y necrosis, además de que también se les puede encontrar en la hemolinfa de camarones

infectados (Lightner, 1996; Esteve & Herrera, 2000b; Soto-Rodríguez *et al.*, 2010). Un alto porcentaje de células hepatopancreáticas presentan daños considerables cuando la infección es progresiva y es en ese momento donde se manifiestan las mortalidades en los camarones. Muchas especies de *Vibrio* han sido relacionadas con esta enfermedad, pero solo pocas han demostrado ser el agente etiológico de la misma, mientras que el resto representan a la microbiota normal del camarón o del medio acuático (Thompson *et al.*, 2004).

No obstante, en este estudio en particular, las observaciones histológicas no son suficientes para dar un diagnóstico definitivo a SHPN. Aunque de acuerdo a las recomendaciones del Laboratorio que hizo el estudio, la morfología de la bacteria, el tamaño relativo y los antecedentes permiten decir que posiblemente *Vibrio* sp. estuvo relacionada con las lesiones identificadas. Sin embargo, la única forma contundente para comprobar esto hubiera sido a través del aislamiento de la bacteria y su identificación molecular.

Aunque en este experimento no se hizo ningún análisis enfocado a evaluar el sistema inmunológico de los animales, algo que en el análisis histopatológico llamó la atención fue que en el órgano linfoide de los tratamientos en biofloc se observó una cierta tendencia a presentar una mayor cantidad de nódulos hemocíticos en este tejido. El órgano linfoide está compuesto por túbulos plegados con un lumen hemal central y una pared cubierta de células (Pongsomboon *et al.*, 2008). Es un sitio en donde se encapsulan bacterias a través de la formación de nódulos hemocíticos (es decir, los hemocitos fagocitan bacterias o material extraño) (Van de Braak *et al.*, 2002), los cuales se encuentran en mayor o menor cantidad dependiendo del grado de severidad y tiempo de exposición del camarón con la bacteria, tal y como lo han reportado Soto-Rodríguez *et al.* (2012) en *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente con una cepa patógena de *Vibrio harveyi*. Por ello, el órgano linfoide es considerado un órgano con funciones bacteriostáticas (Burgents *et al.*, 2005). A pesar de no tener análisis más certeros relacionados a este mecanismo de acción, la frecuencia en la aparición de estos nódulos a nivel histológico nos da una primera aproximación para realizar futuros estudios enfocados a estudiar el efecto de los sistemas de cultivo tradicionales (agua clara) y biofloc sobre el sistema inmune de los camarones. Los hallazgos identificados en los hepatopáncreas de los animales en biofloc / con y sin

probiótico se presentaron en menor grado de severidad y en un número bajo de organismos. No obstante, pese al diagnóstico presuntivo a vibriosis en G1, el posible efecto de vibrios oportunistas no se vio reflejado en las tasas de crecimiento y supervivencia, principalmente; siendo esto referencia de que el biofloc es capaz de controlar los efectos negativos que diversos factores de estrés y microorganismos pudieran tener sobre los camarones bajo condiciones de cultivo.

La sinergia biofloc-probiótico contra el efecto oportunista de vibrios ha sido demostrada con anterioridad en *Artemia franciscana* cultivada bajo estas condiciones y con la adición de *Bacillus* en el agua de los estanques, demostrando un menor crecimiento de vibrios patógenos en comparación con el grupo control (Crab, 2010). Sin embargo, aún se necesitan más investigaciones para entender este efecto.

El resultado del biofloc por sí solo sobre los parámetros evaluados puede estar relacionado al efecto que este medio tiene al interrumpir el *quórum sensing* de vibrios patógenos, como *Vibrio harveyi* (Avnimelech, 2012). Este efecto consiste en regular la expresión de genes en respuesta a fluctuaciones en la densidad de poblaciones bacterianas a partir de la producción y liberación de moléculas con señales químicas llamadas autoinductores que aumentan su concentración en función de la densidad celular (Miller & Bassler, 2001). Aunque hasta ahora este mecanismo no es del todo entendido en un ambiente biofloc, se cree que este podría involucrar la producción de *quórum sensing* antagonista o señales de enzimas de degradación por parte de microorganismos presentes en estos sistemas (Defoirdt *et al.*, 2004).

El crecimiento de organismos acuáticos puede verse afectado por la calidad del agua, sistema de cultivo (Tacon *et al.*, 2002), nutrición (Chen *et al.*, 2006) y condiciones de salud de los animales (Rodríguez & Le Moullac, 2000; Argue *et al.*, 2002). En este experimento, el análisis estadístico permitió identificar que el efecto del medio (agua clara vs. biofloc) fue capaz de mostrar diferencias significativas en el CDC. Sin importar la presencia o ausencia del probiótico en el alimento, se observó que los camarones cultivados en biofloc registraron las mayores tasas de crecimiento, esto puede deberse a las características microbianas que su ambiente posee, comprobando así sus beneficios de tipo nutricional (Tacon *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2004b; Hari *et al.*, 2004).

Para el porcentaje de supervivencia, tanto el factor medio (agua clara vs. biofloc) como el probiótico (presente / ausente) tuvieron efectos significativos. A pesar de no haber interacción entre ellos, las diferencias estadísticas permitieron determinar por un lado que el biofloc nuevamente benefició en mayor medida la tasa de supervivencia de los organismos, en comparación a los de agua clara. La sinergia biofloc-probiótico fue estadísticamente significativa, y a pesar de que en este tratamiento se observaron lesiones a nivel histológico semejantes a las provocadas por vibriosis, la acción del probiótico junto con el sistema biofloc parecen haber evitado una manifestación mayor de la enfermedad. Lo anterior se vio reflejado en un menor número de hallazgos de lesiones graves en el hepatopáncreas y un aumento en la supervivencia, principalmente. Estos resultados pueden ser el reflejo de la actividad de tipo *antibiosis* en los sistemas biofloc debido a la presencia de bacterias ácido lácticas en este medio (Aviles, 2011) que tienen la capacidad de reducir el pH en el tracto digestivo para prevenir la colonización de bacterias (Mombelli & Gismondo, 2000; Klewicki & Klewicka, 2004), además de adherirse y producir bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) y estimular el sistema inmune (Cherif *et al.*, 2001; Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Duc *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2005), tal y como lo hacen los probióticos comerciales.

Al añadir un probiótico y manipular la microflora digestiva del camarón en biofloc, los microorganismos añadidos son capaces de colonizar y multiplicarse en el intestino de los camarones, llevando así a cabo funciones de tipo inmunomoduladoras (Cross 2002; Nayak, 2010) y aumentando la tasa de supervivencia de los animales en cultivo. Este efecto se ha demostrado en *Farfantepenaeus brasiliensis* y *Artemia franciscana* (Crab *et al.*, 2010b; Moreira *et al.*, 2012) cultivados en biofloc, teniendo mejores crecimientos y mayor supervivencia, además de controlar el efecto de algunas cepas de vibrios con efecto oportunista, como *Vibrio harveyi*, evitando así la incidencia y prevalencia de enfermedades.

Los beneficios logrados por los probióticos también pueden obtenerse a través de la tecnología biofloc, evitando así el uso de productos comerciales y disminuyendo costos. Tal fue el resultado obtenido en el tratamiento biofloc / sin probiótico, comprobando que las condiciones de cultivo que se establecen con esta tecnología pueden tener un efecto

inmunoestimulador en los camarones cultivados (Becerra-Dorame *et al.*, 2012; Crab *et al.*, 2012).

La supervivencia en agua clara fue mayor cuando el probiótico estuvo presente en el alimento, demostrando su efectividad sobre este parámetro, y confirmando resultados previos de alzas en la productividad y estado de salud de *Litopenaeus vannamei* (Supamattaya *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006), probando su efecto sobre el crecimiento y supervivencia de los camarones bajo estas condiciones (Jiravanichpaisal & Chuaychuwong, 1997; Jory, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998; Uma *et al.*, 1999).

En años recientes, se ha demostrado el efecto de tipo antimicrobiano que de manera natural se produce bajo el ambiente que se desarrolla en el biofloc (Avnimelech, 2012). Ejemplo de ello es la presencia de agregados bacterianos compuestos por poli- β -hidroxibutiratos (PHB) que han sido probados de manera favorable en producción animal y que son producidos como material de reserva de algunas bacterias (Defoirdt *et al.*, 2006). En biofloc se les ha encontrado en una concentración de 0.5 hasta 18% de materia seca (Crab, 2010; De Schryver & Verstraete, 2009), misma que podría ser suficiente para proteger a los animales de enfermedades provocadas por bacterias nocivas (Halet *et al.*, 2007), tal y como ya se ha demostrado en larvas de *Macrobrachium rosenbergi* y *Artemia franciscana* sobre la presencia de *Vibrio* spp. y *Vibrio campbellii* (Defoirdt *et al.*, 2007; Nhan *et al.*, 2010). Los PHB inhiben el mecanismo de acción de diversos géneros bacterianos causantes de enfermedades en los animales, principalmente sobre *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* (Cherrington *et al.*, 1991; Bearson *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1998; Van Immerseel *et al.*, 2003). A nivel *in vitro* también se ha demostrado este mecanismo sobre vibrios patógenos (Defoirdt *et al.*, 2006). Por todo esto, son considerados ácidos orgánicos con propiedades bacteriostáticas y bactericidas (Ricke, 2003; Vázquez *et al.*, 2005).

Su producción natural en el biofloc pudo tener efecto entre las similitudes de los tratamientos biofloc / con probiótico y biofloc / sin probiótico, ambos superiores en comparación a los tratamientos en agua clara (con y sin probiótico). A pesar de que el tratamiento biofloc / con probiótico mostró lesiones similares a las causadas por vibriosis, ningún parámetro evaluado se vio afectado, por lo que es posible suponer que el funcionamiento de los probióticos comerciales es muy similar al de las bacterias

productoras de PHB presentes en el biofloc. Además, es posible que estas bacterias otorguen beneficios a nivel nutricional e inmunológico del camarón, al aumentar su salud intestinal y estimular la producción de poblaciones microbianas benéficas en el intestino, tal y como sucede con los probióticos (Burr *et al.*, 2005; Yilmaz *et al.*, 2005; Scholz-Ahrens *et al.*, 2007).

De nuevo se encontraron diferencias entre la composición poblacional de *Vibrio* en los tratamientos evaluados en ambos sistemas, sin importar la influencia del medio o del probiótico. Una vez más se identificó al nuevo grupo de cepas de *Vibrio* (porcentaje de identidad inferior a 98% con cualquier cepa reportada) exclusivamente en el sistema biofloc. Nuevamente, se propone comprobar a futuro si estas cepas presentan alguna función inhibitoria sobre cepas patógenas de *Vibrio*.

Al comparar ambos experimentos (octubre-noviembre del 2011, abril-mayo del 2013) se encontraron diferencias entre las especies de *Vibrio* aisladas. *Vibrio rotiferianus* y *Vibrio owensii* fueron encontrados en los dos experimentos; mientras que *Vibrio harveyi* sólo fue identificado en el primero y *Vibrio plantisponsor* y *Vibrio vulnificus* solamente en el segundo. Esta diferencia puede estar relacionada a la estacionalidad que algunas especies de este género bacteriano presentan de manera natural. Tal es el caso de *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*, quienes aumentan su densidad a partir de cambios ambientales, relacionados principalmente a un aumento en la temperatura (Baffone *et al.*, 2003), aunque este comportamiento tiende a presentarse en la mayoría de las especies de este género bacteriano. Esta característica ha sido mencionada también para *Vibrio vulnificus*, cuya presencia en aguas del Golfo de México fluctúa y aumenta en los meses cálidos (Panicker *et al.*, 2004).

Los promedios de salinidad, temperatura y oxígeno disuelto mostraron un aumento en ambos sistemas durante el experimento 2, donde las condiciones ambientales fueron más favorables para el cultivo, mientras que durante el experimento 1 la variabilidad en estos parámetros en agua clara y biofloc fue mayor debido a que esta época coincidió con la temporada de nortes en la zona de estudio. Esta variabilidad entre especies de *Vibrio* coincide con los estudios hechos por Sung *et al.* (1999) en larvas de *Penaeus monodon*, donde este efecto lo atribuyeron a la variabilidad dada por factores abióticos (temperatura,

salinidad, pH y oxígeno disuelto en el agua), los cuales determinan las especies de *Vibrio* en los cultivos de camarón.

Los efectos de las comunidades microbianas presentes en agua clara y biofloc que se observaron en este experimento, son ilustrados en la Figura 17.

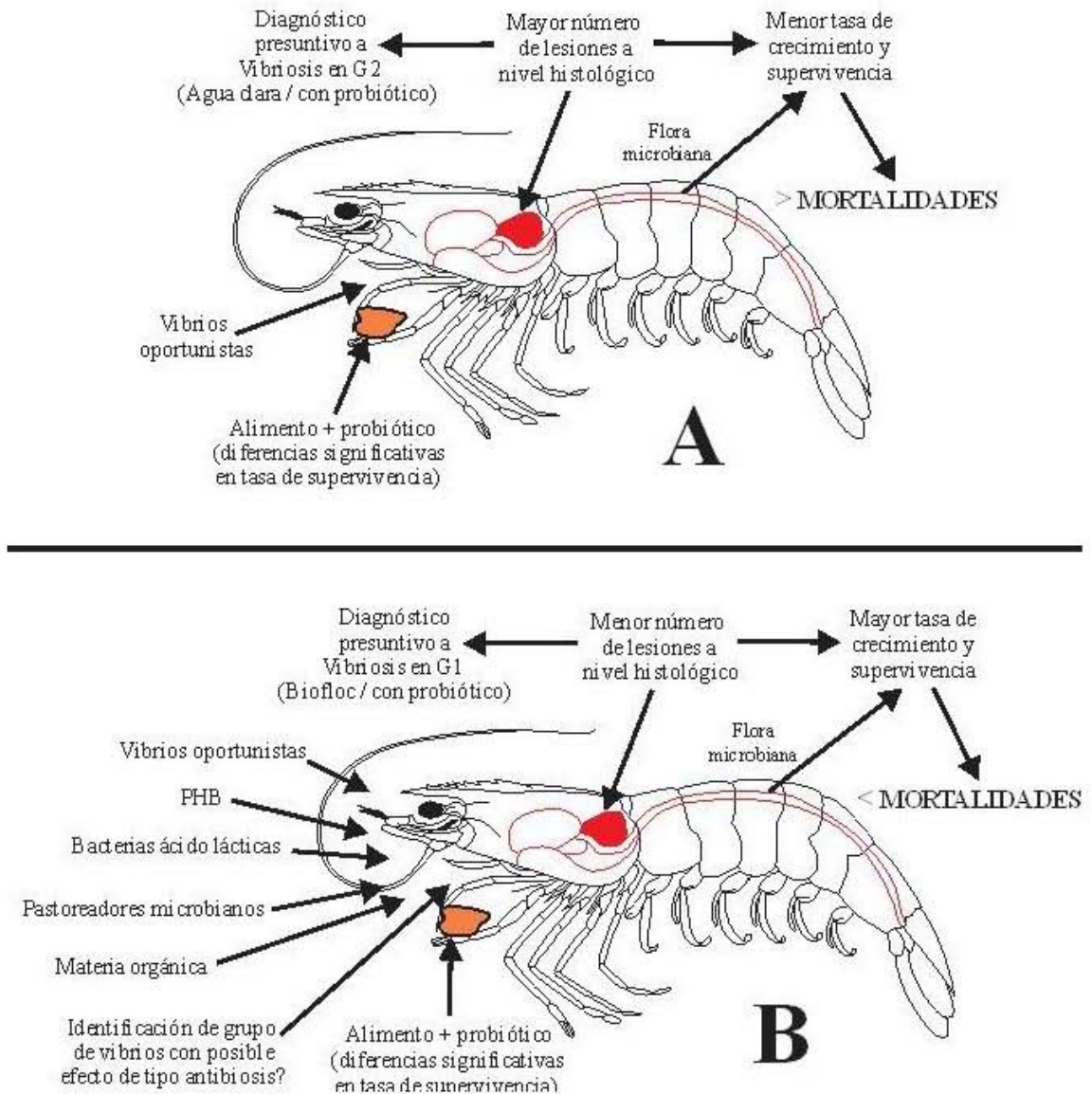


FIGURA 17: Efecto de la interacción medio agua clara (A) y biofloc (B) sobre *Litopenaeus vannamei* evaluada en este estudio, que finalmente resultó en la diferencia estadística en las tasas de supervivencia de los camarones en los tratamientos agua clara / con probiótico; agua clara / sin probiótico; biofloc / con probiótico; biofloc / sin probiótico.

Conclusiones

Utilizando el probiótico comercial en el cultivo biofloc, se demostró el efecto favorable de este sistema junto con las que componen el probiótico utilizado para este estudio, favoreciendo la tasa de CDC y supervivencia de los camarones.

Al no existir diferencias estadísticamente significativas en los camarones cultivados en biofloc y alimentados con la adición y ausencia del probiótico, se demostró que el biofloc por sí solo es capaz de ofrecer beneficios similares a los que ofrecen los probióticos comerciales utilizados en acuicultura.

Aunque el probiótico comercial utilizado en este estudio no tuvo efecto sobre el CDC de los camarones, en la supervivencia si demostró tener resultados positivos, encontrando una mayor tasa de supervivencia en los tratamientos en biofloc, principalmente en el tratamiento biofloc / con probiótico.

Nuevamente, a pesar de compartir algunas especies, la composición poblacional del género *Vibrio* fue distinta entre el sistema agua clara y biofloc. El aislamiento de una cepa no identificada de *Vibrio* (porcentaje de identidad menor a 98% a cualquier cepa reportada) en el sistema biofloc estudiado, aunado a lesiones graves en los hepatopáncreas de los camarones en agua clara relacionadas al efecto oportunista de las comunidades de *Vibrio*, nos permite especular acerca del efecto probiótico que esta cepa nueva pueda ofrecer a los camarones bajo condiciones biofloc.

CONSIDERACIONES FINALES

El biofloc es un sistema de cultivo que fue desarrollado con el fin de mitigar los problemas en cuanto a calidad de agua, los cuales frecuentemente tenían una relación importante con las altas tasas de mortalidades presentadas en las granjas acuícolas; además de ser una excelente opción para reducir los problemas de contaminación de cuerpos de agua naturales, evitando así la propagación de agentes nocivos que alteran los ecosistemas marinos, favoreciendo así la bioseguridad de los estanques de cultivo.

Los microorganismos nativos que se encuentran en biofloc ayudan a mantener un estado de homeostasis entre el medio interno (camarón) y externo (agua), siendo su efecto similar al que los probióticos comerciales tienen al ser utilizados en granjas acuícolas, debido a que el biofloc posee componentes y efectos similares a los que estos presentan sobre el crecimiento y supervivencia de los camarones.

Dados los resultados encontrados con respecto al uso de probióticos comerciales en sistemas de cultivo convencionales (agua clara), en futuros estudios podría aumentarse la dosis a administrar con el fin de tener resultados más favorables que los que se presentaron en el segundo experimento del presente trabajo de investigación.

Es necesario evitar la transferencia repentina de los camarones cultivados en biofloc hacia condiciones controladas con ambientes en agua clara, ya que esto evitará en buena medida el estrés al que los animales son sometidos al ser transferidos espontáneamente, alterando las comunidades microbianas con las que está en contacto. Para ello, se recomienda contar con un programa de manejo en el que se diluya la concentración del biofloc gradualmente hasta eliminar por completo todos sus componentes y tener un sistema de agua clara 100% puro.

El beneficio de la tecnología biofloc sobre los organismos acuáticos no solo radica en factores puramente nutricionales, sino también de tipo inmunológico, y aunque a la fecha estos últimos no han sido determinados con certeza, los estudios reportados hasta ahora han demostrado que este efecto llamado *antibiosis* sí se produce de manera natural bajo condiciones con cero recambio de agua.

Este campo es una nueva oportunidad para considerar el dejar de lado el uso de probióticos en los cultivos, lo que representa un ahorro en términos económicos.

Ya sea en sistemas convencionales o biofloc, tanto los estanques como los animales cultivados en los mismos deben ser monitoreados constantemente para procurar mantener un balance en cuanto a la composición de la comunidad microbiana y mantener así a los organismos sanos y sin riesgo a que sean susceptibles a factores estresantes, además de reducir el riesgo de diseminación de microorganismos oportunistas o patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Akinbowale OL, Peng H, Barton MD.** 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1103-1113.
- Alapide-Tendencia EV, Dureza LA.** 1997. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture* 154: 107- 114.
- Alavandi SV, Vijayan KK, Santiago TC, Poornima M, Jithendran KP, Ali SA, Rajan JJS.** 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunology* 17: 115-120.
- Alday-Sanz V, Roque A, Turnbull JF.** 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 48(2): 91-99.
- Álvarez-León R.** 2009. Asociaciones y patologías en los crustáceos dulceacuícolas, estuarinos y marinos de Colombia: aguas libres y controladas. *Revista Académica Colombiana Científica* 33(126): 129-144.
- Amaya EA, Davis DA, Rouse DB.** 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture* 262: 393-401.
- Anderson IG, Shamsudin MN, Shariff M.** 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fisheries Science* 2: 93-108.
- Araya R, Jorquera M, Riquelme C.** 1999. Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. *Revista Chilena de Historia Natural* 72: 261-271.
- Arbeláez TA.** 2010. Parámetros ambientales y balance energético del camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* como herramienta de evaluación ecológica bajo condición de cultivo basado en el sistema de recambio limitado de agua "Biofloc Technology BFT". Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
- Arcos GF, Ibarra AM, Boucard CV, Palacios E, Racotta IS.** 2003. Haemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* 34:749-755.

- Argue BJ, Arce SM, Lotz JM, Moss SM.** 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204: 447-460.
- Arthur JR, Bondad-Reantaso MG, Hewitt C, Campbell ML, Hewitt CL, Phillips MJ, Subasinghe RP.** 2009. Understanding and applying risk analysis in aquaculture: a manual for decision-makers. FAO, Documento Técnico de Pesca y Acuicultura n.º 519/1. Roma, FAO. 113 pp.
- Asaduzzaman M., Wahab M.A., Verdegem M.C.J., Huque S., Salam M.A., Azim M.E.** 2008. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture* 280,117-123.
- Audelo-Naranjo JM, Martínez-Córdova LR, Voltolina D, Gómez-Jiménez S.** 2011. Water quality, production parameters and nutritional condition of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) grown intensively in zero water exchange mesocosms with artificial substrates. *Aquaculture Research* 42: 1371-1377.
- Austin B, Austin DA.** 1989. General introduction. In: Methods for the biological examination of fish and shellfish. Austin B. and Austin DA. (Eds.). pp. 1-24. Chichester: Ellis Horwood.
- Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I, Griffith DRW.** 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18, 93-96.
- Austin B, Austin DA.** 1999. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. 3rd ed. Springer, Chichester, 457 pp.
- Aviles LE.** 2011. Estudio de la microbiota del sistema digestivo en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Sisal, Yucatán.
- Avnimelech Y.** 1999. Carbon nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176(3-4): 227-235.
- Avnimelech Y.** 2012. Biofloc Technology – A practical guide book, 2nd Edition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Azain MJ.** 2004. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *Journal of Animal Science* 82: 916-924.
- Azim M.E., Little D.C.** 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283, 29–35.

- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Campana R, Falzano L, Donelli G.** 2003. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology* 89(1): 31-39.
- Bairagi A, Ghosh KS, Sen SK, Ray AK.** 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* 10(2): 109-121.
- Bairagi A, Ghosh S.K, Sen SK, Ray AK.** 2004. Evaluation of nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research* 35: 436-446.
- Balcázar JL.** 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. *CIVA*, 877-881.
- Balcázar JL.** 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruíz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL.** 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114: 173-186.
- Ballester ELC, Abreu PC, Cavalli RO, Emerenciano M, de Abreu L, Wasielesky Jr. W.** 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in zero water exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition* 16: 163-172.
- Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO.** 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2): 968-978.
- Bartley DM, Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP.** 2006. A risk analysis framework for aquatic animal health management in marine stock enhancement programmes. *Fisheries Research* 80: 28-36.
- Bearson S, Bearson B, Foster JW.** 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letter* 147: 173-180.
- Becerra-Dorame MJ, Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M, Hernández-López J, López-Elías JA, Mendoza-Cano F.** 2012. 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* 1-5.
- Bomba A, Nemcová R, Mudroňna D, Guba P.** 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 13: 121-126.

- Bratvold D, Browdy CL.** 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, 81-94.
- Breithaupt DE.** 2004. Identification and quantification of astaxanthin esters in shrimp (*Pandalus borealis*) and in a microalga (*Haematococcus pluvialis*) by liquid chromatography-mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3870-3875.
- Brock JA, Main KL.** 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, 242 pp.
- Brock JA, Gose RB, Lightner DV, Hasson K.** 1997. Recent developments and an overview of Taura Syndrome of Farmed shrimp in the Americas. In: Flegel TW, McRae IH (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 275-284.
- Browdy CL, Bratvold D, Stokes AD, McIntosh RP.** 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy CL, Jory DE (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp. 20-34.
- Burford MA, Thompson PJ, McIntosh RP, Bauman RH, Pearson DC.** 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219, 393-411.
- Burford MA, Sellars MJ, Arnold SJ, Keys SJ, Crocos PJ, Preston NP.** 2004a. Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell), in high-density rearing systems. *Aquaculture Research* 35: 508-515.
- Burford MA, Thompson PJ, McIntosh RP, Bauman RH, Pearson DC.** 2004b. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture* 232: 525-537.
- Burgents JE, Burnett LE, Burnett KG, Stabb EV.** 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 29: 681-691.
- Burr G, Gatlin D, Ricke S.** 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 36(4): 425-436.
- Cahu C, Guillaume JC, Stéphan G, Chim L.** 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. *Aquaculture* 126: 159-170.

- Campbell AC, Buswell JA.** 1983. The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea* L.) at different stages of fish development. *Journal of Applied Bacteriology* 55: 215-223.
- Capone DG, Weston DP, Miller V, Shoemaker C.** 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture* 145: 55-75.
- Castex M, Liet C, Dominique P, Pierrette L, Nelly W, Jean-Louis N, et al.** 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275: 182-193.
- Chamberlain G, Avnimelech Y, McIntosh RP.** 2001. Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N. *The Advocate* 22-24.
- Chen D.** 1992. An overview of the disease situation, diagnostic techniques, treatments and preventatives use on shrimp farms in China. In: W. Fuls and KL. Main (Eds.) *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. The Oceanic Institute, Hawaii. pp. 47-55.
- Chen S, Ling J, Blancheton JP.** 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquaculture Engineering* 34: 179-197.
- Cheng W, Chen JC.** 2002. Effects of environmental factors in the immune responses of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and other decapod crustaceans. *Journal of Fisheries Society of Taiwan* 29: 1-19.
- Cheng W, Juang FM, Chen JC.** 2004. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels, *Fish and Shellfish Immunology* 16: 295-306.
- Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S, Boudabous A.** 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* 32: 243-247.
- Cherrington CA, Hinton M, Pearson GR, Chopra I.** 1991. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 161-165.
- Chun, J., J.-H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B. K. Kim, and Y. W. Lim.** 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2259-2261.

- Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A.** 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology* 38: 251-256
- Cohen J., Samocha T.M., Fox J.M., Gandy R.L., Lawrence A.L.** 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *L. vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacultural Engineering* 32,425-442.
- Conway PL.** 1996. Development of intestinal microbiota. In: Mackie RI, White BA, Isaacson RE (Eds), *Gastrointestinal Microbiology*. Champan and Hall, New York, pp. 3-38.
- Costa R, Mermoud I, Koblavi S, Morlet B, Haffner P, Berthe F, Legroumellec M, Grimont P.** 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164: 297-309.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.** 1990. *Patología estructural y funcional*. Vol. 1. Editorial Interamericana, McGraw-Hill. Madrid, España, 4° Ed. 739 pp.
- Crab R.** 2010. Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture. PhD thesis, Ghent University. 178 pp.
- Crab R, Lambert A, Defoird T, Bossier P, Verstraet W.** 2010a. Bioflocs protect gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1643-1649.
- Crab R, Chielens B, Wille M, Bossier P, Verstraete W.** 2010b. 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, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W.** 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356-357: 351-356.
- Cross ML.** 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34: 245-253.
- Cuartas EI, Díaz AC, Petriella AM.** 2003. Modificaciones del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea, Penaeidae) por efecto de la salinidad. *Biociencias, Porto Alegre* 11(1): 53-59.
- Cuéllar-Anjel J.** 2008. Métodos de diagnóstico de enfermedades en camarones marinos de cultivo. En: Morales V. y Cuéllar-Angel J. (Eds.), *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos* (1-54). Panamá: Programa CYTED Red II-D.

- Cuzon G, Lawrence A, Gaxiola G, Rosas C, Guillaume J.** 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235: 513-551.
- Davis JW, Sizemore RK.** 1982. Incidence of *Vibrio* species associated with Blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. *Applied and Environmental Microbiology* 43(5): 1092-1097.
- De la Peña LD, Lavilla-Pitogo CR, Paner MG.** 2001. Luminescent vibrios associated with mortality in pond-cultured shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines: Species composition. *Fish Pathology* 36: 133-138.
- De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, Boon N, Verstraete W.** 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125-137.
- De Schryver S, Verstraete W.** 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 100: 1162-1167.
- De Schryver P, Sinha AK, Kunwar PS, Baruah K, Verstraete W, Boon N, De Boeck G, Bossier P.** 2009. The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1535-1541.
- De Schryver P, Sinha AK, Baruah K, Verstraete W, Boon N, De Boeck G, Bossier P.** 2010. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1535-1541.
- Decamp O., Conquest L., Forster I., Tacon A.G.J.** 2002. The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-water exchange aquaculture production system: role of Eukaryotic microorganisms. In: *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems*, (ed by C.S. Lee and P. O'Bryen), pp. 79–86. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.
- Defoirdt T, Boon N, Bossier P, Verstraete W.** 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240: 69-88.
- Defoirdt T, Halet D, Sorgeloos P, Bossier P, Verstraete W.** 2006. Short chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture* 261(2): 804-808.
- Defoirdt T, Halet D, Vervaeren H, Boon N, Van de Wiele T, Sorgeloos P, Bossier P, Verstraete W.** 2007. The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology* 9(2): 445-452.

- Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P.** 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*. 14: 251-258.
- Denner EBM, Vybiral D, Fuscher UR, Velimirov B, Busse HJ.** 2002. *Vibrio calviensis* sp. nov., a halophilic, facultatively oligotrophic 0.2 micron-filterable marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 549-553.
- Diggles BK, Moss GA, Carson J, Anderson CD.** 2000. Luminous vibriosis in rock lobster *Janus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43: 127-137.
- Dinh TN, Wille M, De Schryver P, Defoirdt T, Bossier P, Sorgeloos P.** 2010. The effect of poly- β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture* 302: 76-81.
- Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM.** 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4): 2161-2171.
- Ducklow HW.** 2000. Bacterial production and biomass in the oceans. In: *Microbial Ecology of the Oceans*. Kirchman DL (Ed.). Wiley-Liss, New York. Pp. 85-120.
- Emerenciano, M.G.C., Wasielesky Jr., W., Soares, R.B., Ballester, E.C., Izeppi, E.M., Cavalli, R.O.** 2007. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. *Acta Scientiarum. Biological Science* 29(1), 1-7.
- Emerenciano MGC, Cuzon G, Goguenheim J, Gaxiola G.** 2011. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture Research* 4(1): 75-85.
- Emerenciano MGC.** 2012. Biofloc technology (BFT) application on reproduction of penaeid shrimp (Decapoda, Penaeidea) and its effects on biochemical composition and fatty acid profile. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.
- Emerenciano MGC, Gaxiola G, Cuzon G.** 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry, *Biomass Now - Cultivation and Utilization*, Dr. Miodrag Darko Matovic (Ed.), ISBN: 978-953-51-1106-1, InTech, DOI: 10.5772/53902. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/biofloc-technology-bft-a-review-for-aquaculture-application-and-animal-fod-industry>.

- Epp MA, Ziemann DA, Schell DM.** 2002. Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture Research* 33: 839-846.
- Esteve M, Herrera FC.** 2000a. Alteraciones histológicas del hepatopáncreas en juveniles de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Penaeidae) experimental mente infectados con *Vibrio alginolyticus*. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela* 12(1): 14-20.
- Esteve M, Herrera FC.** 2000b. Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (crustacea: decapoda: penaeidae) experimentally infected with *Vibrio alginolyticus* strain. *Journal of Invertebrate Pathology* 76:1-5.
- Flegel TW.** 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 166-173.
- García-Barreno P.** 2008. Inflamación. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* Vol. 102, No. 1. pp. 91-159.
- Gatesoupe FJ.** 1999. The use of probiotics in aquaculture. Review. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gibson R, Barker PL.** 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanography Marine Biology. Annual Reviews* 17: 285-346.
- Goarant C, Herlin J, Ansquer D, Imbert F, Domalain D, Marteau AL.** 2004. Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du Syndrome d'été: résultats préliminaires du programme DESANS. In: Ifremer (Ed.), *Styli* 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa-Komé, 2-6 Juin 2003, Actes Colloq., vol. 38, pp. 210-215.
- Goarant C, Ansquer D, Herlin J, Domalain D, Imbert F, De Decker S.** 2006. "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253: 105-113.
- Goarant C, Merien F.** 2006. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological of Syndrome 93 in New Caledonia shrimp by real-time PCR using SYBER Green I chemistry. *Journal of Microbiological Methods* 67: 27-35.
- Gómez-Gil B, Tron-Mayén L, Roque A, Turnbull JF, Inglis V, Guerra-Flores AL.** 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163: 1-9.
- Gómez-Gil B, Roque A, Turnbull JF.** 2000. The use and selection of probiotic for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.

- Gómez-Gil B, Roque A, Guerra FA.** 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos, En: Páez-Osuna F. (Ed.), Camaronicultura y Medio Ambiente. UNAM. pp 315-346.
- Gómez-Gil B, Soto-Rodríguez S, García-Gasca A, Roque A, Vazquez-Juarez R, Thompson FL, Swings J.** 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150: 1769-1777.
- Gómez-Gil B, Roque A, Soto-Rodríguez S.** 2011. Vibriosis en camarones y su diagnóstico. En: Ruíz-Luna A, Berlanga-Robles CA, Betancourt-Lozano M (Eds.). *Avances en Acuicultura y Manejo Ambiental*. CIAD, A.C. pp 137-149.
- Gómez-Jiménez S, Espinosa-Plascencia A, Valenzuela-Villa F, Bermúdez-Almada MC.** 2008. Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph, muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment. *Aquaculture* 274: 24-29.
- Griffin HL, Freer SN, Greene RV.** 1987. Extracellular endoglucanase activity by a novel bacterium isolated from marine shipworm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44: 143-151.
- Griffith DRW.** 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: Larvi'95-Fish & Shellfish Larviculture Symposium. In: Lavens P., Jaspers E., Roelants I. (Eds.), *European Aquaculture Society, Special Publication 24*, Gent, Belgium, p. 478.
- Grodner RM, Hinton A.** 1988. Gamma irradiation of *Vibrio cholera* in crayfish (*Procambarus clarkii*). *Proceedings of the Twelfth Annual Conference of the Tropical and Subtropical Fisheries Technological Society of the Americas* 429-441.
- Gullian M, Rodríguez J.** 2002. Immunostimulant qualities of probiotic bacteria. *Global Aquaculture Advocate* 5: 52-54.
- Gullian M, Thompson F, Rodríguez J.** 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233: 1-14.
- Halet D, Defoirdt T, Van Damme P, Vervaeren H, Forrez I, Van de Wiele T, Boon N, Sorgeloos P, Bossier P, Verstraete W.** 2007. Poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbelli*. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 363-369.
- Hari B, Kurup BM, Varghese JT, Schrama JW, Verdegem MCJ.** 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture* 241: 179-194.

- Harris JM, Seiderer LJ, Lucas MI.** 1991. Gut microflora of two saltmarsh detritivore Thalassinid prawns, *Upogebia africana* and *Callinassa kraussi*. *Microbial Ecology* 21: 63-82.
- Harris JM.** 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates – A synthesis. *Microbial Ecology* 25(3): 195-231.
- Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR.** 2002a. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5488-5497.
- Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR.** 2002b. Bacteria of the α -subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5498-5507.
- Hektoen H, Berge JA, Hormazabal V, Yndestad M.** 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133: 175-184.
- Holmstrom K, Gräslund S, Wahlström A, Pongshompoo S, Bengtsson BE, Kautsky N.** 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology* 38: 255-266.
- Hood MA, Meyers SP, Colmer AR.** 1971. Bacteria of the digestive tract of the white shrimp *Penaeus setiferus*, *Bacteriological Proceedings* 71:G147.
- Hopkins JS, Sandifer PA, Browdy CL.** 1995. Effect of two feed protein levels and feed rate combinations on water quality and production of intensive shrimp ponds operated without water exchange. *Journal of the World Aquaculture Society* 26: 93-97.
- Horowitz A., Horowitz S.** 2001. Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. In: *Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming* (ed. by C.L. Browdy and C.L. Jory), pp.199-218. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Hsieh SL, Ruan YH, Li YC, Hsieh PS, Hu CH, Kuo CM.** 2007. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 275: 335-341.
- Huq A, Huq SA, Grimes DJ, O'Brien M, Chu KH, Capuzzo JM, Colwell RR.** 1986. Colonization of the gut of the blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 586-588.
- Huys L, Dhert P, Robles R, Ollevier F, Sorgeloos P, Swings J.** 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture* 193: 25-37.

- Icely JD, Nott JA.** 1992. Digestion and absorption: digestive system and associated organ. In: Harrison FW, Humes AG (Eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod, Crustacea*, Vol. 10. New York: Wiley-Lyssa Inc. p. 147-201.
- Jayaprakash NS, Rejish KVJ, Philip R, Bright SIS.** 2006. *Vibrios* associated with *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) larvae from three hatcheries on the Indian southwest coast. *Aquaculture Research* 37: 351-358.
- Jayasree L, Janakiram P, Madhavi R.** 2006. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society* 37: 523-532.
- Jiravanichpaisal P, Chuaychuwong I.** 1997. The use of *Lactobacillus* sp. as treatment of vibriosis in *Penaeus monodon* (giant tiger shrimp). *J. Aq.*, 151.
- Jory DE.** 1998. Shrimp aquafeeds in commercial production ponds. *Aquaculture Magazine* 24(5): 65-68.
- Joseph A, Philip R.** 2007. Cute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture* 272: 87-97.
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR.** 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128: 203-209.
- Kautsky N, Rönnbäck P, Tedengren M, Troell M.** 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191: 145-161.
- Kennedy B, Venugopal MN, Karunasagar I.** 2006. Bacterial flora associated with the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in the hatchery system. *Aquaculture* 216: 1156-1167.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L.** 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274(1): 1-14.
- Khatoon H, Yusoff FM, Banerjee S, Shariff M, Mohamed S.** 2007. Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. *Aquaculture* 271: 196-205.
- Klewicki R, Klewicka E.** 2004. Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the Enterobacteriaceae family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotechnology Letters* 26: 317-320.

- Kuhn DD, Boardman GD, Lawrence AL, Marsh L, Flick Jr GJ.** 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture* 296: 51-57.
- Ladino-Orjuela G, Rodríguez-Pulido JA.** 2009. The effect of *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodopseudomonas palustris* (beneficial and effective microorganisms – em) and molasses on tilapia (*Oreochromis* sp) weight-gain in laboratory conditions. *Orinoquia* 13(1): 31-36.
- Lavilla-Pitogo CR, Leño EM, Paner MG.** 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* 164: 337-349.
- LeMoullac G, Haffner P.** 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191: 121-131.
- Leyva-Ordáz GA., Sáenz-Gaxiola L., Guevara-Escamilla S.** 2010. Protocolo de prevención y contingencias para el cultivo de camarón en Baja California. 1° ed. Comité Estatal de Sanidad Acuicola e Inocuidad de Baja California A.C. México.
- Li CC, Chen JC.** 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish and Shellfish Immunology* 25: 701-709.
- Lightner DV, Bell TA, Redman RM, Mohny LL, Natividad JM, Rukyani A, Poernomo A.** 1992. A review of some major diseases of economic significance in penaeid shrimps/shrimps of the Americas and Indo-Pacific. In: M. Shariff, R. Subasinghe and JR. Arthur (Eds.) Proceedings 1st Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 57-80.
- Lightner DV.** 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: JP. McVey (Ed.) CRC Handbook of Mariculture, Second edition, Volume 1, Crustacean Aquaculture. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. pp. 393-486.
- Lightner DV (Ed.).** 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Lightner DV.** 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV. Current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *Journal of Applied Aquaculture* 9: 27-52.
- Lightner DV, Pantoja CR.** 2004. Infectious Myonecrosis (IMN): Current status report in the biology of the etiological agent and development of diagnostic methods. In: Rocha IP (Ed.), Book of abstract of Fenacam, Natal, Brazil, p. 40.

- Liltved H, Landfald B.** 1995. Use of alternative disinfectants, individually and in combination, in aquacultural wastewater treatment. *Aquaculture Research* 26: 567-576.
- Liñán-Cabello MA, Paniagua-Michel J, Hopkins PM.** 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition* 8: 299-309.
- Lipp EK, Huq A, Colwell RR.** 2002. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 757-770.
- Liu CH, Chen JC.** 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 16: 321-334.
- Lotz JM, Lightner DV.** 1999. Shrimp biosecurity: pathogens and pathogen exclusion. In: Bullis RA, Pruder GD (Eds.) *Controlled and biosecure production systems, preliminary proceeding of a special integration of shrimp and chicken models.* World Aquaculture Society, Sydney, Australia, 27-30 April, pp 70-72.
- Lynch JM, Hobbie JE (Ed.).** 1988. The animal environment. In: *Microorganisms in Action: Concepts and Applications in Microbial Ecology* pp. 163-192. London: Blackwell Scientific Publications.
- Ma D, Hu Y, Wang J, Ye S, Li A.** 2006. Effects of antibacterials use in aquaculture on biogeochemical processes in marine sediment. *Science of the Total Environment* 367(1): 273-277.
- Maillard VM, Boardman GD, Nyland JE, Kuhn DD.** 2005. Water quality and sludge characterization at raceway-system trout farms. *Aquaculture Engineering* 33: 271-284.
- Marques A, Dinh T, Ioakeimidis C, Huys G, Swings J, Verstraete W et al.** 2005. Effects of bacteria on *Artemina franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4307-4317.
- Marsden GE, McGuren JJ, Hansford SW, Burke MJ.** 1997. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145-156.
- McIntosh D, Samocha TM, Jones ER, Lawrence AL, McKee DA, Horowitz S, Horowitz A.** 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low-protein diet in outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering* 21: 215-227.
- McLean E, Reid B, Fegan D, Kuhn D, Craig S.** 2006. Total replacement of fishmeal with an organically certified yeast-based protein in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) diets: laboratory and field trials. *Ribarstvo* 64(2):47-58.

- Megahed ME.** 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. *Journal of the Arabian Aquaculture Society* 5(2): 119-142.
- Menasveta P.** 2002. Improved shrimp growout systems for disease prevention and environmental sustainability in Asia. *Reviews in Fisheries Science* 10:391-402.
- Mermoud I, Costa R, Ferré O, Goarant C, Haffner P.** 1998. “Syndrome 93” in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of three major outbreaks. *Aquaculture* 164: 323-335.
- Miller MB, Bassler BL.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 165-199.
- Mombelli B, Gismondo MR.** 2000. The use of probiotics in medicinal practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16: 531-536.
- Morales-Covarrubias MS.** 2008. Enfermedades bacterianas. En: Morales V. y Cuéllar-Angel J. (Eds.), *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos* (119-134). Panamá: Programa CYTED Red II-D.
- Moreira de Souza D, Medeiros-Suita S, Leivas-Leite FP, Romano LA, Wasielesky W, Cupertino Ballester EL.** 2012. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. *Aquaculture Research* 43(12): 1828-1837.
- Moriarty DJW.** 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Bell C, Brylinsky M and Johnson-Green G, (Eds.), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada.
- Moss SM, LeaMaster BR, Sweeney JN.** 2000. Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *Journal of the World Aquaculture Society* 31(2): 255-263.
- Moss SM.** 2002. Dietary importance of microbes and detritus in penaeid shrimp aquaculture. *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems*. Lee CS, O’Byrne P (Eds.), World Aquaculture Society, Louisiana, pp. 1-18.
- Nayak SK.** 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 2-14.

- Neal RS, Coyle SD, Tidwell JH, Boudreau BM.** 2010. Evaluation of stocking density and light level on the growth and survival of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in zero exchange system. *Journal of the World Aquaculture Society* 41(4): 533-544.
- Newman GS.** 2007. Antibiotics in aquaculture ¿Is responsible use possible? *Global Aquaculture Advocate* 36-38.
- Nhan DT, Wille M, De Schryver P, Defoirdt T, Bossier P, Sorgeloos P.** 2010. The effect of poly β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 302: 76-81.
- Nogami K, Maeda M.** 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 2373-2376.
- Nunan LM, Pantoja CR, Gomez-Jimenez S, Lightner DV.** 2013. *Candidatus hepatobacter penaei*, an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Applied and Environmental Microbiology* 79(4): 1407-1409.
- Nunes AJP, Martins PCC, Gesteira TCV.** 2004. Carcinicultura ameacada: produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Virus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). *Panorama da Aqüicultura* 14(83): 37-51.
- Otoshi CA, Moss DR, Moss SM.** 2011. Growth-enhancing effect of pond water on four size classes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 42: 417-422.
- Oxley APA, Shipton W, Owens L, McKay D.** 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and culture banana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology* 93(2): 214-223.
- Páez-Osuna F, Gracia A, Flores-Verdugo F, Lyle-Fritch LP, Alonso-Rodríguez R, Roque A, Ruiz-Fernández AC.** 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin* 46: 806-815.
- Palacios E, Ibarra AM, Racotta IS.** 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock, *Aquaculture* 185: 353-371.
- Panicker G, Myers ML, Bej AK.** 2004. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 498-507.

- Panjaitan P.** 2010. Shrimp culture of *Penaeus monodon* with zero water exchange model (Zwem) using molasses. *Journal of Coastal Development* 14(1): 35-44.
- Peddie S, Wardle R.** 2005. Crustaceans: The impact and control of vibriosis in shrimp culture worldwide. *Aquaculture Health International* 2: 4-7.
- Perea-Sasiain J.** 2003. Reseña de “Cien años del colorante de Giemsa”. *Biomédica* 23(1): 5-18.
- Pérez-Velázquez M, González-Félix ML, Gómez-Jiménez S, Davis DA, Miramontes-Higuera N.** 2008. Nitrogen budget for a low-salinity, zero water exchange culture system: II. Evaluation of isonitrogenous feeding of various dietary protein levels to *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 39(9): 995-1004.
- Pongsomboon S, Wongpanya R, Tang S, Chalorsrikul A, Tassanakajon A.** 2008. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 485-493.
- Potasman I, Paz A, Odeh M.** 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*. 35: 921-928.
- Prieur D, Mevel G, Nicolas JL, Plusquellec A, Vigneulle M.** 1990. Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 28: 277-352.
- Raissy M, Momtaz H, Moumeni M, Ansari M, Rahimi E.** 2011. Molecular detection of *Vibrio* spp. in lobster hemolymph. *Africal Journal of Microbiology Research* 5(13): 1697-1700.
- Ray A.J., Seaborn G., Leffler J.W., Wilde S.B., Lawson A., Browdy C.L.** 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture* 310, 130–138.
- Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P.** 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon*, survival and growth. *Aquaculture* 167: 301-313.
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P.** 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191: 271-288.
- Ricke SC.** 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science* 82(4): 632-639.

- Riquelme C, Araya R, Vergara N, Rojas A, Guaita M, Candia M.** 1997. Potential probiotic strain in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154: 17-26.
- Riquelme C, Araya R, Escribano R.** 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181: 25-36.
- Río-Rodríguez RE, Soto-Rodríguez S, Lara-Flores M, Cu-Escamilla AD, Gómez-Solano MI.** 2006. A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, México: A first case report. *Aquaculture* 255: 606-609.
- Roberts RJ.** 1989. *Fish Pathology*. 2^o Edition. Ballière-Tindall. London, England.
- Robertson PAW, Calderón J, Carrera L, Stark JR, Zherdmant M, Austin B.** 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 32: 151-155.
- Rodríguez J, Le Moullac G.** 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109-119.
- Rojas-Herrera R, Narváez-Zapata J, Zamudio-Maya M, Mena-Martínez ME.** 2008. A simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. *Molecular Biotechnology* 40: 13-17.
- Roque A, Molina AA, Bolán MC, Gómez GB.** 2001. *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *Internacional Journal Antimicrobial Agents* 17: 383-387.
- Roque A, Abad S, Betancourt-Lozano M, De la Parra LM, Baird D, Guerra-Flores AL, Gómez-Gil B.** 2005. Evaluation of the susceptibility of the cultured shrimp *Litopenaeus vannamei* to vibriosis when orally exposed to the insecticide methyl parathion. *Chemosphere* 60: 126-134.
- Rosas C, Carrillo O, Wilson R, Andreatta ER.** 2006. Estado Actual y Perspectivas de la Nutrición de los Camarones Peneidos Cultivados en Iberoamérica. Subprograma II "Acuicultura" Red Temática II.C. México 321 pp.
- Rosenberg E, Ben-Haim Y.** 2002. Microbial diseases of corals and global warming. *Environmental Microbiology* 4: 318-326.
- Ruby EG, Greenberg EP, Hastings JW.** 1980. Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 302-306.
- Ruíz-Ponte C, Samain JF, Sánchez JL, Nicolas JL.** 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology* 1: 52-59.

- Sakai M, Yoshida T, Astuta S, Kobayashi M.** 1995. Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyrium* bacteria. *Journal of Fish Diseases* 18: 187-190.
- Sakata T.** 1989. Microflora of healthy animals. In: *Methods for the Biological Examination of fish and shellfish*. Austin B. and Austin DA. (Eds.). pp. 141-163. Chichester: Ellis Horwood.
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault M, Cumming J, Franck A, Gibson G, et al.** 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* 80: S147-S171.
- Samocha TM, Lawrence A, Collins CR, Emberson CR, Harvin JL, Van Wyk PM.** 2001. Development of integrated, environmentally sound, inland shrimp production technologies for *Litopenaeus vannamei*. In: Browdy CL, Jory DE (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp. 64-75.
- Santiago ML, Espinosa A, Bermúdez MC.** 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40(3): 22-32.
- Saulnier DS, Avarre JC, Le Moullac G, Ansquer D, Levy P, Vonau V.** 2000a. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Diseases of Aquatic Organisms* 40: 109-115.
- Saulnier DS, Haffner P, Goarant C, Levy P, Ansquer D.** 2000b. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191: 133-144.
- Sawabe T, Setogushi N, Inoue S, Tanaka R, Ootsubo M, Yoshimizu M, Ezura Y.** 2003. Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone- *V. haliotocoli* association. *Aquaculture* 219: 671-679.
- Schneider O, Sereti V, Eding EH, Verreth JAJ.** 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquaculture Engineering* 32: 379-401.
- Schneider O, Sereti V, Eding EH, Verreth, JAA.** 2006. Molasses as C sources for heterotrophic bacteria production on solid fish waste. *Aquaculture* 261, 1239-1248.
- Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Acil Y, Glüer CC, Schrezenmeir J.** 2007. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *Journal of Nutrition* 137: 838S-846S.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR.** 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: pp. 431-437.

- Scott JR, RL Thune.** 1986. Bacterial flora of hemolymph from red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard), from commercial ponds. *Aquaculture* 58: 161-165.
- Sharren MJ, Tal Y, Ferrier D, Hankins JA, Summerfelt ST.** 2007. Membrane biological reactor treatment of a saline backwash flow from a recirculating aquaculture system. *Aquaculture Engineering* 36: 159-176.
- Shiau S, Wu M.** 2003. Dietary vitamin B6 requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 225: 397-404.
- Skjølstrup J, McLean E, Nielson PH, Frier JO.** 2000. The influence of dietary oxolinic acid on fluidized bed biofilters performance in a recirculation system for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 183: 255-268.
- Sochard MR, Wilson DF, Austin B, Colwell RR.** 1979. Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 37: 750-759.
- Soto-Rodríguez SA, Armenta M, Gómez-Gil B.** 2006a. Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 255: 48-54.
- Soto-Rodríguez SA, Simoes N, Roque A, Gómez-Gil B.** 2006b. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture* 258: 109-115.
- Soto-Rodríguez SA, Gómez-Gil B, Lozano R.** 2010. "Bright-red" syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 11-19.
- Soto-Rodríguez SA, Gómez-Gil B, Lozano R, Río-Rodríguez R, Diéguez AL, Romalde JL.** 2012. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the "Bright-red" Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 307-317.
- Straub DV, Dixon BA.** 1993. Bacteriological flora of the brine shrimp (*Artemia franciscana*) from a hypersaline pond in San Francisco Bay, California. *Aquaculture* 118: 309-313.
- Strom E, Olafsen JA.** 1990. The indigenous microflora of wild captured cod in net-pen rearing. In: Lésel, R. (Ed.) *Microbiology of Poeciloterms*, pp. 181-185. Amsterdam: Elsevier.
- Suantika G, Dhert P, Rombaut G, Vandenberghe J, De Wolf T, Sorgeloos P.** 2001. The use of ozone in a high density recirculation system for rotifers. *Aquaculture* 201: 35-49.

- Sugita H, Ueda S, Ueda R, Degushi Y.** 1987. Morphology and brief characteristics of *Vibrio* sp. isolated from marine Crustacea. Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine Nihon University 44: 160-164.
- Sun CQ, O'connor CJ, Turner SJ, Lewis GD, Stanley RA, Robertson AM.** 1998. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: implications for neonates fed on suckled milk. Chemical-Biological Interactions 113: 117-131.
- Sung HH, Li HC, Tsai FM, Ting YY, Chao WL.** 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 236(2): 261-271.
- Sung HH, Hsu SF, Chen CK, Ting YY, Chao WL.** 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. Aquaculture 192: 101-110.
- Supamattaya K, Viriyapongsuttee B, Ruangsri J, Encarnacao P, Schatzmayr G.** 2005. Effect of probiotic *Enterococcus faecium* and phycophytic substances on growth performance and health condition of white shrimp (*Penaeus vannamei*). In: Mayer E (Ed.), Evaluation of *Vibrio* control with a multi-species probiotic in shrimp aquaculture. Tomado de [http://www.biomin.net/index.php?id=62&type=123&L=0&tx_ttnews\[tt_news\]=475&cHash=de30373e4db428f516c328b81dcb1c6a](http://www.biomin.net/index.php?id=62&type=123&L=0&tx_ttnews[tt_news]=475&cHash=de30373e4db428f516c328b81dcb1c6a).
- Tacon AGJ.** 2000. Nutritional disorders and aquatic animal health. The Global Aquaculture Advocate 40-41.
- Tacon AGJ, Cody JJ, Conquest LD, Divakaran S, Forster IP, Decamp OE.** 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition 8(2): 121-137.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. [Molecular Biology and Evolution](#) 28: 2731-2739.
- Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Kim SM, Park SL, Yoshikawa T, Sakata T.** 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. Fisheries Science 72: 755-766.
- Teo JWP, Suwanto A, Laa Poh C.** 2000. Novel β -macatmase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44: 1309-1314.

- Teo JWP, Tan TMC, Laa Ph C.** 2002. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1038-1045.
- Thakur DP, Lin CK.** 2003. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture system. *Aquaculture Engineering* 27(3): 159-176.
- Thompson FL, Abreu PC, Cavalli R.** 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture* 174: 139-153.
- Thompson FL, Abreu PC, Wasielesky W.** 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203: 263-278.
- Thompson FL, Iida T, Swings J.** 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 403-431.
- Timmons MB, Ebeling JM, Wheaton FW, Summerfelt ST, Vinci BJ.** 2002. *Recirculating Aquaculture Systems*, 2nd Ed. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, New York, US.
- Uma A, Abraham TJ, Sundararaj V.** 1999. Effect of a probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* on disease resistance of *Penaeus indicus* larvae. *Indian Journal of Fisheries* 46(4): 367-373.
- Urakawa H, Yoshida T, Nishimura M, Ohwada K.** 2000. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. *Environmental Microbiology* 2: 542-554.
- Van de Braak CB, Botterblom MH, Taverne N, Van Muiswinkel WB, Rombout JH, Van Der Knaap WP.** 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 293-309.
- Van Der Waij D.** 1992. Mechanism involved in the development of the intestinal microflora in relation to the host organism; consequences for colonization resistance. In: *Molecular Biology of Bacterial Infection*, Hormaeche, CE, Penn, CW and Smyth CJ (Eds.), pp. 1-12. Cambridge: Cambridge University Press.
- Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Velge P, Bottreau E, Fievez V, Haesebrouck F, Ducatelle R.** 2003. Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells *in vitro* is influenced by short-chain fatty acids. *International Journal of Food Microbiology* 85: 237-248.
- Vandenbergh J, Li Y, Verdonck L, Li J, Sorgeloos P, Xu HS, Swings J.** 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169: 121-132.

- Vandenbergh J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Balladares M, Gómez-Gil B, Calderón J, Sorgeloos P, Swings J.** 1999. Vibriosis associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6): 2592-2597.
- Vandenbergh J, Thompson FL, Gómez-Gil B, Swings J.** 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219: 9-20.
- Vaseeharan B, Ramasamy P.** 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology* 36: 83-87.
- Vaughan EE, De Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans ADL, De Vos WM.** 2002. The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 341-352.
- Vázquez JA, González MP, Murado MA.** 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245: 149-161.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W.** 2000. Probiotic bacteria as biocontrol agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 655-671.
- Vinatea L, Gálvez AO, Browdy CL, Stokes A, Venero J, Haveman J, et al.** 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.
- Vine NG, Leukes WE, Kaiser H.** 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 404-427.
- Wai SN, Mizunoe Y, Yoshida S.** 1999. How *Vibrio cholera* survive during starvation. *FEMS Microbiology Letters* 180: 123-131.
- Wang LU, Chen JC.** 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish and Shellfish Immunology* 18: 269-278.
- Wang FI, Chen JC.** 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subs *Damsela*. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 671-681.
- Wang Q, Zhuang Z, Deng J, Ye Y.** 2006. Stock enhancement and translocation of the shrimp *Penaeus chinensis* in China. *Fisheries Research* 80(1): 67-79.

- Wasielesky W, Emerenciano M, Ballester E, Soares R, Cavalli R, Abreu PC.** 2006a. Flocos Microbianos: um novo caminho a ser percorrido. *Revista Panorama da Aquicultura* 16, 14-23.
- Wasielesky W, Atwood H, Stokes A, Browdy CL.** 2006b. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258: 396-403.
- Weirich CR, Browdy CL, Bratvold D, McAbee BJ, Stokes AD.** 2002. Preliminary characterization of a prototype minimal exchange super-intensive shrimp production system. Proceedings of the IVth International Conference on Recirculating Aquaculture. Virginia Tech University, Blacksburg, Virginia, USA, pp. 255-270.
- Weltzien FA, Hemre GI, Evjemo JO, Olsen Y, Fyhn HJ.** 2000. β -Hydroxybutyrate in developing nauplii of brine shrimp (*Artemia franciscana* K.) under feeding and non-feeding conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* 125: 63-69.
- Wetzel RG.** 2001. *Limnology: Lake and River Ecosystems*, 3rd edition. Academic Press, San Diego, California, US.
- Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D.** 1997. Distribution of bromophenols in Australian Wild-Harvested and Cultivated Prawns (Shrimp). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4398-4405.
- Yasuda K, Kitao T.** 1980. Bacterial flora in the digestive tracts of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 19(3): 229-234.
- Yeh ST, Li CC, Tsui WC, Lin YC, Chen JC.** 2010. The protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* that had been immersed in the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* and subjected to combined stresses of *Vibrio alginolyticus* injection and temperature. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 271-278.
- Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y.** 2005. Determination of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(4): 565-566.
- Zhi YJ, Foster I, Conquest L, Dominy W, Kuo WC, Horgen FD.** 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research* 39(2): 118-133.
- Zouková R, Klimesová Z, Nepejchalová L, Hilscherová K, Bláha L.** 2011. Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquaculture. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30: 1184-1189.

ANEXOS

ANEXO 1: OBTENCIÓN DE COLONIAS *Vibrio* A PARTIR DE MUESTRAS DE HEPATOPÁNCREAS Y AGUA

- 1) Extraer el hepatopáncreas de la zona del cefalotórax de los organismos a analizar, con cuidado de no romper el órgano, retirar porción de intestino si fuera necesario.
- 2) Lavar el hepatopáncreas con agua estéril para evitar posible contaminación.
- 3) Preparar un pre-cultivo de la muestra en estudio, tomando 1 gr de muestra (en el caso de hepatopáncreas) de su porción distal, o 500 µl (en el caso de agua) en 5 ml de caldo BHI y homogenizar.
- 4) Incubar durante 24 hrs a 35°C
- 5) Preparar diluciones con solución salina (NaCl al 2.5%) hasta 10⁻⁵. Del cultivo incubado se toman 500 µl y se agregan a 4.5 ml al primer tubo (dilución 10⁻¹), se homogeniza y de esta dilución se toman 500 µl que se añaden a otro tubo con 4.5 ml de solución salina al 0.85% (dilución 10⁻²) y así sucesivamente.
- 6) Sembrar las últimas 3 diluciones (10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵) en agar TCBS, colocando 50 µl por tubo a cada placa.
- 7) Incubar las placas de agar con la muestra sembrada durante 24 hrs a 35°C
- 8) Se elige la dilución sembrada en la que claramente puedan distinguirse las colonias.
- 9) Identificar colonias en las placas cultivadas y tomar cada una de estas colonias con palillo estéril para depositar en un tubo con 5 ml de BHI.
- 10) Incubar nuevamente durante 24 hrs a 35°C
- 11) Después de incubar, tomar 1 ml de la muestra obtenida y colocar en un tubo de microcentrífuga (hacer este paso por duplicado para cada muestra). Centrifugar durante 10 minutos a 10,000 RMP a 4°C.
- 12) Tirar el sobrenadante y conservar la pastilla. De los dos tubos de microcentrífuga de cada colonia obtenida, uno se procesará para poder conservar cada colonia y reutilizarla si es necesario (se le agrega 1 ml de BHI + glicerol) y del otro tubo solo se conserva la pastilla sola para poder extraer posteriormente el ADN de cada colonia.

ANEXO 2: CRITERIOS DE SELECCIÓN DE COLONIAS DE *Vibrio* A PARTIR DE SU MORFOLOGÍA

Las colonias de *Vibrio* seleccionadas para la obtención de su ADN fueron seleccionadas a partir de criterios físicos: color, tamaño, forma y textura (Figura 18).

1 Morfología de las colonias de *Vibrio* obtenidas en el experimento 1

- 1) Muy pequeña, amarilla-verdosa, redonda, brillante.
- 2) Muy pequeña, amarilla, forma irregular.
- 3) Muy pequeña, verde-amarillosa, redonda, opaca, apariencia cremosa.
- 4) Muy pequeña, verde, redonda, punto amarillo en el centro.
- 5) Muy pequeña, amarilla, redonda.
- 6) Pequeña, amarilla, borde irregular.
- 7) Pequeña, redonda, verde.
- 8) Pequeña, redonda, amarilla.
- 9) Pequeña, color blanco-amarillento, redonda.
- 10) Pequeña, redonda, verde alrededor, amarilla en el centro.
- 11) Pequeña, amarilla, forma irregular, punto amarillo en el centro.
- 12) Pequeña, verde-amarillosa, redonda, opaca, apariencia cremosa.
- 13) Mediana, color semi-amarillo, brillante, bordes irregulares.
- 14) Mediana, verde, redonda, centro con un punto más verde.
- 15) Mediana, redonda, verde, lechosa.
- 16) Mediana, amarilla, redonda, con borde en el centro.
- 17) Mediana, amarilla, redonda, brillante.
- 18) Mediana, amarilla, brillosa, forma irregular.
- 19) Mediana, verde alrededor, amarilla en el centro, redonda, brillante.
- 20) Mediana, verde, redonda, brillante.
- 21) Mediana, amarilla, redonda, centro con un punto más amarillo.

- 22) Mediana, verde, redonda, centro con un punto más verde.
- 23) Mediana, redonda, amarilla, centro color verde.
- 24) Mediana, amarilla, forma irregular, verde alrededor, con un círculo transparente en el centro.
- 25) Mediana, amarilla, forma irregular, punto amarillo en el centro.
- 26) Mediana, verde-amarillosa, redonda, opaca, apariencia cremosa.
- 27) Grande, redonda, amarilla brillante, aspecto mucoso.
- 28) Grande, amarilla, con un punto blanco en el centro, forma semiredonda.
- 29) Grande, lechosa, blanca en el centro, halo alrededor.
- 30) Grande, amarilla transparente, borde blanco resaltado al centro.
- 31) Grande, amarilla, brillante, redonda.
- 32) Grande, amarilla en el centro, redonda, halo verde alrededor.
- 33) Grande, amarilla, brillante, forma irregular.
- 34) Grande, verde, redonda, centro con un punto más verde.
- 35) Grande, verde, redonda, centro con un punto amarillo.
- 36) Grande, amarilla, forma irregular, punto amarillo en el centro.
- 37) Grande, verde-amarillosa, redonda, opaca, apariencia cremosa.

‡ **Morfología de las colonias de *Vibrio* obtenidas en el experimento 2**

- 1) Muy pequeña, amarilla-verdosa, redonda.
- 2) Muy pequeña, amarilla, forma irregular.
- 3) Pequeña, verde, forma redonda.
- 4) Pequeña, verde, forma irregular.
- 5) Pequeña, redonda, verde transparente.
- 6) Pequeña, forma irregular, con gránulos.
- 7) Pequeña, amarilla, redonda.
- 8) Mediana, redonda, verde, amarilla en el centro.

- 9) Mediana, amarilla, forma irregular, punto amarillo en el centro.
- 10) Mediana, amarilla, forma irregular.
- 11) Mediana, redonda, verde.
- 12) Mediana, redonda, amarillo-verdosa.
- 13) Mediana, verde, forma irregular.
- 14) Mediana, forma irregular, amarilla en el centro, amarilla-verdosa alrededor.
- 15) Mediana, verde pálido, forma irregular, punto más verde en el centro.
- 16) Mediana, redonda, verde pálido, punto verde más claro en el centro.
- 17) Mediana, forma irregular, verde pálido, punto más verde en el centro.
- 18) Mediana, verde, redonda, punto amarillo en el centro.
- 19) Mediana, amarilla, redonda, brillante.
- 20) Mediana, verde, redonda.
- 21) Mediana, verde-amarillosa, redonda, brillante.
- 22) Mediana, redonda, verde transparente, brillante.
- 23) Mediana, forma irregular, verde-amarillosa, punto amarillo en el centro.
- 24) Mediana, redonda, verde-amarillosa, punto amarillo en el centro.
- 25) Mediana, redonda, verde, halo amarillo en el centro.
- 26) Mediana, forma irregular, verde, con gránulos.
- 27) Mediana, verde transparente, redonda, punto amarillo en el centro.
- 28) Mediana, verde, redonda, gránulos amarillos.
- 29) Mediana, amarilla, redonda, verde alrededor, punto más amarillo en el centro.
- 30) Grande, amarilla, forma irregular, verde alrededor.
- 31) Grande, verde, forma irregular.
- 32) Grande, amarilla, forma irregular, punto amarillo en el centro.
- 33) Grande, verde, forma irregular, punto más verde en el centro.
- 34) Grande, amarilla, redonda.
- 35) Grande, redonda, verde transparente.

- 36) Grande, verde pálido, redonda, punto amarillo en el centro.
- 37) Grande, redonda, amarilla, brillante.
- 38) Grande, amarilla, forma irregular, brillante.
- 39) Grande, muy verde, brillante, redonda, amarillo-verdosa al centro.
- 40) Grande, forma irregular, verde-amarillosa, punto amarillo en el centro.
- 41) Muy grande, redonda, verde-amarillosa, brillante.

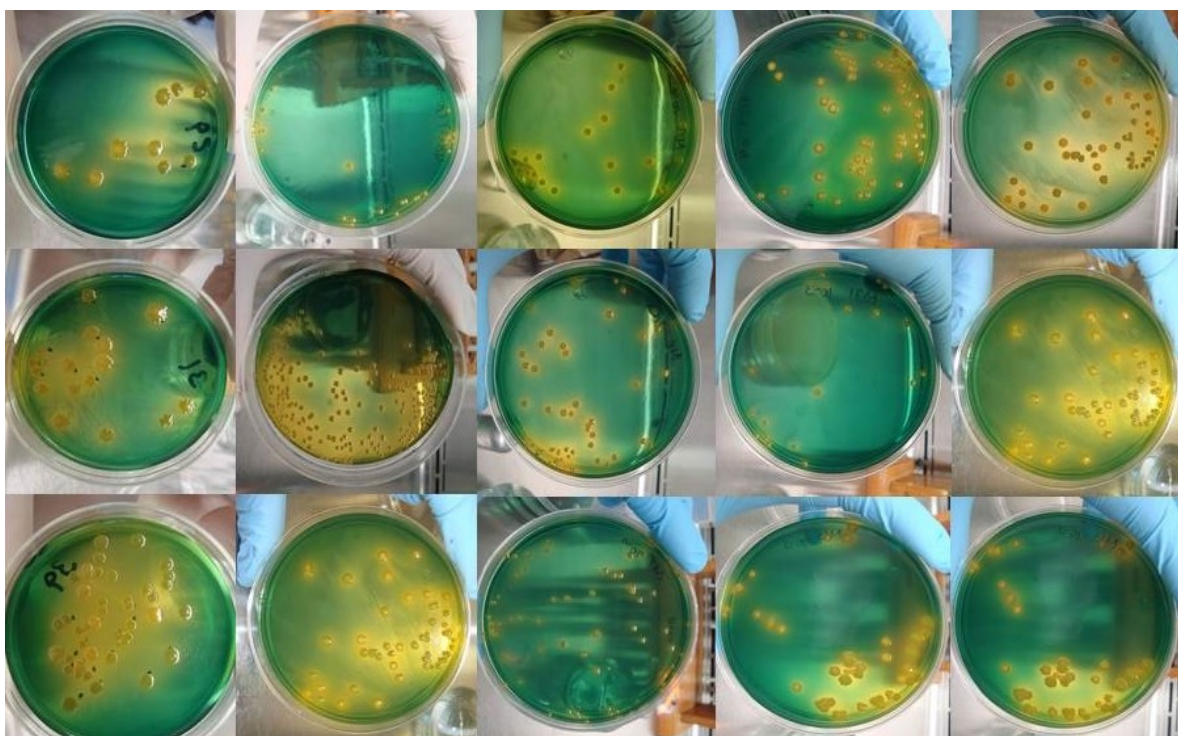


FIGURA 18. Morfología de las colonias seleccionadas para la identificación de especies de *Vibrio* en muestras de agua y hepatopáncreas de camarones cultivados en agua clara y biofloc.

ANEXO 3: EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE LA TÉCNICA DE ADSORCIÓN EN SÍLICE (ROJAS-HERRERA *et al.*, 2008)

- 1) Añadir 1 ml de buffer TEN a la pastilla obtenida y agitar en vórtex por 30 segundos.
- 2) Añadir 20 μ l de lisozima a cada muestra.
- 3) Incubar a 37°C por 1 hora en un baño de agua, agitando suavemente cada 10 minutos.
- 4) Colocar las muestras durante 10 minutos en un baño de hielo/alcohol (-10°C) y luego 5 minutos en un baño de agua a 65°C. Repetir tres veces este ciclo.
- 5) Añadir 100 μ l de SDS al 20% y agitar en vórtex por 1 minuto.
- 6) Incubar en un baño de agua durante 30 minutos a 30°C.
- 7) Centrifugar 10 minutos a 10,000 RMP a temperatura ambiente.
- 8) Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrífuga, añadir 500 μ l de acetato de K 5 M.
- 9) Incubar 5 minutos en un baño de agua a 65°C y luego en un baño de hielo/alcohol durante 20 minutos.
- 10) Centrifugar 30 minutos a 20,000 RPM a 4°C.
- 11) Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 200 μ l de SiO₂ al 4%.
- 12) Agitar por inversión durante 3 minutos.
- 13) Centrifugar 2 minutos a 16,000 RPM a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
- 14) Lavar el precipitado 2 veces con 1 ml de etanol al 70% (sin agitar), centrifugando cada vez 2 minutos a 16,000 RPM a temperatura ambiente.
- 15) Dejar evaporar el alcohol manteniendo los tubos abiertos sobre la mesa.
- 16) Resuspender la pastilla con 50 μ l de agua destilada e incubar durante 5 minutos en un baño de agua a 55°C con agitación ocasional.
- 17) Centrifugar durante 5 minutos a 16,000 RPM a temperatura ambiente.
- 18) Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrífuga, cuidando de no llevar parte del sílice (SiO₂) que se encuentra precipitado.

ANEXO 4: AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S

Una vez crecidas las colonias obtenidas a partir de las muestras de hepatopáncreas y agua de los tratamientos a evaluar, tomar con ayuda de un palillo estéril una porción de colonia y colocarla en un tubo de 1.5 ml que contienen 15 µl de agua estéril. Los tubos se colocan en un baño maría a 95°C durante 10 minutos y luego en hielo, hasta el momento de emplearlos en la reacción de PCR.

CONDICIONES DE PCR

- 1) Para la amplificación, utilizar una mezcla de reacción que contiene una concentración final de: 1X de buffer de reacción (10mM Tris-HCl [pH 8.8], 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1U de Taq polimerasa, 0.2 mM de cada iniciador (357F y 907R) (Kaksonen *et al.*, 2006), 2 µl de la muestra, en un volumen final de 25 µl.
- 2) Las muestras se corren con el siguientes programa:

Etapa I:	1 ciclo	
	95°C durante 8 min.	Desnaturalización inicial
Etapa II:	35 ciclos con tres pasos cada uno:	
	a) 95°C durante 1min	Desnaturalización
	b) 64°C durante 3min	Hibridación de los iniciadores

- 3) Los productos de PRC se guardan a -20°C.
- 4) Para la visualización de los productos de PCR, se corre un gel de agarosa al 2%, inyectando 2 µl de cada producto de PCR con 1 µl del buffer de carga para electroforesis.

ANEXO 5: PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PRC

- 1) Adicionar 25 μ l de la solución de atrapado (Binding) a la membrana por cada 25 μ de producto de PCR.
- 2) Colocar una minicolumna dentro de un tubo colector y etiquetar los tubos con el nombre de la muestra. Pasar el gel disuelto a la minicolumna evitando que la muestra se quede en la pared. Dejar incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- 3) Centrifugar la minicolumna con el tubo colector a 13,000 RPM durante 1 minuto. Quitar la minicolumna y desechar el líquido del tubo colector. Volver a colocar la minicolumna dentro del tubo colector.
- 4) Lavar la columna con 700 μ l de la solución de lavado. Centrifugar por 1 minuto a 13,000 RPM, quitar la minicolumna y desechar el líquido del tubo colector. Volver a colocar la minicolumna dentro del tubo colector.
- 5) Colocar nuevamente 500 μ l de la solución de lavado, centrifugar por 5 minutos a 13,000 RPM, desechar el tubo colector y pasar la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml por 10 minutos para evaporar los residuos de etanol.
- 6) Adicionar 40 μ l de agua libre de nucleasas en el centro de la columna, evitando tocar la membrana con la punta. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar durante 2 minutos a 13,000 RPM.

Nota: La elución del ADN en volúmenes menores a 15 μ l no son recomendadas, debido a que el porcentaje de recuperación disminuye. Ejemplo: en 10 μ l se recupera hasta el 35%, en 25 μ l se recupera el 98% y en 50 μ l se recupera el 100%.

- 7) Descartar la minicolumna y almacenar el tubo de 1.5 ml que contiene la elución de ADN a 4°C ó -20°C.

ANEXO 6: INCLUSIÓN DEL PROBIÓTICO ALTAI® EN EL ALIMENTO BALANCEADO

La mezcla del probiótico debe prepararse de 6 a 12 horas antes de aplicarlo en el alimento balanceado. Se debe añadir de 1 a 2 g de probiótico / kg de alimento. En nuestro caso se utilizaron 1.5 g de probiótico / kg de alimento (para este experimento se añadirá el probiótico a 1.5 kg de alimento MaltaCleyton®).

Para preparar la mezcla del probiótico que se añadirá en el alimento se utilizó lo siguiente:

- ‡ 1.5 g de probiótico Altai®
- ‡ 15 g de melaza
- ‡ 7.5 g de salvado de trigo
- ‡ 300 ml de agua de piscina o fresca

La mezcla formada debe homogeneizarse perfectamente y dejarla reposar de 6 a 12 horas. Después debe mezclarse con el alimento a procesar y se deja secar de 10 a 30 minutos. En ese momento, el alimento queda listo para ser utilizado.

ANEXO 7: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN FIJADORA DE DAVIDSON (ALCOHOL-FORMALINA-ÁCIDO ACÉTICO)

Para preparar 1 litro de solución Davidson se necesitan mezclar:

- ‡ 330 ml de alcohol etílico al 95%
- ‡ 220 ml de formaldehído (solución saturada con gas formaldehído; concentración final de 37-39%)
- ‡ 115 ml de ácido acético glacial
- ‡ 335 ml de agua corriente (de preferencia agua destilada)

La solución obtenida se almacenará a temperatura ambiente.

PRECAUCIÓN: Debe evitarse el contacto con la piel o con los ojos (usar guantes y lentes protectores). En caso de un accidente, lavar inmediatamente la parte expuesta con bastante agua, consultar a un médico.

ANEXO 8: FIJACIÓN DE MUESTRAS DE CAMARÓN PARA ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

- 1) Con una jeringa inyectar el fijador en el camarón cuando éste aún esté vivo. Inyectar de 0.1 a 10 ml, dependiendo del tamaño del camarón. El tamaño de la aguja debe adecuarse al tamaño del camarón, por ejemplo, para la fijación de postlarvas tardías y juveniles pequeños se deberá usar una aguja del número 27.
- 2) El camarón deberá ser inyectado lateralmente, en el hepatopáncreas, en la región anterior al hepatopáncreas, y en la parte anterior, media y posterior del abdomen.
- 3) La cantidad de fijador a inyectar deberá dividirse entre cada una de estas regiones, con el hepatopáncreas recibiendo una cantidad mayor que la región abdominal.
- 4) Como regla general, inyectar el equivalente a 5-10% del peso del camarón. Con esto deben de cesar inmediatamente todos los signos vitales del animal y se observará un cambio fuerte de color en las áreas inyectadas.
- 5) Inmediatamente después de la inyección, cortar con tijeras la cutícula en un transecto que vaya lateralmente desde el sexto segmento abdominal hasta la base del pedúnculo ocular. Tratar de que el corte sea superficial para no dañar a los tejidos que se encuentran debajo de la cutícula. El corte en la región abdominal deberá ser lateral a la línea media dorsal y el corte en el cefalotórax deberá localizarse en la región medio-lateral.
- 6) Si el camarón es mayor de 12 g, entonces se deberán hacer incisiones adicionales. Se deberá cortar transversalmente en la región dorsal, justo después de la unión del cefalotórax con el abdomen y en la región media del abdomen.
- 7) Una vez que el camarón ha sido inyectado y cortado, el paso final de fijación es por inmersión sumergiendo al animal completamente en lo que reste de la solución fijadora.

- 8) Los especímenes deberán ser mantenidos en la solución fijadora, a temperatura ambiente, por un lapso de tiempo de 24 a 72 horas, dependiendo del tamaño del animal (los animales más grandes por más tiempo).
- 9) Una vez transcurrido el tiempo de fijación, los animales deberán ser transferidos a una solución de alcohol etílico al 50-70%, en donde podrán mantenerse por tiempo indefinido.
- 10) Se deberá asegurar también la recolección de información pertinente a las muestras fijadas: condiciones y apariencia de los especímenes al momento de la colecta, especie, edad, peso, origen de la muestra (número de identificación del estanque, tanque), origen del camarón (silvestre, de laboratorio) y cualquier otra información que más adelante pudiera proveer claves para determinar la causa y el origen del problema. Debido a que las notas escritas con tinta pueden ser borradas por el alcohol, es necesario usar lápiz, principalmente si las notas serán incluidas con las muestras. Se recomienda también el uso de un papel que no se desintegre por la acción del alcohol (por ejemplo, papel albanene).

REPORTE DE ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA ESTANCIA EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE (CIBNOR)

La estancia de investigación fue realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) Unidad Sonora, Campus Hermosillo, bajo la dirección del Dr. Jorge Hernández López y el MVZ Fernando Mendoza Cano, en el periodo comprendido del 6 de mayo al 7 de junio del 2013.

‡ **Objetivo general**

Evaluar la respuesta inmune de los organismos en cultivo para conocer si éstos pueden resistir condiciones especiales que les permitan sobrevivir en situaciones de peligro, esto a través de diversos métodos para evaluar los parámetros inmunológicos que permitan identificar alguna inmunosupresión en el organismo de los peneidos que pueda significar a largo plazo un problema mayor al provocar un aumento importante en las mortalidades de los camarones bajo condiciones de cultivo.

‡ **Metas alcanzadas**

Para aprender las técnicas de laboratorio empleadas para la evaluación fisiológica e inmunológica del camarón, se diseñó un experimento con una duración de 20 días, en el cual se evaluó el efecto de un probiótico comercial en diferentes concentraciones sobre parámetros fisiológicos e inmunológicos de reproductores de *Litopenaeus vannamei*, y su susceptibilidad ante una infección experimental con el virus de la mancha blanca (WSSV).

Durante este experimento se llevaron a cabo las siguientes prácticas:

- Toma de muestras de hemolifa (Figura 19A).
- Observación de hemocitos en el microscopio.
- Medición de parámetros fisiológicos por técnica en microplaca: proteínas totales, glucosa, colesterol, proteasas tipo tripsina, lactato, triglicéridos.
- Medición de parámetros inmunológicos por técnica en microplaca: profenoloxidasa y fenoloxidasa.
- Medición de nutrientes en agua por técnica en microplaca: amonio y nitritos.
- Conteo de UFC/ml de agua de colonias de *Vibrio* obtenidas a partir de muestras de agua filtradas y sembradas en agar TCBS.
- Prueba de fagocitosis de hemocitos de camarón.

- Inoculación oral del virus de la mancha blanca (WSSV) en reproductores de *Litopenaeus vannamei* (Figura 19B).
- Extracción de ADN a partir de muestras de hemolinfa.
- Cuantificación de ADN de camarón.
- Ajuste de concentraciones de ADN de camarón.
- PCR-tiempo real para la identificación de ADN viral (WSSV) en camarón.
- De manera adicional, se hizo una visita al Parque Acuícola “Cruz de Piedra”, ubicado en Ciudad Obregón, Sonora (Figura 19D).
-

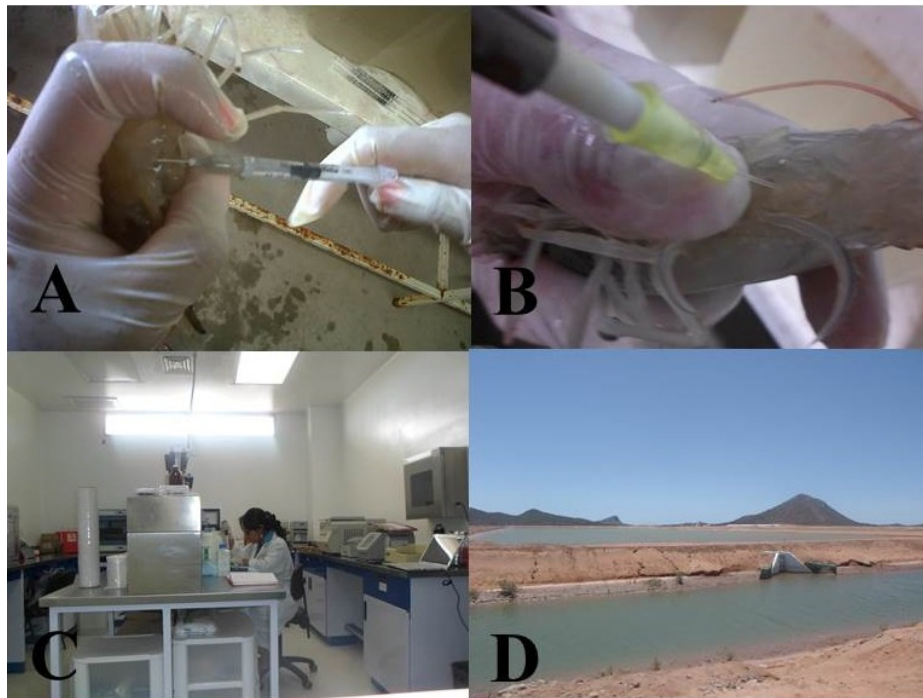


FIGURA 19. Actividades realizadas en el CIBNOR: (A) Toma de muestra de hemolinfa; (B) Inoculación oral del virus de la mancha blanca (WSSV); (C) Laboratorio de análisis del CIBNOR-Campus Hermosillo; (D) Parque Acuícola “Cruz de Piedra”, Ciudad Obregón, Sonora.