



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
(QUÍMICA ACUÁTICA)

**DETERIORO DE LA CALIDAD DEL AGUA Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA
DE ENFERMEDADES EN CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*): EFECTO
DEL INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS
NITROGENADOS EN AGUA DE BAJA SALINIDAD.**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
IBQ. MARCELA GUILLERMINA FREGOSO LÓPEZ

TUTOR:
DR. FEDERICO PÁEZ OSUNA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM
DRA. MARÍA SOLEDAD MORALES COVARRUBIAS
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DR. MARTÍN FEDERICO SOTO JIMÉNEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM
DR. MARTÍN GABRIEL FRÍAS ESPERICUETA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. JESÚS TRINIDAD PONCE PALAFOX
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D.F. ABRIL 2015



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.

Este trabajo se desarrolló en el Módulo Experimental YK, en el Laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, UNAM y en el Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección del Dr. Federico Páez Osuna y la Dra. María Soledad Morales Covarrubias.

Se agradece a la Proveedora de Larvas S.A. de C.V. (FITMAR) por su invaluable ayuda y proporcionar las postlarvas de camarón para ejecutar este proyecto y también se agradece el apoyo parcial del proyecto CONACYT con clave INFR-2013-01/204818; proyecto con la clave 2017710219-Morales-Covarrubias, M.S. y Fundación Produce Colima proyecto clave 06-2011-0018.

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado la salud, fuerza y confianza para lograr mis objetivos.

A mis padres Jorge y Eva Guillermina, por su valioso apoyo en todo momento, por sus consejos, valores y sobre todo la motivación constante que me ha permitido ser una buena persona y llegar a donde ahora me encuentro, pero más que nada, por todo su amor y cariño.

A mi hermano Jorge Alberto, por contar con su cariño y confianza en todo momento.

A mi familia ya que al igual que mis padres, también fueron un pilar importante para mi formación académica y personal puesto que yo sé que puedo contar con ellos en cualquier momento, por su constante apoyo y cariño.

Sobre todo lo anterior, quiero dedicarle esta tesis a una persona que fue muy importante para mí, *a mi nina María Emilia*, una gran persona con altos valores que también influyó en mi desarrollo personal, por todas sus enseñanzas, confianza, apoyo y todo su amor, que donde sea que se encuentre sé que me cuida desde lo más alto y que siempre contaré con su bendición. *Que Dios te tenga en su gloria.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y familia por el cariño y apoyo que siempre me han brindado en todo momento. A mis hermanitos Jorge Fregoso y Fer Félix que me ayudaron obligatoriamente a fuerza durante la realización del experimento.

Un agradecimiento muy especial a mi director de tesis, a quien le tengo mucho aprecio y respeto, el Dr. Federico Páez Osuna, por darme la oportunidad de realizar la maestría bajo su dirección, por todo su apoyo, disposición, enseñanzas, y sobre todo por la paciencia y confianza que me ha tenido durante todo este tiempo, desde antes de empezar con la maestría, por las observaciones, correcciones y sugerencias realizadas para mejorar este trabajo, además por aquellas lecciones que me ha dado a través de mi desempeño en la vida y la academia, por mostrar y reflejar esa persona humilde y sencilla, gracias por todo.

A mi co-directora de tesis, la Dra. María Soledad Morales Covarrubias le doy las gracias por el gran apoyo que me brindó desde el primer momento de acudir por su tutoría y aceptarme como alumna, por todas las enseñanzas, sugerencias, por la atención, disponibilidad, confianza y paciencia durante mi formación académica.

A mi comité tutorial, integrado por el Dr. Martín Gabriel Frías Espericueta, Dr. Jesús Ponce Palafox y Dr. Martín Federico Soto Jiménez, por su apoyo, enseñanzas y sugerencias durante la formación académica, así como en los exámenes tutorales, además por su disponibilidad y el tiempo invertido para las asesorías y revisión de este trabajo.

Al Dr. Miguel Ángel Franco Nava, por su apoyo, paciencia y disposición para compartir sus conocimientos y enseñarme las herramientas estadísticas para su aplicación en este proyecto.

A Rodolfo Lozano Olvera y Antonio Velázquez Garay, por su ayuda y atención para la realización de las láminas histológicas de los camarones de este proyecto.

A la Dra. Rosalba Alonso, por la prestación y disponibilidad de su laboratorio, para la utilización del área de microscopios con el fin de realizar el análisis en fresco, además de su apoyo en el monitoreo de la población fitoplanctónica dentro de los estanques.

A los técnicos de SKALAR Juan Ávila, Karolina Danielewska y Plancius Visser, por su apoyo y disponibilidad en la asistencia técnica del automatizador SKALAR SAN++, para los análisis químicos del agua.

Al Quim. Humberto Bojórquez Leyva, por mantener los equipos del laboratorio en buen estado y por su disposición para explicar la forma de utilizarlos, así como por su valiosa ayuda al aclarar mis dudas, por su apoyo y consejos.

A Javier Ramírez Rochín y Juan Francisco Fierro Sañudo por su apoyo en el trabajo de campo, así como también a Manuel Arvizu, Jorge Bustamante y Armando León por el apoyo incondicional en la construcción y adaptación de los módulos experimentales para el desarrollo de este proyecto.

A las muchachas que realizaron su servicio social, Brenda Cárdenas y Cinthia Santoyo de la Universidad Politécnica de Sinaloa, por ayudar en la preparación de material de muestreo y análisis de laboratorio; así como a Francys Garay, Stephani Partida y Lupita Hernández del Instituto Tecnológico de Mazatlán, por su apoyo en la preparación de material de muestreo, toma de parámetros fisicoquímicos y en el trabajo de campo.

A Gladys Valencia, Javier Ramírez, Juan Fierro y Susana Osuna por su ayuda para el momento de la siembra del camarón en los estanques. A Francys Garay, Javier Ramírez, Omar Alejandro Rubio y Magdalena Bergéz, por su apoyo y asistencia durante la realización del bioensayo de confirmación.

A mis profesores del posgrado que tuve durante esta formación académica: Dr. Carlos Green, Dr. Yovani Montaña, Dr. Federico Páez, Dr. Martín Soto, Dra. Ana Carolina Ruíz, así como a los que impartieron el curso de bioestadística y Limnología.

A Margarita Cordero Ruíz, Natalia Medina, Diana Juárez, Gabriela Almaráz, Chantal Ruíz y Guadalupe Godoy por su disponibilidad, asesoría y ayuda en los trámites del posgrado.

Al instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido alcanzar una de mis metas formativas, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca para la realización de la maestría.

A mis amigos, compañeros y deportistas del laboratorio de Geoquímica, Alexis Garzón, Any Noriega, Armando León, Cristina Osuna, Dalia Moreno, Francis Garay, Gladys Valencia, Javier Ramírez, Juan Francisco Fierro, Juan Pablo Mora, Kathia Bergéz, Magdalena Bergés, Martha Millán, Omar Rubio, Stephani Partida, Suammy Alarcón, Susana Osuna, y Yassir Torres, por los buenos momentos, su apoyo, amistad y competencia en el voleyball.

A mis amigas y compañeras del Centro de Investigación de Alimentos y Desarrollo, las mugres de Anahí Carrasco, Diana Lizárraga, Rubí Sánchez, Melissa Bernal y Alejandra Marco, por hacer amena y divertida mi estancia en el CIAD, gracias por aguantarme tanto tiempo y brindarme su honesta y sincera amistad.

A todos mis amigos en general por estar conmigo en todo momento, brindarme su gran amistad y a todas aquellas personas que de alguna manera u otra, contribuyeron para que este proyecto se desarrollara.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Generalidades del camarón	6
2.2 Anatomía general	6
2.3. Cultivos de camarón a baja salinidad	8
2.4. Calidad de agua en cultivos de baja salinidad	11
2.5. Enfermedades e histología en camarón	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	16
5. HIPÓTESIS	17
6. ÁREA DE ESTUDIO	18
7. METODOLOGÍA	19
7.1. Descripción y diseño del sistema de producción	19
7.2. Cultivo de camarón	20
7.3. Preparación de los tanques de cultivo	21
7.4. Adquisición y transporte de postlarvas	22
7.5. Aclimatación y siembra de postlarvas	22

7.6. Alimentación	24
7.7. Crecimiento y cosecha	25
7.8. Monitoreo de la calidad del agua	26
7.9. Análisis de las muestras de agua.....	28
7.9.1. Determinación de nitritos	28
7.9.2. Determinación de nitritos + nitratos	29
7.9.3. Determinación de nitrógeno amoniacal.....	29
7.9.4. Determinación de clorofila <i>a</i>	30
7.10. Análisis en fresco	30
7.11. Análisis histológico	33
7.12. Bioensayo de confirmación	35
7.12.1. Preparación de soluciones para el bioensayo	36
7.13. Análisis estadístico	37
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1. Cultivo de camarón.....	38
8.2. Monitoreo de la calidad del agua	40
8.2.1. Temperatura.....	40
8.2.2. Oxígeno disuelto	42
8.2.3. pH.....	44
8.2.4 Conductividad eléctrica (CE)	46
8.2.5. Clorofila <i>a</i>	50
8.2.6. Sólidos suspendidos totales (SST)	53
8.2.7. Nitrógeno amoniacal total (TAN)	55
8.2.8. Nitritos.....	62
8.2.9. Nitratos.....	66

8.2.10. Nitrógeno inorgánico disuelto (NID)	68
8.3. Análisis en fresco	72
8.3.1. Branquias	72
8.3.2. Hepatopáncreas	75
8.3.3. Intestino.....	75
8.4. Análisis histológico	79
8.4.1. Glándula antenal.....	79
8.4.1.1. Cultivo de camarón	79
8.4.1.2. Bioensayo de confirmación.....	81
8.4.1.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en glándula antenal	82
8.4.2. Órgano linfoide	84
8.4.2.1. Cultivo de camarón	85
8.4.2.2. Bioensayo de confirmación.....	86
8.4.2.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en órgano linfoide.....	87
8.4.3. Hepatopáncreas	89
8.4.3.1. Cultivo de camarón	91
8.4.3.2. Bioensayo de confirmación.....	92
8.4.3.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en hepatopáncreas	94
8.4.4. Corazón	97
8.4.4.1. Cultivo de camarón	97
8.4.4.2. Bioensayo de confirmación.....	98
8.4.4.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en corazón.....	99
8.4.5. Intestino.....	102
8.4.5.1. Cultivo de camarón	102
8.4.5.2. Bioensayo de confirmación.....	103

8.4.5.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en intestino.....	104
8.4.6. Branquias	106
8.4.6.1. Cultivo de camarón	107
8.4.6.2. Bioensayo de confirmación.....	107
8.4.6.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en branquias.....	108
8.4.7. Ciegos hepáticos	113
8.4.7.1. Cultivo de camarón	113
8.4.7.2. Bioensayo de confirmación.....	115
8.4.7.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en ciegos hepáticos	116
8.4.8. Músculo.....	117
8.4.8.1. Cultivo de camarón	117
8.4.8.2. Bioensayo de confirmación.....	119
8.4.8.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en músculo.....	119
8.5. Relación de los compuestos nitrogenados con las alteraciones de los órganos y tejidos de camarón a baja salinidad.....	126
8.5.1. Aplicación del análisis de correlación lineal simple.....	126
8.5.2. Aplicación de la prueba de Chi-cuadrada.....	130
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	138
10. BIBLIOGRAFÍA.....	142
11. ANEXOS.....	173
ANEXO I. Determinación de clorofila <i>a</i>	174
ANEXO II. Determinación de análisis en fresco	176
ANEXO III. Determinación de análisis histológico.....	180

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones principales de los órganos y tejidos del camarón blanco (modificado de Morales-Covarrubias, 2010).	8
Tabla 2. Datos de producción de cultivos de camarón (<i>L. vannamei</i> y <i>L. monodon</i>) realizados a nivel laboratorio o piloto y en estanques comerciales a baja salinidad y diferentes densidades de siembra.	10
Tabla 3. Variables que influyen en el éxito de la operación de los cultivos acuícolas	12
Tabla 4. Velocidad de aclimatación según la salinidad (tomado de Van Wyk, 1999)	24
Tabla 5. Escala para tipificar la cantidad de alimento remanente después de un tiempo específico (tomado de Zendejas-Hernandez, 1994).	25
Tabla 6. Valores para ajustes de la tabla de alimentación sobre valores promedio observados en los comederos.	25
Tabla 7. Parámetros de calidad del agua a monitorear durante el ciclo de cultivo	27
Tabla 8. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la deformación tubular en hepatopáncreas con análisis en fresco (Morales-Covarrubias, 2010).	31
Tabla 9. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la infestación por epicomensales en lámelas branquiales (Morales-Covarrubias, 2013).	32
Tabla 10. Guía general para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a los daños y alteraciones en órganos y tejidos de los organismos (Tomado y modificado de Lightner, 1996).	34

Tabla 11. Datos promedio de producción de <i>L. vannamei</i> , obtenidos durante el ciclo de cultivo experimental de junio a agosto 2013 utilizando agua de mar diluida a 1.9 g/L.	38
Tabla 12. Mínimos, máximos y medias con desviación estándar de las variables fisicoquímicas en los tanques de camarón en módulo 1 y 2 a las 7:00 y 19:00 horas.	49
Tabla 13. Mínimos, máximos y promedio con desviación estándar de las variables de calidad de agua del cultivo de camarón <i>L. vannamei</i> en agua de baja salinidad (1.9 g/L) para el módulo 1 y módulo 2. Las concentraciones de TAN, amonio no-ionizado, nitritos, nitratos, NID y SST se expresan en mg/L, y las concentraciones de clorofila a en mg/m ³ .	71
Tabla 14. Número de organismos muestreados en los módulos 1 y 2 que presentaron alteraciones en sus características internas y externas a lo largo del cultivo de camarón.	78
Tabla 15. Funciones específicas de las células especializadas de la glándula digestiva de los peneidos (Tomado de Al-Mohanna y Nott, 1987; Puello-Cruz, 2013).	90
Tabla 16. Mínimos, máximos y medias (\bar{x}) con desviación estándar (s) de las prevalencias (%) en los estanques de camarón en cada módulo (M1 y M2) a lo largo del ciclo de cultivo.	122
Tabla 17. Resultados del análisis de correlación lineal entre parámetros químicos vs. prevalencia de afección en cada órgano y tejido del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) (n =11; α =0.05). Intersecciones en blanco representan correlaciones no significativas (p>0.05). Números resaltados en negritas representan correlaciones altamente significativas (p<0.005).	129

Tabla 18. Prevalencias de las afecciones (%) de los órganos y tejidos significativamente asociados ($p < 0.05$) de control y de los módulos 1 y 2 del cultivo de camarón durante las semanas 5 y 6. Letras diferentes significa que las medias de los valores son significativamente ($p < 0.05$) diferentes entre los tres distintos casos que se comparan en un mismo renglón. 133

Tabla 19. Prevalencias de las afecciones (%) de los órganos y tejidos significativamente asociados ($p < 0.05$) de los tratamientos del bioensayo de confirmación (T1 y T2) y de los módulos experimentales (M1 y M2) durante las semanas 10 y 11. Letras diferentes significa que las medias de los valores son significativamente ($p < 0.05$) diferentes entre los tres distintos casos que se comparan en un mismo renglón o fila. 136

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Elementos de la triada epidemiológica (tomado de Rosales-Ortega, 2012).	3
Fig. 1.2. Diagrama del ciclo del nitrógeno en un estanque de cultivo de camarón (modificado de Gruber, 2008).	5
Fig. 2.1. Anatomía interna del camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) mostrando esófago (ES), estómago (ET), hepatopáncreas (HP), intestino (INT), ciego hepático anterior (CHA), ciego hepático posterior (CHP), recto (R), corazón (C), arteria oftálmica (AO), arteria esternal (AE), arteria abdominal (AA), órgano linfoide (OL), cordón nervioso ventral (CNV), ganglio supraesofágico (SEG), tejido hematopoyético (THP), glándula antenal (GA), branquias (BQ) y músculo (MSC). (Modificado de Alday-Sanz, 2010).	7
Fig. 6. 1. Área de estudio y localización del Módulo Experimental YK.....	18
Fig. 7.1. Diagrama de los estudios y parámetros de la calidad de agua y sanidad del cultivo experimental en baja salinidad de <i>L. vannamei</i>	19
Fig. 7.2. Ilustración que muestra el diseño del sistema de producción propuesto: los tanques 1, 2 y 3 (M1) con una densidad de siembra de 70 PL/m ² ; los tanques 4, 5 y 6 (M2) para cultivo de camarón con una densidad de siembra de 120 PL/m ²	20
Fig. 7.3. Montaje de bioensayo de confirmación exponiendo a <i>L. vannamei</i> a diferentes concentraciones de NH ₄ ⁺ y NO ₂ ⁻ a una salinidad de 1.9 g/L.	37

Fig. 8.1. Crecimiento de camarón durante el ciclo de cultivo en ambos módulos (○M1 y ■M2).....	39
Fig. 8.2. Variación promedio de la temperatura en cada módulo experimental (○ M1= 70 pL/m ² y ■ M2= 120 pL/m ²) durante el desarrollo del cultivo de camarón.....	41
Fig. 8.3. Variación promedio del oxígeno disuelto en cada módulo experimental (○M1= 70 pL/m ² y ■M2= 120 pL/m ²) durante el desarrollo del cultivo de camarón.....	43
Fig. 8.4. Variación promedio de pH en cada módulo experimental (○M1= 70 pL/m ² y■M2= 120 pL/m ²) durante el desarrollo del cultivo de camarón.	45
Fig. 8.5. Variación promedio de la conductividad eléctrica en cada módulo experimental (○M1= 70 pL/m ² y ■M2= 120 pL/m ²) durante el desarrollo del cultivo de camarón.....	48
Fig. 8.6. Variación promedio de la concentración de clorofila <i>a</i> (± desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón <i>L. vannamei</i> (○M1 y ■M2).	51
Fig. 8.7. Variación promedio de los sólidos suspendidos totales (± desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón <i>L. vannamei</i> (○M1 y■M2).	54
Fig. 8.8. Variación promedio de la concentración de nitrógeno amoniacal total (TAN) (± desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón (○M1 y ■M2). (*)Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas (p<0.05) entre módulos (M1 y M2).....	58
Fig. 8.9. Variación promedio de la concentración de nitrógeno amoniacal no ionizado (NH ₃) (± desviación estándar) de cada módulo a lo	

largo del cultivo de camarón (◯M1 y ■M2). (*)Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas (p<0.05) entre módulos (M1 y M2).	59
Fig. 8.10. Variación promedio de la concentración de nitritos (± desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón <i>L. vannamei</i> (◯M1 y ■M2). (*)Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas (p<0.05) entre módulos (M1 y M2).	64
Fig. 8. 11. Variación promedio de la concentración de nitratos (± desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón <i>L. vannamei</i> (◯M1 y ■M2). (*)Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas (p<0.05) entre módulos (M1 y M2).....	67
Fig. 8.12. Variación promedio de la concentración del nitrógeno inorgánico disuelto (± desviación estándar) de cada módulo a lo largo del ciclo de camarón <i>L. vannamei</i> (◯M1 y ■M2). (*)Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas (p<0.05) entre módulos (M1 y M2).	69
Fig. 8.13. Características externas del camarón <i>L. vannamei</i> a lo largo del cultivo. A) Camarón aparentemente sano; B) camarón con antenas rojas, cutícula suave y delgada con músculo flácido; C) camarón con opacidad en tercero, cuarto y quinto segmento abdominal; D) camarón con opacidad muscular, expansión de los cromatóforos, antenas rojas, necrosis multifocal en todos los segmentos abdominales y pleópodos amarillentos.	73
Fig. 8.14. Análisis en fresco de <i>L. vannamei</i> presentando A) branquias normales con objetivo de 10x; B) presencia de materia orgánica multifocal (flechas) con objetivo de 10x; C) presencia de materia	

orgánica (1), fitoplancton (2) y melanización multifocal (3) con objetivo de 4x; D) melanización multifocal (flechas) en dendobranquias con objetivo de 40x.....	74
Fig. 8.15. Montaje en fresco de hepatopáncreas de <i>L. vannamei</i> A y C) hepatopáncreas con túbulos normales; B) túbulos con deformaciones tubulares (flechas) GS2; y D) túbulos vacíos y deformaciones (flechas) GS4.....	76
Fig. 8.16. Características a) internas y b) externas del camarón blanco <i>L. vannamei</i> muestreados en M1 a lo largo del ciclo de cultivo.	77
Fig. 8.17. Características a) internas y b) externas del camarón blanco <i>L. vannamei</i> muestreados en M2 a lo largo del ciclo de cultivo.	77
Fig. 8.18. Corte histológico de glándula antenal de <i>L. vannamei</i> en M1: A) túbulos normales donde las células epiteliales contienen un núcleo medial (Nuc) y un nucléolo bien definido (Nuu) y rodean el lumen (Lum), alrededor de estos túbulos se tiene a los senos de hemolinfa (Sin), los cuales contienen hemocitos (Hem); B) glándula antenal con pérdida de la estructura (flecha) e infiltración de hemolinfa. Tinción H&E. Objetivo 40x.	80
Fig. 8.19. Corte histológico de glándula antenal de <i>L. vannamei</i> en M2. A) túbulos normales donde las células epiteliales contienen un núcleo medial (Nuc) y un nucléolo bien definido (Nuu) y rodean el lumen (Lum), alrededor de estos túbulos se tiene a los senos de hemolinfa (Sin), los cuales contienen hemocitos (Hem); B) glándula antenal con pérdida de la estructura y nódulo hemocítico melanizado. Tinción H&E. Objetivo 40x.	81
Fig. 8.20. Corte histológico de la glándula antenal de <i>L. vannamei</i> . A) Órgano normal del tratamiento control; B) T1 con deformación	

de la estructura y edema; C) T2 con pérdida de la estructura normal; y D) T3 con deformación de la estructura (1), edema (2) e infiltración de hemolinfa dentro del lumen con melanización (3 y 4). Tinción H&E. Objetivo 40x..... 82

Fig. 8.21. Corte histológico de órgano linfoide de *L. vannamei* en M1: A) túbulos normales con lumen simple y una matriz estromal de células y B) pérdida de la estructura normal con infiltración de hemolinfa (1), formación de esferoides (2) y vacuolizaciones. Tinción H&E. Objetivo 40x..... 85

Fig. 8.22. Corte histológico de órgano linfoide de *L. vannamei* en M2: A) túbulos normales con lumen simple y una matriz estromal de células; B) pérdida de la estructura con formación de esferoides (1) y vacuolizaciones (2). Tinción H&E. Objetivo 40x..... 86

Fig. 8.23. Corte histológico del órgano linfoide de *L. vannamei*. A) Órgano normal del tratamiento control; B) T1 con deformación de la estructura (1), y presencia de vacuolas (2); C) T2 con pérdida de la estructura normal (1), infiltración de hemolinfa (2), formación de esferoides (3) y presencia de vacuolas (4); y D) T3 con deformación de la estructura (1), infiltración de hemolinfa (2), formación de esferoides (3) y presencia de vacuolas (4). Tinción H&E. Objetivo 40x..... 87

Fig. 8.24. Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei* de M1 con: A) órgano normal donde se muestran túbulos normales que tienen forma de estrella rodeando al lumen, éstos deben de tener las células E (embrionarias), F (fibrilares), R (reabsortivas o de reserva), B (secretoras o globulares) y M (basales); y B) nódulos hemocíticos (flechas) con aglomerados de

bacterias en el centro, infiltración de hemocitos y desprendimiento celular. Tinción H&E. Objetivo 40x..... 92

Fig. 8.25. Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei* de M2 con: A) órgano normal donde se muestran túbulos normales que tienen forma de estrella rodeando al lumen, éstos deben de tener las células E (embrionarias), F (fibrilares), R (reabsortivas o de reserva), B (secretoras o globulares) y M (basales); y B) hepatopáncreas con nódulos hemocíticos con (1) y sin melanización (2), encapsulaciones (3), atrofia tubular (4), desprendimiento celular (5), infiltración hemocítica, y de hemolinfa (6). Tinción H&E. Objetivo 10x..... 93

Fig. 8.26. Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei*. A) Control con túbulos normales; B) T1 con cápsula, atrofia, infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas); C) T2 presenta atrofia, desprendimiento celular, infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas); y D) T3 muestra nódulo hemocítico e infiltración hemocítica (flechas). Tinción H&E. Objetivo 10x. 94

Fig. 8.27. Corte histológico de corazón de *L. vannamei* en M1. A) Corazón normal, donde se encuentra formado por células miocárdicas (Myo) dispuestas en bandas, las cuales están organizadas en manojos o haces distintivos tales como el muscularis frontalis (Msf), el arreglo en haces del miocardio da como resultado que el lumen (Lum) del corazón esté subdividido en subcámaras; B) corazón con pérdida de la estructura normal e infiltración hemocítica (flecha). Tinción H&E. Objetivo 4x..... 98

Fig. 8.28. A) Corte histológico de corazón de *L. vannamei* en M2. A) Corazón normal, donde se encuentra formado por células miocárdicas (Myo) dispuestas en bandas, las cuales están

organizadas en manojos o haces distintivos tales como el muscularis frontalis (Msf), el arreglo en haces del miocardio da como resultado que el lumen (Lum) del corazón esté subdividido en subcámaras; B) corazón con pérdida de la estructura normal e infiltración de hemolinfa severa (flecha).

Tinción H&E. Objetivo 4x..... 99

Fig. 8.29. Corte histológico del corazón de *L. vannamei*. A) Control con tejido normal; B) T1 con pérdida de la estructura normal, infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas); C) T2 con pérdida de la estructura normal e infiltración de hemolinfa (flechas); y D) T3 con infiltración hemocítica y de hemolinfa y pérdida de la estructura normal (flechas). Tinción H&E. Objetivo 4x..... 100

Fig. 8.30. Corte histológico de intestino de *L. vannamei* de M1. A) Intestino normal que muestra epitelio columnar simple (Epm), soportado por capas de tejido muscular circular (Msx) y longitudinal (Msl); y B) intestino posterior con enteritis hemocítica (flecha). Tinción H&E. Objetivo 10x..... 103

Fig. 8.31. Corte histológico de intestino de *L. vannamei* de M2. A) Intestino normal que muestra epitelio columnar simple (Epm), soportado por capas de tejido muscular circular (Msx) y longitudinal (Msl); y B) intestino con enteritis hemocítica severa (flecha). Tinción H&E. Objetivo 10x..... 104

Fig. 8.32. Corte histológico del intestino de *L. vannamei*. A) Control con tejido normal; B) T1, C) T2 y D) T3 con enteritis hemocítica (flecha). Tinción H&E. Objetivo 10x..... 105

Fig. 8.33. A) Corte histológico de filamentos branquiales secundarios normales, cada filamento contiene un vaso eferente (ef), tiene

espacios interconectados o lacunae (lac), por donde se mueve la hemolinfa y los extremos distales (dis) de los filamentos contienen lacunae agrandados; B) filamentos branquiales con edema (1), infiltración hemocítica (2) y de hemolinfa (3) además de núcleos picnóticos (4) de *L. vannamei* de M1. Tinción H&E. Objetivo 40x..... 108

Fig. 8.34. A) Corte histológico de filamentos branquiales secundarios normales, cada filamento contiene un vaso eferente (ef), tiene espacios interconectados o lacunae (lac), por donde se mueve la hemolinfa y los extremos distales (dis) de los filamentos contienen lacunae agrandados; B) branquias con edema, presencia de materia orgánica, fitoplancton, *Zoothamnium sp.* (1) y *Leucothrix mucor* (2) de *L. vannamei* de M2. Tinción H&E. Objetivo 40x..... 109

Fig. 8.35. Corte histológico de branquias de *L. vannamei*. A) Control con dendobranquias normales; B) T1 con melanización multifocal, branquias edematosas, infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas); C) T2 con branquias edematosas y con infiltración de hemolinfa (flechas); y D) T3 con melanización multifocal, branquias edematosas e infiltración de hemolinfa (flechas). Tinción H&E. Objetivo 40x..... 111

Fig. 8.36. Corte histológico de ciego hepático anterior de *L. vannamei* de M1 donde se observa: A) estructura normal siendo un saco ciego con pliegues epiteliales (Eec) grandes y distintivos que se proyectan dentro del lumen del ciego (Luc); y B) deformación de la estructura, infiltración hemocítica (1) y presencia de vacuolas (2). Tinción H&E. Objetivo 10x. 114

Fig. 8.37. Corte histológico de ciego hepático anterior de <i>L. vannamei</i> de M2, donde se observa: A) estructura normal siendo un saco ciego con pliegues epiteliales (Eec) grandes y distintivos que se proyectan dentro del lumen del ciego (Luc) y B) desaparición de los pliegues epiteliales dejando un gran espacio. Tinción H&E. Objetivo 4x.....	115
Fig. 8.38. Corte histológico de ciego hepático anterior de <i>L. vannamei</i> . A) Control con ciego hepático normal; B) T1 y C) T2 con pérdida de la estructura normal; D) T3 con pérdida de la estructura normal e infiltración hemocítica (flecha). Tinción H&E. Objetivo 10x.....	116
Fig. 8.39. A) Corte histológico de <i>L. vannamei</i> de M1 de músculo normal; B) necrosis muscular (flechas). Tinción H&E. Objetivo 40x.	118
Fig. 8.40. A) Corte histológico de <i>L. vannamei</i> de M2 de músculo normal; B) infiltración hemocítica severa (1) y necrosis muscular (2). Tinción H&E. Objetivo 40x.....	119
Fig. 8.41. A) Corte histológico de <i>L. vannamei</i> de músculo normal del tratamiento control; B) T1 con necrosis e infiltración hemocítica (flechas), C) T2 infiltración hemocítica y necrosis (flechas); D) T3 con necrosis e infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas). Tinción H&E. Objetivo 10x.....	120
Fig. 8.42. Prevalencias de los órganos y tejidos de a) hepatopáncreas (HP); b) glándula antenal (GA); c) Intestino (Int); d) órgano linfoide (OL); e) branquias (Brq); f) corazón (Crz); g) ciegos hepáticos (CH); h) músculo (Msc) del camarón (<i>L. vannamei</i>) a baja salinidad (1.9 g/L); i) concentraciones de nitritos+nitratos y amonio para cada módulo (M1 y M2) a lo largo del ciclo de cultivo experimental.	123

Fig. 8.43. Prevalencias en porcentaje de los diferentes órganos y tejidos de <i>L. vannamei</i> exponiéndolo a diferentes concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- en agua de baja salinidad (1.9 g/L) en un período de 240 h (T1= 4mg/L N- NH_4^+ y 1 mg/L N- NO_2^- ; T2= 8 mg/L N- NH_4^+ y 1.5 mg/L N- NO_2^- ; T3= 13 mg/L N- NH_4^+).	125
Fig. 8.44. Porcentajes de estadio de muda de los organismos analizados en el control del experimento (n=14), y en los módulos M1 (n=12) y M2 (n=12) del cultivo de camarón en las semanas 5 y 6.	132
Fig. 11.1. Diagrama de flujo de la técnica de tinción Hematoxilina (Harris) y Eosina-Floxina.	185

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la relación entre los niveles de los compuestos nitrogenados en el agua y la presencia de daños y/o alteraciones en órganos y tejidos del camarón en ambiente de baja salinidad (1.9 g/L). El diseño experimental consistió en realizar un cultivo de camarón y un bioensayo de confirmación para contrastar los efectos del nitrógeno. El cultivo intensivo consistió en 2 módulos experimentales con diferentes densidades (M1=70 PL/m² y M2=120 PL/m²). El peso promedio del camarón cosechado fue de 5.9±0.3 y 5.5±0.7g, la supervivencia de 87.7±3.5 y 11.9±1.6%, la tasa de crecimiento específica de 7.3±0.1 y 7.6±0.2%/día, el rendimiento de 1.4±0.3 y 0.1±0.02 ton/ha y el factor de conversión alimenticia de 1.5±0.3 para M1 y M2, respectivamente. Las variables fisicoquímicas monitoreadas fueron las óptimas para el cultivo. En la calidad de agua, en M1 las concentraciones de los compuestos de nitrógeno se mantuvieron estables, mientras que en M2 el amonio alcanzó una concentración promedio de 13.1 mg/L de N-NH₄⁺ que se considera tóxico para el organismo.

El análisis en fresco mostró melanización multifocal, coloración rojiza en apéndices, flacidez y opacidad muscular en ambos módulos (M1 y M2). En histología, los mayores daños en M1 y M2 se presentaron en hepatopáncreas, glándula antenal, intestino, órgano linfoide, y branquias; en el bioensayo de confirmación los mayores daños se presentaron en hepatopáncreas, glándula antenal, branquias y órgano linfoide. Se demostró que los daños provocados por los compuestos nitrogenados en el cultivo de camarón se asociaron significativamente ($p < 0.05$) a hepatopáncreas, glándula antenal, corazón y músculo. Se concluye que conforme se desarrolla el ciclo de cultivo, los compuestos nitrogenados tienden a aumentar con los demás factores del cultivo (alimento no consumido, heces, proliferación de fitoplancton y bacterias), por lo que aumentan la prevalencia de los daños en los tejidos del camarón.

ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the relationship between nitrogen compounds and damages and/or alterations in shrimp tissues under low salinity conditions (1.9 g/L). The experimental design consisted of shrimp culture and confirmation bioassay to contrast the nitrogen effects. Intensive shrimp culture was performed in two modules with different densities (M1=70 PL/m² y M2=120 PL/m²). The final mean weight harvested shrimp was 5.9±0.3 and 5.5±0.7 g; the survival was 87.7±3.5 and 11.9±1.6%; the yield was 1.4±0.3 and 0.1±0.02 ton/ha; and the feeding conversion rate was 1.5±0.3 for M1 and M2, respectively. Physical-chemicals variables monitored in water of shrimp tanks were the optimal for culture. In water quality, M1 had stable levels of nitrogen compounds; meanwhile, in M2 ammonia reached a mean concentration of 13.1 mg/L of N-NH₄⁺ that is toxic for organisms.

Fresh analysis shows multifocal melanization, reddish appendages, muscle flaccidity and opacity in both modules (M1 and M2). The histology analysis revealed the most damages for M1 and M2 was in hepatopancreas, antennal gland, lymphoid organ, midgut and gills. In the confirmation bioassay the most damages were in hepatopancreas, antennal gland, gills and lymphoid organ. The damage caused by nitrogen compounds in shrimp farming were significantly associated ($p < 0.05$) to hepatopancreas, antennal gland, heart and muscle. It is concluded that as the growing season is developed, the nitrogen compounds tend to increase with culture factors involved (uneaten food, feces, bacteria and phytoplankton blooms) and increase the prevalence of damages in shrimp tissues.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una industria que se ha convertido en una de las alternativas con mayor viabilidad económica para la producción de alimento, apoyándose en técnicas y procesos sobre los cuales se cultivan organismos acuáticos en condiciones controladas (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004; Montemayor-Leal *et al.*, 2005). De acuerdo a la FAO, los camarones peneidos son las principales especies de crustáceos cultivadas en el mundo por lo que constituyen una importante fuente de recursos económicos para muchos países (FAO, 2013).

La práctica de cultivo de camarón con aguas de baja salinidad está incrementándose a nivel mundial. El desarrollo de cultivos epicontinentales de camarón en agua de baja salinidad se considera una alternativa con mayor viabilidad contra la contaminación costera (Saoud *et al.*, 2003; Martínez-Córdova *et al.*, 2009), además de otras razones, como viene a ser el hecho de contrarrestar el efecto de las enfermedades virales, aprovechar grandes extensiones de terrenos con aguas salinas, que no pueden ser utilizados para la agricultura tradicional, y para compensar la carencia de tierras disponibles para la instalación de granjas en la zona costera (Páez-Osuna y Valencia-Castañeda, 2013). El cultivo de camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* en aguas epicontinentales se está extendiendo con rapidez en el continente americano. Esta variación en el cultivo permite desarrollar esta actividad en tanques a diferentes densidades y a diferentes salinidades aprovechando su capacidad eurihalina por lo que es factible su cultivo en zonas donde la fuente de abastecimiento de agua es baja en sales (Roy *et al.*, 2007; Esparza-Leal *et al.*, 2010).

Este tipo de cultivo ha sido establecido en varios países, entre ellos se encuentran EUA, Tailandia, Ecuador, Israel, China y México (Boyd, 2001; Samocha *et al.*, 2001; Saoud *et al.*, 2003). En México, se tiene que en Baja

California, Sinaloa, Jalisco y Colima, se cuenta con la tecnología disponible y la experiencia que les permite producir camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* en sistemas intensivos en agua a muy baja salinidad (~0.4-1.0 g/L), alcanzando rendimientos cercanos a 10 toneladas por hectárea (Angulo *et al.*, 2005).

Sin embargo, este tipo de cultivos de camarón a baja salinidad al igual que los cultivos tradicionales con aguas salobres o marinas, tienen sus problemas asociados con las enfermedades, los cuales tienen un efecto directo en la producción, eficiencia de alimentación y crecimiento que pueden limitar el desarrollo del cultivo (Fegan, 2001; Molina-Aja *et al.*, 2002). Muchos de estos problemas son producto de una mala planeación y un diseño inapropiado de las unidades de producción, aunado a prácticas incorrectas en la producción que derivan en problemas de inocuidad, salud animal e impacto ambiental (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

Las enfermedades constituyen el principal obstáculo para el crecimiento y desarrollo sostenible de la industria acuícola del camarón y han causado enormes pérdidas; éstas son causadas por agentes infecciosos, como virus, bacterias, hongos y parásitos. Dichas enfermedades ocurren cuando tres factores se dan de forma simultánea, la presencia del patógeno, las condiciones ambientales y el huésped, conocido como la triada epidemiológica (Fig. 1.1). Mientras no se presente algún factor condicionante o desencadenante, la relación en la triada tiende a guardar el equilibrio (Lightner y McVey, 1993; Rodríguez, 2013).

Cuando se rompe el equilibrio entre el agente, el hospedero y el ambiente a consecuencia del estímulo, el organismo es invadido por el agente patógeno estableciéndose la infección e iniciándose así el período patogénico. El agente pasa por una fase de adaptación y multiplicación en los tejidos blancos, ocasionando cambios patológicos a nivel celular, que tiempo después alterará órganos y tejidos. Al momento en que se establece la infección y el agente

empieza a multiplicarse, el organismo reacciona con mecanismos de defensa inespecíficos y específicos de inmunidad humoral y celular, que dependiendo de las circunstancias del hospedero, el agente y el medio, pueden llegar a recuperar al individuo. El tiempo que transcurre desde que ocurrió el estímulo y se estableció la infección hasta que aparecen los primeros signos se le denomina período de incubación. Siguiendo el curso natural de la enfermedad, los signos van siendo más severos hasta llegar a la postración, incapacidad, agonía y muerte del individuo, a menos que en algún momento de la infección la respuesta del hospedero haya sido efectiva y el proceso infeccioso se interrumpa y se presente la recuperación y convalecencia (Rosales-Ortega, 2012).

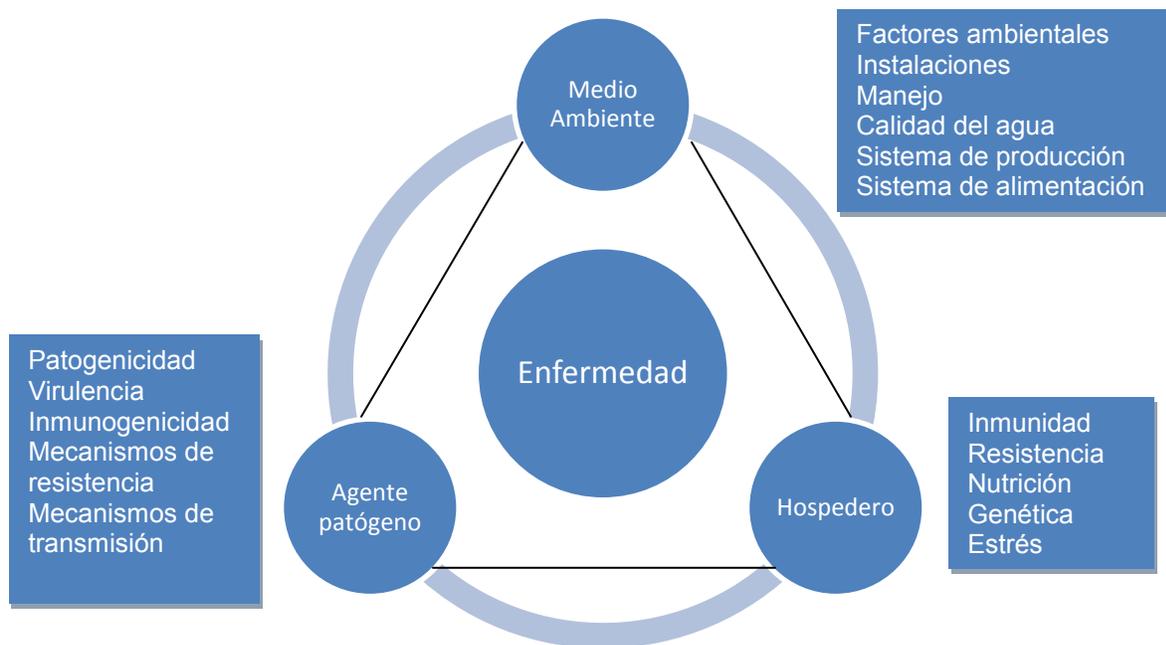


Fig. 1.1. Elementos de la triada epidemiológica (tomado de Rosales-Ortega, 2012).

La gravedad de la infección dependerá del nivel de incidencia, la prevalencia, el tipo de patógeno, de su virulencia, de su patogenicidad, de la especie cultivada, de la genética de la especie (ciclo cerrado o especies) y del

nivel de estrés de los camarones al momento de estar expuestos al patógeno. El estrés que da como resultado la pérdida de apetito, crecimiento lento y susceptibilidad a las enfermedades está asociado con la calidad del agua, el tipo de alimentación, la densidad de siembra, la variación drástica en los parámetros fisicoquímicos, como oxígeno disuelto, temperatura, salinidad, pH, entre otras cosas, así como por las prácticas de manejo (Morales-Covarrubias, 2010).

La calidad del agua es alterada principalmente por las grandes cantidades de alimento balanceado y de fertilizantes adicionados (Cho *et al.* 1994; Boyd y Tucker, 1998; Ponce-Palafox, *et al.*, 2005; Morales-Covarrubias, 2010). Los excesos de tales sustancias principalmente como nutrientes en forma de nitrógeno y fósforo, respecto a la capacidad asimilativa de los estanques de cultivo, disminuyen la calidad de agua durante el cultivo a través de la acumulación de nitrógeno inorgánico disuelto, los cuales son tóxicos para la biota y pueden causar altas mortalidades, por lo cual se utiliza el recambio de agua para proveer de óptimas condiciones en los camarones cultivados (Saldias, 2001; Páez-Osuna, 2001).

El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en los estanques, se encuentra bajo la forma principal de amonio, nitritos y nitratos. La suma de éstos se le denomina como nitrógeno inorgánico disuelto o nitrógeno total inorgánico. Estos productos se convierten a través del ciclo natural del nitrógeno (Fig. 1.2), y la presencia o abundancia de sus diferentes formas químicas son afectadas por el pH, oxígeno disuelto y los organismos que consumen y producen ciertas formas de nitrógeno. Además, el agua, el alimento suministrado y los fertilizantes, constituyen fuentes adicionales de nitrógeno, sumado a la fijación de éste por el fitoplancton y las bacterias. Como se menciona anteriormente, el nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para los seres vivos y uno de los elementos clave que limitan los cultivos acuícolas, además juega un

papel importante en la dinámica de los sistemas de acuicultura debido a los 2 roles en que actúa, por un lado como nutriente para los fotótrofos y como tóxico para los heterótrofos (Burford y Lorenzen, 2004; Páez-Osuna *et al.*, 2007).

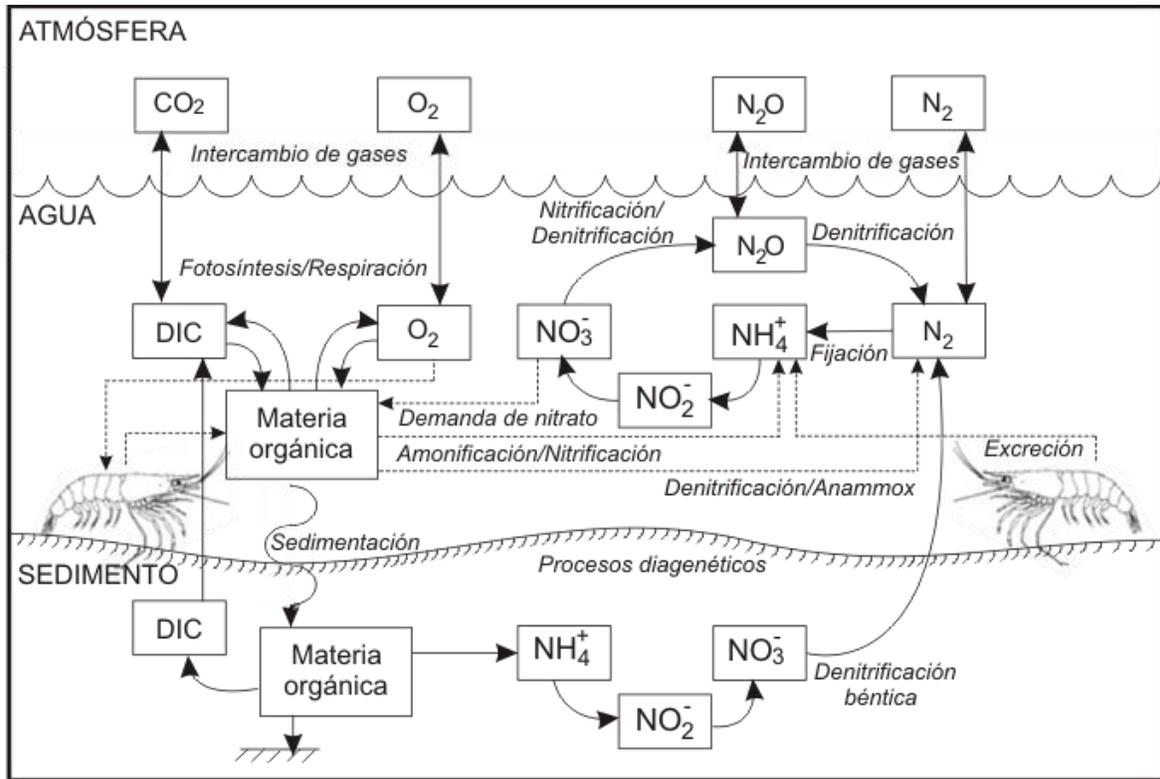


Fig. 1.2. Diagrama del ciclo del nitrógeno en un estanque de cultivo de camarón (modificado de Gruber, 2008).

En el presente proyecto se desarrolló un experimento de cultivo de camarón a baja salinidad (1.9 g/L) utilizando dos densidades de siembra (70 y 120 PL/m²) con cero recambio (con sólo la reposición de niveles) para observar a través del ciclo de cultivo la salud de los organismos con respecto a la calidad del agua y describir los daños causados en órganos y tejidos por medio del análisis histológico, realizando un bioensayo con las concentraciones de nitrógeno del cultivo donde se observó daños en órganos y tejidos y mortandad de los organismos, para comparar los daños ocasionados por las concentraciones de nitrógeno con respecto al cultivo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del camarón

El camarón blanco (*L. vannamei*) es un crustáceo decápodo que pertenece a la familia Penaeidae. Está formado por un cefalotórax y un abdomen constituidos por órganos y tejidos (Fig. 2.1), los cuales cumplen con diferentes funciones biológicas (Morales-Covarrubias, 2010), que se explicarán a detalle más adelante (Tabla 1). Posee una gran tolerancia a factores ambientales para soportar un intervalo de salinidad entre 0.5 y 45 g/L; particularmente, crece muy bien a densidades de siembra por encima de 50 org/m² en ambientes con salinidades entre los 15 y 25 g/L donde el medio acuático y la hemolinfa son iso-osmóticos (Wyban y Sweeny, 1991; McGraw *et al.*, 2002). Tal rango de tolerancia la convierte en una especie candidata para el cultivo epicontinental donde esta estrategia en particular, se encuentra en expansión en muchos países del mundo (Saoud *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2009; Godínez-Siordia *et al.*, 2011).

2.2 Anatomía general

El camarón *L. vannamei* está dividido en 2 regiones, el cefalotórax formado por la fusión de cinco segmentos cefalales y ocho segmentos torácicos, en esta región se encuentran la mayoría de los órganos vitales del camarón y son enfoque de este estudio (glándula antenal, órgano linfoide, hepatopáncreas, corazón, ciego hepático anterior y branquias), y el abdomen constituido por seis segmentos distintos donde se puede observar el intestino y músculo. La superficie externa y apéndices están cubiertos por un exoesqueleto, el cual requiere de mudas periódicas para su crecimiento, una serie de procesos denominado ciclo de muda.

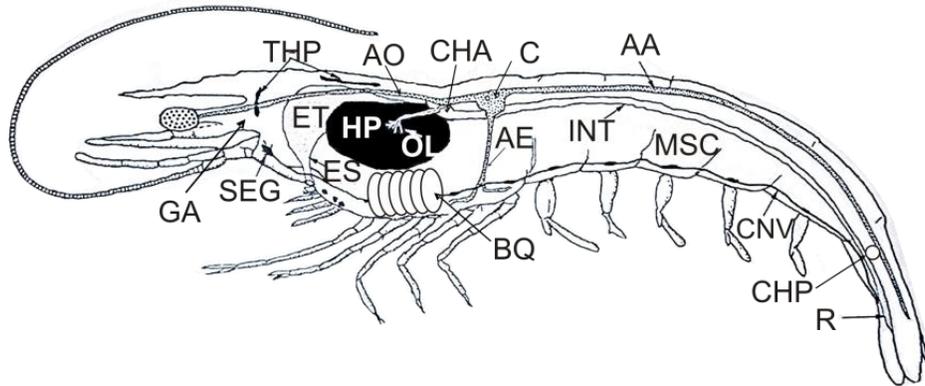


Fig. 2.1. Anatomía interna del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) mostrando esófago (ES), estómago (ET), hepatopáncreas (HP), intestino (INT), ciego hepático anterior (CHA), ciego hepático posterior (CHP), recto (R), corazón (C), arteria oftálmica (AO), arteria esternal (AE), arteria abdominal (AA), órgano linfóide (OL), cordón nervioso ventral (CNV), ganglio supraesofágico (SEG), tejido hematopoyético (THP), glándula antenal (GA), branquias (BQ) y músculo (MSC) (Modificado de Alday-Sanz, 2010).

De manera externa, el color del camarón es controlado por la actividad de los cromatóforos en el epitelio. Estas células tienen varios procesos que irradian desde la región nuclear y contienen uno o más gránulos de pigmento. Los melanóforos tienen gránulos predominantemente negro, los leucóforos contienen gránulos blancos, eritróforos constituyen el rojo y los xantóforos tienen gránulos de color amarillo. Los gránulos son dispersados a través de la célula para mostrar al máximo su color o se concentra para minimizarlo. El movimiento de los gránulos de pigmento son controlados por la actividad hormonal del seno glandular o del sistema nervioso central anterior (Huberman, 2000; Fanjul-Moles, 2006; Alday-Sanz, 2010). En la Fig. 2.1 se observan todos los órganos y tejidos que conforman el camarón *L. vannamei*, así como las funciones de los órganos principales de interés en este estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Funciones principales de los órganos y tejidos del camarón blanco (modificado de Morales-Covarrubias, 2010).

Órgano/tejido	Función
Antenas	Sensores táctiles (detección de depredadores)
Anténulas	Quimiorreceptores
Branquias	Respiración, excreción, osmoregulación y fagocitosis
Ciegos hepáticos	Secretor de jugos gástricos y absorción de nutrientes
Corazón	Bombea e irriga hemolinfa, transporte de hemocitos
Exoesqueleto	Soporte y barrera protectora
Glándula antenal	Excreción y mantenimiento del balance osmótico
Hepatopáncreas	Digestión, absorción de nutrientes y almacén de energía
Intestino (boca, esófago y estómago)	Captura, proceso de masticar y almacenamiento temporal del alimento
Intestino medio	Absorción y excreción del alimento
Mandíbulas, palpo mandibular y escafognatito	Sensores táctiles, para tomar partículas de alimento y movimiento de agua sobre las branquias
Músculo abdominal estriado	Contracciones rápidas para escapar de los depredadores
Órgano linfoide	Encapsulación y fagocitador de antígenos
Pereiópodos y pleópodos	Locomoción y quimiorrecepción

2.3. Cultivos de camarón a baja salinidad

El cultivo de camarón intensivo se ha limitado a zonas relativamente estrechas de tierra a lo largo de las costas de los países tropicales y subtropicales en desarrollo, debido a la necesidad de grandes volúmenes de agua salada para el intercambio de agua durante el período de cultivo. Los acontecimientos recientes en Tailandia sugieren, que esta asociación cultivo de camarón-región tropical y subtropical, podría quedar pronto en el pasado, ya que un gran

número de agricultores tailandeses están adoptando el cultivo a baja salinidad. Este desarrollo aumenta en gran medida el potencial para el establecimiento de cultivo de camarón mucho más lejos de la costa de lo que se creía posible. Por otro lado, la migración de la camaronicultura intensiva en ambientes de agua dulce, plantea graves preocupaciones sobre la eliminación de los efluentes de los estanques y el impacto de la intrusión de agua salada en los alrededores de las actividades agrícolas (Flaherty y Vandergeest, 1998).

En México, el método de cultivo de camarón a baja salinidad comienza a difundirse, no sólo por la posibilidad de lograr el cultivo fuera de lagunas costeras o tierra adentro, sino también por la posibilidad de mantener al cultivo libre de enfermedades ya que se piensa que las condiciones de cultivo en agua dulce disminuyen el riesgo de aparición de enfermedades (Olivas-Valdéz *et al.*, 2003; Zarain-Herzberg, 2003). Sin embargo, en el trabajo de Godínez-Siordia (2012) comprueban que las bajas salinidades utilizadas en cultivos de camarón, no constituyen factores limitantes para 4 tipos de virus (IHHNV, TSV, WSSV e IMNV) que ocasionan fuertes impactos negativos y no discriminan casi a ninguna especie de crustáceo comercial como son el camarón blanco (*L. vannamei*, Boone, 1931), camarón azul (*L. stylirostris*, Stimpson, 1874), camarón blanco del Sur (*L. schmitti*, Burkenroad, 1936), camarón blanco del Norte (*L. setiferus*, Linnaeus, 1767) y camarón tigre gigante (*P. monodon*, Fabricus, 1798); de manera que la condición hipohalina parece no resultar eficaz.

Tabla 2. Datos de producción de cultivos de camarón (*L. vannamei* y *L. monodon*) realizados a nivel laboratorio o piloto y en estanques comerciales a baja salinidad y diferentes densidades de siembra.

Especie	Salinidad (g/L)	Densidad (org/m ²)	Rendimiento (ton/ha)	Supervivencia (%)	FCA	Duración (días)	Talla (g)	Crecimiento (g/semana)	Referencia
Experimentos en laboratorio o nivel piloto									
<i>L. vannamei</i>	0.64	90	7.80	76.1	-	203	11.4	0.38	Araneda <i>et al.</i> (2008)
<i>L. vannamei</i>	0.64	130	9.10	68.9	-	203	10.2	0.34	Araneda <i>et al.</i> (2008)
<i>L. vannamei</i>	0.64	180	11.70	65.9	-	203	9.9	0.33	Araneda <i>et al.</i> (2008)
<i>L. vannamei</i>	0.9	50	3.90	56.3	1.6	120	14	0.73	Mariscal-Lagarda <i>et al.</i> (2012)
<i>L. vannamei</i>	1.0	50	3.30	82.5	-	84	8.1	0.70	Esparza-Leal <i>et al.</i> (2010)
<i>L. vannamei</i>	1.8	13	1.30	61.5	-	77	15.6	1.41	Meraz-Bautista (2008)
<i>L. vannamei</i>	1.8	132	8.1	61.5	2.1	114	9.9	0.61	Buitimea-Duarte (2012)
<i>L. vannamei</i>	1.9	75	6.10	90.1	1.6	120	9.1	0.54	Alarcón-Silva (2013)
<i>L. vannamei</i>	2.0	56	-	99.0	-	32	3.9	-	Pérez-Velázquez <i>et al.</i> (2007)
<i>L. vannamei</i>	1.9	70	1.37	87.7	1.51	72	5.9	0.53	Este estudio
<i>L. vannamei</i>	1.9	120	0.10	11.9	29.8	69	5.5	0.50	Este estudio
Cultivos en estanques comerciales									
<i>L. vannamei</i>	0.5-7.0	60	2.90	68.4	1.4	210	11.2	0.37	Wudtisin y Boyd (2011) ^a
<i>L. vannamei</i>	0.5-7.0	65	2.30	56.9	1.9	210	8.7	0.29	Wudtisin y Boyd (2011) ^a
<i>L. vannamei</i>	0.7	39	3.50	47.0	3	112	19.3	1.30	Green(2008) ^b
<i>L. vannamei</i>	0.7	23	0.98	82.3	1.9	55	5.5	0.90	Green(2008) ^b
<i>L. vannamei</i>	0.7	28	2.40	99.2	1.2	65	9	1.30	Green(2008) ^b
<i>L. vannamei</i>	1.8	13	1.24	61.5	1	77	15.6	1.42	Mariscal-Lagarda <i>et al.</i> (2010) ^c
<i>L. vannamei</i>	2.0	100	13.40	69.0	2.3	53	9.9	1.26	Sowers y Tomasso (2006) ^d
<i>L. vannamei</i>	2.0	28	5.16	98.8	-	77	19	1.67	Samocha <i>et al.</i> (1998) ^e
<i>L. vannamei</i>	2.2	346	10.30	86.1	2.1	107	14.7	1.03	Samocha <i>et al.</i> (2004) ^f
<i>L. vannamei</i>	2.2	91	11.10	66.9	2.7	100	18.5	1.36	Samocha <i>et al.</i> (2004) ^f
<i>L. monodon</i>	2.9	42	4.22	38.0	2.7	104	26.5	1.80	Collins <i>et al.</i> (2005) ^g
<i>L. monodon</i>	2.9	23	2.97	63.0	1.9	98	20.4	1.40	Collins <i>et al.</i> (2005) ^g
<i>L. vannamei</i>	4.0	28	5.24	98.8	-	77	19.3	1.70	Samocha <i>et al.</i> (1998) ^e

^aTailandia; ^bArkansas, EUA; ^cSonora, México; ^dTexas, EUA; ^eTexas, EUA ; ^fArizona, EUA; ^gQueensland, Australia

Existen diversos tipos de estudio de los cultivos de camarón en aguas de baja salinidad o en agua dulce; están por un lado, aquellos que se realizan experimentalmente en laboratorios o a nivel piloto para estudiar la calidad del agua, las variables biológicas, rendimiento, producción, supervivencia, etc. (Pérez-Velázquez *et al.*, 2007; Araneda *et al.*, 2008; Meraz-Bautista, 2008; Esparza-Leal *et al.*, 2010; Mariscal-Lagarda *et al.*, 2010, 2012) (Tabla 2).

Por otro lado, están aquellos estudios realizados en las granjas utilizando estanques de cultivo comercial y en donde se persiguen los mismos objetivos mencionados (Samocha *et al.*, 1998, 2004; Collins *et al.*, 2005; Sowers y Tomasso, 2006; Arzola-González *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2009; Roy y Davis, 2010; Miranda *et al.*, 2010; Valenzuela-Quiñonez *et al.*, 2010; Godínez-Siordia *et al.*, 2011; Wudtisin y Boyd, 2011; Prapaiwong y Boyd, 2012).

2.4. Calidad de agua en cultivos de baja salinidad

La calidad del agua determina la capacidad del ambiente que influye directamente en la vida del organismo, por lo que la producción y rendimiento de los cultivos están estrechamente ligados con la calidad del agua (Páez-Osuna y Valencia-Castañeda, 2013). De acuerdo con Páez-Osuna *et al.* (2001) los estudios de calidad de agua tienen dos puntos de partida (Tabla 3): el primero, que considera las variables o parámetros conservativos independientes de la actividad biológica, que son afectados por los procesos físicos como: temperatura, radiación solar, viento, precipitación, evaporación, luz, salinidad, alcalinidad, entre otros, y el segundo, que se refiere a los parámetros no conservativos que se alteran por la actividad biológica como: nutrientes (nitrógeno y fósforo), productividad natural, oxígeno disuelto y sólidos suspendidos totales, entre otros.

En los siguientes estudios se presentan aquellos autores que evaluaron algunas de las variables de calidad de agua en cultivos intensivos de camarón

en aguas de baja salinidad, entre ellos se encuentran el de Valenzuela- Quiñonez *et al.* (2010) quienes evaluaron el potencial de diferentes fuentes de agua subterránea de baja salinidad para cultivar camarón blanco comparándolo con un cultivo de agua de mar. Estos autores sembraron 200 org/m². Los promedios de temperatura, oxígeno disuelto y pH fueron de 26°C, 5.9 mg/L y 8.0, respectivamente. Las variaciones en las concentraciones de los nutrientes fueron: 0.26-0.31 mg/L N-TAN, 0.28-0.32 mg/L N-NO₂⁻, 0.73-0.77 mg/L N-NO₃⁻. De acuerdo a dichos resultados, concluyen que es factible la realización de este tipo de cultivos con el fin de incrementar el nivel de vida de poblaciones con alta marginación.

Tabla 3. Variables que influyen en el éxito de la operación de los cultivos acuícolas

Conjunto de variables físicas, químicas y biológicas	
Parámetros físicos:	Temperatura, salinidad, sólidos, color, luz
Parámetros químicos:	pH y alcalinidad, nutrientes, gases (O ₂ , N ₂ , CO ₂ , H ₂ S)
Parámetros biológicos:	Bacterias, virus y hongos

Mariscal-Lagarda *et al.* (2014) realizaron un estudio en un sistema integrado de camarón (*L. vannamei*) y tomate donde evaluaron las variables de calidad de agua y la variación del fitoplancton en el efluente de los tanques de camarón y del agua que retorna del cultivo de tomate, el agua de los efluentes de los tanques de camarón se utilizó para la irrigación de las plantas de tomate. Este cultivo de camarón es intensivo con una salinidad de 0.6 g/L y utilizaron una densidad de siembra de 50 PL/m². Durante el cultivo, las concentraciones de los nutrientes en el agua del efluente de los tanques de camarón fueron de <0.001-0.848 mg/L N-TAN, <0.001-1.45 mg/L N-NO₂⁻ y de 5.2-172.2 mg/L N-NO₃⁻. Siendo evidente la factibilidad del estudio, ya que las variables de calidad de agua fueron moderadamente aceptables a través del cultivo.

2.5. Enfermedades e histología en camarón

Para un mejor entendimiento se debe tener en claro los conceptos de salud y enfermedad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define salud como un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades, y define enfermedad como alteración o desviación del estado fisiológico en una o varias partes del cuerpo, por causas en general conocidas, manifestada por síntomas y signos característicos, y cuya evolución es más o menos previsible.

Olivas y Cásarez (2003) realizaron una evaluación sanitaria en 4 granjas de camarón a baja salinidad en el Valle de Mexicali, Baja California, México. Este estudio se realizó en un ciclo de producción de 130 días. Las granjas utilizaron densidades de siembra desde 10 a 60 org/m² dependiendo si se cuenta o no con aireación suplementaria. La salinidad de cada granja fue 1.1, 1.6, 1.65 y 5.6 g/L, y supervivencia de 74, 26, 45 y 51%, respectivamente. En el análisis sanitario, los organismos presentaron una apariencia exterior con diferentes grados de cobertura branquial, numerosas epifitas, bacterias y protozoarios oportunistas como *Epystilis sp.* y *Leucothrix sp.* adheridas a branquias y apéndices durante todo el ciclo de cultivo, mismas que afectan al camarón cultivado en aguas saladas. Las especies encontradas en los cultivos de baja salinidad se asociaron a mala calidad de agua, especialmente altas concentraciones de materia orgánica y disminución en las concentraciones de oxígeno disuelto. Los problemas que describen estos autores no los asocian con enfermedades virales, si no con epibiontes y agentes oportunistas.

Morales-Covarrubias (2010) menciona que las funciones anatómicas de los camarones pueden ser alteradas por cambios en el entorno y por otros factores estresantes, lo cual hace susceptible al organismo y da origen a la manifestación de enfermedades (triada epidemiológica). Actualmente se han

descrito alrededor de 20 virus que afectan de manera directa o indirecta al camarón (Aguirre y Valle, 2000). De los cuales se considera a TSV (virus del síndrome de Taura), IHNV (virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa), YHV (virus de la cabeza amarilla), IMNV (virus de la mionecrosis infecciosa) y WSSV (virus del síndrome de la mancha blanca), como los de mayor incidencia en el continente Americano y que han ocasionado fuertes impactos sociales además de cuantiosas pérdidas económicas (Lightner, 2011; Godínez-Siordia *et al.*, 2012).

Morales-Covarrubias *et al.* (2011) estudiaron la presencia de enfermedades que afectan a cultivos de camarón blanco (*L. vannamei*) en sistemas semi-intensivos e intensivos de ocho regiones costeras en siete países latinoamericanos, con litoral en el océano Pacífico, mar Caribe y océano Atlántico. Registraron 12 enfermedades con prevalencia variable que en promedio varió de 2.5 a 21.7% y con máximos observados de 40%, siendo en ambos casos la enfermedad de la mancha blanca la que registró los máximos. Estos autores resaltan que en la siembra de camarón es importante el cuidado de la calidad del agua.

Gutiérrez *et al.* (2011) realizaron un estudio donde evaluaron la prevalencia de agentes infecciosos en los sistemas de cultivo de *L. vannamei* (intensivo, semi-intensivo y extensivo) en las granjas ubicadas en Tamaulipas, México. También se analizó la relación estadística entre estos agentes y los parámetros físico-químicos relacionados con el medio acuático durante el verano-otoño de 2008 y la primavera-verano de 2009. En la granja intensiva de este estudio de 80-100 org/m² que utiliza agua del río Tigre, mostró una relación significativa con la turbidez, donde la dependencia de *Nematopsis* sp. con la temperatura fue altamente significativa. Además, se encontró que la bacteria filamentosa *Leucothrix mucor* y el epibionte *Zoothamnium* sp. se encuentran asociados con el exceso de materia orgánica.

3. JUSTIFICACIÓN

La camaronicultura a baja salinidad es una actividad económica redituable que se está llevando a cabo en varios lugares del mundo, pero a su vez es una actividad que requiere de mayor investigación. Uno de los mayores problemas con tal actividad es el brote de enfermedades, las cuales constituyen una amenaza económica, un desafío de gestión para la industria acuícola, así como una afectación para la sanidad y bienestar de los animales acuáticos, el comercio y la salud humana. Entre una de las demandas más importantes en el estudio de las enfermedades del camarón, está la de comprender los factores que influyen su presencia y se examinan realizando un diagnóstico mediante el análisis en fresco e histopatológico. Es importante conocer las enfermedades y los agentes patógenos de mayor incidencia donde se desarrolla esta actividad, así como los factores de estrés que propician o promueven el deterioro de la calidad del agua de los estanques de cultivo de camarón, entre las variables más críticas se encuentran los niveles de concentración de los diferentes compuestos nitrogenados; y de esta manera, se le pueda dar un seguimiento y aplicar métodos de prevención y seguridad apropiados.

4. OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Evaluar la relación entre los niveles de los compuestos nitrogenados en el agua y la presencia de daños y/o alteraciones en órganos y tejidos del camarón en un cultivo intensivo de cero recambio de agua a baja salinidad.

- **Objetivos específicos**

- a) Describir a lo largo del cultivo el comportamiento de las variables de calidad de agua: temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto, medidas diariamente (2 veces por día).
- b) Determinar semanalmente los análisis de las siguientes formas químicas del nitrógeno: nitritos, nitratos, amonio y además se cuantificará la clorofila *a*.
- c) Dar un seguimiento semanal a las características morfológicas del camarón mediante un análisis en fresco para evidenciar enfermedades u otros rasgos sobre la calidad del camarón.
- d) Efectuar cortes histológicos para identificar el tipo de enfermedad específica.
- e) Relacionar la calidad del agua y las condiciones bajo las cuales se presentan las enfermedades u otros rasgos que afectan la calidad o salud del camarón.

5. HIPÓTESIS

Conforme se desarrolla el cultivo de camarón y al no haber recambios de agua, ésta se va deteriorando, y se acumula materia orgánica y nutrientes que pueden llegar a alcanzar concentraciones que se consideran tóxicas para los organismos. Asimismo, se desarrolla una trama trófica dentro de los estanques de los cuales también existe la posibilidad de que proliferen organismos como bacterias o protozoarios que afectan la salud de los camarones, provocando una serie de condiciones desfavorables para el desarrollo del cultivo.

Por lo que la pregunta de investigación inicial en tal contexto sería ¿Con el deterioro de la calidad del agua mediante el incremento de concentración de los compuestos nitrogenados, se ve o no afectada la salud del camarón cuando este se cultiva en un agua de baja salinidad? Y ¿cuál es la secuencia de los daños y/o alteraciones en las que se ven afectados por dichos tóxicos?

Otra pregunta complementaria al respecto es ¿Si hay o no una relación entre el incremento de la concentración de alguna de las formas químicas del nitrógeno con las diferentes afectaciones que se presentan en *L. vannamei* en el cultivo intensivo con cero recambio?

6. ÁREA DE ESTUDIO

El proyecto se llevó a cabo en el Módulo Experimental “YK”, ubicado en el municipio de Mazatlán, Sinaloa, a unos ~1500 metros del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Unidad Académica Mazatlán. El módulo experimental está localizado aproximadamente en los 23°12'11.07" de latitud norte y 106°25'41.64" de longitud oeste (Fig. 6.1).

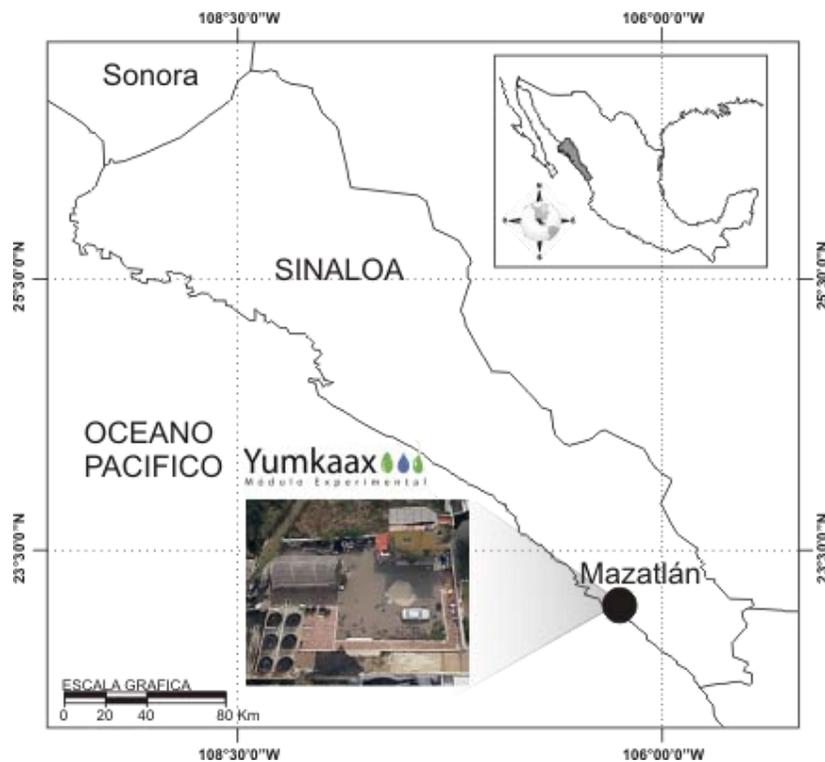


Fig. 6. 1. Localización del Módulo Experimental “YK”

7. METODOLOGÍA

Este estudio constó de un cultivo de camarón el cual está dividido en tres partes importantes: una de ellas que es la calidad de agua, el monitoreo de la sanidad de los organismos, y el bioensayo de confirmación; tal como se muestra en la Fig. 7.1, se observan todos los parámetros medidos en el trabajo y se detallan más adelante cada uno de ellos.

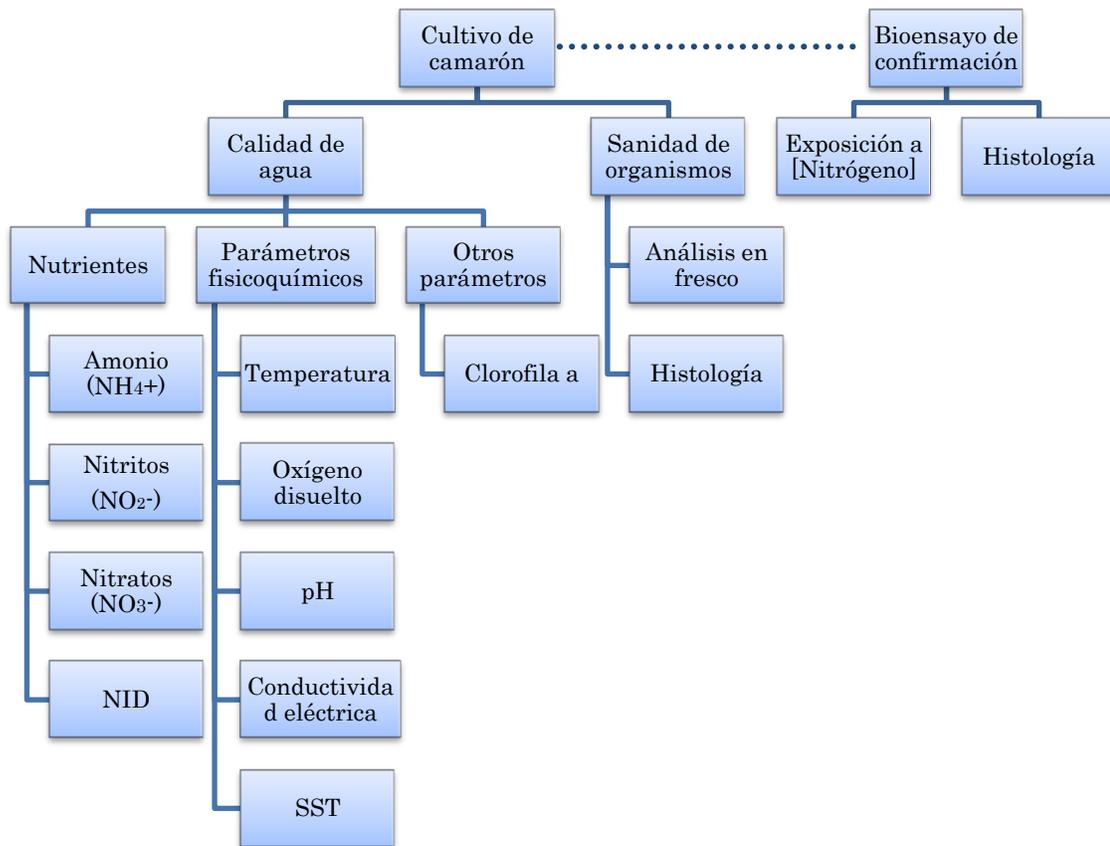


Fig. 7.1. Diagrama de los estudios y parámetros de la calidad de agua y sanidad del cultivo experimental en baja salinidad de *L. vannamei*.

7.1. Descripción y diseño del sistema de producción

El presente trabajo se realizó en el Módulo Experimental YK, dicho experimento constó de 6 tanques circulares (salinidad de 1.9 g/L) para el cultivo

de camarón divididos en dos módulos; el módulo 1 (M1) se trabajó con una densidad de siembra de 70 PL/m² y el módulo 2 (M2) con 120 PL/m². Como se muestra en la Fig. 7.2, cada módulo contó con 3 tanques circulares (2 m de diámetro x 1.2 m de altura) y cada tanque tuvo un volumen equivalente a 3.14 m³ de agua. Los tanques estuvieron cubiertos con liner (1.5 mm polietileno de alta densidad). Para abastecer los requerimientos de oxígeno en los estanques con camarón, se contó con un aireador de inyección de aire (blower) de 1/2 hp para mantener el oxígeno en concentraciones adecuadas para el cultivo de camarón (Rakocy *et al.*, 1992; Loyless y Malone, 1998; Boyd, 1998; Van Wyk *et al.*, 1999).

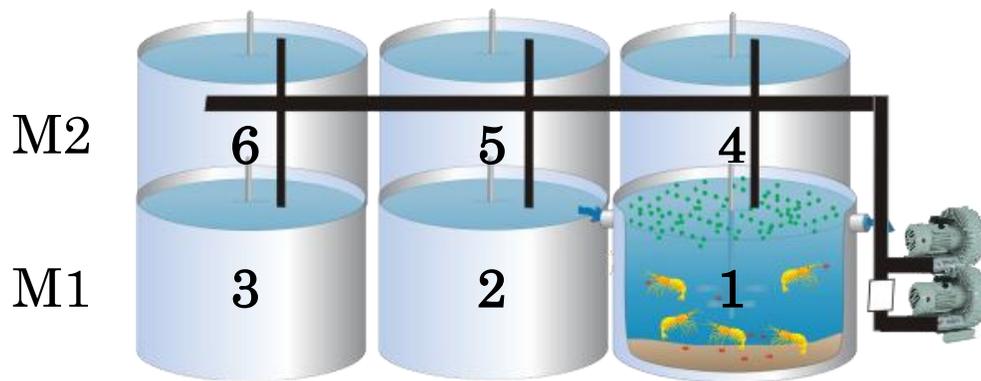


Fig. 7.2. Ilustración que muestra el diseño del sistema de producción propuesto: los tanques 1, 2 y 3 (M1) con una densidad de siembra de 70 PL/m²; los tanques 4, 5 y 6 (M2) para cultivo de camarón con una densidad de siembra de 120 PL/m².

7.2. Cultivo de camarón

El camarón blanco (*L. vannamei*) se seleccionó debido a (Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, 2001; Ocean Garden, 2003): soporta un amplio rango de salinidad (desde 0.5 g/L hasta aguas marinas), se desarrolla bien a altas densidades, tiene una gran adaptabilidad en cautiverio, disfruta de buena aceptación y buen precio en el mercado, y además está disponible en los

laboratorios del noroeste del país. Además, esta especie se cultiva actualmente en aguas de baja salinidad tanto en México como en otras regiones del mundo.

El ciclo de producción tuvo una duración de 69 días en M1 y de 76 días en M2. Se sembró una superficie de 18.85 m² aproximadamente que es equivalente a los seis tanques de experimentación. La densidad de siembra fue de 70 y 120 PL/m², dando un total de 1,884 postlarvas con una talla mínima de PL₂₂ y un peso promedio de 30.0±3.0 mg y una longitud total promedio de 1.9±0.4 cm.

7.3. Preparación de los tanques de cultivo

Previo a la siembra, los tanques se lavaron con jabón y cloro (hipoclorito de sodio diluido 5-10%) para desinfectarlos. Se tallaron los fondos y paredes con un cepillo de cerdas de plástico, después se realizó un enjuague y se drenó el agua de desecho. Posteriormente, se dejaron secar al sol por tres días y se colocó un tubo de PVC de 1 1/2" de diámetro y 1.1 m de longitud en el centro del tanque para evitar que las postlarvas se escapen al ser sembradas. Una vez limpios, se llenaron con agua de mar diluida (1.9 g/L), hasta alcanzar un tirante de 1 m.

El agua de mar utilizada se obtuvo directamente del área de acuarios de la Unidad Académica Mazatlán, la cual fue tratada con un sistema de filtros de cartucho de 10 y 5 µm, además de un filtro de luz UV y madurada en piletas de cemento; por su parte, el agua dulce de dilución se obtuvo del agua de la llave corriente pero pasada a través de un sistema de filtración WaterTec® de lecho profundo (con arena, grava, carbón activado y zeolita). Con el fin de promover la productividad primaria en los estanques, estos se fertilizaron agregando 10 g por tanque de fertilizante P-Nutrilake cuatro días antes de la siembra, ya que el fitoplancton constituye una fuente importante de alimento para las postlarvas.

Dentro de cada tanque se colocó un biofiltro sumergido (Fig. 7.3) que es un sustrato artificial. Los sustratos artificiales son estructuras que proporcionan un área superficial adicional que puede ser utilizada por el camarón a fin de evitar el hacinamiento en el fondo del tanque. También sobre esta área superficial adicional pueden colonizar las bacterias nitrificantes, las cuales dependen de las concentraciones de oxígeno (<1 mg/L), temperatura (28°C) y pH (7.2-9) (Sans y Ribas, 1989; Claros-Bedoya, 2012). Por otro lado, la biopelícula formada en la superficie de estos sustratos proporciona un tipo de nutrición adicional para el camarón, mejorando las tasas de aprovechamiento del alimento. En teoría el uso de sustratos artificiales permite densidades de cultivo superiores al reducir el estrés y el canibalismo (Van Wyk, 1999; Stewart *et al.*, 2006; Lezama-Cervantes *et al.*, 2010; Bojórquez-Mascareño y Soto-Jiménez, 2013).

7.4. Adquisición y transporte de postlarvas

Como medida de seguridad e inocuidad y para garantizar su calidad, las postlarvas empleadas fueron proporcionadas por un laboratorio certificado de producción, FITMAR S.A. de C.V., donde se revisaron y se verificaron que se encuentren en óptimas condiciones observando su estado de salud y comportamiento. Una vez verificados los organismos se prepararon (bolsas de polietileno a baja temperatura) y se les suministró oxígeno necesario para su transporte al sitio de cultivo y colocadas en hieleras para conservar una temperatura de <23 °C hasta llegar al módulo experimental.

7.5. Aclimatación y siembra de postlarvas

Un aspecto importante para el éxito de un cultivo de camarón a baja salinidad es el proceso de aclimatación, por el cual debe pasar el camarón antes de la siembra en los estanques. *L. vannamei* puede alcanzar un balance osmótico y aclimatarse totalmente a ambientes de salinidad menor a 1 g/L a través de

disminuciones graduales en la salinidad ambiental durante sus etapas postlarvales. Para el proceso de aclimatación, lo primero que se realizó fue colocar las bolsas donde fueron transportadas las postlarvas dentro de un tanque de aclimatación, para lograr que las temperaturas se igualen, una vez que se logró esto, las postlarvas se sacaron de las bolsas y se dejaron en los tanques de aclimatación, mismos que están a la salinidad a la que venían las postlarvas. Una vez adaptado el organismo en los tanques se inició el proceso de aclimatación, para esto, se le fue añadiendo paulatinamente agua del tanque cisterna a los tanques aclimatadores hasta llegar a la salinidad deseada (1.9 ‰) de acuerdo a Van Wyk (1999); McGraw y Scarpa (2004); Davis *et al.* (2002, 2005); Balbi *et al.* (2005) (Tabla 4).

Durante el proceso de aclimatación se alimentaron a las postlarvas con alimento balanceado (Animalnutri México, S.A. de C.V., Cd. Obregón, Sonora) en polvo con un contenido de proteína del 50 % (Samocho *et al.*, 1998) y se realizaron limpiezas frecuentes del tanque para eliminar el alimento no consumido y evitar un deterioro en la calidad del agua. Además, se estuvo suministrando oxígeno mediante una bomba aireadora de ½” hp regulada mediante mangueras difusoras. Así mismo, se llevó a cabo un registro de los parámetros físico-químicos como temperatura, salinidad, oxígeno y pH, además del estado de salud y comportamiento de las postlarvas. Una vez finalizado el proceso de aclimatación, los camarones se sembraron en los tanques de crecimiento y después se siguió con el protocolo establecido.

Tabla 4. Velocidad de aclimatación según la salinidad (tomado de Van Wyk, 1999)

Cambios de salinidad (‰)	Tiempo (h)	Velocidad de reducción (‰ / h)
32 a 16	8	2
16 a 8	8	1
8 a 4	8	0.5
4 a 2	8	0.25
2 a 1	8	0.125
1 a 0.5	8	0.063

7.6. Alimentación

Debido a la riqueza del plancton que de manera natural prolifera en el tanque, se considera que en los primeros días sus requerimientos son satisfechos con el agua de mar diluida. Sin embargo, también se utilizó alimento balanceado comercial iniciador para camarón (VIMIFOS Provimi de la compañía Animalnutri México, S.A. de C.V.) con un contenido de proteína de 40% y para camarón en etapa juvenil (Camaronina 35 de PURINA®) con un contenido de proteína de 35%. La cantidad de alimento a suministrar diariamente, se calculó con base a un porcentaje de la biomasa de los camarones y fue aplicada en 3 raciones por día (08:00, 13:00 y 18:00) (Reid y Arnold, 1992; Davis y Arnold, 1998; Van Wik, 1999). La alimentación se llevó a cabo aplicando la técnica de comederos distribuyendo 2 por tanque, esto con la finalidad de monitorear el alimento, y de ser necesario realizar ajustes en las raciones (Zendejas, 1999; Clifford III, 2000, Casillas-Hernández *et al.*, 2007). Como estrategia para optimizar la alimentación se empleó el criterio de las raciones descrito en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Escala para tipificar la cantidad de alimento remanente después de un tiempo específico (tomado de Zendejas-Hernandez, 1994).

Cantidad de alimento observado	Valor
Sin remanente	0
Poco remanente (<12.5%)	1
Moderado remanente (12.5-25%)	2
Considerable remanente (>25%)	3

Tabla 6. Valores para ajustes de la tabla de alimentación sobre valores promedio observados en los comederos.

Valor promedio procedente de los comederos	Ajustes a la tasa de alimentación
Promedio >2	Reducir la tasa de alimentación en 30%
Promedio >1	Reducir la tasa de alimentación en 20%
Promedio = 0.5 – 1	Mantener la tasa de alimentación
Promedio <0.5	Incrementar la tasa de alimentación en 10%

7.7. Crecimiento y cosecha

El muestreo de crecimiento se llevó a cabo con el propósito de monitorear el desarrollo del organismo, corroborar que éste sea normal y en caso de presentarse algún problema poder tomar las medidas o acciones necesarias. Se realizó semanalmente utilizando una red de cuchara con malla de la denominada ecuatoriana. El mínimo de camarones muestreados fue de 10 organismos por tanque, registrándose el peso, talla, después se calculó el peso individual promedio del camarón para cada tanque y cada módulo. Es importante señalar que de los 10 individuos muestreados, 7 eran regresados a

su tanque correspondiente, 1 se le realizaba el análisis en fresco, y los otros 2 eran fijados para histología, es decir, que por módulo se muestrearon semanalmente 3 camarones para el análisis en fresco y 6 para los estudios histológicos. Al transcurrir 70 días de cultivo para ambos módulos (M1 y M2), se realizó la cosecha de camarón dado que se observó una alta mortandad en M2 y en consecutivo se cosechó el M1. Se contaron y pesaron todos los organismos de cada tanque para después calcular las siguientes variables de producción (Lezama-Cervantes *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011; Alatorre-Jacome *et al.*, 2012):

$$\text{Peso individual promedio (g)} = \frac{\text{Biomasa cosechada}}{\text{Número de camarones cosechados}}$$

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{No. de camarones cosechados}}{\text{No. de camarones sembrados}} \times 100$$

$$\text{Tasa de crecimiento semanal (g/sem)} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{semanas de cultivo}}$$

$$\text{Tasa de crecimiento específico (\%/día)} = \frac{\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}}{\text{días de cultivo}} \times 100$$

$$\text{FCA} = \frac{\text{Alimento suministrado}}{\text{Biomasa cosechada}}$$

7.8. Monitoreo de la calidad del agua

De acuerdo a Reid y Arnold (1992), Davis y Arnold (1998), Van Wyk y Scarpa (1999), el monitoreo del agua se realiza con el propósito de verificar que las condiciones del agua sean óptimas para el buen desarrollo del organismo y poder tomar decisiones de emergencia, en caso de presentarse cualquier problema con el agua. Los parámetros a monitorear se muestran en la Tabla 7. Las mediciones se realizaron *in situ* dos veces al día (7:00 y 19:00 horas), para monitorear el oxígeno disuelto y temperatura se utilizó un oxímetro (HANNA Instruments modelo 9147). El método de calibración es simple, se realiza

manualmente en un punto al aire, con la membrana rellena de solución electrolítica de cloruro de potasio, asegurándose que no queden burbujas de aire atrapadas, se calibra con la sonda en posición vertical y se mueve el trimmer hasta que la pantalla muestre el 100% de saturación. Este aparato tiene la ventaja de compensar las mediciones de oxígeno mediante un factor de salinidad, el cual tiene un intervalo entre 0 a 51 g/L, y fue ajustado para una salinidad de 1.9 g/L. Para determinar conductividad eléctrica y pH, se utilizó un potenciómetro combo (HANNA Instruments modelo HI 98129). La calibración de pH en este aparato se realizó con un juego de tampones de calibración de pH 7.0 y 4.0; y de la conductividad eléctrica se utilizó una solución de calibración de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La salinidad de los tanques de camarón se estimó a partir de las ecuaciones descritas por Boyd *et al.* (2002); y Collins *et al.* (2005), donde la conductividad eléctrica (en $\mu\text{S}/\text{cm}$) se multiplica por 0.00063 para obtener el equivalente a la salinidad.

Tabla 7. Parámetros de calidad del agua a monitorear durante el ciclo de cultivo

Parámetro	Hora	Frecuencia
Temperatura	2 veces al día (07:00 y 19:00)	Diariamente
OD	2 veces al día (07:00 y 19:00)	Diariamente
pH	2 veces al día (07:00 y 19:00)	Diariamente
Conductividad eléctrica	2 veces al día (07:00 y 19:00)	Diariamente
SST	Una vez al día (12:00 a 13:00)	Semanalmente
Clorofila <i>a</i>	Una vez al día (12:00 a 13:00)	Semanalmente
Amonio	Una vez al día (12:00 a 13:00)	Semanalmente
Nitritos	Una vez al día (12:00 a 13:00)	Semanalmente
Nitratos	Una vez al día (12:00 a 13:00)	Semanalmente

7.9. Análisis de las muestras de agua

Las muestras de agua se recolectaron semanalmente en cada uno de los tanques desde el día de inicio del cultivo, hasta la finalización del cultivo a 10-20 cm por debajo de la superficie del agua en frascos de polietileno de 120 mL. El agua se filtró a través de filtros Whatman GF/F de 0.45 μm de diámetro para determinar el nitrógeno inorgánico disuelto (amonio, nitritos y nitratos), sólidos suspendidos totales y clorofila *a*. Se utilizaron 2 filtros Whatman GF/F por tanque, ya que uno de éstos se utilizó para determinar los sólidos suspendidos totales y el otro para la determinación de clorofila *a*.

Para analizar la concentración de amonio y nitratos en agua se utilizó el auto-analizador SKALAR SAN plus System, Breda, Países Bajos. Este instrumento es un analizador de nitrógeno inorgánico, nitrógeno y fósforo total, que ofrece resultados de alta precisión utilizando el conocido análisis de flujo continuo, principio que se basa en las regulaciones internacionales de estándares como ISO (SKALAR SAN++, 2010).

7.9.1. Determinación de nitritos

Los nitritos se analizaron con el método colorimétrico descrito por Strickland y Parsons (1972), en el cual el nitrito presente en la muestra de agua se hace reaccionar con sulfanilamida en medio ácido, al compuesto que se forma se le hace reaccionar con N-1-naftiletildiamina (NED), y éste produce una coloración rosa debido al compuesto azo. Una vez producida la coloración se lee la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 543 nm. Ésta técnica tiene un límite de detección de 0.001 mg/L y el coeficiente de variación fue de 5.1%.

7.9.2. Determinación de nitritos + nitratos

La determinación semi-automatizada para el nitrito y nitrato está basado en el método de reducción de cadmio; a la muestra se le agrega un buffer de cloruro de amonio para llevarlo a un pH de 8.2 y éste se pasa a través de una columna con cadmio-cobre para reducirlo de nitrato a nitrito. El nitrito (originalmente presente además del nitrato reducido) es determinado por la diazociación con sulfanilamida y mezclado con N-(1-naftil) etilendiamina que produce un intenso color azo con el que es medido a una longitud de onda de 540 nm (Strickland y Parsons, 1972; SKALAR SAN++, 2010). El límite de detección de esta técnica fue de 1.46 µg/L y con un coeficiente de variación de 7.08%.

7.9.3. Determinación de nitrógeno amoniacal

El procedimiento semi-automatizado para la determinación del nitrógeno amoniacal total (TAN), está basado en la modificación de la reacción de Berthelot; el amonio es clorado para sintetizar monocloramina el cual reacciona con el fenol. Después de la oxidación se forma un complejo de color verde. La reacción es catalizada por nitroprusiato e hipoclorito de sodio que es usado para la donación del clorito. La absorción de este complejo es medido a una longitud de onda de 630 nm (SKALAR SAN++, 2010). Ésta técnica tiene un límite de detección de 0.98 µg/L y el coeficiente de variación fue de 3.22 %.

En el caso particular del amonio no-ionizado (NH_3), se calculó mediante la ecuación propuesta por Millero (2006), la cual estima la constante de disociación del amonio en el agua en función de la salinidad y temperatura, que es como sigue:

$$\begin{aligned} \ln K_{\text{NH}_4^+} = & \left(\frac{6285.33}{T} \right) + 0.0001635 T - 0.25444 + \left(0.46532 - \frac{123.7184}{T} \right) S \\ & + \left(-0.01992 + \frac{3.17556}{T} \right) S \end{aligned}$$

Donde T es la temperatura expresada en °K y S es la salinidad en g/L. Una vez calculada la constante de disociación, para este trabajo se calculó para una temperatura de 25°C (298.15°K) y salinidad de 1.9 g/L, resultando un pK = 9.15, mediante el diagrama pC-pH, se calculó el factor de la constante de disociación (0.066), con este factor se multiplicó por la concentración de TAN para determinar el amonio no-ionizado (NH₃).

7.9.4. Determinación de clorofila *a*

El método químico más usado para determinar la cantidad total (biomasa) de fitoplancton en el agua es estimando la concentración de clorofila *a* mediante la extracción del pigmento utilizando acetona al 90%. Para su determinación se empleó el procedimiento descrito por Parsons *et al.* (1984) (Ver Anexo I).

7.10. Análisis en fresco

Conforme el desarrollo del cultivo de camarón se realizaron muestreos semanales de aproximadamente 3 organismos aleatoriamente por módulo; con la finalidad de monitorear el estado de salud en general y el estado de muda, se utilizó el análisis en fresco, que consistió en la disección y observación en húmedo de porciones de branquias, hepatopáncreas, intestino y urópodos del camarón en todos sus estadios, para observar en el microscopio óptico las alteraciones y/o patógenos que presenten sus órganos y tejidos (Morales-Covarrubias, 2010) (Ver anexo II). Para la determinación del grado de severidad (GS) de la deformación tubular en hepatopáncreas (Tabla 8) y a la infestación por epicomensales en lámelas branquiales (Tabla 9), se utilizó la escala propuesta por Morales-Covarrubias (2010; 2013).

Tabla 8. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la deformación tubular en hepatopáncreas con análisis en fresco (Morales-Covarrubias, 2010).

Grado de severidad	Signos clínicos
0	No presentan signos de infección. No presentan deformación tubular ni rugosidad. Organismo sano.
1	Presencia muy baja de deformación tubular (1-5/campo/organismo). Se observa muy poco desprendimiento celular. Fase 0, infección.
2	Se observa la presencia moderada de deformación tubular (6-10/campo/organismo), atrofia, melanización y necrosis tubular. Se presenta mortalidad si no se aplica tratamiento. Fase 1, inicial.
3	Se observa presencia alta de deformación tubular (11-20/campo/organismo), con lesiones de moderadas a severas, con melanización, necrosis, desprendimiento celular y atrofia tubular. Presencia de hemocitos y fibroblastos alrededor de túbulos atrofiados.
4	Se observa gran cantidad de túbulos deformes (más de 20/campo/organismo), con severas lesiones con melanización, necrosis, atrofia tubular y túbulos vacíos. Presencia de hemocitos y fibroblastos alrededor de túbulos atrofiados, melanizados y necróticos. Con mortalidades. Fase 3, crónica.

Tabla 9. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la infestación por epicomensales en lámelas branquiales (Morales-Covarrubias, 2013).

Grado de severidad	Signos clínicos
0	No presentan signos de infección por protozooario. No presentan lesiones causadas por epicomensales.
1	Presencia muy baja de protozoarios (1-5 /lámelas/campo/organismo), muy pocas lesiones causadas por los epicomensales, como inflamación.
2	Se observa la presencia moderada de protozoarios (6-19 /lámelas/campo/organismo), incremento en las lesiones causadas por los epicomensales, como inflamación, melanización y formación de nódulos hemocíticos. Se observa mortalidad si no se aplican medidas de corrección.
3	Se observa alta presencia de protozoarios (10-20 /lámelas/campo/organismo), lesiones moderadas a severas causadas por los epicomensales, como inflamación, áreas multifocales melanizadas y formación de nódulos hemocíticos. Potencialmente letal si no se toman medidas de corrección.
4	Se observa gran cantidad de parásitos (más de 20/lámelas/campo/organismo). Severas lesiones causadas por los epicomensales, como inflamación, formación de nódulos hemocíticos, áreas multifocales melanizadas y necróticas. Muy letal, con altas mortalidades.

7.11. Análisis histológico

Se realizaron muestreos semanales de aproximadamente 6 organismos por módulo de manera aleatoria con la finalidad de determinar el estado de salud de los camarones por medio de la histología. Las muestras de camarón fueron fijados por inyección e inmersión en solución Davidson durante 24 a 72 h, luego transferidos a etanol al 70% y analizados individualmente para la detección de anormalidades y/o lesiones utilizando la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) según Bell y Lightner (1988) (Ver Anexo III). Las preparaciones histológicas fueron observadas bajo el microscopio de luz (BX 60 OLYMPUS) con objetivos de 10, 20, 40 y 100 X para la detección de daños, alteraciones celulares y estructurales de órganos, tejidos y/o agentes patógenos. En tanto, la prevalencia de los daños y/o alteraciones fue determinada de acuerdo a lo propuesto y modificado de Bush *et al.* (1997), mediante la siguiente ecuación:

$$Prevalencia = \frac{No. organismos afectados}{No. total de organismos observados} \times 100$$

El grado de severidad (GS) de los daños de los órganos y tejidos del camarón se realizó mediante la Tabla 10, tomada y modificada de Lightner (1996). Dicha tabla modificada consiste en dar un valor numérico al nivel de los daños y alteraciones en los diferentes órganos y tejidos del camarón de acuerdo al grado de afectación derivado de algún tipo de infección o intoxicación, puesto que no se encuentra en la literatura disponible una tabla para darle el valor numérico al grado de severidad que no sea causado por un tipo de enfermedad, se propone la modificación de Lightner (1996) para un mejor desarrollo de este trabajo.

Tabla 10. Guía general para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a los daños y alteraciones en órganos y tejidos de los organismos (Tomado y modificado de Lightner, 1996).

Grado de severidad	Signos clínicos
0	No presentan lesiones y/o alteraciones en los diferentes órganos y tejidos de camarón.
1	Se observan muy pocas lesiones características como pérdida de la estructura normal, infiltración hemocítica y de hemolinfa.
2	Presentan lesiones ligeras o moderadas, tales como la presencia de melanización, necrosis y nódulos hemocíticos.
3	Se observan lesiones de moderadas a severas como nódulos hemocíticos melanizados, encapsulaciones, necrosis severa con presencia de núcleos picnóticos, cariorréxicos y cariolíticos.
4	Se observa la desintegración o pérdida total del órgano con atrofia severa presentando infiltración hemocítica y de hemolinfa severa, encapsulaciones, nódulos hemocíticos con y sin melanización, fase terminal de necrosis.

7.12. Bioensayo de confirmación

Se realizó un bioensayo para confirmar los daños provocados por los compuestos nitrogenados en camarón blanco (*L. vannamei*) en un ambiente de baja salinidad (1.9 g/L) utilizando agua de mar diluida. Consistió en la exposición de 10 organismos de *L. vannamei* (con peso promedio 4.6 ± 0.8 g) a 3 concentraciones diferentes de amonio y nitritos durante 10 días, trabajando cada tratamiento por triplicado. Se utilizaron bandejas de polietileno con una densidad de 10 organismos en un volumen total de 10 L (Fig. 7.3). Las concentraciones con las que se trabajaron fueron las siguientes:

- T0. Control
- T1. Concentración de 4 mg N-NH₄⁺ /L y 1 mg N-NO₂⁻/L
- T2. Concentración de 8 mg N-NH₄⁺ /L y 1.5 mg N-NO₂⁻/L
- T3. Concentración de 13 mg N-NH₄⁺ /L

Los organismos se alimentaron 3 veces al día con Provimi pellet 40, y cada 24 horas se procedió a la toma de muestra de agua para su análisis químico, recambios totales de agua con su respectiva concentración, observaciones clínicas y se muestreó 1 camarón de manera aleatoria de cada concentración para realizar su análisis histológico y se procedió a realizar su diagnóstico para compararlo con los organismos analizados del cultivo (método 7.11). Las descripciones histológicas de los organismos del control se compararon con organismos normales en condiciones de agua salobre o marina descritas por Bell y Lightner (1988) para poder considerar los resultados de este estudio como normales.

La realización y justificación de este experimento surge luego de presentar los avances de tesis en el segundo tutorial, por acuerdo del comité tutorial. El motivo principal fue que habría que probar en un experimento controlando las variables de temperatura, oxígeno disuelto y luz; para poder contrastar los

daños observados en este experimento con los daños observados en los camarones cultivados en los tanques experimentales a cielo abierto. Esto, para mostrar que las afecciones provocadas fueron por el incremento de los compuestos de nitrógeno, o bien, por una combinación con otros factores externos (bacterias, y otros agentes patógenos asociados).

Las concentraciones a las que se efectuaron los experimentos corresponden a aquellas en donde en los cultivos en los tanques se observaron los mayores daños y afectaciones en el camarón, presentándose en las últimas tres semanas de cultivo y que parecen ser las más críticas en este tipo de sistemas. El objetivo fue representar las mismas condiciones del cultivo experimental pero en la fase más crítica y así poder confirmar los daños y afectaciones por el deterioro de la calidad del agua.

7.12.1. Preparación de soluciones para el bioensayo

T0. Control

Se llenó cada contenedor con 10 L de agua de mar diluida a 1.9 g/L cada 24 h (el agua dulce y de mar utilizada para la preparación de esta agua fue la misma que se describió en la sección anterior).

T1. Concentración de 4 mg N-NH₄⁺/L y 1 mg N-NO₂⁻/L

Se pesaron 150 mg de cloruro de amonio (NH₄Cl) y 50 mg de nitrito de sodio (NaNO₂⁻) disueltos en 10 L de agua de mar diluida a 1.9 g/L, realizando recambios totales cada 24 h.

T2. Concentración de 8 mg N-NH₄⁺/L y 1.5 mg N-NO₂⁻/L

Se pesaron 300 mg de cloruro de amonio (NH₄Cl) y 74 mg de nitrito de sodio (NaNO₂⁻) disueltos en 10 L de agua de mar diluida a 1.9 g/L, realizando recambios totales cada 24 h.

T3. Concentración de 13 mg N-NH₄⁺/L

Se pesaron 500 mg de cloruro de amonio (NH₄Cl) disuelto en 10 L de agua de mar diluida a 1.9 g/L, realizando recambios totales cada 24 h.



Fig. 7.3. Montaje de bioensayo de confirmación exponiendo a *L. vannamei* a diferentes concentraciones de NH₄⁺ y NO₂⁻ a una salinidad de 1.9 g/L.

7.13. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos resultantes de los experimentos anteriores se procedió a realizar correlaciones lineales entre cada una de las variables estudiadas, tales como, las prevalencias de los órganos y tejidos del camarón, respecto a las concentraciones de los compuestos de nitrógeno; tales como lo son, el nitrógeno amoniacal total, amonio no-ionizado, nitritos, nitratos y nitrógeno inorgánico disuelto. Adicionalmente se aplicaron pruebas de Chi-cuadrada (X²) para comparar ($\alpha = 0.05$) la prevalencia de los daños en órganos y tejidos del camarón dentro de los tratamientos del cultivo (M1 y M2) y de los bioensayos utilizando el programa estadístico WinEpi Ratios 2.0. (Working in epidemiology). Asimismo, se llevó a cabo una prueba *a posteriori* de Dunnett ($\alpha = 0.05$) para determinar entre qué tratamientos se encontraron las diferencias estadísticas (Zar, 1984).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Cultivo de camarón

Para el desarrollo del cultivo de camarón *L. vannamei* en M1 y M2, se mantuvo a una salinidad promedio de 1.96 y 1.97 g/L, respectivamente. En M1, se obtuvo una biomasa cosechada de 1.3 kg, teniendo un rendimiento equivalente a 1.4 ton/ha, con una supervivencia promedio de 87.7%, el factor de conversión alimenticia (FCA) fue de 1.51 y la tasa de crecimiento semanal de 0.53 g/semana. En M2, se obtuvo una cosecha de 97 g, un rendimiento equivalente a 0.103 ton/ha y una supervivencia de 11.9%. Dichos valores de producción en el M2 se deben a las altas mortalidades (88.1%) que se presentaron durante las dos últimas semanas en estos estanques (Tabla 11).

Tabla 11. Datos promedio de producción de *L. vannamei*, obtenidos durante el ciclo de cultivo experimental de junio a agosto 2013 utilizando agua de mar diluida a 1.9 g/L.

	M1	M2
Densidad (camarones/m ²)	70	120
Tiempo de cultivo (días)	72	69
Peso inicial (mg)	30.0±3.0	30.0±3.0
Peso final (g)	5.85±0.31	5.50±0.66
Tasa de crecimiento (g/semana)	0.53±0.03	0.50±0.06
Tasa de crecimiento específico (%/día)	7.32±0.07	7.55±0.17
Producción (kg)	1.29±0.27	0.10±0.01
Rendimiento (ton/ha)	1.37±0.29	0.10±0.02
Supervivencia (%)	87.73±3.54	11.93±1.63
FCA	1.51±0.33	-

En la Fig. 8.1 se presenta el gráfico del crecimiento del camarón a lo largo del ciclo de cultivo para ambos tratamientos. Se ha señalado que en cultivos con una salinidad de 2 g/L tienen supervivencias de 71% (Arzola *et al.*, 2008), 100% en postlarvas de camarón durante 7 días y 60% durante 21 días de

cultivo (Atwood *et al.*, 2003), además se ha registrado una supervivencia de 73.2% durante 131 días en condiciones de agua de pozo con una salinidad promedio de 0.8 g/L (Angulo *et al.*, 2005). De acuerdo a Ogle *et al.* (1992) y Sowers *et al.* (2006) estimaron que hay una menor supervivencia de *L. vannamei* cultivados a una salinidad de 2 g/L comparado con 20 g/L con una diferencia de ~9%.

El peso promedio que se obtuvo en un periodo de aproximadamente 70 días fue de 5.85 g en M1 y 5.50 g en M2, valores que coinciden con Salas (2003) que utilizando salinidades de 1 y 3 g/L, quien registró organismos con un peso promedio de 5.6 y 5.5 g, respectivamente durante un periodo de 131 días de cultivo. Valenzuela y colaboradores (2010) determinaron un peso promedio de 8.8 g durante 3 meses de cultivo utilizando esta misma especie utilizando agua de pozo de baja salinidad.

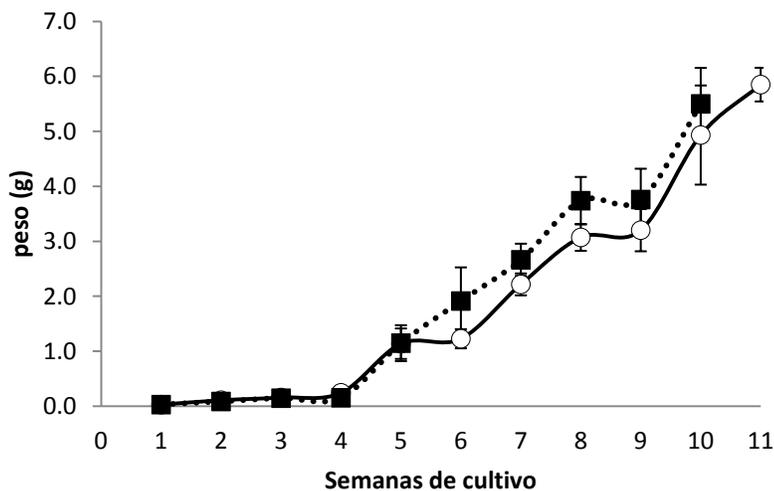


Fig. 8.1. Crecimiento de camarón durante el ciclo de cultivo en ambos módulos (○ M1 y ■ M2).

8.2. Monitoreo de la calidad del agua

La calidad del agua es un factor crítico para la salud, supervivencia y desarrollo del camarón, influenciada por diversas variables fisicoquímicas (temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto), y biológicas (fotosíntesis, respiración, alimentación, crecimiento), afectadas de manera directa por las condiciones climáticas o indirecta por el manejo del cultivo (densidad de siembra, consumo de alimento, tasas de alimentación, tasas de fertilización y tasas de recambio), que son necesarios para el éxito de un cultivo de camarón.

8.2.1. Temperatura

En un estanque de cultivo de camarón, la temperatura limita procesos biológicos y de velocidad de reacciones químicas dentro del organismo. Es el parámetro más observado debido a la facilidad con que se puede registrar. A medida que aumenta la temperatura, también aumenta la tasa metabólica, provocando un aumento en el consumo de alimento, de oxígeno, excreción de amonio y crecimiento (Kinne, 1970; Aragón, 1999; Van Wyk y Scarpa, 1999; Clark y Seymour, 2006).

Se observa que la temperatura en ambos módulos tienen el mismo comportamiento ya que no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) (Fig. 8.2). Las temperaturas más bajas se registraron por la mañana, siendo el mínimo de 28.7 °C en M2 y la temperatura más alta por la tarde con un máximo de 33.0 °C en M1. Los promedios semanales en la mañana de M1 oscilaron entre 28.9 y 30.6 °C, con una media de 29.7 °C, y por la tarde fluctuaron entre 30.1 y 33.0 °C, con una media de 32.0 °C. En M2 los promedios semanales por la mañana se encontraron entre 28.7 y 30.1 °C, con una media de 29.5 °C, con respecto a la tarde estos valores oscilaron entre 29.7 y 32.8 °C, con una media de 31.6 °C (Tabla 12).

Los camarones son animales poiquiloterms (poiki = variado), cuya temperatura se aproxima a la del ambiente (Talavera *et al.*, 1998a). El camarón *L. vannamei* se considera una especie euritérmica en sus primeras etapas de vida (larva y postlarva) y estenotérmico a partir de pre-adulto. De acuerdo a Van Wyk y Scarpa (1999) *L. vannamei* puede tolerar un amplio rango de temperatura; sin embargo, Wyban *et al.* (1995) menciona que la temperatura óptima en camarón pequeño de *L. vannamei* (<5 g) es de aproximadamente 30°C. Para camarones por encima de este peso, su valor óptimo es alrededor de 27°C. Es importante evitar temperaturas del agua por debajo de 23°C y por encima de 34°C, ya que se reduce la tasa de alimentación y crecimiento. El límite letal inferior es de 15°C y el límite máximo es de 35 °C aproximadamente por periodo prolongado, o hasta 40°C por periodos breves, y proponen un intervalo de temperatura óptima de 28 a 32°C para su máximo crecimiento. Una variación en la temperatura mayor a 4°C o fuera de los límites mencionados provoca estrés en el camarón (Davis *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005).

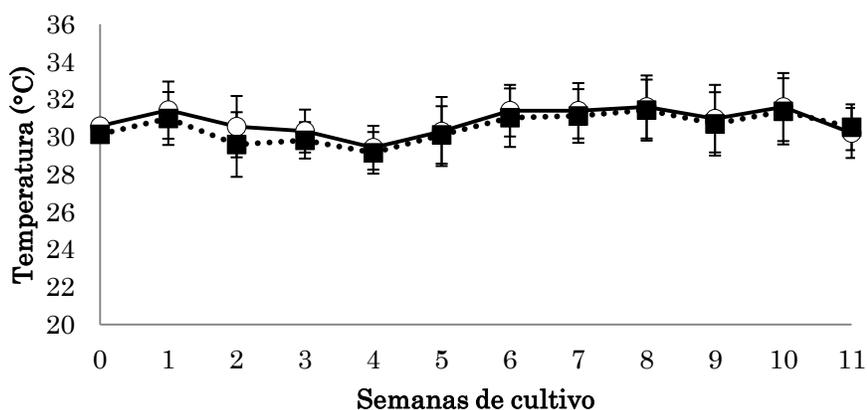


Fig. 8.2. Variación promedio de la temperatura en cada módulo experimental (○ M1= 70 pL/m² y ■ M2= 120 pL/m²) durante el desarrollo del cultivo de camarón.

De acuerdo al rango de temperaturas mencionadas por Van Wyk y Scarpa (1999), en este estudio se considera que las temperaturas obtenidas se encuentran dentro de los límites óptimos para el buen desarrollo del cultivo de camarón. A pesar de que se obtuvieron lecturas por encima del valor óptimo en el turno vespertino, no superó el límite letal.

8.2.2. Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto (OD) es una de las variables críticas para la calidad del agua, ya que el camarón requiere de este para sus procesos fisiológicos donde las células oxidan los carbohidratos y producen energía necesaria para su metabolismo. Cuando las actividades necesarias para el mantenimiento de la homeostasis del organismo se llevan a cabo con un alto costo metabólico debido a las bajas concentraciones de oxígeno disuelto, se reduce el presupuesto de energía disponible para su crecimiento y reproducción (Dalla-Via, 1987a; Morris and Taylor, 1985; Paschke *et al.*, 2010). Esta variable tiene una dinámica muy compleja en los cultivos intensivos de camarón. Es afectada por la salinidad, altitud, temperatura, densidad de cultivo, alimentación, tamaño de los organismos, materia orgánica, pero principalmente por los procesos biológicos de producción (fotosíntesis) y consumo (respiración) (Tucker y Boyd, 1985; Vanwyk y Scarpa, 1999; Páez-Osuna y Ruíz-Fernández, 2001).

La variación semanal del OD en M1 al igual que en M2 se mantuvo estable durante todo el cultivo, y no presentan diferencias significativas ($p>0.05$) (Fig. 8.3). En M1, el OD osciló entre 7.2 y 8.6 mg/L, con un promedio de 8.0 mg/L por la mañana, y por la tarde, fluctuó entre 6.7 y 8.6 mg/L, teniendo una media de 7.5 mg/L. Por otro lado, en M2 presentó un rango de OD entre 7.3 y 9.0 mg/L, con una media de 7.9 mg/L por la mañana, y por la tarde varió entre 6.6 y 8.7 mg/L, con una media de 7.4 mg/L (Tabla 12).

Los florecimientos algales que frecuentemente ocurren en los estanques acuícolas, reducen la penetración de luz y entre más densos son, la luz alcanza menores profundidades. Como resultado de esto, la fotosíntesis ocurre en las capas superficiales del agua y las concentraciones de oxígeno decrecen con la profundidad. Hay estudios que demuestran que los bajos niveles de oxígeno están relacionados con la sensibilidad de los organismos a otras sustancias tóxicas en los camarones (Páez-Osuna, 2001).

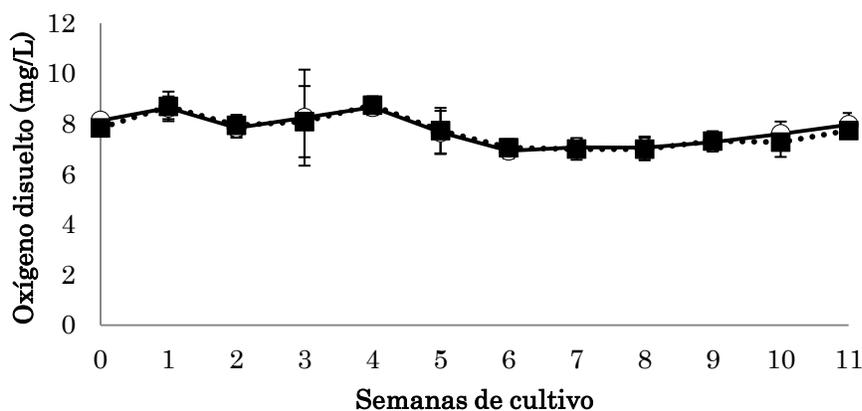


Fig. 8.3. Variación promedio del oxígeno disuelto en cada módulo experimental (○ M1= 70 pL/m² y ■ M2= 120 pL/m²) durante el desarrollo del cultivo de camarón.

Allan *et al.* (1990) observaron que los niveles reducidos de oxígeno disuelto incrementan significativamente la toxicidad aguda del amonio en *P. monodon*. El amonio y el amoniaco se encuentran en equilibrio (ver el punto 8.2.7) y las proporciones de ambas especies químicas están influenciadas por la temperatura, salinidad y pH (Alcaraz *et al.*, 1999). El pH, a su vez se encuentra influenciado por el oxígeno, el cual se une a un ión H⁺ resultado de la disociación del agua ($H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$) produciendo iones OH⁻ ocasionando que el pH aumente, siendo el amoniaco (NH₃) la especie dominante; por otra parte, hay procesos como la respiración y la degradación de la materia orgánica

que disminuyen los niveles de oxígeno y promueven el incremento de la concentración de CO₂ en el agua, este compuesto reacciona con el CO₃⁻ y el H₂O formando HCO₃⁻; el HCO₃⁻ se disocia para liberar H⁺, disminuyendo el pH y teniendo como especie dominante el amonio (NH₄⁺) (Páez-Osuna, 2001).

Alcaraz *et al.* (1999) encontraron que la exposición de postlarvas de *P. setiferus* a 0.7 mg/L de amoniaco provoca efectos severos sobre la tasa de respiración y es letal a niveles bajos de oxígeno. Además, la exposición a nitritos provoca una disminución de la tasa respiratoria de las postlarvas a concentraciones de 5, 4 y 3 mg/L de OD, comparado con el tratamiento control donde no se expusieron a nitritos, las postlarvas mostraron un mayor consumo de OD. Boyd y Fast (1992) consideran que la mejor supervivencia y crecimiento en los camarones marinos de cultivo se obtiene a concentraciones de oxígeno disuelto entre 3.5 mg/L y el nivel de saturación; mientras que deben de evitarse las concentraciones menores a 1.5 mg/L debido a que pueden ser tan letales como los altos niveles de saturación de oxígeno disuelto (Fast y Lester, 1992). Sin embargo, en camarones peneidos, según Allan y Maguire (1991) mencionan que el rango de concentraciones letales de oxígeno disuelto se encuentra entre 0.2 y 1.0 mg/L en experimentos a nivel laboratorio disminuyendo progresivamente los niveles de oxígeno. De acuerdo a los rangos anteriores, se considera que las concentraciones de OD que mantuvo el cultivo (7.2 - 8.9 en M1 y 7.3 - 9.0 en M2) fueron óptimas para su crecimiento, sin haber limitaciones por este parámetro ya que durante el desarrollo del cultivo de camarón se mantuvo aereación mecánica continua mediante el blower de ½ hp.

8.2.3. pH

El potencial de hidrógeno (pH) es un parámetro de gran importancia ya que su efecto radica sobre la ionización del amonio, conforme aumenta el pH la ionización disminuye y aumenta la proporción de NH₃, que es la forma química

más tóxica para el camarón (Tucker y Boyd, 1985; Van Wyk y Scarpa, 1999). Dentro de los estanques de camarón, el pH presenta una variación diurna provocada por el equilibrio entre la tasa de respiración y la tasa fotosintética. Cuando la tasa de respiración excede la tasa de fotosíntesis, el pH disminuye ya que el CO_2 en el agua da como resultado la liberación de iones H^+ que acidifican el agua, por el contrario, cuando la fotosíntesis es mayor que la tasa de respiración, el CO_2 se remueve del agua y los H^+ libres reaccionan con los iones carbonato y bicarbonato, reduciendo su concentración e incrementando el pH (Alarcón-Silva, 2013).

En el presente estudio se presentó una variación por la mañana entre 7.4 y 9.6 teniendo una media de 8.2 en M1; mientras que en M2, la variación fue entre 7.5 y 9.7 con una media de 8.3. Por otra parte, la variación que se presentó por la tarde fue entre 7.5 y 9.6 con una media de 8.6 en M1; y en M2 presentó una variación entre 7.7 y 9.7 con una media de 8.7 (Fig. 8.4) (Tabla 12). Sin embargo, se debe hacer notar que no hubo variaciones entre módulos y no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$).

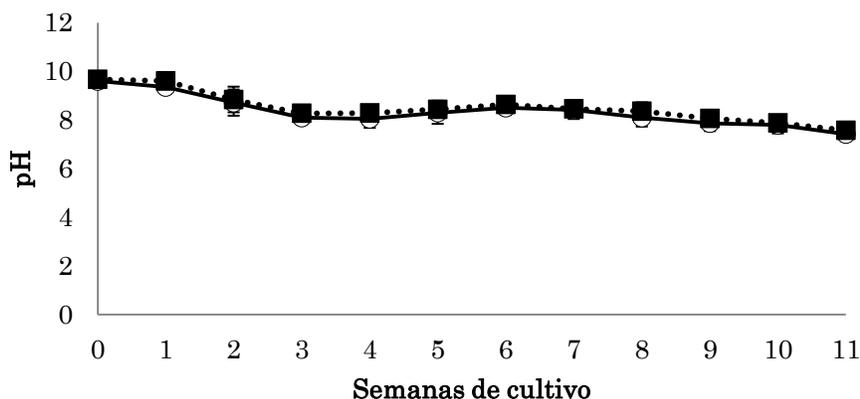


Fig. 8.4. Variación promedio de pH en cada módulo experimental (○M1= 70 pL/m² y ■ M2= 120 pL/m²) durante el desarrollo del cultivo de camarón.

Existen pocos datos sobre el efecto del pH en camarones. Boyd (1989) asume que al igual que con los peces, a un pH de 4 se alcanza el punto de la llamada muerte ácida; al tener condiciones con pH de 4-6 hay un crecimiento lento; al mantener un pH de 6-9, se obtiene un crecimiento óptimo; mientras que cuando el pH es de 9-11, se tiene un crecimiento lento y de acuerdo a Van Wyk *et al.* (1999) señalan que perjudica las dendobranquias del camarón y finalmente, cuando tiene un pH de 11, se alcanza el punto de muerte alcalina (Páez-Osuna y Ruíz-Fernández, 2001).

Dado los resultados de pH obtenidos a lo largo del cultivo se encontraron en el intervalo óptimo, a pesar de que se alcanzó un valor máximo de 9.6 y 9.7, hubo un ligero efecto sobre los organismos en cuestión de crecimiento, ya que éstos se encuentran a principios del cultivo donde la densidad fitoplanctónica es dominante sobre el cuerpo de agua, además de que en estas 2 primeras semanas el camarón tuvo una tasa de crecimiento de 2.7 mm/semana, que comparado con el trabajo de Arzola *et al.* (2008) donde obtuvo una tasa de crecimiento de 4.6 mm/semana, el resultado de nuestro estudio indica que el hubo una reducción en el crecimiento del camarón durante éstas semanas. Sin embargo, cuando el estanque de camarón llegó a su punto óptimo (pH 8.0), el crecimiento del camarón se vuelve normal teniendo un peso promedio final de 5.8 y 5.5 en M1 y M2, respectivamente; comparado al estudio de Arzola *et al.* (2008) donde en la semana 10 muestra un peso promedio del camarón de 5.5 g. El pH tuvo una tendencia a disminuir conforme avanzó el ciclo de cultivo, sin embargo, nunca disminuyó por debajo de 6.

8.2.4 Conductividad eléctrica (CE)

La conductividad eléctrica es una medida que permite estimar la concentración de sales disueltas presentes en una muestra de agua, lo que nos indica que a mayor concentración de sales, mayor será la conductividad del agua y se

expresa en S/cm o en fracciones de esta. La salinidad se refiere a la suma de las concentraciones de todos los iones disueltos y se define como la masa de las sales disueltas por unidad de masa de solución (g kg^{-1}) (UNESCO, 1979). Su importancia radica en las funciones biológicas que se realiza en las membranas celulares, el cual es el transporte de iones, esto da lugar al equilibrio osmótico que debe de existir entre el organismo y el medio ambiente e influye en la obtención de reservas energéticas y en su distribución. Este parámetro, en conjunto con otras variables hidrológicas, influye en la calidad del agua, la flotación, el movimiento y la respiración de los organismos y es afectado principalmente por los procesos de evaporación y precipitación (Bray *et al.*, 1994; Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2001; Molina y Orellana, 2001). *L. vannamei* es un osmoregulador capaz de crecer en aguas de 0.5 a 60 g/L, lo que exhibe un patrón de regulación hiper-osmótico (bajas salinidades) e hipo-osmótico (altas salinidades), con un punto iso-osmótico entre 25-26 g/L (Castille y Lawrence, 1981; Saoud *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2004), considerado como la salinidad óptima para el crecimiento del camarón o valores cercanos a éste (Panikkar, 1968; Bückle *et al.*, 2006; Valdez *et al.*, 2008) donde el medio acuático y la hemolinfa se encuentran en equilibrio (Wyban y Sweeny, 1991; McGraw *et al.*, 2002). En condiciones iso-osmóticas obtiene el mayor consumo de energía a través del alimento, ya que no requiere de tanta energía para mantener su equilibrio con el medio, ésta es destinada al crecimiento. En condiciones hiper o hipo-osmóticas, requiere de mucha energía para su osmoregulación y aumenta la tasa de excreción de amonio, afectando el crecimiento y supervivencia (Panikkar, 1968; Jiang *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2002; Valdez *et al.*, 2008).

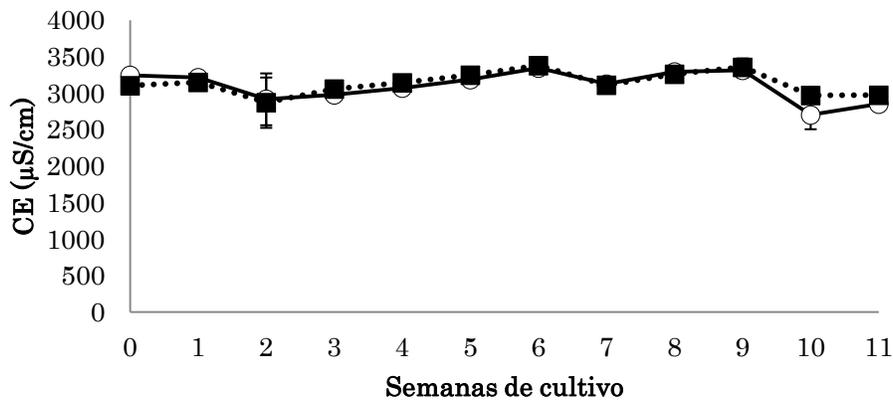


Fig. 8.5. Variación promedio de la conductividad eléctrica en cada módulo experimental (\circ M1= 70 pL/m² y \blacksquare M2= 120 pL/m²) durante el desarrollo del cultivo de camarón.

El objetivo de este estudio es mantener el cultivo a una salinidad de aproximadamente 1.9 g/L, lo que equivale a 3174.6 μ S/cm. La variación semanal de la CE en M1 y M2 se mantuvo relativamente estable durante todo el cultivo ya que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre módulos, puesto que este fue un parámetro controlado dado a las condiciones climatológicas variables. Entre módulos no hay diferencias significativas (Fig. 8.5). En M1 la CE osciló entre 2695.1 y 3335.9 μ S/cm, con un promedio de 3099.2 μ S/cm por la mañana, y durante la tarde, la variación fluctuó entre 2711.0 y 3357.5 μ S/cm, teniendo una media de 3111.3. Por otro lado, en M2 presentó un rango entre 2913.1 y 3360.9 μ S/cm, con una media de 3124.3 μ S/cm en la mañana, mientras que por la tarde varió entre 2839.9 y 3408.52 μ S/cm, con un promedio de 3148.53 (Tabla 12). Por medio de la CE se calculó la salinidad (ecuación de Boyd, 2002), la cual estuvo entre 1.7 y 2.1 g/L en M1 para ambos horarios (matutino y vespertino). En M2 la variación de la salinidad osciló entre 1.8 y 2.1 g/L para ambos horarios (matutino y vespertino). Teniendo para M1 y M2 un promedio de 1.96 y 1.98 g/L, respectivamente. Los valores obtenidos se mantuvieron dentro del intervalo propuesto inicialmente.

Tabla 12. Mínimos, máximos y medias con desviación estándar de las variables fisicoquímicas en los tanques de camarón en módulo 1 y 2 a las 7:00 y 19:00 horas.

	Temperatura (°C)		Oxígeno disuelto (mg/L)		pH		Conductividad eléctrica (µS/cm)	
	07:00	19:00	07:00	19:00	07:00	19:00	07:00	19:00
M1								
Mín	28.9	30.1	7.2	6.7	7.4	7.5	2695.1	2711.0
Máx	30.6	33.0	8.8	8.6	9.6	9.6	3335.9	3357.5
$\bar{x} \pm s$	29.7±0.5	32.0±1.0	8.0±0.5	7.5±0.7	8.2±0.7	8.6±0.6	3099.2±195.6	3111.3±212.2
M2								
Mín	28.7	29.7	7.3	6.6	7.5	7.7	2913.1	2839.9
Máx	30.1	32.8	9.0	8.7	9.7	9.7	3360.9	3408.5
$\bar{x} \pm s$	29.5±0.5	31.6±1.1	7.9±0.5	7.4±0.7	8.3±0.7	8.7±0.6	3124.3±149.8	3148.5±162.6
Valor* aceptable	28.0- 32.0		5.0-9.0		7.0-8.3			

*Valores recomendados para cultivo de camarón a baja salinidad de acuerdo a Van Wyk y Scarpa (1999).

Existen estudios de cultivos de camarón a baja salinidad exitosos como el descrito por Bray *et al.* (1994) que registraron mayores pesos en juveniles cultivados en salinidades de 5 y 15 g/L que a 25, 35 y 49 g/L; Samocha *et al.* (2004) y Sowers y Tomasso (2006) encontraron un mayor crecimiento en agua de baja salinidad utilizando 2 g/L que en agua de mar. Araneda *et al.* (2008) cultivaron *L. vannamei* en agua dulce a 90, 130 y 180 camarones/m² con una supervivencia de 76.1, 68.9 y 65.9, respectivamente, mencionando que la supervivencia del camarón disminuye conforme se incrementa la densidad de siembra. Mariscal-Lagarda *et al.* (2012) cultivaron camarón a 0.65 g/L con una densidad de 50 camarones/m² con una supervivencia de 53.6%. Alarcón-Silva (2013) realizó un cultivo de camarón con una densidad de 75 PL/m² a 1.3 y 1.9 g/L con sobrevivencias de 46.8 y 90.1%, respectivamente. Laramore *et al.* (2001) encontraron mejor supervivencia y crecimiento en postlarvas a 30 g/L (80%)

que a 2 g/L (20%), e incluso detectaron mortalidad del 100% por debajo de 2 g/L. Sin embargo, Laramore *et al.* (2001) mencionan que la supervivencia en juveniles es mayor que en postlarva a una salinidad de 2 g/L puesto que el efecto de la salinidad y crecimiento varía con el tamaño y edad de los organismos. Los camarones juveniles pueden ser capaces de sobrevivir a 2 g/L al igual que a una salinidad de 30 g/L (Bray *et al.*, 1994; Ogle *et al.*, 1992; Samocha *et al.*, 1998; Laramore *et al.*, 2001).

8.2.5. Clorofila *a*

La biomasa del fitoplancton comúnmente se estima mediante la concentración de clorofila *a*. Este es el principal pigmento fotosintético presente en las algas que se encuentra en cantidades variables en las células, dependiendo no solamente de la especie, sino posiblemente también de la etapa de su ciclo reproductivo (Páez-Osuna y Ruíz-Fernández, 2001). Tiene una gran importancia en los estanques de cultivo debido a su estrecha relación con la calidad del agua y la producción, además es una fuente de alimento natural que puede llegar a constituir el 50% de la dieta del camarón, y ayuda a disminuir el consumo de alimento balanceado, y por tanto, su costo de operación. También reduce las concentraciones de CO₂ y de nitrógeno amoniacal total, y a su vez, enriquece el sistema con oxígeno durante las horas de luz, lo que mejora la calidad de agua (Chien, 1992; Páez-Osuna y Ruíz-Fernández, 2001; Gregor y Marsálek, 2004; Martínez-Córdova *et al.*, 2010).

La clorofila *a* en la mayor parte del ciclo de cultivo (semanas 0 a 7) tuvo una tendencia a incrementarse en M1, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ambos módulos. El módulo M1 presentó un mínimo de 2.9 mg/m³ correspondiente al agua empleada en el inicio del experimento, y un máximo de 497.0 mg/m³ en la semana 9. En M2 fue incrementando su concentración hasta la semana 7, a partir de la semana 8 en

éste módulo empezó a haber un cambio en el color a café en los tanques dada la cantidad acumulada de sólidos suspendidos aunado al deterioro de la calidad de agua refiriéndonos a las altas concentraciones de los compuestos nitrogenados provocando una disminución significativa de la clorofila *a*; como se observa en la Tabla 13, el valor mínimo de clorofila *a* de inicio fue de 2.7 mg/m³ y el máximo se presentó en la semana 8 con 634.2 mg/m³ (Fig. 8.6).

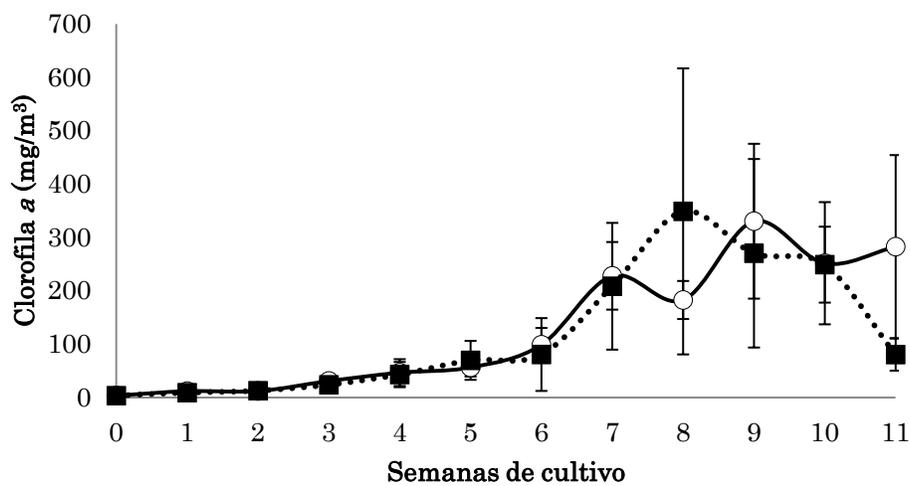


Fig. 8.6. Variación promedio de la concentración de clorofila *a* (\pm desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón *L. vannamei* (\circ M1 y \blacksquare M2).

La presencia de los nutrientes como N y P dentro del estanque son esenciales para el óptimo crecimiento del fitoplancton o productividad primaria y las altas tasas de aireación mezclan la columna de agua asegurando que la luz y el dióxido de carbono no se conviertan en una limitante (Burford *et al.*, 2003). La productividad primaria es mejorada con los fertilizantes antes y después del momento de la siembra del camarón aunado con el alimento a través del ciclo de crecimiento. Una vez que el estanque aumenta la cantidad de sólidos, y no tiene las condiciones favorables para el desarrollo de la

productividad primaria, va a decaer o reducirse la trama trófica dentro del estanque habiendo resultados desfavorables en el cultivo.

Una alta producción de fitoplancton trae como consecuencia una disminución de la penetración de la luz, lo cual puede provocar la disminución de la producción fotosintética en el fondo del estanque. Por las noches, disminuye el oxígeno disuelto debido a la respiración de todos los organismos, incluyendo el fitoplancton, por otro lado, durante el día produce una sombra para que el camarón tenga un ambiente adecuado mientras permanece en el fondo y evita el crecimiento de algas filamentosas (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004). Redfield (1958) muestra que para la relación N/P>16, una cantidad menor a ésta el fósforo se convierte en el limitante para el crecimiento del fitoplancton. Otro factor limitante es el substrato que se encuentra relativamente disponible para el crecimiento del cultivo (Liebig, 1840), o bien que se acumule en el medio de cultivo y se transforme en tóxico.

Respecto a los niveles ideales de clorofila *a*, no parece haber un valor de referencia, y es que ello va a depender más bien de la composición del fitoplancton, ya que se conoce que hay especies benéficas y no-benéficas. Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna (2003) enlistan a detalle las especies que se han observado en cultivos comerciales de *L. vannamei* de la región costera del noroeste de México, y en donde sobresalen las siguientes especies nocivas: *Gyrodinium instriatum*, *Synechocystis diplococcus*, *Schizothrix calcicola*, *Prorocentrum monimum* y *Gymnodinium catenatum*.

McIntosh *et al.* (2001) desarrollaron un cultivo de camarón *L. vannamei* con agua de baja salinidad en Arizona y encontraron que las concentraciones promedio de clorofila *a*, fluctuaron entre 998.9 mg/m³ y 2411 mg/m³. Mariscal-Lagarda *et al.* (2014) presentan valores de clorofila de 615 mg/m³ en un cultivo de camarón con una salinidad <1 g/L, siendo que en el presente estudio las concentraciones se encontraron por debajo de los valores mostrados por éstos

autores. Sin embargo, en el estudio que realizó Alarcón-Silva (2013) en un cultivo de camarón con una salinidad de 1.9 g/L, muestra concentraciones de clorofila de 345.2 mg/m³, siendo un valor comparable, lo cual demuestra que la densidad de fitoplancton en cultivos intensivos es por lo general siempre alta.

8.2.6. Sólidos suspendidos totales (SST)

La concentración de sólidos suspendidos totales dentro de los estanques camaronícolas se encuentra relacionada con la intensificación del cultivo, la cantidad de alimento suministrado, la tasa de recambio y las partículas fitoplanctónicas (Boyd, 1989; Hopkins *et al.*, 1995).

El contenido de SST en M1 tuvo una tendencia a incrementarse a lo largo del ciclo del cultivo variando desde 0.8 a 104.7 mg/L con una media de 27.3 mg/L, mientras que en M2 al igual que en M1, las concentraciones de SST incrementaron conforme transcurría el ciclo de cultivo, cuyos valores fluctuaron de 0.7 a 138.7 mg/L, con una media de 33.5 mg/L, la concentración máxima de 138.7 mg/L se presentó en la semana 10 (Tabla 13). Sin embargo, aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$), se observa que las medias en la semana 10 son más altas en M2 en comparación a M1. A lo largo de un ciclo de camarón, en un sistema cerrado sin recambio de agua, el camarón se va desarrollando incrementando la cantidad de alimento a suministrar y la cantidad de heces que el organismo desecha, aumentando de esta manera la cantidad de SST (Fig. 8.7).

Estos sólidos pueden llegar a depositarse y acumularse en el fondo de los tanques. Se realizan una serie de procesos donde una de ellas es la descomposición de materia orgánica, y el resultado de dichas reacciones son varios productos químicos que dependen de las condiciones de óxido-reducción predominantes en el medio. Dicha oxidación empieza por agotar las concentraciones de oxígeno, después se llevan a cabo por la nitrato-reducción

donde el agente oxidante es el NO_3^- , luego entran los óxidos de Fe y Mn, y por último, la etapa de sulfato-reducción que pueden llegar a obtener productos de la oxidación como amonio, ácido sulfhídrico y sus diferentes especies químicas (S^{2-} , HS^- , H_2S), que son tóxicos para el camarón (Páez-Osuna, 2001).

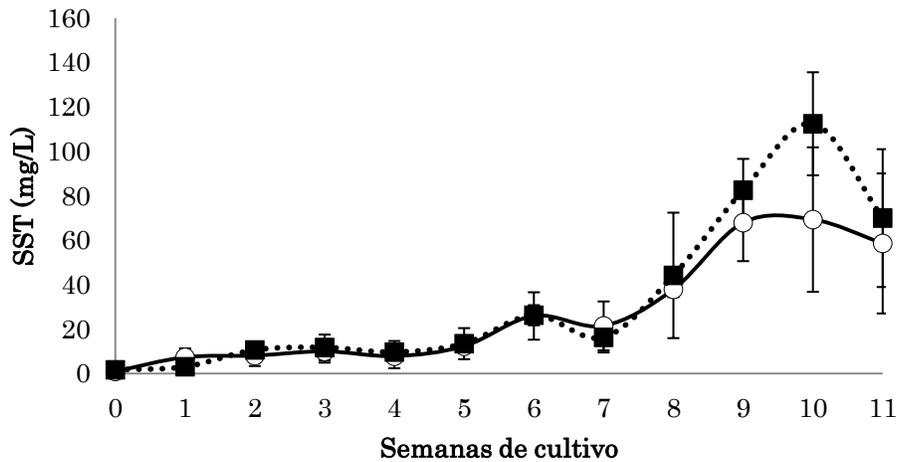


Fig. 8.7. Variación promedio de los sólidos suspendidos totales (\pm desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón *L. vannamei* (\circ M1 y \blacksquare M2).

A partir de la semana 10 cuando se realizaba la purga de los sedimentos en cada estanque, éstos tenían un color oscuro y un olor desagradable característico del ácido sulfhídrico, lo cual nos indica que el fondo de los sedimentos no era favorable para el camarón. Páez-Osuna (2001) menciona que además influye la calidad y reactividad de los sedimentos, si la calidad del agua se deteriora, a su vez, se deteriora la calidad de los sedimentos y bajo tales condiciones de estrés, el camarón no va a asimilar eficientemente el alimento, siendo susceptible a enfermedades dando lugar a una baja supervivencia y una pobre cosecha.

Existen trabajos como Meraz-Bautista (2008) quien realizó un estudio en 2 estanques de camarón a baja salinidad con una densidad de 13 org/m² y

registra una variación de 9.33 a 27.33 mg/L y de 83.33 a 16.67 mg/L de SST. Alarcón-Silva (2013) registró variaciones entre 5.6 y 102.0 mg/L de sólidos suspendidos totales en cultivo de camarón con una salinidad de 1.9 g/L y una densidad de siembra de 75 org/m², valores que son comparables con este estudio en cuanto a salinidad, densidad de siembra (M1) y concentración de SST, a pesar que éstos valores están por encima de los valores registrados por Meraz-Bautista (2008) debido a las diferencias de densidad de siembra. De acuerdo con Trece y Hamper (2000), existen alternativas para reducir los niveles de SST en los estanques tales como reducir la densidad de siembra, además de incrementar los niveles de aereación mecánica, ya que con estas medidas lograron una reducción en la descarga de 3.6 a 0.5 kg de SST/kg de camarón cosechado.

8.2.7. Nitrógeno amoniacal total (TAN)

El nitrógeno amoniacal total o amonio (TAN) se encuentra presente en el agua mediante dos formas químicas, el amonio no ionizado o amoniaco (NH₃) y el ión amonio o amonio ionizado (NH₄⁺). Es uno de los compuestos inorgánicos disueltos del nitrógeno que resulta tóxico para los organismos en altas concentraciones (Chien, 1992) y el mayor producto nitrogenado excretado por los crustáceos (Claybrook, 1983; Dall *et al.*, 1990) considerando que el camarón *L. vannamei* es un organismo amoniotélico, ya que la formación de amonio se considera un sistema primitivo para la excreción de nitrógeno y para ello requiere de muy poca energía (Forster y Goldstein, 1969). Tiende a acumularse en los sistemas de cultivo debido a la descomposición microbiana de la materia orgánica (Stanier *et al.*, 1976) y por algunas prácticas de fertilización (Boyd, 1982).

La proporción de cada una de las especies químicas mencionadas anteriormente, depende principalmente del pH, temperatura y salinidad ya que

es una reacción que se encuentra en equilibrio. De acuerdo a Millero (1996) es la siguiente: $NH_4^+ \leftrightarrow H^+ + NH_3$. Además, estos niveles se encuentran influenciados por el potencial óxido-reducción, debido a que controla la especiación química del nitrógeno. De acuerdo a Burford *et al.* (2003) un pH entre 7 y 8 dentro de los estanques puede resultar en baja proporción de la forma no ionizada (NH_3). El amonio no ionizado se considera tóxico por su alta solubilidad en lípidos y es capaz de difundirse a través de la membrana celular (Chen y Kou, 1993). Además resulta tóxico para la comunidad bacteriana que se encargan de la nitrificación (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*), inhibiendo este proceso, resultando en un incremento de la acumulación de TAN en el ambiente acuático e intensificando su toxicidad tanto a las bacterias como a los organismos (Russo, 1985).

Cuando el camarón *L. vannamei* se expone a un ambiente de baja salinidad, aumenta la excreción de amonio debido al intercambio de NH_4^+ por Na^+ del medio, y/o por el incremento en el catabolismo de los aminoácidos involucrados en la regulación osmótica. Se necesita de una absorción activa de sodio para compensar su pérdida en organismos que se encuentran en un medio hipotónico. Por esto, el aumento de la excreción de amonio favorece la captación de Na^+ mediante el funcionamiento de la bomba Na^+/NH_4^+ , para mantener la hemolinfa en homeostasis (Pequeux, 1995; Díaz *et al.*, 2001).

La concentración de TAN usualmente tiende a incrementarse conforme se aumenta la densidad de siembra y conforme avanza el ciclo de cultivo (Páez-Osuna 2001). En el presente estudio, el comportamiento en M1 durante las primeras 7 semanas se mantuvo constante a niveles <0.01 mg/L, incrementando su concentración de la octava semana en adelante, presentando un nivel máximo de 9.38 mg/L en la décima semana y en la semana 11 decayó hasta 2.88 mg/L, la concentración media de M1 durante el ciclo de cultivo fue de 1.24 mg/L. En M2, el comportamiento del TAN fue constante durante las

primeras 7 semanas manteniendo niveles <0.2 mg/L. Se presentó un aumento significativo en los niveles de concentración de TAN en la semana 8 con un valor de 13.91 mg/L, disminuyendo en las semanas siguientes. La variación de la concentración de TAN en M2 fue de <0.001 a 13.912 mg/L con una media de 3.23 mg/L (Tabla 13). Se presentaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre M1 y M2 en las semanas 8 y 9 (Fig. 8.8).

Por otra parte, se estimaron las concentraciones de amonio no-ionizado (NH_3) mediante la ecuación propuesta por Millero (1996), dando como resultado una variación en M1 desde ser no detectable (<0.001 mg/L) a 0.62 mg/L de N- NH_3 ; mientras que en M2 fluctuó de no detectable (<0.001 mg/L) a 0.91 mg/L de N- NH_3 . Los niveles de ambos módulos (M1 y M2) se encontraron por encima de lo propuesto (0.03 mg/L) por Van Wyk y Scarpa (1999) en las últimas semanas del cultivo, a partir de la semana 8 en M1 y a partir de semana 7 en M2. Sin embargo, al igual que en los resultados de amonio, ambos módulos mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) en las semanas 8 y 9 (Fig. 8.9).

El valor máximo (0.91 mg/L de N- NH_3) encontrado en M2 está por debajo del valor mencionado por Lin y Chen (2001) de $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ para *L. vannamei* en cultivo con salinidad de 15 g/L que es de 1.20 mg/L de N- NH_3 , tomando en cuenta la escasez de información dentro de la literatura disponible, además que esta $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ es para una salinidad mayor a este estudio, se sabe que a menor salinidad aumenta la toxicidad del amoniaco, y al ser el compuesto nitrogenado de mayor toxicidad en los crustáceos peneidos, la concentración de éste compuesto (NH_3) en el cultivo de camarón se le puede atribuir la alta mortandad que se tuvo en M2.

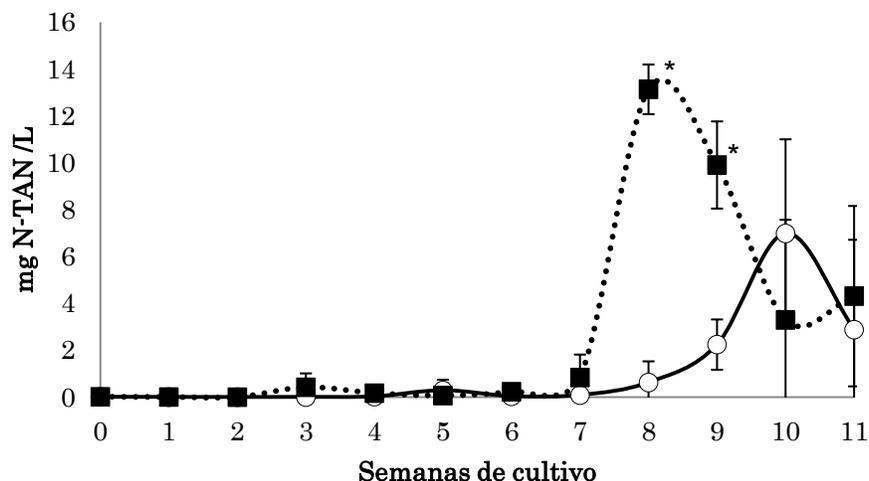


Fig. 8.8. Variación promedio de la concentración de nitrógeno amoniacal total (TAN) (\pm desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón (○ M1 y ■ M2). (*) Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre módulos (M1 y M2).

Uno de los grupos de organismos que se alimenta o nutre de amonio es el fitoplancton, cuya captación y asimilación es un proceso activo que requiere de luz para que se pueda llevar a cabo (Raven, 1984), por lo que resulta indispensable tener un cierto grado de transparencia en la columna de agua. En el caso particular de los módulos de cultivo de este estudio, se tuvo un aumento excesivo en la concentración de SST en las últimas semanas coincidiendo con un aumento en la concentración de amonio, lo que indica que dicho proceso de la asimilación de amonio pudiera haberse interrumpido. Sin embargo, es posible que el fitoplancton mixotrófico y heterotrófico, además de las bacterias, hayan contribuido posiblemente con la asimilación de amonio en condiciones oscuras ya que las tasas de consumo de amonio son mayores que en estanques convencionales (Burford y Glibert, 1999; Burford, 2000).

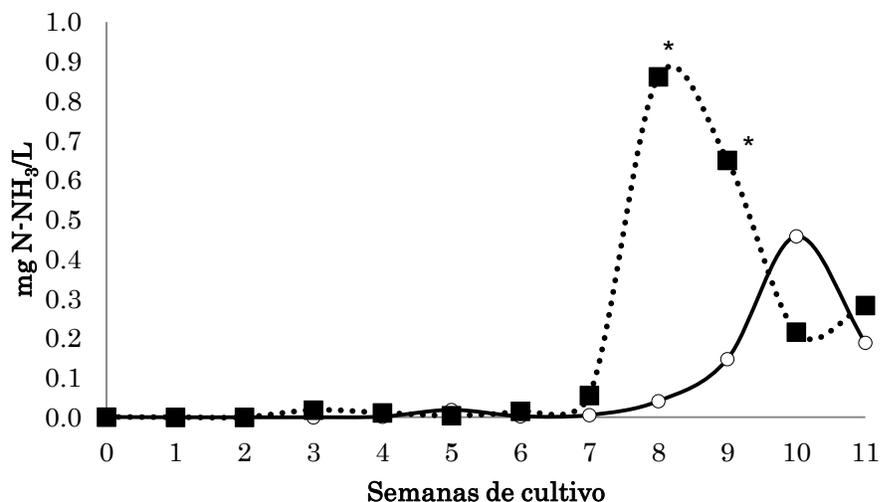


Fig. 8.9. Variación promedio de la concentración de nitrógeno amoniacal no ionizado (NH_3) (\pm desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón (\circ M1 y \blacksquare M2). (*)Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre módulos (M1 y M2).

Como se había mencionado anteriormente, el amonio es un producto de desecho tóxico resultante de la excreción y la mineralización de los detritus orgánicos (heces y alimento no consumido) (Godínez-Soirdia *et al.*, 2011). La excreción de amonio en crustáceos depende de varios factores como salinidad, temperatura, el ciclo de muda, el nivel nutricional y el control endocrino (Frías-Espéricueta y Páez-Osuna, 2001). Algunos investigadores como Gómez *et al.* (2004) y Re *et al.* (2004) concluyeron que hay un incremento en la tasa de excreción de amonio en postlarvas de *L. vannamei* y juveniles de *L. stylirostris* al exponerlos a un ambiente hipotónico. En el caso de las postlarvas, observaron que la concentración de aminoácidos libres aumentó en la hemolinfa del camarón; esto puede deberse al intercambio de NH_4^+ por Na^+ del medio, y/o por un incremento en el catabolismo de aminoácidos u otros compuestos nitrogenados incluidos en la regulación osmótica (Dalla, 1986).

Esto también puede contribuir con el aporte de amonio generado dentro de los estanques, ya que también puede estar asociado con el aumento en la talla del camarón que conforme aumenta su peso y talla, aumenta el aporte y excreción de amonio.

Valenzuela-Quiñones *et al.* (2010) muestran concentraciones mínimas y máximas de amonio de 0.26 a 0.31 mg/L en cultivos de camarón *L. vannamei* a una salinidad <1.0 g/L; Alarcón-Silva (2013) presenta una variación de niveles de amonio de 0.031 a 1.188 mg/L en un cultivo intensivo de camarón (75 org/m²) con una salinidad de 1.9 g/L, y Mariscal-Lagarda *et al.* (2014) realizaron un cultivo intensivo de camarón (50 org/m²) a baja salinidad <1.0 g/L, donde registraron una variación de amonio de <0.001 a 0.848 mg/L. Ninguno de estos autores encontró niveles de amonio por encima de 1.5 mg/L comparables a este estudio. El nivel óptimo de amonio sugerido por Van Wyk (1999) es de 0.03 mg/L. Dicho valor se mantuvo en ambos módulos hasta la séptima semana, pero luego tendió a incrementarse significativamente en las siguientes semanas pero sin rebasar la concentración letal media (CL₅₀ - 96 h) de 24.39 mg N-TAN/L y de 1.20 mg N-NH₃/L en juveniles de *L. vannamei* a una salinidad de 15 g/L de acuerdo a Lin y Chen (2001). Sin embargo, Barbieri *et al.* (2010) presentan un CL₅₀-96 h de 19.12 mg N-NH₄/L en camarón *L. schmitti* a una salinidad de 5 g/L. Estos niveles registrados de las CL₅₀ nos permiten de alguna manera evidenciar que los niveles registrados en el presente estudio particularmente en las últimas semanas pudieran estar cerca de tales valores y por ende provocar daños subletales en los organismos. Es importante también considerar que no se dispone de datos de CL₅₀ para el amonio en bajas salinidades para esta especie, y por otro lado, se sabe que cuando se expone a esta especie en bajas salinidades, la toxicidad del amonio se incrementa, por tanto es de esperar que las CL₅₀ sean más bajas, por lo que se debe de tomar en cuenta este punto.

El amonio causa daños al sistema nervioso central (Wright, 1995), provoca daños a las branquias y reduce la capacidad del transporte de oxígeno de la hemolinfa, mientras que aumenta el consumo de oxígeno en los tejidos (Chien, 1992; Racotta y Hernández-Herrera, 2000), y además de que el camarón incrementa la frecuencia del ciclo de muda (Chen y Kou, 1992). En crustáceos peneidos, el amonio puede afectar: (a) el balance ácido-base, dado que el NH_3 liberado desde el medio adyacente a la hemolinfa o el que se genera a partir de la producción metabólica, es convertido a NH_4^+ con la liberación de OH^- , lo que puede provocar un aumento del pH intracelular afectando las reacciones enzimáticas y la estabilidad de la membrana (Campbell, 1973); (b) la osmoregulación, ya que en altos niveles de amonio se incrementa la permeabilidad del organismo, reduciendo la concentración iónica de la hemolinfa (Lloyd y Orr, 1969; Chen y Chen, 1996), además que la adición de iones NH_4^+ al medio externo resulta en la inhibición de la absorción de Na^+ (Magnum *et al.*, 1976) y tomando en cuenta que es el catión más abundante en la hemolinfa, reduce su osmolaridad (Chen y Chen, 1996); (c) el metabolismo y excreción del nitrógeno, conforme aumenta el nivel de amonio en el agua, la excreción de la mayoría de los organismos acuáticos decrece y el nivel de amonio en la hemolinfa y en los tejidos aumenta, lo que puede provocar serios efectos sobre la fisiología del organismo a nivel celular, de órganos y sistemas, siendo que la primera reacción del organismo puede ser el cese y/o la reducción de alimentación, lo cual disminuye la formación de amonio metabólico y por ende, una reducción en la tasa de crecimiento (Colt y Armstrong, 1981); (d) la respiración y el transporte de oxígeno, el efecto del amonio sobre el transporte del oxígeno incluye daños a las branquias, la reducción de la capacidad de la sangre para transportarlo a consecuencia de cambios en el pH, incremento en la demanda de oxígeno y daños histológicos a las células rojas y órganos que las producen, aunado a esto la toxicidad del amonio aumenta a bajas concentraciones de oxígeno, lo cual se le atribuye a un incremento en la captura

de amonio como consecuencia del aumento en la tasa de ventilación de las branquias para prevenir la hipoxia (Colt y Armstrong, 1981; Allan *et al.*, 1990); y (e) las tasas de crecimiento y el ciclo de muda, se tienen variaciones en la tasa de excreción a través del ciclo de muda que pueden estar directamente relacionados con las perturbaciones del metabolismo del nitrógeno en varios tejidos como el músculo, hepatopáncreas y el integumento (Regnault, 1987), los cuales dan como resultado una reducción en la tasa de crecimiento (Chen y Kuo, 1992; Chen y Lai, 1992; Chen y Cheng, 1993; Robles, 1997; Frías-Espericueta y Páez-Osuna, 2001).

Como se puede observar, el efecto del amonio tiende a afectar primero a nivel celular hasta la parte externa del organismo, y al causar un primer daño dentro del organismo, desencadena una serie de procesos que van afectando las funciones vitales del camarón, pudiéndolo llevar hasta la muerte del mismo, siempre. De manera que si llegase a disminuir la concentración de amonio del medio a niveles “óptimos”, existe la posibilidad de que el organismo se recupere, pero si el organismo se encuentra muy afectado, al tener lesiones irreversibles (punto del no-retorno), ya que no hay tal recuperación sino una progresión de los daños hasta la muerte del organismo.

8.2.8. Nitritos

El nitrito (NO_2^-) es un producto intermediario durante el proceso de nitrificación de amonio a nitrato por bacterias aeróbicas autotróficas (Frías-Espericueta y Páez-Osuna, 2001; Lin y Chen, 2003). Es acumulado en los sistemas de cultivo debido al desequilibrio de la actividad bacteriana nitrificante causada por el deterioro de la calidad del agua. Al igual que el amonio, es altamente tóxico para los organismos acuáticos y puede causar desórdenes respiratorios (Needham, 1961; Alcaraz, 1999).

La concentración de nitritos a lo largo del cultivo se mantuvo estable para ambos módulos incrementando su concentración en la semana 11 en M1 y en la semana 10 en M2, puesto que, en las pruebas estadísticas se muestra que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos módulos en la semana 10. En M1 se presentó una variación de 0.001 a 1.08 mg/L de N-NO_2^- , con una media de 0.07 mg/L de N-NO_2^- . Mientras que en M2, las concentraciones de nitritos fluctuaron entre 0.001 y 2.26 mg/L de N-NO_2^- , con un promedio de 0.23 mg/L de N-NO_2^- (Fig. 8.10) (Tabla 13). A diferencia de los cultivos de camarón en aguas salobres, marinas e hipersalinas, que se caracterizan por tener niveles de nitritos bajos o muy bajos, los cultivos en agua de baja salinidad tienden a presentar concentraciones de nitritos más altas (Van Wyk, 1999). Este es uno de los rasgos diferenciales más relevantes entre los distintos sistemas de cultivo. Se deben evitar concentraciones mayores a 0.45 mg/L de N-NO_2^- , para prevenir alteraciones en el metabolismo, que de acuerdo a Gross *et al.* (2004) este valor se considera como concentración segura para camarones juveniles de *L. vannamei* en agua de 2 g/L de salinidad.

Valenzuela-Quiñones *et al.* (2010) registraron concentraciones mínimas y máximas de nitritos de 0.28 a 0.32 mg/L de N-NO_2^- en cultivos de camarón *L. vannamei* a una salinidad < 1.0 g/L. Alarcón-Silva (2013) encontró una variación de niveles de nitrito desde por debajo del límite de detección (< 0.001) hasta 0.072 mg/L de N-NO_2^- en un cultivo intensivo de camarón (75 org/m²) de una salinidad de 1.9 g/L. Mariscal-Lagarda *et al.* (2014) realizaron un cultivo intensivo de camarón (50 org/m²) a baja salinidad (< 1.0 g/L), con una variación de nitrito de < 0.001 a 1.450 mg/L de N-NO_2^- . En el presente estudio se obtuvieron valores más altos que los encontrados por Valenzuela-Quiñones *et al.* (2010) y Alarcón-Silva (2013), pero comparables con el trabajo realizado por Mariscal-Lagarda *et al.* (2014).

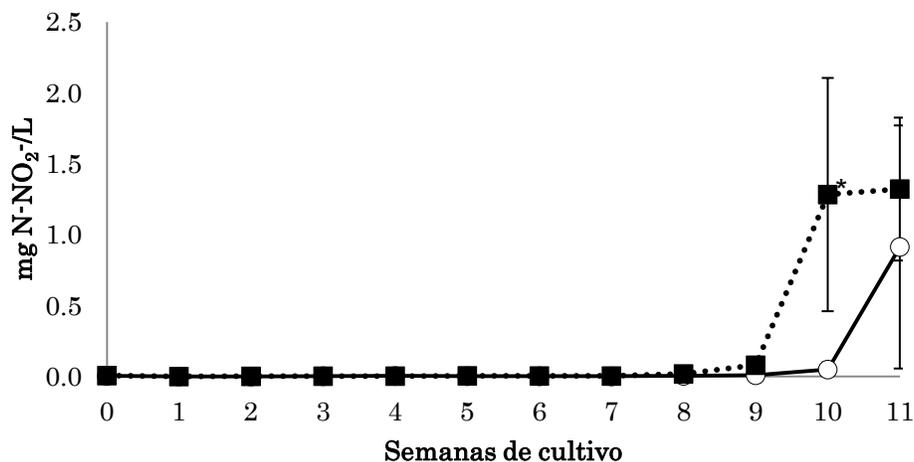


Fig. 8.10. Variación promedio de la concentración de nitritos (\pm desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón *L. vannamei* (○ M1 y ■ M2). (*)Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre módulos (M1 y M2).

Van Wyk (1999) menciona que los nitritos deben de estar ≤ 1 mg/L de N-NO₂⁻. A pesar de que en el cultivo en ambos módulos aumentaron significativamente las concentraciones de nitrito de una semana a otra, superaron este nivel óptimo, por lo que se puede suponer que a dicha concentración empieza a causar un cierto nivel de estrés en el camarón, sin embargo, esto hace un efecto sinérgico con las concentraciones de amonio, intensificando su toxicidad en una exposición aguda (48 h) (Alcaraz *et al.*, 1999a; Shuler *et al.*, 2010). Por su parte, Gross *et al.* (2004) mencionan que la CL₅₀-96 h es de 8.9 mg/L de N-NO₂⁻ para una salinidad de 2 g/L en camarones juveniles de *L. vannamei*.

La principal acción tóxica de NO₂⁻ en crustáceos, es debido a la conversión de la proteína (hemocianina) encargada del transporte de oxígeno a formas que son incapaces de realizar su transporte (metahemocianina) causando hipoxia y finalmente, la muerte. En la hemocianina cada sitio de unión con el oxígeno

contiene dos átomos de cobre (Cu^{1+} , conocida como deoxihemocianina), la cual cambia su estado de oxidación cuando se le une el O_2 (Cu^{2+} , conocido como oxihemocianina) (Chen y Cheng, 1995). La entrada de NO_2^- al plasma sanguíneo está asociada con la oxidación de los átomos de cobre ($\text{Cu}^{1+} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$), donde la deoxihemocianina es oxidada en metahemocianina, producto de la cual no puede enlazar de nuevo al oxígeno molecular (Tahon *et al.*, 1988; Chen y Chen, 1992; Jensen, 2003). Además, se han encontrado los siguientes efectos en organismos acuáticos (Lewis y Morris, 1986; Eddy y Williams, 1987; Harris y Coley, 1991; Jensen, 2003): (1) descenso de los niveles extra e intracelulares de Cl^- , causando un desbalance electrolítico severo; (2) descenso de los niveles de K^+ intracelular e incremento de K^+ extracelular, afectando los potenciales de la membrana, neurotransmisión, contracciones musculares y las funciones del corazón; (3) formación de compuestos de N-nitroso que son mutagénicos y carcinogénicos; (4) daños a la mitocondria en células hepáticas causando escasez de O_2 en los tejidos; (5) afectación o represión del sistema inmune, disminuyendo la tolerancia a enfermedades bacterianas y parasitarias.

Entre los diferentes factores ambientales que puedan afectar la toxicidad del nitrito al camarón, parece ser que la más importante es la concentración de cloruros del medio, ya que por medio de las branquias, el NO_2^- entra por la misma ruta que tiene el Cl^- por ser inhibidor competitivo del mecanismo de captación de cloruro branquial activo ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$), puesto que elevadas concentraciones de Cl^- en el agua pueden inhibir la absorción de NO_2^- y de esta manera proteger al organismo de la acción del tóxico (Tomasso *et al.*, 1979; Eddy y Williams, 1987; Harris y Coley, 1991; Jensen, 2003; Camargo y Alonso, 2006).

8.2.9. Nitratos

Los nitratos (NO_3^-) son el resultado de la segunda etapa de la nitrificación, donde los nitritos se oxidan a nitratos por medio de las bacterias *Nitrobacter*. Esta forma química del nitrógeno se considera no-tóxica o poco tóxica, ya que el camarón puede sobrevivir a niveles de hasta 200 mg/L (Lee y Wickins, 1997). Sin embargo, puede ser un problema cuando sobrepasan este límite y se encuentran expuestos por un tiempo prolongado. De acuerdo a Van Wyk *et al.* (1999) los niveles óptimos se deben de mantener por debajo de 60 mg/L de N-NO_3^- en cultivos de agua de baja salinidad.

El comportamiento de la concentración de nitratos en M1 se mantuvo constante a lo largo del ciclo, el cual tuvo un nivel mínimo de <LD (<0.001 mg/L de N-NO_3^-) y un máximo de 11.75 mg/L de N-NO_3^- en la semana 11 presentando en M1 una media de 0.77 mg/L de N-NO_3^- . Por otro lado, en M2 no se encontró una tendencia clara dado que las variaciones en su concentración oscilaron significativamente a partir de la octava semana, dicho módulo tuvo un valor mínimo de <LD y un valor máximo de 42.64 mg/L de N-NO_3^- en la décima semana, teniendo una media de 4.16 mg/L de N-NO_3^- (Tabla 13). Por otra parte, se observa que en la semana 8 se presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de concentración de nitratos en ambas semanas (Fig. 8.11).

Valenzuela-Quiñones *et al.* (2010) registraron concentraciones mínimas y máximas de nitrato de 0.73 a 0.77 mg/L en cultivos de camarón *L. vannamei* a una salinidad <1.0 g/L. Alarcón-Silva (2013) encontró una variación de niveles de nitrato de 0.04 a 2.78 mg/L en un cultivo intensivo de camarón (75 org/m²) de una salinidad de 1.9 g/L. Mariscal-Lagarda *et al.* (2014) realizaron un cultivo intensivo de camarón (50 org/m²) a baja salinidad <1.0 g/L, con una variación de nitrato de 5.25 a 172.2 mg/L. En el presente trabajo, se obtuvieron concentraciones por encima de Valenzuela-Quiñones *et al.* (2010) y Alarcón-

Silva (2013), pero por muy debajo de Mariscal-Lagarda *et al.* (2014). Según Van Wyk (1999) el intervalo óptimo de nitratos es de ≤ 60 mg/L N-NO_3^- , lo que quiere decir que las concentraciones de nitratos en este estudio no fueron una limitante o no fueron niveles que conlleven a causar daños en el organismo.

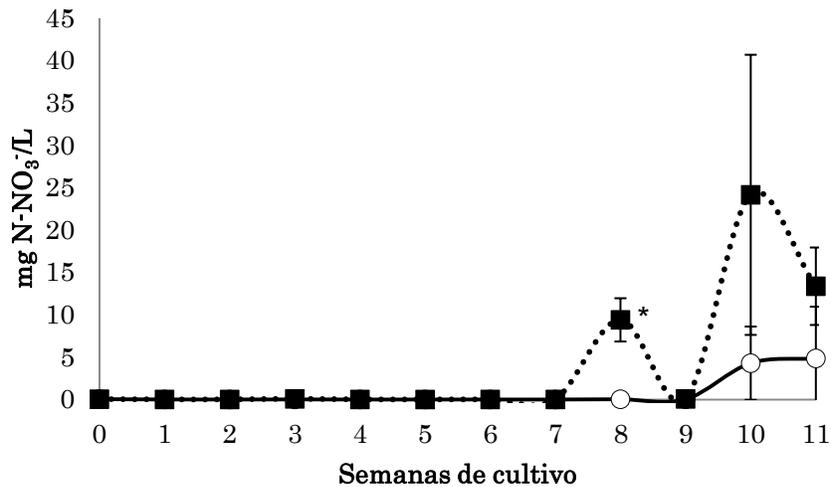


Fig. 8. 11. Variación promedio de la concentración de nitratos (\pm desviación estándar) de cada módulo a lo largo del cultivo de camarón *L. vannamei* (○ M1 y ■ M2). (*)Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre módulos (M1 y M2).

Los nitratos como en el caso de los nitritos, la principal acción tóxica que pueden tener en los crustáceos, parece ser la conversión de la hemocianina encargada de acarrear el oxígeno a formas incapaces de realizar el transporte del mismo (metahemocianina) (Jensen, 1996; Scott y Crunkilton, 2000; Cheng *et al.*, 2002). Sin embargo, antes de que los nitratos se conviertan en un tóxico, el nitrato debe ser convertido a nitrito bajo las condiciones internas del organismo (Cheng y Chen, 2002). Por otro lado, debido a la baja permeabilidad de las branquias a los iones NO_3^- , la captación en los organismos resulta mayormente limitada, que la captación de NO_2^- , el cual contribuye a que la

toxicidad del NO_3^- sea relativamente baja (Jensen, 1996; Scott y Crunkilton, 2000; Cheng y Chen, 2002; Alonso y Camargo, 2003; Camargo *et al.*, 2005a).

8.2.10. Nitrógeno inorgánico disuelto (NID)

El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) es la suma de las formas químicas de amonio, nitritos y nitratos, los cuales como se ha mencionado anteriormente tienen ciertos efectos sobre el camarón. El efecto en el metabolismo del camarón a consecuencia de los desechos nitrogenados ocasiona anoxia cuando los niveles son muy elevados y su exposición es prolongada. Cabe señalar que la toxicidad de estos desechos está en función del pH, temperatura, alcalinidad, salinidad; observándose que se incrementa el efecto tóxico conforme disminuye la salinidad del agua. Esto se debe a la acción antagonista que presenta el ión cloro contra estos productos nitrogenados (Lin y Chen, 2001; Lin y Chen, 2003). La toxicidad del amonio y nitrito ha sido demostrada para peces, moluscos y crustáceos. El orden de toxicidad de cada uno de estas especies químicas que constituyen el nitrógeno inorgánico disuelto de acuerdo a Chen *et al.* (1990) es la siguiente:

Amoniacó (NH_3) > amonio (NH_4^+) > nitrito (NO_2^-) > nitrato (NO_3^-).

Como se puede observar en la Fig. 8.11, en el módulo M1, el NID se comporta de manera constante con poca variación en su concentración, aunque a partir de la semana 8 empieza a subir su nivel, éste módulo presentó una variación de 0.01 a 20.14 mg/L de N-NID con una media de 1.96 mg/L de N-NID. Por otro lado, en M2 el N inorgánico disuelto fluctuó de 0.01 a 52.79 mg/L de N-NID con una media de 6.84 mg/L de N-NID (Tabla 13), el cual tendió a subir drásticamente a partir de la semana 7 con grandes fluctuaciones en las siguientes semanas. El comportamiento de las concentraciones del NID fueron similares a las tendencias que tuvieron las concentraciones de nitratos y, principalmente de amonio, siendo la especie dominante. En la semana 8 y 9 se

presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre módulos, lo cual indica que en M2 tuvo altos niveles de concentraciones de compuestos de NID en comparación a M1, que de acuerdo a estos niveles se le atribuye a la mortandad en M2.

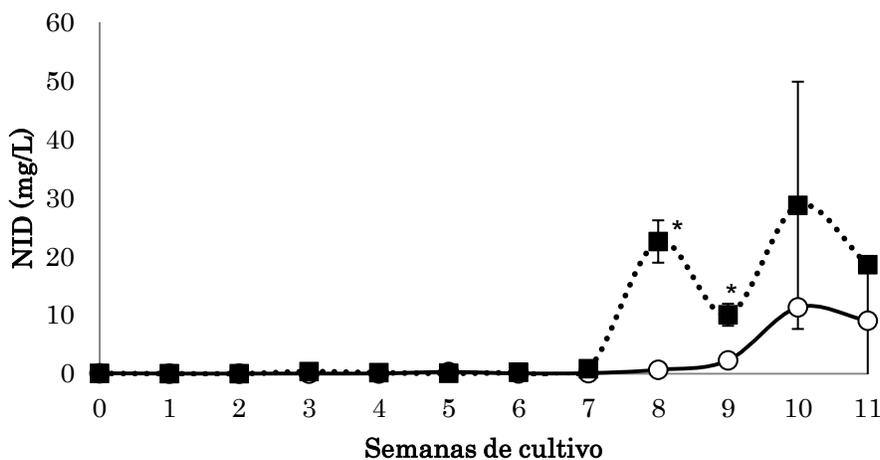


Fig. 8.12. Variación promedio de la concentración del nitrógeno inorgánico disuelto (\pm desviación estándar) de cada módulo a lo largo del ciclo de camarón *L. vannamei* \circ M1 y \blacksquare M2). (*) Muestra la semana donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre módulos (M1 y M2).

Las estrategias de alimentación pueden influenciar tanto en la calidad del agua y la salud del camarón, ya que la optimización de las estrategias de alimentación es una consideración primordial en el manejo de estanques de cultivo intensivo de camarón, lo cual implica la nutrición, el proceso y manejo del alimento (Jory, 1995; Burford y Williams, 2001; Smith *et al.*, 2002). La proteína es el componente más costoso del alimento (Thoman *et al.*, 2001), y no es totalmente aprovechado por el camarón, haciendo que el nitrógeno (N) sea un fertilizante costoso el cual promueve el crecimiento de poblaciones bacterianas y de plancton (Moriarty, 2001).

En cultivos tradicionales en agua de mar y salobre así como en aguas de baja salinidad, los desechos orgánicos generados por los procesos de alimentación se acumulan en el fondo del estanque. Esto conduce al desarrollo de condiciones micro-aeróbicas o anaeróbicas, nitrificación lenta y una tasa lenta de reciclamiento de materia orgánica dentro de la trama trófica natural del estanque teniendo como consecuencia el aumento de metabolitos tóxicos, los cuales deben de ser removidos con recambios diarios de agua, resultando en una pérdida neta de nitrógeno (Piedrahita, 2003; Audelo-Naranjo, 2010).

En este caso, se observó algo similar, incluso hubo la necesidad de retirar los lodos del fondo mediante purgas semanales abriendo la válvula de descarga por periodos cortos de tiempo (1 minuto o menos) para permitir la salida de los lodos acumulados en el fondo del tanque, esto fue practicado una vez por semana a partir de la semana 7 y de la semana 9 dos veces por semana. Esto con el objetivo de reducir la carga de lodos y con ello mejorar las condiciones del fondo de los tanques y de la columna de agua. Por otra parte, en cada uno de los estanques de cada módulo se encontraba un biofiltro el cual ayuda a promover la nitrificación para convertir los compuestos altamente tóxicos de amonio y nitrito a un producto menos tóxico como el nitrato por medio de las bacterias nitrificantes que proliferan en la malla del biofiltro al haber el medio y condiciones adecuadas para su crecimiento; pero a su vez, si el medio donde se encuentran las bacterias nitrificantes adheridas al biofiltro es inadecuado, el proceso de nitrificación se verá afectado, resultando en altos niveles de amonio y nitrito, supresión del crecimiento, problemas de salud y mortandad de los organismos (Kuhn *et al.*, 2010).

Tabla 13. Mínimos, máximos y promedio con desviación estándar de las variables de calidad de agua del cultivo de camarón *L. vannamei* en agua de baja salinidad (1.9 g/L) para el módulo 1 y módulo 2. Las concentraciones de TAN, amonio no-ionizado, nitritos, nitratos, NID y SST se expresan en mg/L, y las concentraciones de clorofila *a* en mg/m³.

	TAN	NH ₃	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NID ^a	SST	Chl <i>a</i>
M1							
Mín	<LD ^b	<LD	<LD	<LD	0.01	0.80	2.86
Máx	9.38	0.62	1.08	11.75	20.14	104.67	496.97
$\bar{x} \pm s$	1.24±2.57	0.08±0.10	0.07±0.16	0.77±2.48	1.96±4.46	27.32±27.31	127.71±132.49
M2							
Mín	<LD	<LD	<LD	<LD	0.01	0.67	2.74
Máx	13.91	0.91	2.26	42.64	52.79	138.67	634.18
$\bar{x} \pm s$	3.23±4.80	0.18±0.30	0.23±0.57	4.16±8.81	6.84±11.50	33.53±37.16	116.26±144.64

^b<LD representa valores por debajo del límite de detección (<0.001 mg/L).

Existen trabajos donde se pudo extraer información del NID en cultivos intensivos de camarón a baja salinidad, como Valenzuela-Quiñones *et al.* (2010) quienes registraron concentraciones mínimas y máximas de NID de 1.27 a 1.40 mg/L en cultivos de camarón *L. vannamei* a una salinidad <1.0 g/L. Alarcón-Silva (2013) observó una variación de niveles de NID de 0.07 a 4.04 mg/L en un cultivo intensivo de camarón (75 org/m²) de una salinidad de 1.9 g/L. Mariscal-Lagarda *et al.* (2014) realizaron un cultivo intensivo de camarón (50 org/m²) a baja salinidad <1.0 g/L, donde tuvieron una variación de NID de 5.25 a 174.50 mg/L. Los valores que se obtuvieron en el presente estudio estuvieron por encima de los registrados por Valenzuela-Quiñones *et al.* (2010) y Alarcón-Silva (2013), pero por debajo de los de Mariscal-Lagarda *et al.* (2014). En la Tabla 13, se presentan los valores promedio con su desviación estándar, además de los mínimos y máximos de amonio, nitritos, nitratos, nitrógeno inorgánico disuelto, sólidos suspendidos y clorofila *a* que se presentaron a lo largo del cultivo intensivo de camarón blanco *L. vannamei* en agua de baja salinidad.

8.3. Análisis en fresco

Se analizaron un total de 63 organismos durante 70 días de cultivo en ambos módulos (M1 y M2), en las características externas, el 19% se presentaron como camarones aparentemente sanos, y en el resto (81%) se observó coloración rojiza en sus apéndices, melanización focal y multifocal en cutícula, opacidad y flacidez muscular, algunos de estos camarones presentaron letargia.

Del 81% de los camarones que presentaron sígnologías, el 49% presentaron coloración rojiza en sus apéndices (antenas y urópodos) en ambos módulos a lo largo del ciclo de cultivo. El 21% mostró melanización focal y multifocal en cefalotórax y abdomen en ambos módulos apareciendo al inicio del cultivo, debido al estrés que tuvieron las postlarvas en el proceso de aclimatación. En la semana 7, coincidió con un pequeño aumento en la concentración de amonio, y en la semana 10, con altas concentraciones de los compuestos nitrogenados dentro de los estaqués y una alta carga de materia orgánica, los organismos estuvieron en constante estrés debido al confinamiento. En estos periodos los camarones se causan lesiones en la cutícula (Fig. 8.13d), permitiendo que las bacterias que se encuentran en la superficie del camarón o en el agua circundante, penetren en la herida. El camarón como defensa produce melanina (sustancia de coloración oscura) para bloquear la penetración de las bacterias (Barraco *et al.*, 2008) por ello se produjo la melanización. El 6% de los organismos presentaron flacidez muscular en la semanas 6, 7 y 10 en ambos módulos (Fig. 8.13b), y el 5% restante tuvo opacidad muscular (Fig. 8.13c) ambos en fase de postmuda (Tabla 14) (Fig. 8.16 y 8.17).

8.3.1. Branquias

Del total de los organismos analizados (n= 63), se observó el 40% de los camarones con materia orgánica y fitoplancton (GS 1-3), a partir de la semana

6 en adelante (Fig. 8.14). El 46% de los camarones mostraron melanosis y necrosis multifocal en las branquias (Fig. 8.14). La melanización se encontró al inicio del experimento, y posteriormente en la semana 7 continuando hasta el final del cultivo.

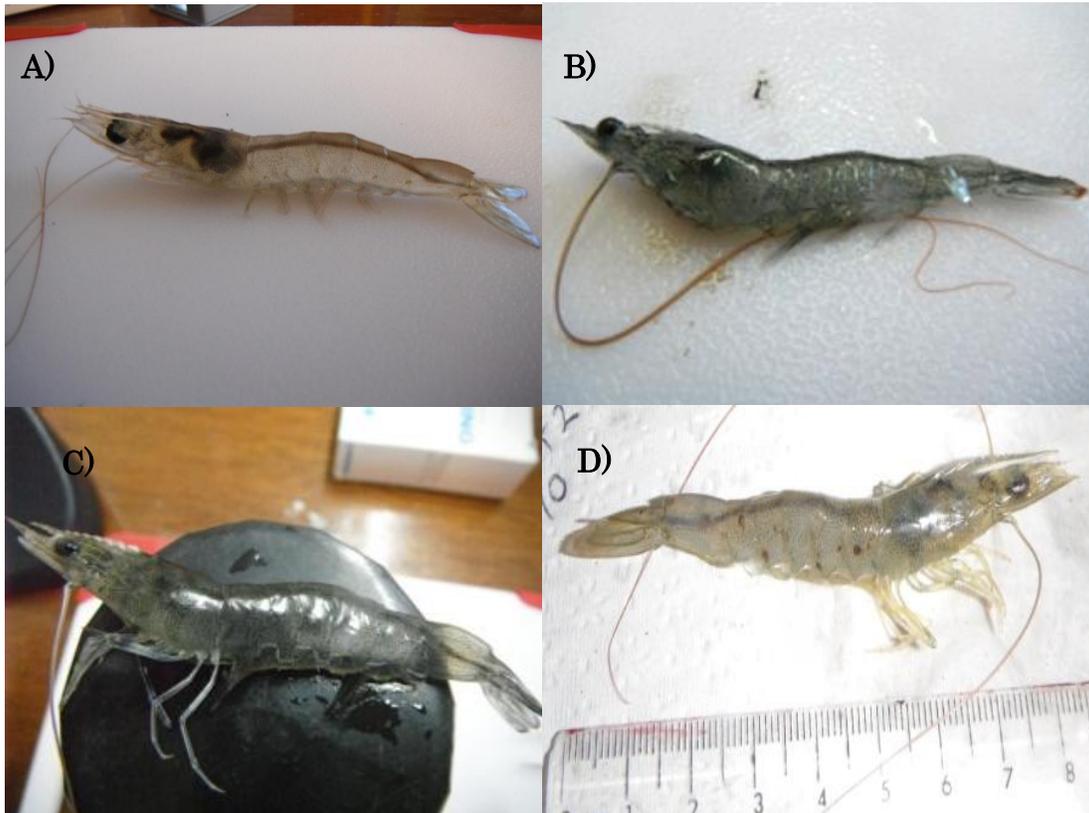


Fig. 8.13. Características externas del camarón *L. vannamei* a lo largo del cultivo. A) Camarón aparentemente sano; B) camarón con antenas rojas, cutícula suave y delgada con músculo flácido; C) camarón con opacidad en tercero, cuarto y quinto segmento abdominal; D) camarón con opacidad muscular, expansión de los cromatóforos, antenas rojas, necrosis multifocal en todos los segmentos abdominales y pleópodos amarillentos.

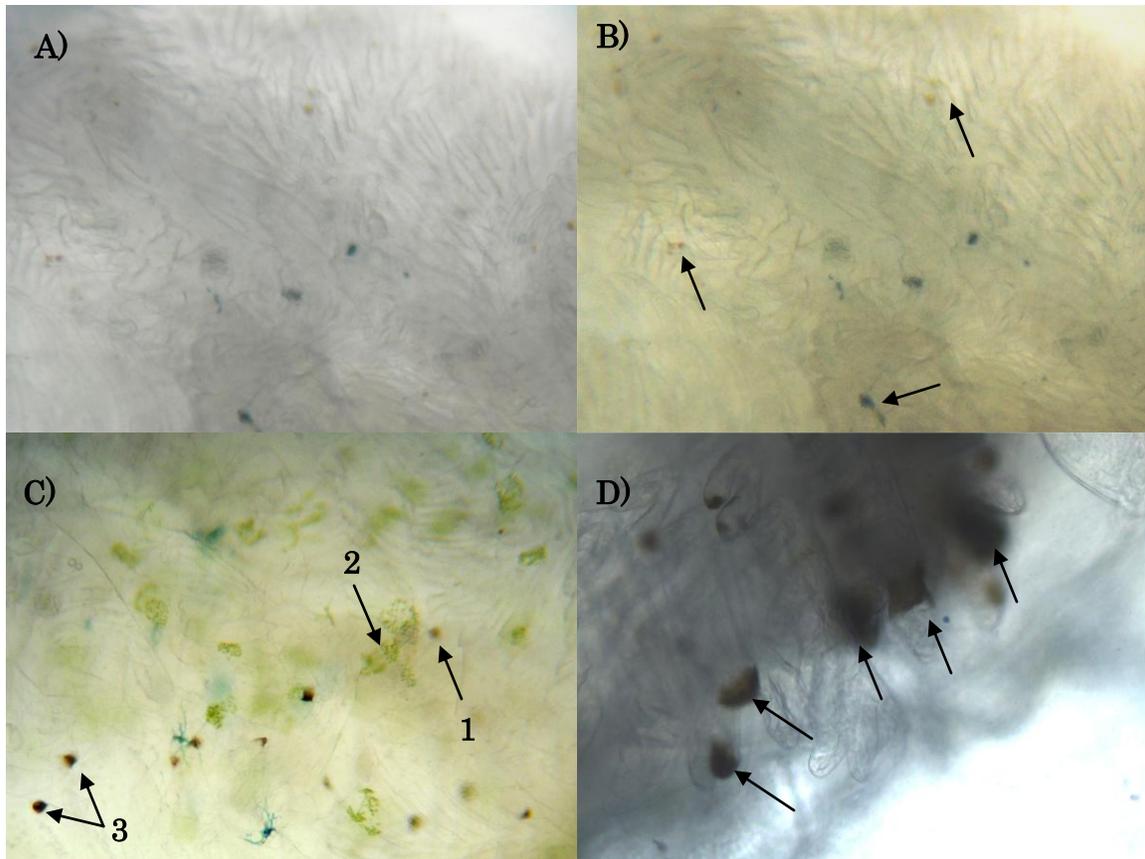


Fig. 8.14. Análisis en fresco de *L. vannamei* presentando A) branquias normales con objetivo de 10x; B) presencia de materia orgánica multifocal (flechas) con objetivo de 10x; C) presencia de materia orgánica (1), fitoplancton (2) y melanización multifocal (3) con objetivo de 4x; D) melanización multifocal (flechas) en dendobranquias con objetivo de 40x.

Olivas-Valdéz *et al.* (2010) encontraron en cultivos de camarón *L. vannamei* en agua subterránea (salinidad de 1.6 g/L), diatomeas (prevalencia de 0-20%, GS 1-2) y rotíferos (prevalencia de 0-40%, GS 1-2) en branquias. Olivas-Valdéz *et al.* (2010) en otro cultivo de camarón que realizaron con agua de río (salinidad de 0.8 a 5.3 g/L), los camarones presentaron algas coloniales Euglenoides (prevalencia de 0-100%, GS 1-2), protozoos peritricos *Epystilis* sp. (prevalencia de 0-100%, GS 1-3) y bacterias filamentosas *Leucothrix* sp.

(prevalencia de 0-100%, GS 1-3). Estos resultados coinciden con los del presente estudio al observarse fitoplancton en branquias y *Leucothrix* sp.

8.3.2. Hepatopáncreas

El 37% de los organismos presentó atrofia y deformación tubular en grado de severidad 1 a 4 en M1 y con mayor grado de severidad en los organismos de M2 (Fig. 8.15). De acuerdo a Olivas-Valdéz *et al.* (2010) en los camarones cultivados con agua de baja salinidad, fueron menos afectados por deformidad en los túbulos del hepatopáncreas con grados de severidad entre 1 y 2, estos valores son comparables a lo presentado en este trabajo haciendo referencia al módulo 1.

8.3.3. Intestino

Sin endoparásitos en los organismos analizados.

En las Fig. 8.16 y 8.17 se puede observar que las características externas como la coloración rojiza de los apéndices y la opacidad muscular son signos de un camarón estresado. Cuando los camarones se encuentran sometidos a factores de estrés, reducen su capacidad de absorción de nutrientes, su capacidad limpiadora y/o no mudan. Además del bajo rendimiento productivo, afecta la respuesta inmunológica, y por lo tanto, son altamente susceptibles a una invasión masiva de virus, bacterias y/o epicomensales, los cuales atacan las branquias, apéndices y el resto del cuerpo de juveniles y adultos, pudiendo causar altas mortalidades en cultivos con altas densidades. De acuerdo a Kruse (1995) en estados avanzados, la superficie corporal se torna rojiza, causando dificultad para la locomoción, alimentación, respiración, reproducción, finalizando con la muerte del organismo. Por otro lado, referente a las características internas, muestran que a partir de la séptima semana se observaron deformaciones en los túbulos hepatopancreáticos, así como

melanización y presencia de materia orgánica y de fitoplancton en las branquias. La acumulación de materia orgánica en las branquias puede alterar sus principales funciones como son: la respiración, osmoregulación y la excreción del organismo; como consecuencia se ve perjudicada la supervivencia de la población resultando de bajas a altas mortalidades dependiendo de la gravedad de los daños.

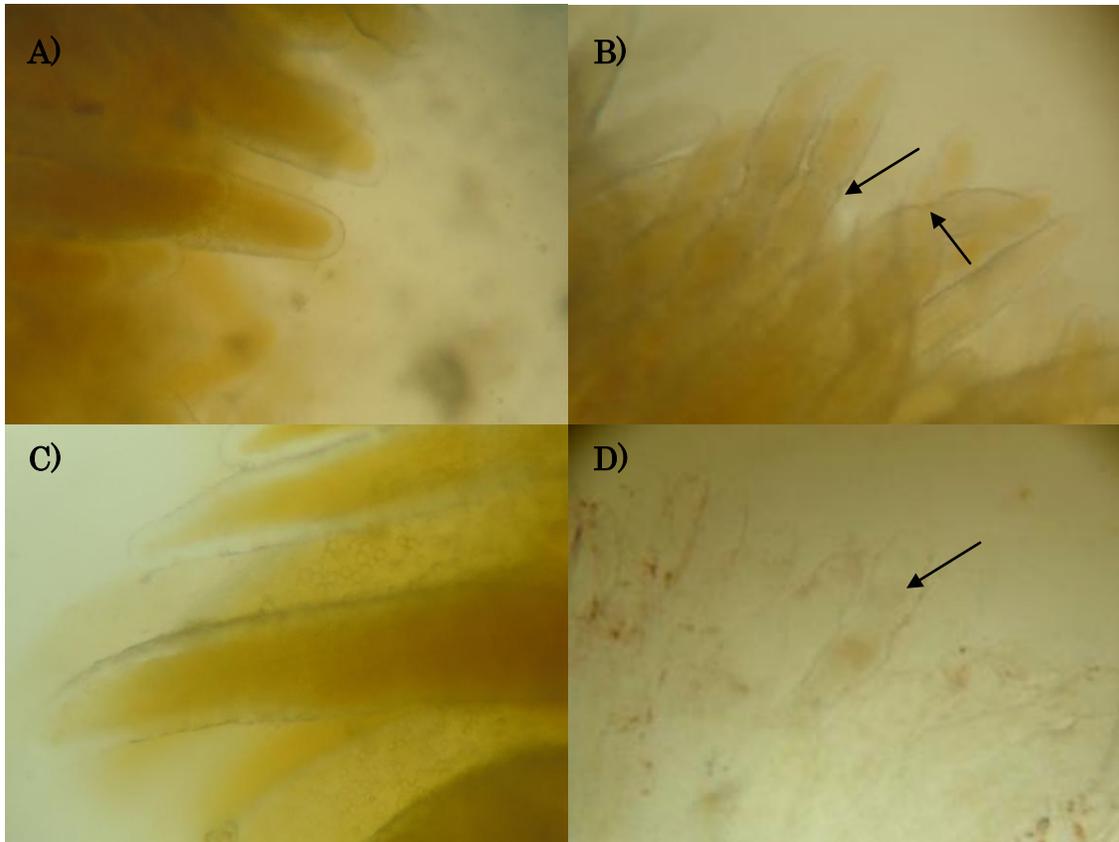


Fig. 8.15. Montaje en fresco de hepatopáncreas de *L. vannamei* A y C) hepatopáncreas con túbulos normales; B) túbulos con deformaciones tubulares (flechas) GS2; y D) túbulos vacíos y deformaciones (flechas) GS4.

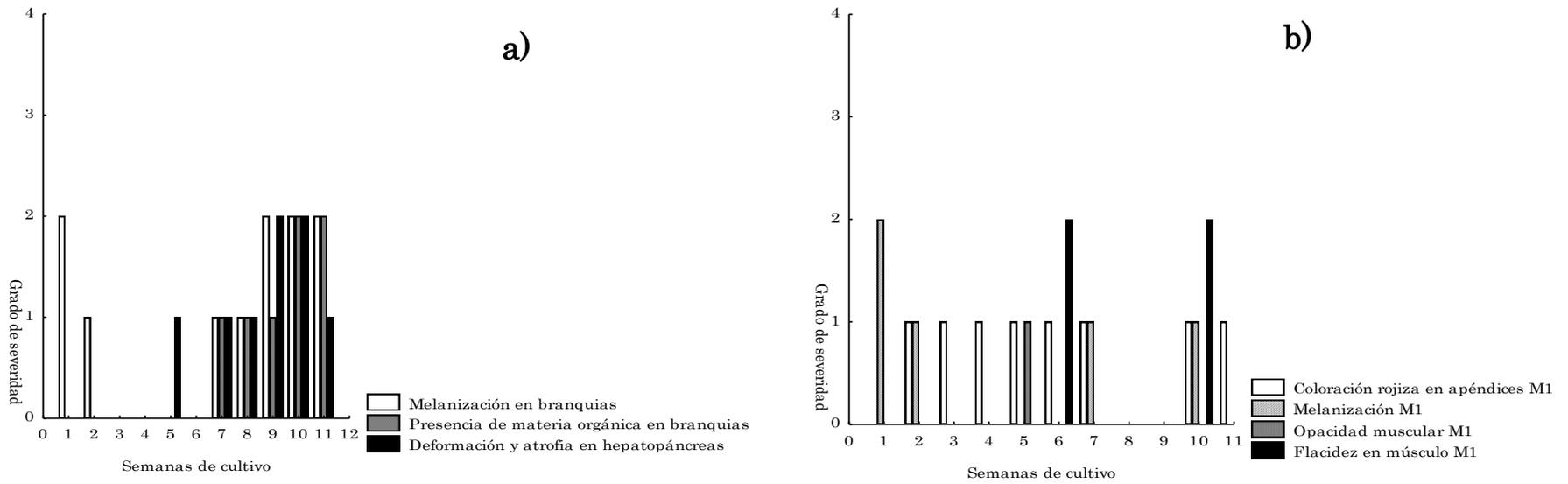


Fig. 8.16. Características a) internas y b) externas del camarón blanco *L. vannamei* muestreados en M1 a lo largo del ciclo de cultivo.

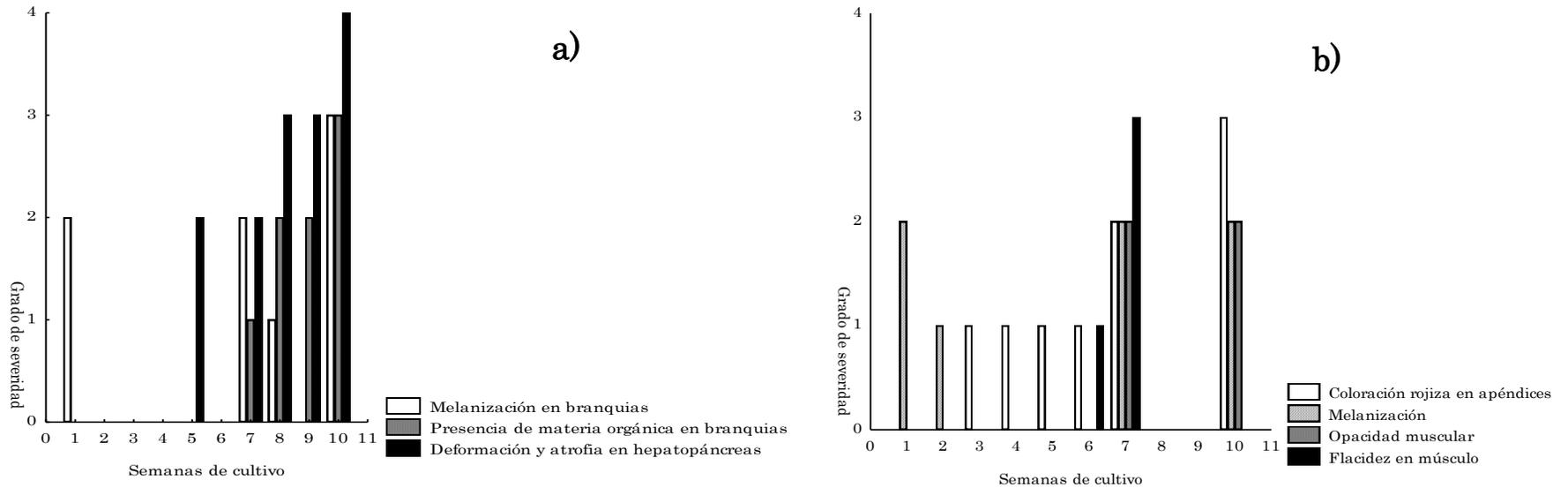


Fig. 8.17. Características a) internas y b) externas del camarón blanco *L. vannamei* muestreados en M2 a lo largo del ciclo de cultivo.

Tabla 14. Número de organismos muestreados en los módulos 1 y 2 que presentaron alteraciones en sus características internas y externas a lo largo del cultivo de camarón.

No. de organismos	Semanas de cultivo																								N ¹	GS ²	
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		M1=33	M2=30		M1	M2
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2					
Características externas																											
Coloración rojiza en apéndices	0	0	1	0	1	1	3	3	3	1	2	1	3	3	0	0	0	0	3	3	3	-	19	12	1	2	
Melanización	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	-	7	6	1	2		
Opacidad muscular	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	-	1	2	0	2		
Flacidez en músculo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	-	2	2	2	2	
Características internas																											
Melanización en branquias	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	1	3	0	3	3	3	-	19	10	1	2	
Presencia de materia orgánica en branquias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	2	3	2	3	3	3	3	3	-	16	10	1	3	
Deformación y atrofia en hepatopáncreas	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	3	3	1	2	3	2	3	1	-	12	11	2	4	

¹ N= No. total de organismos con alteraciones a lo largo del ciclo. En M1 se analizaron 33 camarones y en M2 fueron 30 organismos en total.

² GS = grado de severidad

8.4. Análisis histológico

Este trabajo se constituye de dos partes: (1) el **cultivo de camarón** a cielo abierto, donde se analizaron un total de 66 organismos en M1 y 97 organismos en M2; y (2) el **bioensayo de confirmación** para corroborar alteraciones y daños en órganos y tejidos observados durante el cultivo de camarón, y se analizaron un total de 95 organismos.

Los organismos analizados presentaron patologías en sus diferentes órganos y tejidos a lo largo del cultivo de camarón y de los 10 días de experimento (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 240 h), las cuales se describen a continuación.

8.4.1. Glándula antenal

La glándula antenal es un órgano renal, juega un rol importante en la regulación iónica, osmótica y de fluidos (agua y líquidos). Este sistema es una colección de túbulos altamente ramificados (también llamado laberinto), el cuál pasa fluido a través de una vejiga ligeramente alargada antes de que sea descargado vía poro localizado debajo de cada antena. Los túbulos de la glándula antenal tanto en condición secretora como no excretora se encuentra en todo el cefalotórax (Bell y Lightner, 1988; Alday-Sanz, 2010). Este órgano también se involucra en el control del volumen de hemolinfa, la osmoregulación de magnesio y sulfato en la hemolinfa, excreción de compuestos orgánicos y reabsorción de fluidos como azúcares y aminoácidos a partir de la filtración de la orina (Riegel y Cook, 1975; Mantel y Farmer, 1983; Lin *et al.*, 2000).

8.4.1.1. Cultivo de camarón

Durante las primeras cinco semanas no se observaron alteraciones en la glándula antenal de los organismos de M1 ni de M2. Las alteraciones como: deformación de la estructura, infiltración hemocítica y de hemolinfa (GS1) se

observaron a partir de la semana 6 y 7 en ambos módulos (Fig. 8.18). En los organismos de M2 se observó melanización, nódulos hemocíticos melanizados y núcleos picnóticos (GS3) en la semana 10 (Fig. 8.19).

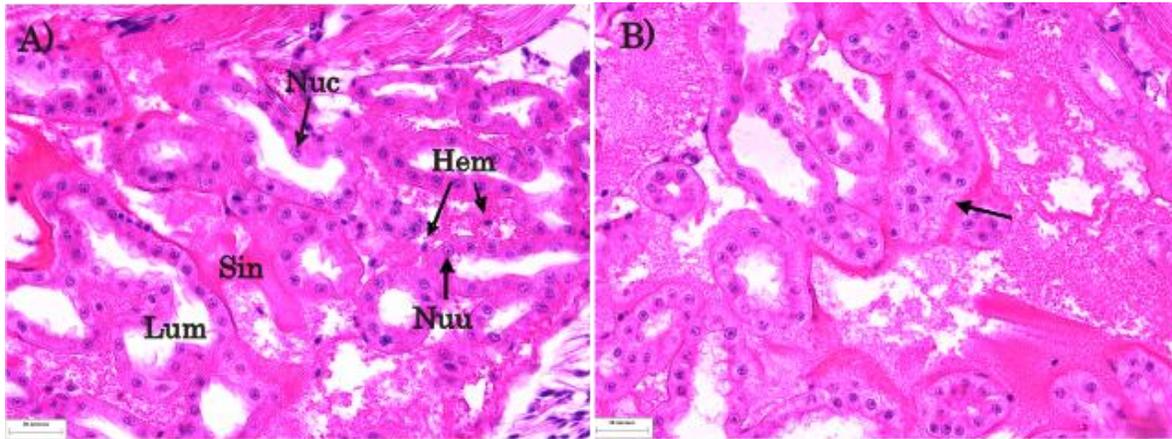


Fig. 8.18. Corte histológico de glándula antenal de *L. vannamei* en M1: A) túbulos normales donde las células epiteliales contienen un núcleo medial (Nuc) y un nucléolo bien definido (Nuu) y rodean el lumen (Lum), alrededor de estos túbulos se tiene a los senos de hemolinfa (Sin), los cuales contienen hemocitos (Hem); B) glándula antenal con pérdida de la estructura (flecha) e infiltración de hemolinfa. Tinción H&E. Objetivo 40x.

Las mayores alteraciones se presentaron en M2 con una prevalencia máxima de 50.0% ($26.8 \pm 17.2\%$) observándose en la semana 9. Por otro lado, en M1 se obtuvo una prevalencia máxima de 38.9% ($22.7 \pm 14.7\%$) presentándose en las semanas 8 y 9 (Tabla 15) (Fig. 8.42b).

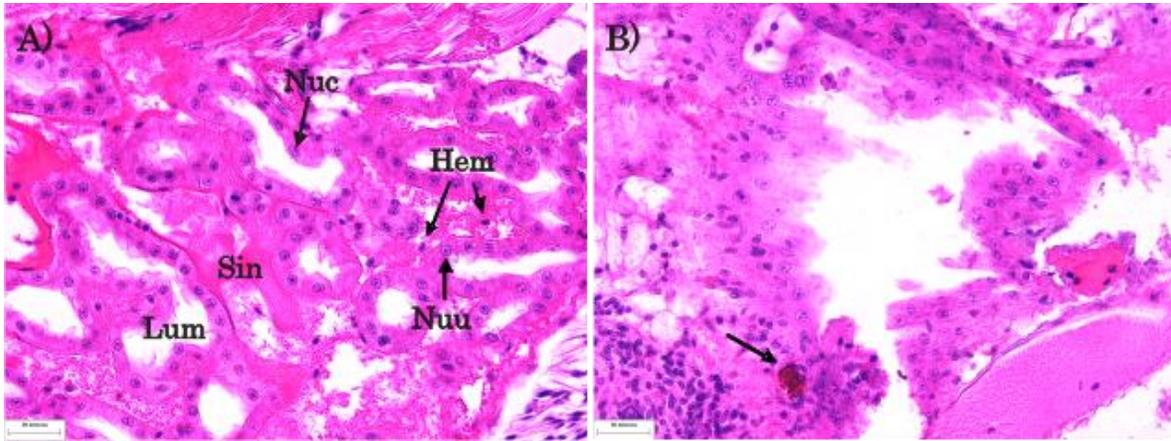


Fig. 8.19. Corte histológico de glándula antenal de *L. vannamei* en M2. A) túbulos normales donde las células epiteliales contienen un núcleo medial (Nuc) y un nucléolo bien definido (Nuu) y rodean el lumen (Lum), alrededor de estos túbulos se tiene a los senos de hemolinfa (Sin), los cuales contienen hemocitos (Hem); B) glándula antenal con pérdida de la estructura y nódulo hemocítico melanizado. Tinción H&E. Objetivo 40x.

8.4.1.2. Bioensayo de confirmación

Al inicio del experimento, los organismos que se analizaron presentaron inflamación en grado 1 de severidad al igual que los organismos del control del bioensayo (T0) teniendo en cuenta que dichos síntomas son normales en organismos a baja salinidad.

- T1. Los organismos analizados presentaron inflamación (de 120 a 168 h) y deformación de los túbulos antenales (192 a 240 h) en GS1.
- T2. Se observó infiltración de hemolinfa, inflamación y necrosis de los túbulos antenales (de 24 a 168 h) en GS2, y la presencia de núcleos picnóticos a las 120 h en GS3.
- T3. Presentaron inflamación, infiltración de hemolinfa y epitelio delgado en GS2 (de 24 a 240 h) y melanización a las 48 h en GS2.

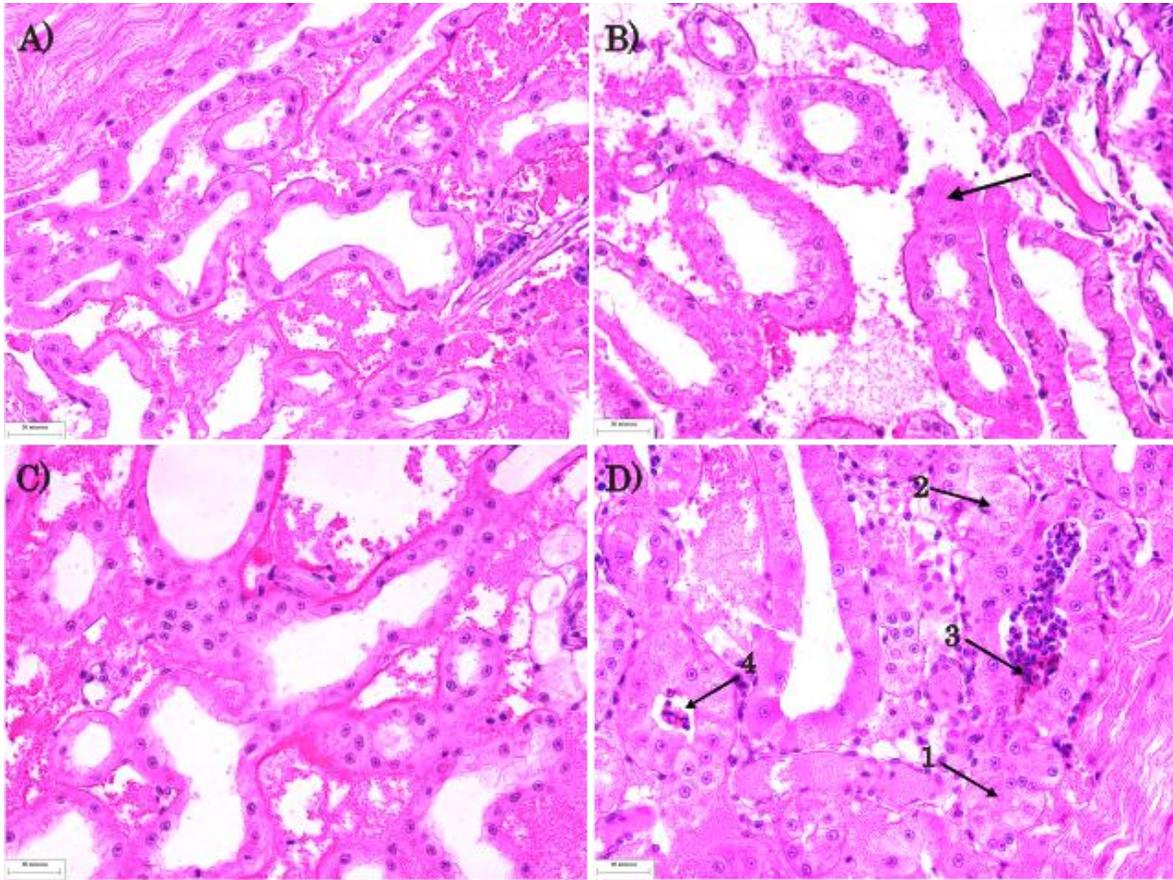


Fig. 8.20. Corte histológico de la glándula antenal de *L. vannamei*. A) Órgano normal del tratamiento control; B) T1 con deformación de la estructura y edema; C) T2 con pérdida de la estructura normal; y D) T3 con deformación de la estructura (1), edema (2) e infiltración de hemolinfa dentro del lumen con melanización (3 y 4). Tinción H&E. Objetivo 40x.

8.4.1.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en glándula antenal

En todas las observaciones se presentaron cambios progresivos en las alteraciones de la glándula antenal a través del tiempo como la dispersión de los túbulos antenales así como la infiltración de hemolinfa alrededor de éstos túbulos. La exposición a las diferentes concentraciones de nitrógeno en sus

diversas formas químicas resulta en tres signologías representativas de sus efectos sobre éste órgano como son: infiltración hemocítica, deformación de la estructura e inflamación de los túbulos de la glándula antenal. Estos efectos se observaron de manera muy marcada en las últimas semanas de los módulos del cultivo de camarón. La infiltración de hemolinfa se le debe atribuir a la hiporregulación del organismo, para su adaptación a un medio de baja salinidad.

La glándula antenal normal (Fig. 8.18a y Fig. 8.19a) a baja salinidad, presenta una ligera infiltración de hemolinfa alrededor de los túbulos glandulares, mostrándose esto como normal debido a las condiciones de salinidad. El estudio realizado por He *et al.* (2013) observaron el efecto de la salinidad (2, 7, 12, 17 y 30 g/L) en la microestructura de la glándula antenal de *L. vannamei*, donde muestran que en la sección total de éste órgano no hay diferencias obvias en la morfología entre las distintas condiciones de salinidad, exceptuando que el color de la glándula antenal es más intenso a mayores salinidades. Por otro lado, muestra que la proporción del volumen del laberinto en camarón a baja salinidad es mayor que a alta salinidad. La diferencia entre una glándula antenal normal a baja salinidad (1.9 g/L) como se presenta en este estudio, y una con agua marina a 35 g/L, es que alrededor de los túbulos de la glándula antenal se tiene mayor volumen de hemolinfa tal como mencionan He *et al.* (2013). En cuanto a los demás daños y alteraciones se le puede atribuir al medio circundante que no era apto para el organismo, puesto que no se encuentra en la literatura disponible, trabajos comparables a éste para corroborar y/o comparar los daños. Sin embargo, existe el trabajo realizado por Doughtie y Rao (1983) donde expusieron al camarón (*Palaemonetes pugio*) en condiciones de baja salinidad (10 g/L) con plaguicidas (Busa-85 y Aquatreat DNM-30) los cuales son tóxicos para el camarón. Estos autores observaron que la actividad secretora de la mayoría de las células del laberinto eran anormales evidenciado por la distancia o la naturaleza vesiculada de las

microvellosidades, además de que la hemolinfa circundante en la glándula antenal era anormalmente densa, los componentes de los podocitos frecuentemente poseían núcleos picnóticos y exhibían una falta de organización celular. Estas últimas patologías encontradas por Doughtie y Rao (1983) como son la densa presencia de hemolinfa en la glándula antenal, presencia de núcleos picnóticos y la falta de organización celular, fueron encontradas en este estudio.

Doughtie y Rao (1983) propone los siguientes posibles mecanismos de defensa de la glándula antenal al estar expuesta a un tóxico: la fagocitosis mediante los hemocitos granulados circundantes del material celular dañado que ocasionalmente pueda ocurrir en este órgano, la encapsulación de tejidos dañados y la aparente heterostasis que sufre a través de una exposición a largo plazo. La heterostasis es un término propuesto por Selye (1973) y lo define como el mantenimiento del equilibrio de un parámetro biológico en presencia de una estimulación exógena permanente; esto ocurre cuando el organismo se encuentra en un equilibrio anormal donde debe de establecer una protección contra el patógeno potencial, ya que se activan defensas que permiten la resistencia a una agresión inusual. En cambio, la homeostasis se refiere al mantenimiento de la estabilidad fisiológica en circunstancias de cambios predecibles o impredecibles, a través de la adaptación y difiere en que depende de un rápido desarrollo y ajustes fisiológicos (Selye, 1973).

8.4.2. Órgano linfoide

El órgano linfoide (OL) es considerado como la parte integral del sistema circulatorio de los camarones peneidos y como el órgano más efectivo para la filtración de hemolinfa y eliminación de partículas patógenas. Está situado a un lado del estómago y consiste en 2 lóbulos formados de túbulos anastomosados que se ramifica desde la arteria oftálmica. Se describe la pared

del túbulo como una matriz estromal de tejido conectivo fibroso con capas de hemocitos que rodean al lumen central (Fig. 8.21a y Fig. 8.22a) (Bell y Lightner, 1988; Alday-Sanz, 2010).

8.4.2.1. Cultivo de camarón

En los organismos de M1 y M2, se observó deformación de la estructura con grado de severidad de 0 a 1 durante las primeras 6 semanas del cultivo (Fig. 8.21), y la formación de esferoides y vacuolas de la semana 7 a la 11 en grado de severidad 1 y 2 (Fig. 8.22). Sin embargo, en M2 se pudo observar la presencia de hemolinfa a partir de la semana 9 con un grado 1 de severidad, y en la semana 10 y 11 los organismos presentaron un grado de severidad 4 en éste órgano. La prevalencia máxima en M1 fue de 44.4% presentándose en la semana 9 del cultivo y una prevalencia media de $15.9 \pm 15.6\%$ (Fig. 8.34d). En M2 presentó una prevalencia máxima de 49.1% observándose en la semana 11, teniendo una prevalencia media de $19.2 \pm 17.5\%$ (Tabla 15) (Fig. 8.42d).

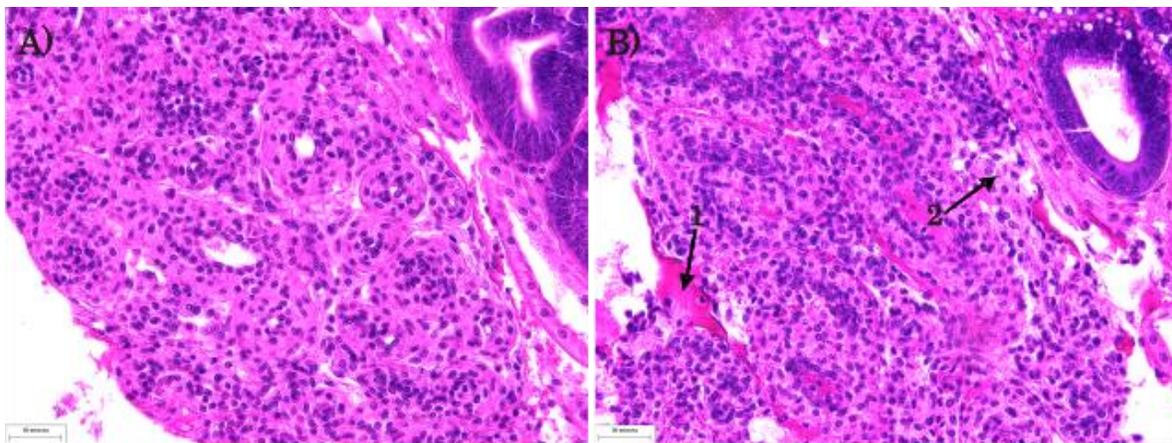


Fig. 8.21. Corte histológico de órgano linfoide de *L. vannamei* en M1: A) túbulos normales con lumen simple y una matriz estromal de células y B) pérdida de la estructura normal con infiltración de hemolinfa (1), formación de esferoides (2) y vacuolizaciones. Tinción H&E. Objetivo 40x.

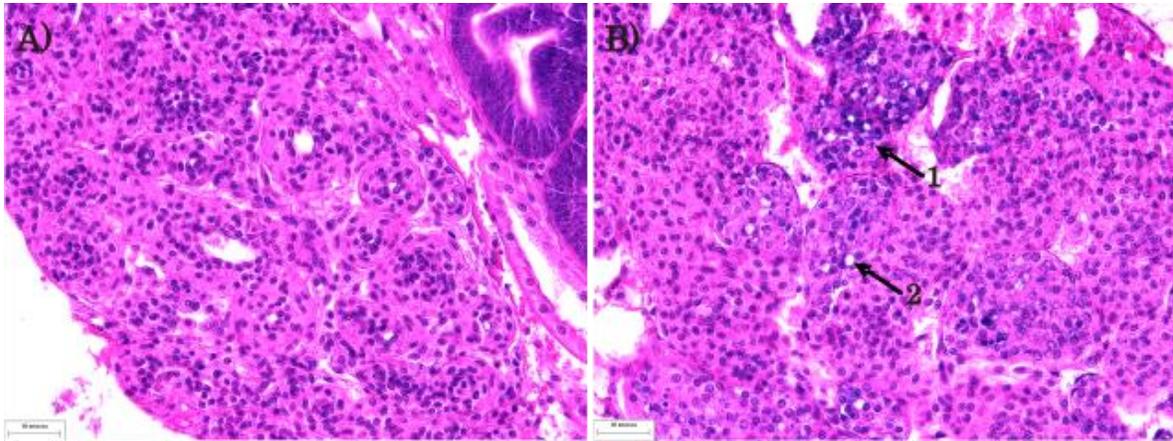


Fig. 8.22. Corte histológico de órgano linfoide de *L. vannamei* en M2: A) túbulos normales con lumen simple y una matriz estromal de células; B) pérdida de la estructura con formación de esferoides (1) y vacuolizaciones (2). Tinción H&E. Objetivo 40x.

8.4.2.2. Bioensayo de confirmación

Los organismos analizados en el inicio del experimento y en el control, presentaron deformación de la estructura del órgano linfoide con un grado de severidad 1.

- T1. Se observó deformación de la estructura (48 h), formación de esferoides y vacuolización (de 72 a 240 h) en GS1. Esto nos muestra que el sistema inmune del camarón detectó la presencia de los compuestos de nitrógeno (amonio y nitrito).
- T2. Los organismos presentaron formación de esferoides, presencia de vacuolas y material celular en lumen (de 48 a 240 h) en GS1.
- T3. Se presentó pérdida de la estructura normal, infiltración de hemolinfa, formación de esferoides y vacuolización (de 48 h a 240 h) con GS2.

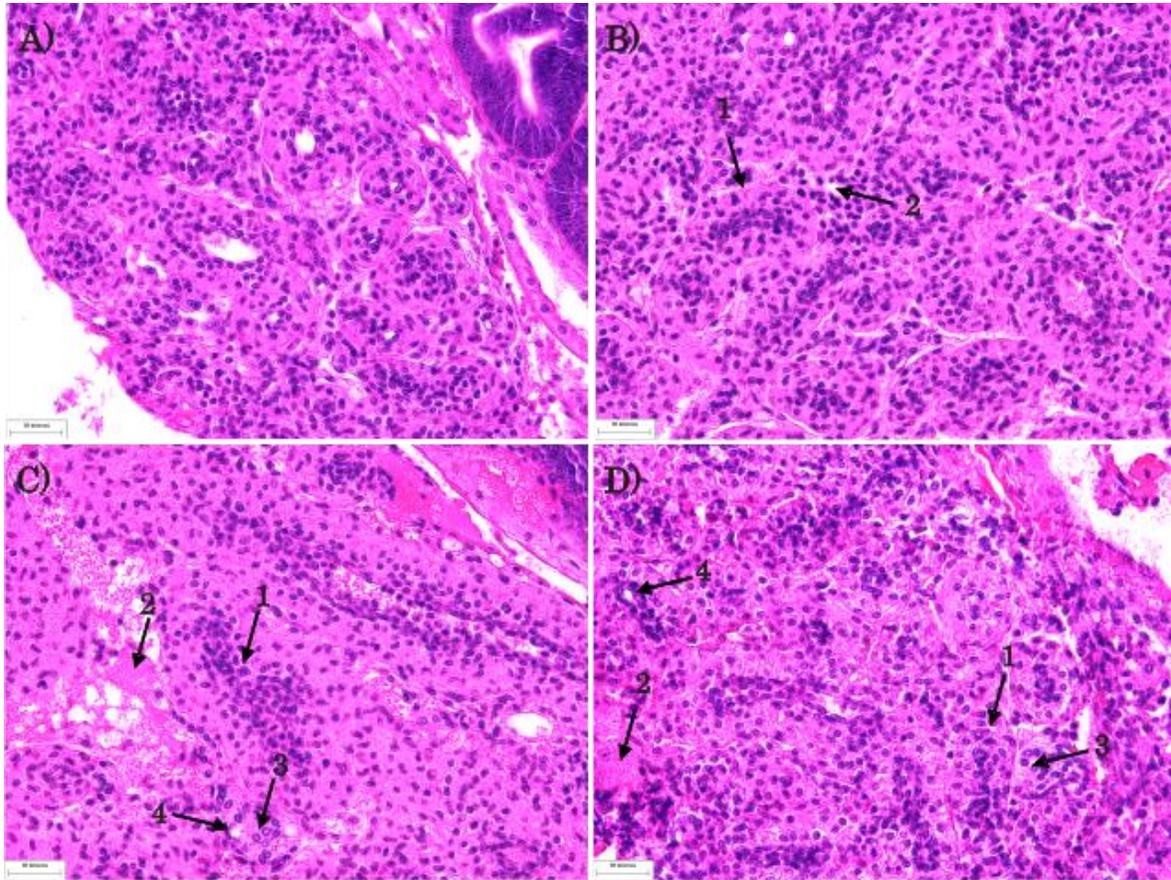


Fig. 8.23. Corte histológico del órgano linfoide de *L. vannamei*. A) Órgano normal del tratamiento control; B) T1 con deformación de la estructura (1), y presencia de vacuolas (2); C) T2 con pérdida de la estructura normal (1), infiltración de hemolinfa (2), formación de esferoides (3) y presencia de vacuolas (4); y D) T3 con deformación de la estructura (1), infiltración de hemolinfa (2), formación de esferoides (3) y presencia de vacuolas (4). Tinción H&E. Objetivo 40x.

8.4.2.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en órgano linfoide

Durante el desarrollo del cultivo de camarón, algunos nutrientes, principalmente el amonio y los nitritos, alcanzan concentraciones que pueden afectar al camarón, y todo este conjunto que entra al sistema circulatorio del

camarón, llega al órgano linfoide, éste detecta dichas sustancias y materiales extraños, los cuales trabaja para eliminarlos del organismo. Se puede observar que en M2 tuvo mayores daños que en M1, dada las diferencias marcadas y mencionadas anteriormente tanto en las patologías presentadas, la calidad del agua y las diferentes densidades de siembra entre ambos módulos. En el caso del bioensayo confirmatorio, se muestra que hay una tendencia del órgano linfoide a realizar el mismo proceso que se describió para lo sucedido en el cultivo de camarón, observándose a lo largo del experimento la formación de dichos esferoides para poder erradicar del sistema el tóxico circundante.

Cabe señalar que el órgano linfoide destacó ciertas patologías que se observan con frecuencia en los tres tratamientos del bioensayo de confirmación como son: la formación de esferoides y la vacuolización (Fig. 8.23). Se podría asumir que dichas patologías son signos representativos en caso de intoxicación debido a la función misma del órgano linfoide. Lo que no se podría explicar en el caso del órgano linfoide es para discernir las causas que provocan la formación de los esferoides debido a alguna infección o intoxicación, lo que se puede decir es que es una causa idiopática, en el caso de las patologías observadas en el cultivo de camarón. A pesar de que tanto en el cultivo de camarón como en los tratamientos del bioensayo se presentan las mismas patologías.

Los esferoides del órgano linfoide (LOS) como se mencionan anteriormente, también son llamados como estructuras nodulares con muchas células vacuolizadas y son considerados por ser de fase senil o degenerativa, que además las células de los esferoides muestran un alto índice de apoptosis (tipo de muerte celular que usan los organismos multicelulares para eliminar células dañadas o no necesarias de una forma controlada que minimiza el daño de las células vecinas). Después de que los esferoides se separan de la capa

externa de los túbulos, pueden sufrir una degradación sin una respuesta inflamatoria o pueden migrar a través de los espacios hemales.

Hasson *et al.* (1999) infectaron al camarón *L. vannamei* con el virus del síndrome del Taura (TSV) induciéndolo a una fase crónica, y observaron que en el órgano linfoide se formaron tres distintos morfotipos de esferoides: A, se activa la fagocitosis, secuestrando al patógeno; B, se observan células necróticas siguiendo la fase aguda de la infección y el tipo C, se observan núcleos basófilos, una reducción del tamaño de las células, y la atrofia progresiva conllevándolo a la degradación sin que ocurra una respuesta inflamatoria. Rusaini y Owens (2010) señalan que la formación de dichos esferoides en el órgano linfoide han sido observados en varias enfermedades infecciosas de camarones peneidos. En comparación a este estudio, se encontró una respuesta inflamatoria con alto grado de infiltración de hemolinfa en M2, esto pudo haber sido ocasionado por los compuestos tóxicos a los que estaba expuesto el organismo, tomando en cuenta que también pudo haber influido la carga de materia orgánica dentro de los estanques del módulo 2 aumentando así la gravedad de los daños provocados en dichos organismos.

8.4.3. Hepatopáncreas

Es una glándula conspicua y bilobulada, rodeada por tejido conectivo, que desemboca en el estómago pilórico. Está compuesta por túbulos simples, con un extremo ciego, limitados externamente por tejido conectivo y cada túbulo posee una red de fibras musculares que permiten movimientos peristálticos. Dentro de cada túbulo, existen 5 tipos de células especializadas: las células E (embrionarias), F (fibrilares), R (reabsortivas o de reserva), B (secretoras o globulares) y M (basales), con funciones específicas (Tabla x.xx), de manera que la digestión en los peneidos se da a nivel celular (Cuadras *et al.*, 2002; Puello-Cruz, 2013).

Tabla 15. Funciones específicas de las células especializadas de la glándula digestiva de los peneidos (Tomado de Al-Mohanna y Nott, 1987; Puello-Cruz, 2013).

Tipo de célula	Función
E (embrionarias)	Son células cilindro-cúbicas con núcleos con 2 ó 3 nucleolos conspicuos. Se ubican en la punta ciega del túbulo.
F (fibrilares)	Tienen propiedades absorbentes para materiales solventes. Sintetizan y secretan enzimas digestivas y actúan como soporte con estructuras internas complejas. Estas células se agrandan por pinocitosis capturando nutrientes, y dan origen a las células B.
R (re-absortivas)	Absorben y almacenan lípidos y glucógeno. Tienen una gran cantidad de vacuolas chicas y superficie irregular, lo cual facilita el transporte de metabolitos.
B (secretoras)	Son células "ampolla" o "vejiga" que se caracterizan por tener vacuolas grandes, lo que implica función secretora. Estas células son las de mayor tamaño y presentan invaginaciones, lo que indica digestión intra y extracelular. Se les atribuyen propiedades de absorción de partículas mediante pinocitosis. También se menciona que actúan como activadores para iniciar la liberación de células del epitelio. Finalmente, estas células llegan al interior del intestino y son desechadas. Se cree que la secreción bajo condiciones fisiológicas normales es de tipo merocrina ¹ o apocrina ² , y cuando intervienen estimulaciones internas puede ser de tipo holocrina ³ .
M (basales)	En algunas publicaciones se cita la existencia de éstas, sin embargo, su función no está definida.

¹Merocrina: glándula en la que el producto de secreción formado en el interior de las células es expulsado hacia afuera, sin destrucción del protoplasma, que continúa formando los materiales de una nueva secreción.

²Apocrina: glándula cuyo producto de secreción es expulsado con una parte de la célula en la que ha sido acumulado. Es una situación intermedia entre la holocrina y la merocrina.

³Holocrina: glándula en la cual la célula llena de sus productos de secreción se desprende completamente y muere, realizándose la secreción por fusión celular. Por ejemplo: las glándulas sebáceas.

Su principal función es la asimilación del alimento que se lleva a cabo mediante una serie integrada de procesos, entre los que se incluyen la secreción de enzimas digestivas, digestión y absorción de nutrientes, almacenamiento y disposición de productos de desecho. Otros cambios estructurales importantes se asocian con el ciclo de muda (Travis, 1955; Travis, 1957; Al-Mohanna y Nott, 1989). Dada la multiplicidad de funciones fisiológicas que realiza la glándula digestiva, cualquier proceso que afecte la salud del camarón debería evidenciarse como una alteración en el funcionamiento y/o histología del órgano vital, aún antes de que el organismo muestre síntomas clínicos de enfermedad (Gibson y Barker, 1979; Bautista *et al.*, 1994).

8.4.3.1. Cultivo de camarón

En M1 se presentaron alteraciones como infiltración hemocítica y de hemolinfa con grado de severidad 1 a partir de la semana 6 y 7; necrosis, hipertrofia del lumen, nódulos hemocíticos y cápsulas envolviendo los túbulos del hepatopáncreas con grados de severidad entre 2 y 3 en las semanas 8 y 9 (Fig. 8.24); masas de bacterias a partir de la semana 10 y, elongaciones tubulares en la semana 11.

Por otro lado, en M2 presentaron atrofia tubular, desprendimiento celular, infiltración hemocítica y de hemolinfa (GS1) en las semanas 5 y 6; hipertrofia del lumen y necrosis (GS2) en la semana 7; nódulos hemocíticos, cápsulas, melanización en el epitelio de los túbulos, elongación tubular (GS3) en la semana 10, y la presencia de masas de bacterias en lumen y bacterias intracelulares citoplasmáticas en grado 3 y 4 de severidad en la semana 11 (Fig. 8.25). De acuerdo a la Fig. 8.42a, el porcentaje de daños y alteraciones presentado en M1 se incrementa a partir de la semana 4 hasta la semana 8 y las prevalencias se mantienen estables de la semana 9 a la 11; el estanque M1 presentó un valor máximo de 40.3% (19.4±15.3%). Por otro lado, en M2 va en

aumento conforme transcurre el cultivo de la semana 4 a la semana 11, teniendo una prevalencia máxima de 50.7% (24.1±18.8%) (Tabla 15).

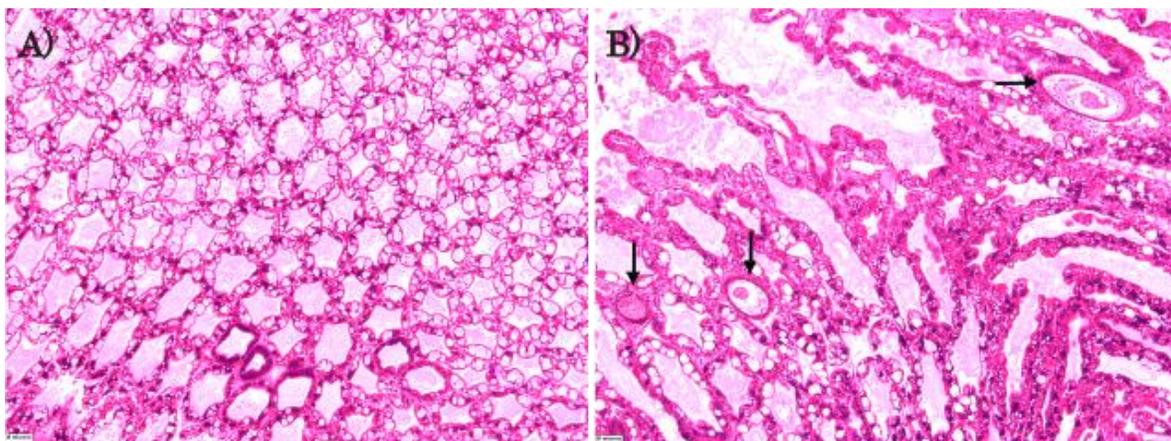


Fig. 8.24. Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei* de M1 con: A) órgano normal donde se muestran túbulo normales que tienen forma de estrella rodeando al lumen, éstos deben de tener las células E (embrionarias), F (fibrilares), R (reabsortivas o de reserva), B (secretoras o globulares) y M (basales); y B) nódulos hemocíticos (flechas) con aglomerados de bacterias en el centro, infiltración de hemocitos y desprendimiento celular. Tinción H&E. Objetivo 40x.

8.4.3.2. Bioensayo de confirmación

En el inicio del experimento los organismos que se muestrearon presentaron atrofia, desprendimiento celular e infiltración de hemolinfa; sin embargo, en el control del experimento, los organismos presentaron atrofia y desprendimiento celular con un grado de severidad 1.

T1. Los organismos analizados presentaron atrofia y desprendimiento celular en GS1 (24 h), infiltración hemocítica y de hemolinfa e inflamación por edema (de 48 a 240 h) con GS1.

- T2. Se observó atrofia tubular y desprendimiento celular en GS1 (de 24 a 168 h); infiltración hemocítica y de hemolinfa, hipertrofia del lumen, nódulos hemocíticos y material celular (de 192 a 240h) en GS 1 a 2.
- T3. Se encontró atrofia, desprendimiento celular e infiltración hemocítica en GS1 (de 24 a 144h), infiltración de hemolinfa y encapsulaciones en GS2 (de 168 a 240h).

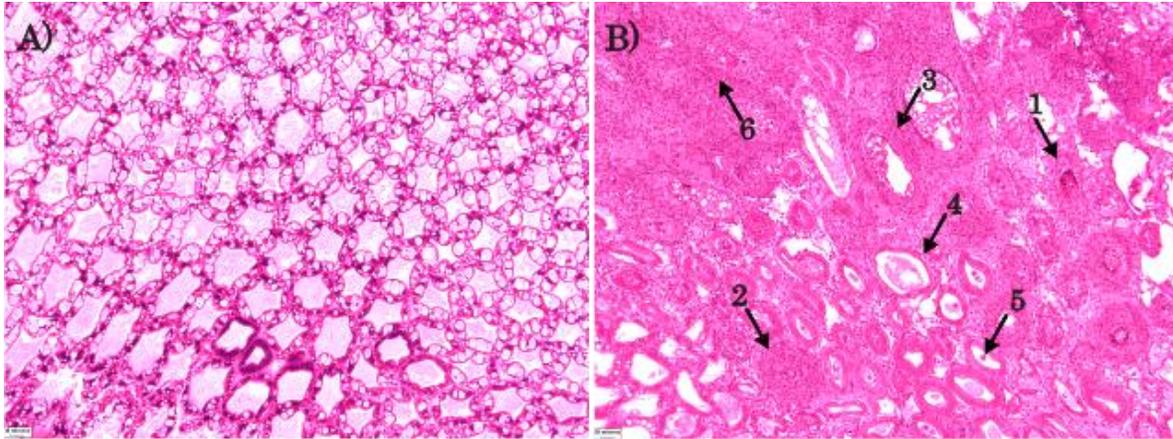


Fig. 8.25. Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei* de M2 con: A) órgano normal donde se muestran túbulos normales que tienen forma de estrella rodeando al lumen, éstos deben de tener las células E (embrionarias), F (fibrilares), R (reabsortivas o de reserva), B (secretoras o globulares) y M (basales); y B) hepatopáncreas con nódulos hemocíticos con (1) y sin melanización (2), encapsulaciones (3), atrofia tubular (4), desprendimiento celular (5), infiltración hemocítica, y de hemolinfa (6). Tinción H&E. Objetivo 10x.

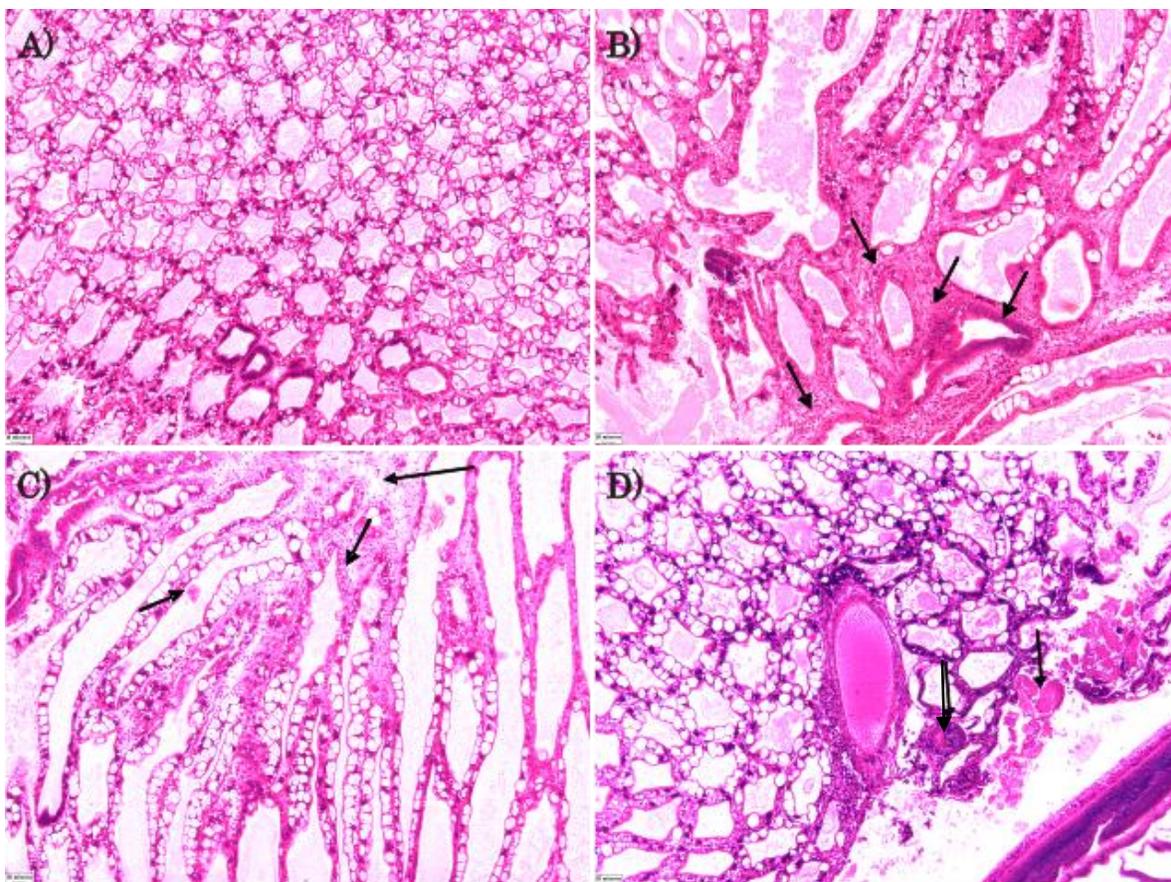


Fig. 8.26. Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei*. A) Control con túbulos normales; B) T1 con cápsula, atrofia, infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas); C) T2 presenta atrofia, desprendimiento celular, infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas); y D) T3 muestra nódulo hemocítico e infiltración hemocítica (flechas). Tinción H&E. Objetivo 10x.

8.4.3.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en hepatopáncreas

Los organismos expuestos a los tóxicos como amonio y nitritos tanto en el cultivo de camarón como en el bioensayo confirmatorio mostraron sintomatología que se puede considerar como intoxicación. En todos los casos donde el hepatopáncreas presentó inflamación e infiltración hemocítica la

lesión se dispersó de la parte proximal del hepatopáncreas hacia la parte distal del órgano.

Puesto que, el organismo que se alimenta exitosamente acumula reservas de lípidos, carbohidratos y proteínas, estos son metabolizados para su crecimiento durante el periodo inmediato después de la ecdisis, cuando el cuerpo del organismo no está limitado por el exoesqueleto (Alday-Sanz, 2010). Los materiales son acumulados en esta glándula durante la fase de alimentación (intermuda) y los pierde en la fase donde el organismo no se alimenta, que son en la pre-muda y post-muda. Esto quiere decir, que cuando el organismo se encuentra en la fase donde no se alimenta, éste se encuentra vulnerable ante cualquier tipo de agente patógeno y/o tóxico aunado a las condiciones del medio en que se encuentre, puede ser afectado de manera que reprime fácilmente su sistema inmunológico. La presencia de hemocitos es importante debido a que forman parte del sistema inmune del camarón, indicando que hay algo que está inquietando la salud del mismo, ya que los hemocitos son considerados como la línea primaria de defensa interna ante la presencia de material extraño y/o infección en los crustáceos (Anggraeni y Owens, 2000; Alday-Sanz, 2010), dado que el sistema de defensa celular de los crustáceos consiste en la coagulación, fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos (Fontaine y Lightner, 1974, Bauchau, 1981, Soderhall y Cerenius, 1992), éstas dos últimas mencionadas son las que se presentan con mayor frecuencia tanto en el cultivo como en el experimento controlado.

Las alteraciones más frecuentes en el bioensayo a la exposición a las concentraciones de nitrógeno fueron: atrofia de los túbulos, desprendimiento celular, infiltración hemocítica y de hemolinfa, además de encapsulaciones (Fig. 8.26) habiendo un proceso degenerativo progresivo por la destrucción de las células epiteliales de los túbulos. Se puede sugerir que el efecto de la toxicidad de las formas químicas más letales como son el amonio y los nitritos, causan

un desprendimiento de las células tubulares viajando por el lumen, y a su vez son excretadas por el intestino, seguido de la activación del sistema inmunitario del organismo, bombeando y transportando mayor cantidad de hemolinfa y de hemocitos al lugar donde se requiere atacar a las moléculas tóxicas que le produce daños al camarón, tratando de degradar los túbulos realizando cápsulas y nódulos hemocíticos.

Frías-Espericueta *et al.* (2008) expusieron al camarón *L. vannamei* a diferentes concentraciones de cobre, donde observaron en el hepatopáncreas las alteraciones como atrofia, necrosis, y estructura irregular de los túbulos, patologías similares a este estudio. Sin embargo, Doughtie y Rao (1983) proponen los siguientes posibles mecanismos de defensa del hepatopáncreas al estar expuesto a un tóxico: la captación de los restos celulares de los fagocitos hepatopancreáticos; la encapsulación de túbulos dañados y la heterostasis del hepatopáncreas durante la exposición a largo plazo.

Por otro lado, se tiene que de acuerdo a Anderson *et al.* (1987), Krol *et al.* (1991) y Brock *et al.* (1995) describen las siguientes patologías ocasionados por rickettsias, mollicutes y virus para hepatopáncreas de *P. marginatus*, *P. monodon* y *L. vannamei* que son: inclusión de células epiteliales en el lumen tubular, necrosis celular, acumulación de hemocitos en los senos hemales asociados con los túbulos y formación de granulomas, alteraciones histológicas que coinciden en buen grado con las descritas en casos de vibriosis. Dado a esto, se puede hacer referencia a los daños ocasionados y/o observados en el presente estudio ya que se encontraron masas de bacterias en las últimas semanas del ciclo de cultivo de camarón, presentando algunos de los daños descritos por éstos autores.

8.4.4. Corazón

El sistema circulatorio de los crustáceos decápodos se constituye de 3 componentes principales que son la hemolinfa, el corazón que genera la fuerza para mover la hemolinfa y su sistema de distribución, es bien conocido por ser un sistema de fuerza controlada, capaz de suministrar oxígeno a los diferentes tejidos tan bien como a aquellos organismos acuáticos vertebrados poiquilotermos (McMahon, 2001), además de nutrientes, hormonas y residuos removidos (Wilkins, 1999). Tiene una amplia gama de vasos sanguíneos por donde conduce la hemolinfa a través de todo el cuerpo. El corazón del camarón se encuentra dorsalmente en el cefalotórax anterior al abdomen dentro del pericardio, las venas y la hemolinfa entran al corazón a través de dos pares de ostia que contienen válvulas musculares en la superficie dorsal y un par simple en la superficie ventral. El lumen del corazón se encuentra rodeado por tejido suelto de células musculares (Alday-Sanz, 2010).

8.4.4.1. Cultivo de camarón

En los organismos de M1 y M2, se observó inflamación (GS1) en la semana 5; infiltración hemocítica y pérdida de la estructura normal (GS1) a partir de la semana 6 a la 11 (Fig. 8.27 y Fig. 8.28). En la semana 11, se observó en M1T3 un organismo el cual contenía una sección con cutícula encapsulada.

Como se muestra en la Fig. 8.42f, tanto en M1 como en M2 no se observa una tendencia clara en los daños provocados en el corazón a lo largo del cultivo salvo un incremento de las prevalencias en las últimas semanas. En el módulo 1 se tuvo la prevalencia máxima de 33.3% ($10.9 \pm 11.8\%$) y en el módulo 2 la prevalencia máxima fue 33.3% ($11.1 \pm 12.8\%$) (Tabla 15).

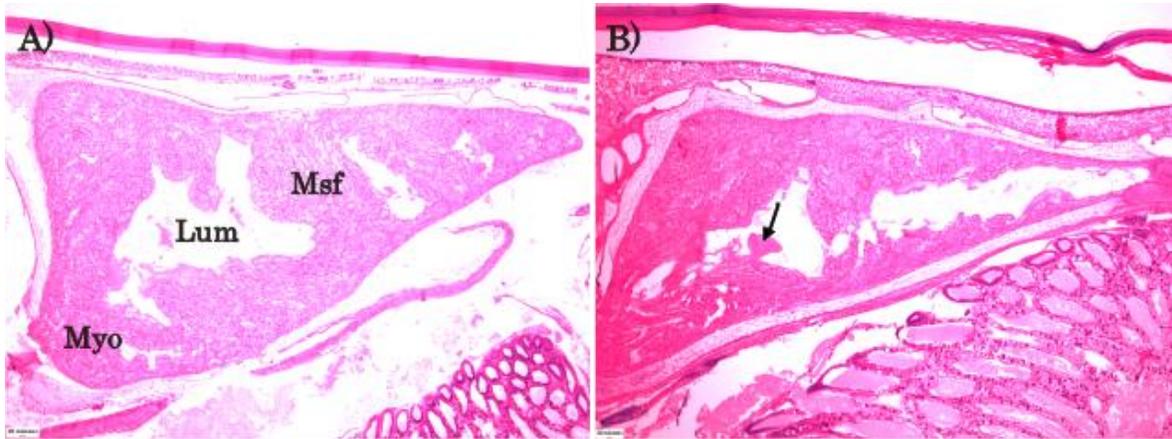


Fig. 8.27. Corte histológico de corazón de *L. vannamei* en M1. A) Corazón normal, donde se encuentra formado por células miocárdicas (Myo) dispuestas en bandas, las cuales están organizadas en manojos o haces distintivos tales como el muscularis frontalis (Msf), el arreglo en haces del miocardio da como resultado que el lumen (Lum) del corazón esté subdividido en subcámaras; B) corazón con pérdida de la estructura normal e infiltración hemocítica (flecha). Tinción H&E. Objetivo 4x.

8.4.4.2. Bioensayo de confirmación

En el inicio del experimento los organismos que se muestrearon se encontraron normales. En el control, los camarones presentaron infiltración de hemolinfa en grado 1 de severidad.

- T1. Los camarones analizados presentaron infiltración hemocítica y de hemolinfa (de 24 a 168 h) e inflamación de las aortas del corazón (240 h) (GS1).
- T2. Se observó infiltración de hemolinfa e inflamación en los vasos del corazón durante todo el tiempo de experimentación (GS1).
- T3. Se encontró pérdida de la estructura normal (24 h) e inflamación (144 a 240 h) (GS1).

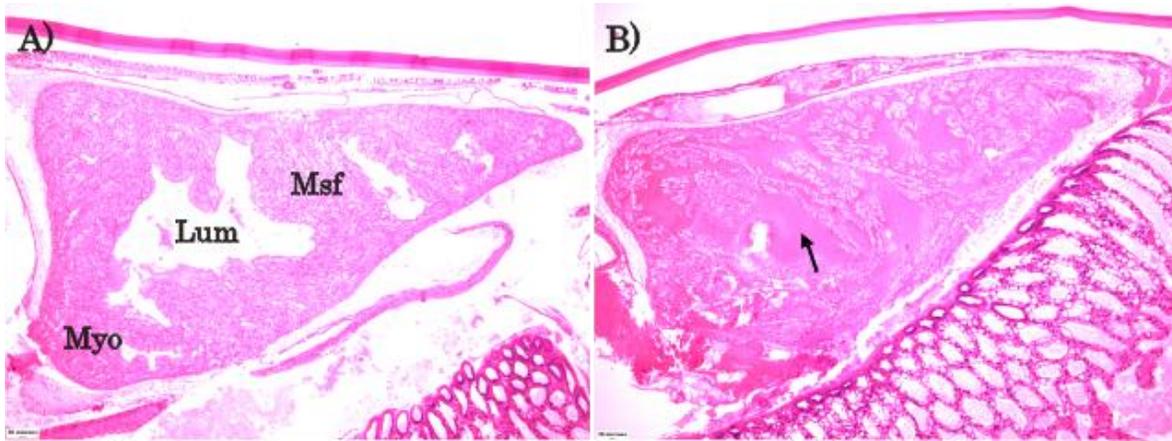


Fig. 8.28. A) Corte histológico de corazón de *L. vannamei* en M2. A) Corazón normal, donde se encuentra formado por células miocárdicas (Myo) dispuestas en bandas, las cuales están organizadas en manojos o haces distintivos tales como el muscularis frontalis (Msf), el arreglo en haces del miocardio da como resultado que el lumen (Lum) del corazón esté subdividido en subcámaras; B) corazón con pérdida de la estructura normal e infiltración de hemolinfa severa (flecha). Tinción H&E. Objetivo 4x.

8.4.4.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en corazón

La respuesta por parte del corazón ante una intoxicación por los compuestos del nitrógeno se puede deducir que presenta una inflamación hemocítica y de hemolinfa además de la pérdida de la estructura normal (Fig. 8.29), dado que su principal función es la de enviar y bombear la hemolinfa por todo el cuerpo del camarón, los hemocitos son células que representan una línea de defensa ante una infección bacteriana o tóxica, y viajan junto con la hemolinfa. Al activarse el sistema inmune del camarón, el organismo responde de manera que el tejido hematopoyético produce una mayor cantidad de hemocitos para ser transportados al sitio de infección, y por lo tanto de hemolinfa, haciendo que el corazón trabaje con un mayor esfuerzo. Por lo tanto, este fenómeno se

presenta de igual manera para el sistema de cultivo de camarón, puesto que puede haber una asociación con respecto a los tóxicos del nitrógeno tanto de amonio como de nitritos.

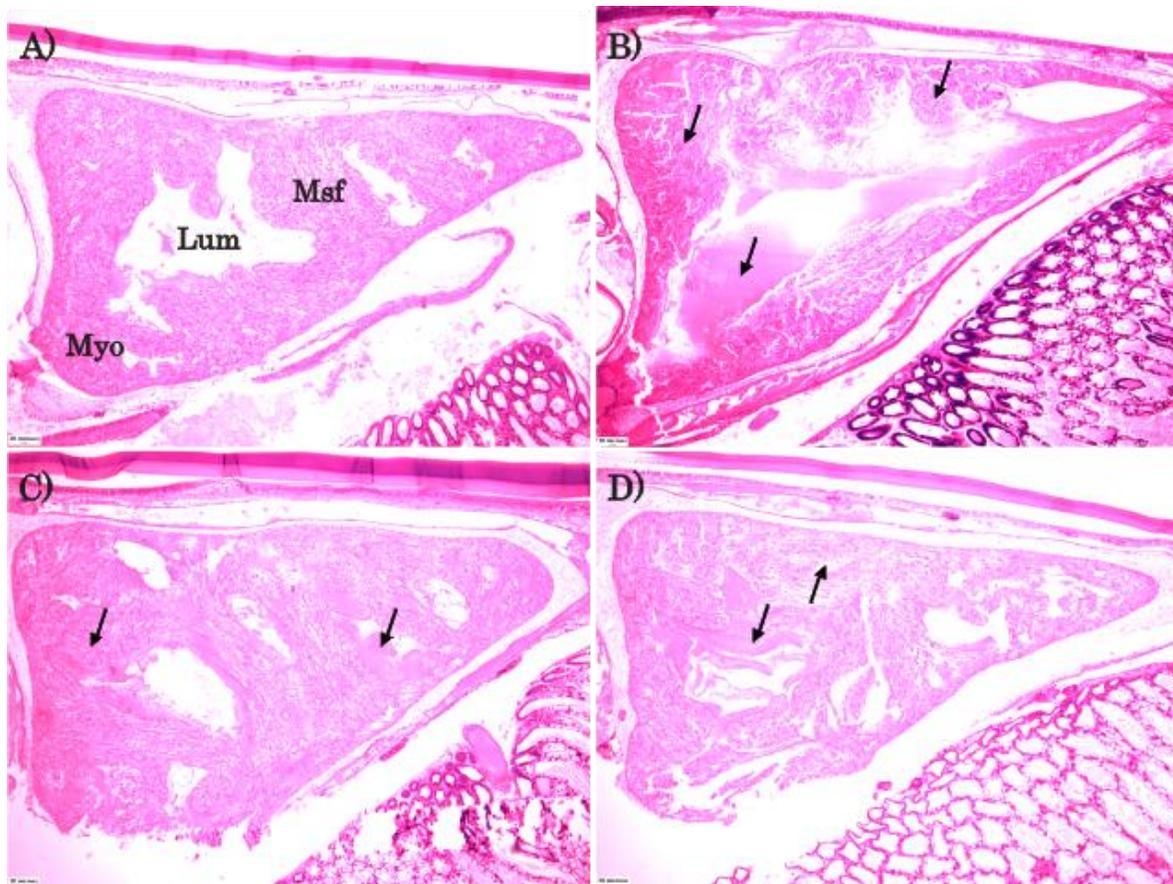


Fig. 8.29. Corte histológico del corazón de *L. vannamei*. A) Control con tejido normal; B) T1 con pérdida de la estructura normal, infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas); C) T2 con pérdida de la estructura normal e infiltración de hemolinfa (flechas); y D) T3 con infiltración hemocítica y de hemolinfa y pérdida de la estructura normal (flechas). Tinción H&E. Objetivo 4x.

La hemolinfa tiene un pH de 7.3-7.5 en los peneidos (Mangum, 1982; Vargas-Albore y Ochoa, 1992), se encarga del transporte de gases, nutrientes, residuos, y hormonas, siendo la primera línea de defensa contra los patógenos.

En la presencia de Ca^{+2} , la proteína coagulable es convertida a transglutaminasa (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000; Maningas *et al.*, 2008), la cual se produce en varios tejidos, incluyendo el órgano linfoide y los hemocitos (Liu *et al.*, 2007; Maningas *et al.*, 2008). El secuestro de los patógenos en la hemolinfa mediante la activación de la proteína coagulable por la transglutaminasa hemocítica y la activación local el sistema de coagulación también le permite secuestrar microorganismos de las branquias y del órgano linfoide para después limpiar el organismo (Manningas *et al.*, 2008).

Además Manningas *et al.* (2008) demostraron que la proteína coagulable y la transglutaminasa son moléculas críticas para la función inmune, así como también pueden aglutinar moléculas extrañas dentro de la hemolinfa, ya que éstas moléculas tienen como defensa la profenoloxidasa que se encuentra presente en la hemolinfa y hemocitos. La profenoloxidasa es una enzima clave en la producción de melanina, ya que tiene propiedades antimicrobianas, induce la fagocitosis y la encapsulación y locomoción hemocítica. Por lo que se puede asumir que, en este trabajo la presencia de una gran cantidad de infiltración tanto de hemolinfa como de hemocitos, se debe a una respuesta del sistema inmune del organismo ante una infección y/o intoxicación por los compuestos nitrogenados. Puesto que para confirmar lo dicho anteriormente, se deben de realizar más estudios.

Existen muy pocos estudios acerca de la fisiología del sistema circulatorio del camarón peneido y la mayoría de estos trabajos se han efectuado en la langosta *Homarus americanus* (McMahon, 1995) y el cangrejo *Cancer magister* (Maynard, 1960; McMahon y Wilkens, 1983), los cuales discuten acerca de la respuesta del corazón ante el aumento de la temperatura y en condiciones de hipoxia (estrés del organismo), donde muestran que el flujo de hemolinfa a través de la aorta oftálmica anterior se incrementa, mientras que el flujo de la arteria anterolateral (antenal) descende. Lo que se puede comparar a este

estudio que cuando un organismo se expone en un ambiente de estrés continuo, éstos organismos aumentan el flujo de hemolinfa en el organismo.

8.4.5. Intestino

El intestino es un tubo que se extiende desde el intestino anterior a través del abdomen hasta el recto. El epitelio mucoso está formado por células columnares simples que están sostenidas por una membrana de basamento, una capa de músculos circulares y una capa de músculos longitudinales. Las microvellosidades están involucradas en la absorción de nutrientes en larvas de camarón, pero en juveniles la absorción es mínima. Son sitios de enzimas que sintetizan la membrana peritrófica (PTM), una envoltura de quitina que encapsula materiales ingeridos tan pronto como entran en esta región del intestino y persisten alrededor del material fecal. Las PTM sólo son permeables a partículas inertes <20 nm, por lo cual, puede separar las bacterias ingeridas desde el epitelio. El espacio ectoperitrófico entre PTM y el epitelio parece estar libre de una flora normal aunque el agua entra por bombeo anal para la preparación de la defecación (Alday-Sanz, 2010). Sin embargo, los microorganismos como algas verde-azules y bacterias (aquellos que contienen toxinas), así como sustancias tóxicas que se ingieren, pueden producir enzimas que degradan la PTM y secretan productos químicos que pasan a través de estas capas, causando daños a las células intestinales, provocando una inflamación intensa, denominada enteritis hemocítica (*i. e.*, inflamación hemocítica del intestino) (Talavera *et al.*, 1998b).

8.4.5.1. Cultivo de camarón

En el monitoreo del intestino durante el cultivo de camarón en M1 se observó enteritis hemocítica (GS1) a partir de la semana 5 en adelante (Fig. 8.30) y en la semana 8 se presentó un nódulo hemocítico melanizado (GS3). En M2, la enteritis hemocítica (GS1-2) se presentó a partir de la semana 5 a la 11 (Fig.

8.31) y en la semana 10 se observó una enteritis hemocítica con melanización en la pared intestinal (GS3).

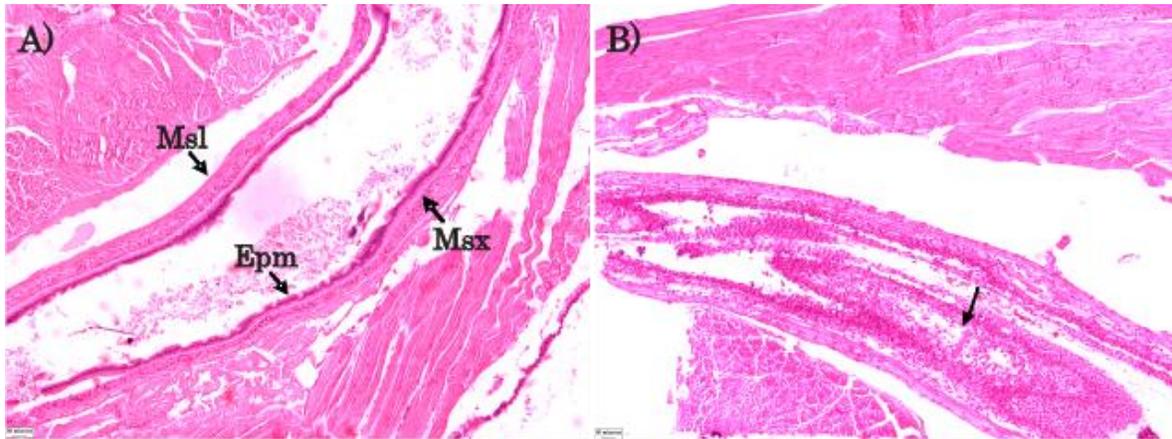


Fig. 8.30. Corte histológico de intestino de *L. vannamei* de M1. A) Intestino normal que muestra epitelio columnar simple (Epm), soportado por capas de tejido muscular circular (Msx) y longitudinal (Msl); y B) intestino posterior con enteritis hemocítica (flecha). Tinción H&E. Objetivo 10x.

Como se muestra en la Fig. 8.42c, en M1 apareció la enteritis hemocítica a partir de la semana 5, oscilando a lo largo del cultivo teniendo la prevalencia máxima de 50.0% ($15.2 \pm 16.6\%$). Por otro lado, en M2 se ve una tendencia de las alteraciones aumentando su prevalencia a partir de la semana 4 hasta la semana 8 y permaneciendo constante hasta la semana 11 teniendo una prevalencia máxima de 50.0% ($23.7 \pm 20.9\%$) (Tabla 15).

8.4.5.2. Bioensayo de confirmación

En el inicio del experimento y en el control experimental, los organismos que se muestrearon se encontraban aparentemente normales. En T1, se observó enteritis hemocítica (GS1-2), mientras que en T2 y T3, los organismos presentaron durante todo el período de experimentación enteritis hemocítica (GS2-3) (Fig. 8.32).

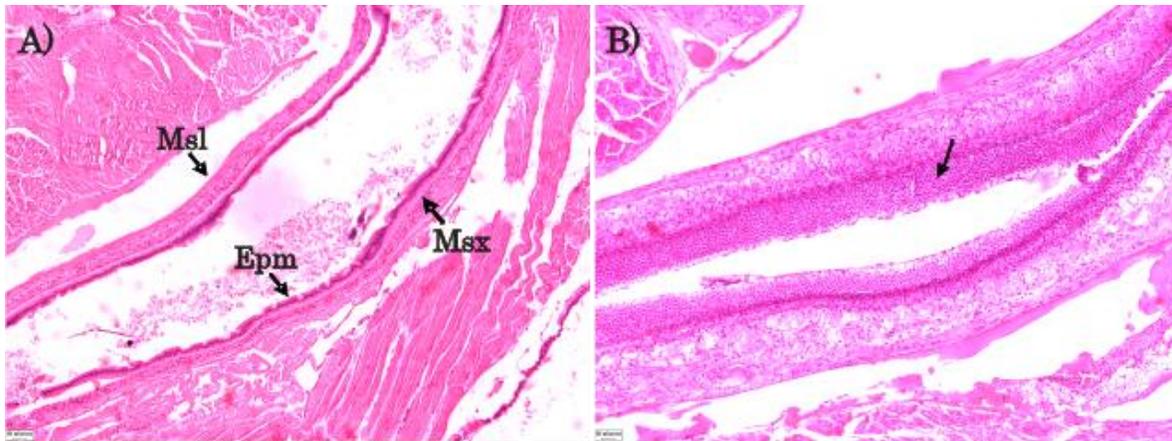


Fig. 8.31. Corte histológico de intestino de *L. vannamei* de M2. A) Intestino normal que muestra epitelio columnar simple (Epm), soportado por capas de tejido muscular circular (Msx) y longitudinal (Msl); y B) intestino con enteritis hemocítica severa (flecha). Tinción H&E. Objetivo 10x.

8.4.5.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en intestino

Como se observa, la única patología observada en el intestino fue la enteritis hemocítica con un grado de severidad de 1 a 2, se nota un engrosamiento y deformación de las capas intestinales conforme el organismo se encuentra expuesto al tóxico en cuanto a tiempo y concentración (Fig. 8.32). De acuerdo a la literatura, la enteritis hemocítica es causada tanto por infección bacteriana como por intoxicación, siendo todo aquello que pueda causar una irritación en la capa intestinal (Talavera *et al.*, 1998b). Se puede observar que el grosor del intestino aumenta ligeramente con la exposición de los tóxicos, que a comparación del cultivo de camarón, el engrosamiento del intestino tiene un mayor grado de severidad, llegando a una etapa donde la afectación es tan fuerte que la infiltración hemocítica tapa el paso del sistema digestivo. Doughtie y Rao (1983) expusieron al camarón a baja salinidad (10 g/L) con plaguicidas, y encontraron que el intestino exhibió un marcado

incremento del grosor de la pared intestinal, tal y como se observó en el presente estudio en la Fig. 8.30b, dando referencia a una enteritis hemocítica, siendo comparable lo observado con el trabajo de estos autores, ya que se encuentra una similitud de los daños provocados por ambas sustancias tóxicas (plaguicidas y compuestos nitrogenados) que afecta las paredes del intestino.

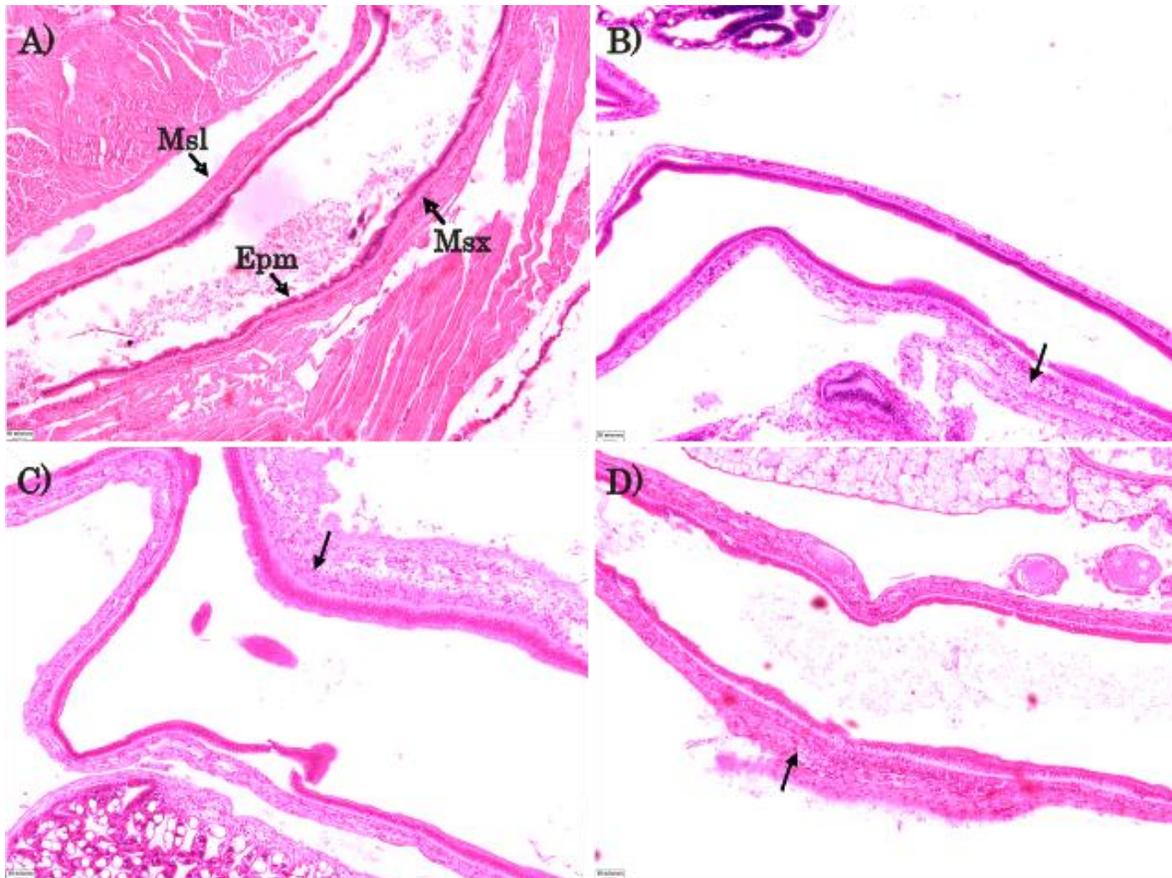


Fig. 8.32. Corte histológico del intestino de *L. vannamei*. A) Control con tejido normal; B) T1, C) T2 y D) T3 con enteritis hemocítica (flecha). Tinción H&E. Objetivo 10x.

Keating *et al.* (2007) en su estudio al exponer a *L. vannamei* a diferentes concentraciones de cadmio, encontraron varias lesiones en varios segmentos del intestino medio, desde el hepatopáncreas hasta el ciego hepático posterior, donde se observó de daños menores (necrosis y desprendimiento de células

epiteliales dispersas) a daños severos (úlceras con expansión por hemocitos y la distensión del lumen del intestino por células descamadas). Además estos autores mencionan que en otros estudios de cultivo de camarón indican que la glándula intestinal (sitio central del metabolismo) es un órgano sensible que puede ser usado como monitor de los cambios en las condiciones de la calidad del agua.

Frías-Espericueta *et al.* (2008) realizaron un experimento exponiendo al camarón *L. vannamei* a una combinación de metales (Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn), estos autores observaron enteritis hemocítica severa con múltiples capas de hemocitos en la superficie mucosa, siendo comparable a lo observado en este estudio en el cultivo de camarón tanto en M1 como M2.

Por otro lado, durante el cultivo el camarón a cielo abierto, se pudieron observar bacterias dentro de los organismos de M2, con respecto a esto, Lightner (1996) y Pérez-Linares *et al.* (2003) señalan que se necesita que los camarones se alimenten con *Schizothrix calcicola*, *Leucothrix mucor* y especialmente de cianobacterias (*Chroococcus*, *Anabaena* spp, *merismopedia*) en concentraciones por arriba de 500,000 cc/mL para que se presente enteritis hemocítica, aunque también puede haber una respuesta hemocítica masiva en el intestino medio y posterior por las toxinas que penetran al intestino vía agua que dañan la mucosa que recubren las células del epitelio del intestino causando una inflamación intensa. Puesto que, aunado a las afectaciones causadas por la toxicidad de los compuestos nitrogenados también influyó la presencia de bacterias y epicomensales dentro de los organismos habiendo mayores alteraciones que en el bioensayo de confirmación.

8.4.6. Branquias

La regulación iónica y osmótica de los crustáceos se realiza principalmente en las branquias, juegan un papel importante en el intercambio gaseoso,

transporte de iones, así como en otras funciones fisiológicas esenciales como la osmoregulación, la homeostasis del calcio, la excreción de amonio y la regulación del pH extracelular (Freire *et al.*, 2008). Además, el epitelio branquial juega un rol muy importante en el sistema de defensa del camarón (Burgents *et al.*, 2005).

8.4.6.1. Cultivo de camarón

En M1 y M2 se observó la presencia de melanización, branquias edematosas, inflamación e infiltración hemocítica (G2) para todos los estanques a partir de la semana 1. En M1, presentaron edema, infiltración de hemolinfa (Fig. 8.33) y melanización (GS2) en la semana 7; masas de bacterias, materia orgánica, fitoplancton, melanización multifocal, edema, infiltración hemocítica y de hemolinfa, núcleos picnóticos y carriorréxicos (GS3) en la semana 9. En M2 se observó necrosis y la presencia de *Leucothrix mucor* y *Zoothamnium* sp. (GS3) (Fig. 8.34). Por otro lado, esta bacteria filamentosa (*Leucothrix mucor*) también se encontró en la semana 11 en grado 4 de severidad junto a la materia orgánica dentro de la cámara branquial en los organismos de M1. En la Fig. 8.42e, se puede observar el mismo comportamiento de las prevalencias de los daños para M1 y M2 conforme transcurre el ciclo de cultivo siendo que en M1 se tuvo una prevalencia máxima de 38.3% (20.8±13.1%) y en M2 fue de 43.7% (22.9±14.5%) (Tabla 15).

8.4.6.2. Bioensayo de confirmación

Los organismos muestreados en el inicio del experimento y en el control del bioensayo, presentaron infiltración de hemolinfa (GS1).

- T1. Se observó melanización, branquias edematosas, infiltración hemocítica y de hemolinfa (GS2) durante todo el experimento.
- T2. Se presentó edema e infiltración de hemolinfa (24 h) en GS1, branquias edematosas (48 h), necrosis y melanización (96 h) en GS2, y conforme

transcurría el tiempo de experimentación, dichas patologías evolucionaron de un grado de severidad 2 a 3 hasta las 240 h.

- T3. Se encontró edema branquial e infiltración de hemolinfa (GS1) (24 h), necrosis, melanización multifocal e infiltración hemocítica (de 48 a 240 h), desarrollándose de grado de severidad 2 a 4.

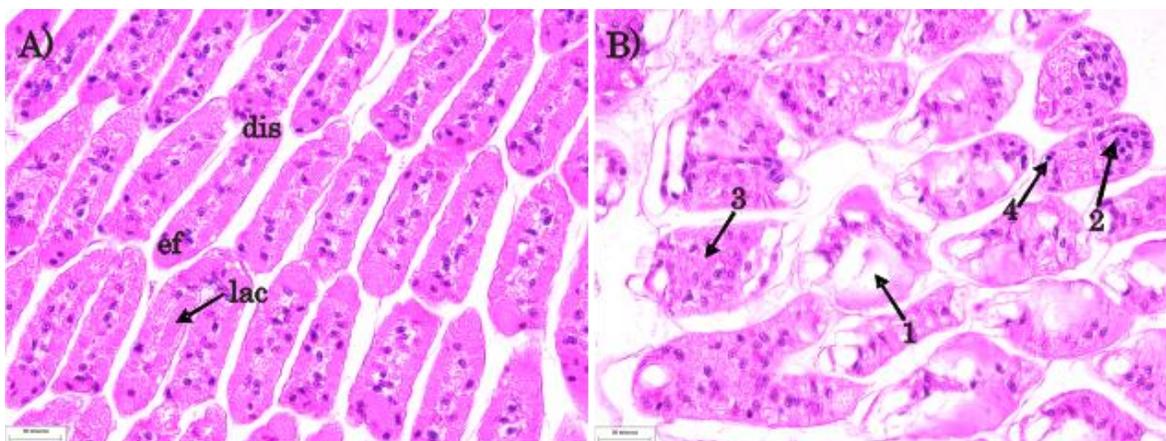


Fig. 8.33. A) Corte histológico de filamentos branquiales secundarios normales, cada filamento contiene un vaso eferente (ef), tiene espacios interconectados o lacunae (lac), por donde se mueve la hemolinfa y los extremos distales (dis) de los filamentos contienen lacunae agrandados; B) filamentos branquiales con edema (1), infiltración hemocítica (2) y de hemolinfa (3) además de núcleos picnóticos (4) de *L. vannamei* de M1. Tinción H&E. Objetivo 40x.

8.4.6.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en branquias

En el sistema de cultivo de camarón las branquias mostraron las siguientes patologías: edema branquial, melanización, infiltración hemocítica y de hemolinfa, núcleos picnóticos y carrierrexicos, además de masas de bacterias y de fitoplancton, característicos de las últimas semanas del cultivo debido al aumento del alimento, bacterias y sustancias tóxicas como el amonio dentro de

los estanques; además la acumulación de la materia orgánica en las branquias causó un proceso degenerativo del órgano por asfixia e intoxicación.

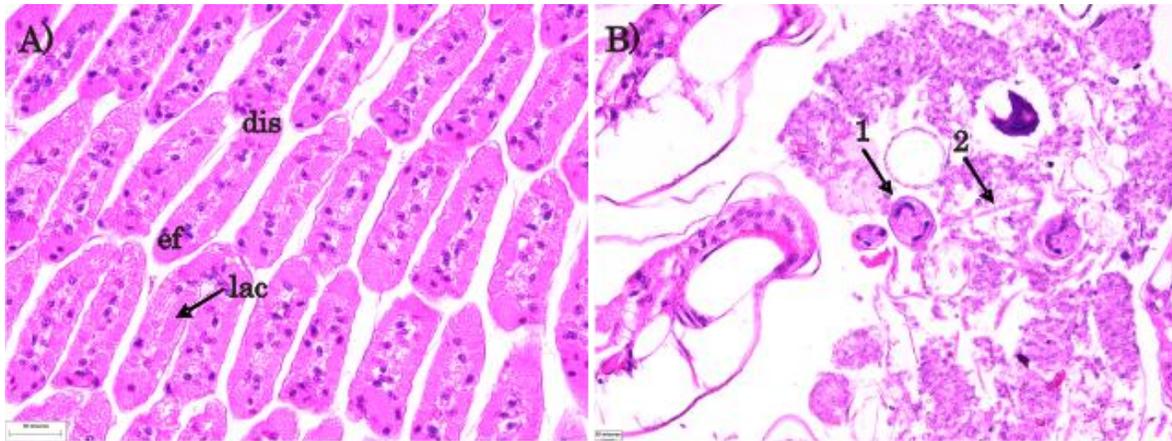


Fig. 8.34. A) Corte histológico de filamentos branquiales secundarios normales, cada filamento contiene un vaso eferente (ef), tiene espacios interconectados o lacunae (lac), por donde se mueve la hemolinfa y los extremos distales (dis) de los filamentos contienen lacunae agrandados; B) branquias con edema, presencia de materia orgánica, fitoplancton, *Zoothamnium sp.* (1) y *Leucothrix mucor* (2) de *L. vannamei* de M2. Tinción H&E. Objetivo 40x.

Las patologías que se observaron en los diferentes tratamientos coinciden con el cultivo de camarón a cielo abierto en presentar edema branquial, infiltración hemocítica y de hemolinfa, en mayor grado melanización y necrosis en las dendobranquias que parecen ser efectos de los compuestos nitrogenados, principalmente como amonio y nitritos. En comparación con el control, se mostró con infiltración hemocítica que puede ser consecuencia de la exposición del organismo a un ambiente alejado de su punto isosmótico. Godoy (2013) menciona que el edema branquial histológicamente se observa un desprendimiento del epitelio branquial de la membrana basal, de forma variable asociado a la presencia de un material eosinófilico de naturaleza proteica, normalmente se relaciona con un daño agudo de etiología no

infecciosa. Infiere que entre las causas a las cuales se puede asociar se encuentran la exposición a metales y tóxicos del medio cuando se refiere en agua dulce y en cultivos de agua de mar se asocia a un florecimiento de algas y tratamientos por baños para el control de parásitos. De forma secundaria presenta fusión en la lámela apical, telangiectasia³, hiperplasia⁴ branquial y necrosis, las cuales traen como consecuencias estrés respiratorio y osmoregulatorio.

En cuanto a los daños provocados por amonio, Romano y Zeng (2007) correlacionan la toxicidad de amonio con los daños inducidos en las branquias en el desarrollo de juveniles de *P. pelagicus*. Romano (2013) menciona que los daños histológicos ocasionados por el nitrito, al igual que en caso del amonio, induce daños en las branquias, este autor indica que la infiltración hemocítica es una respuesta potencial a la remoción de tejidos dañados y necróticos.

Olivas-Valdéz *et al.* (2010) realizaron un estudio sobre los cultivos de camarón *L. vannamei* tanto de origen de agua subterránea (salinidad de 1.6 g/L), como en agua de río (salinidad de 0.8 a 5.3 g/L), donde el análisis histológico reveló melanosis, necrosis e infiltración hemocítica de las branquias, asociado con los epibiontes y condiciones ambientales del cultivo, comparado con el presente estudio donde se obtuvo *Leucothrix mucor* y *Zoothamnium* sp. Coinciden con los daños registrados por estos autores, aunque también los daños que se encontraron en branquias en este trabajo pudieran provenir de sustancias tóxicas, en el caso particular de las branquias del presente trabajo, no pudo ser estadísticamente ($p > 0.05$) comprobado la relación daño en branquias con los niveles de los compuestos nitrogenados, como se discute más adelante.

³ Telangiectasia branquial: consecuencia de la alteración de la integridad vascular producto de la ruptura de la célula pilar o sus uniones. Dilatación de las lámelas branquiales pléticas de eritrocitos (Godoy, 2015).

⁴ Hiperplasia: aumento en la producción de células en un órgano o tejido normal.

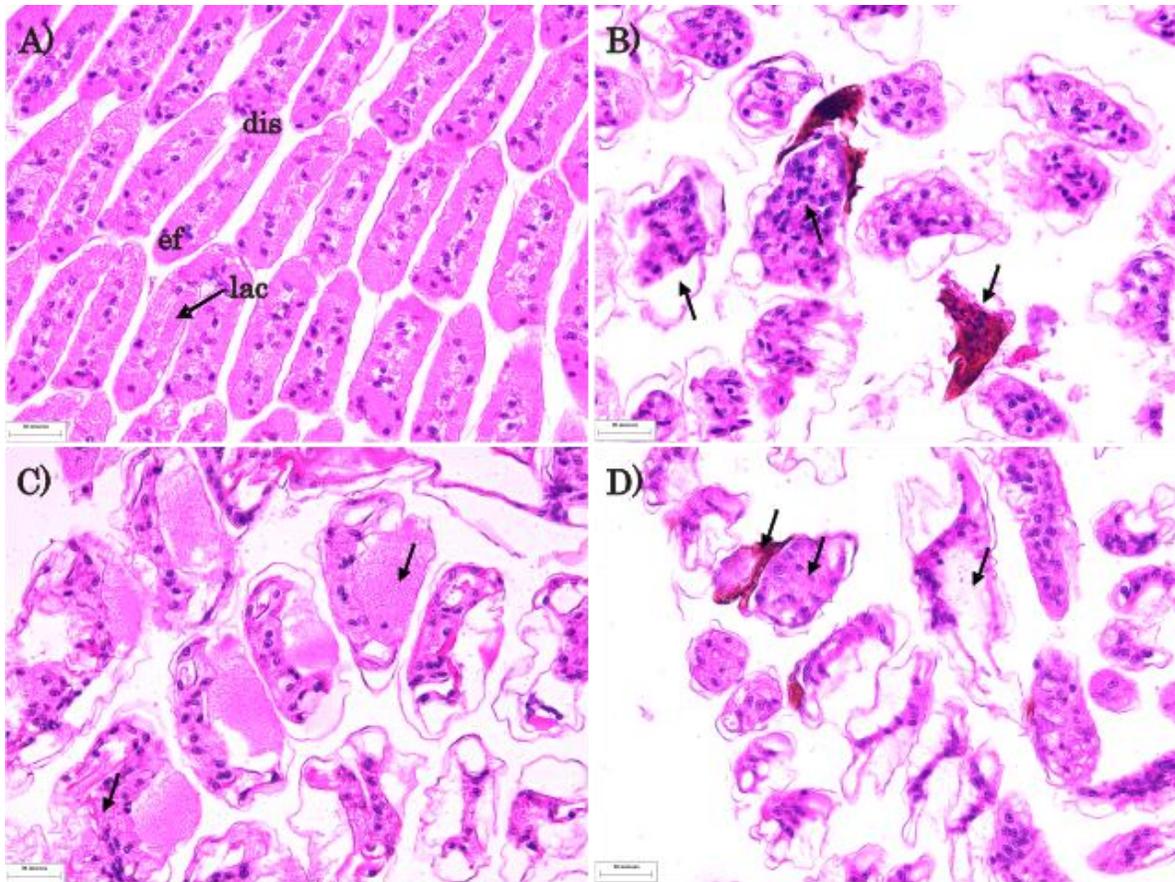


Fig. 8.35. Corte histológico de branquias de *L. vannamei*. A) Control con dendobranquias normales; B) T1 con melanización multifocal, branquias edematosas, infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas); C) T2 con branquias edematosas y con infiltración de hemolinfa (flechas); y D) T3 con melanización multifocal, branquias edematosas e infiltración de hemolinfa (flechas). Tinción H&E. Objetivo 40x.

Keating *et al.* (2007) observaron en camarones *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de cadmio, degeneración y necrosis de las capas epiteliales y superficiales de las lámelas branquiales, además de melanización y que éstas a su vez, exhibieron hiper celularidad debido a la acumulación de hemocitos, la cual resulta de la distensión de los espacios hemales.

Chezhian *et al.* (2012) señalan que en el cultivo de peces de agua dulce expuestos a amonio, se observó necrosis, desintegración de las células epiteliales, cambios degenerativos, hiperplasia e hipertrofia en las branquias de estos organismos. Además ellos mencionan que las branquias son bien conocidas por ser un órgano blanco debido a que es el primer órgano que reacciona en condiciones ambientales desfavorables. Miron *et al.* (2008) observaron los mayores daños en las branquias del pez *Rhamdia quelen* expuesto a niveles de amonio equivalente a 96 h-CL₅₀, donde principalmente exhibieron edema y fusión de las lámelas branquiales secundarias. Estos autores señalan que este órgano al estar expuesto a un tóxico, se reduce la superficie funcional para el intercambio gaseoso (Abbas y Ali, 2007).

Doughtie y Rao (1983) realizaron un trabajo donde exponen al camarón a baja salinidad (10 g/L) con plaguicidas, y observaron las branquias a nivel histológico encontrando que dichos tóxicos dañan el epitelio de las lámelas branquiales causando melanización y necrosis. Además, proponen los siguientes posibles mecanismos de defensa de las branquias al estar expuestas a un tóxico: formación de hemocitos en la parte apical de las lámelas branquiales; fagocitosis mediante los hemocitos granulares circundantes de la degradación del material celular; y encapsulación y necrosis de los tejidos dañados. Estas patologías mencionadas por Doughtie y Rao (1983) también fueron observadas a través del presente cultivo, siendo que los daños a las branquias se le puede atribuir tanto a un efecto tóxico por los compuestos nitrogenados, así como a la presencia de materia orgánica, fitoplancton y epibiontes adheridas a las lámelas branquiales.

Por otro lado, la presencia de *Zoothamnium* sp. y *Leucothrix mucor* en ambos módulos puede ser debido al exceso de nutrientes y/o materia orgánica en los estanques, estrés nutricional o ambiental y una mala calidad de agua. Sin embargo, Couch (1983) y Lightner (1996) señalan que la presencia de estos

epibiontes asociada con necrosis y melanosis, es una condición de camarones cultivados en estanques con exceso de materia orgánica como se observó en M2 y probablemente favorecida por altas densidades en M1 (70 org/m²) y M2 (120 org/m²). De acuerdo a Morales-Covarrubias (2010) cuando los camarones están sometidos a factores de estrés, reducen su actividad limpiadora, no mudan, provocando que éstos sean altamente susceptibles a una infestación. Pueden ocasionar una alta mortandad al atacar las branquias, región oral, cutícula, apéndices y el resto del cuerpo de juveniles y adultos, y principalmente en postlarva. Morales-Covarrubias (2013) señala que los epicomensales más comunes son: *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Vorticella* sp., *Ascophrys* sp., *Lagenophrys* sp., *Acineta* sp., *Ephelota* sp. y *Bodo* sp.

8.4.7. Ciegos hepáticos

Los ciegos hepáticos tanto anterior como posterior, son parte del tracto digestivo, a pesar de que se desconoce su función en los crustáceos, se sabe que tienen la función de secretar jugos digestivos y ayudan tanto a la absorción como a la digestión de los nutrientes provenientes del alimento (Uribarren-Berrueta, 2013). Es un saco ciego con pliegues epiteliales grandes y distintivos que se proyectan dentro del lumen del ciego (Bell y Lightner, 1988).

8.4.7.1. Cultivo de camarón

En todos los estanques de M1, durante las primeras 5 semanas estas estructuras se observaron aparentemente normales, y de la semana 7 hasta el final del cultivo, los camarones presentaron pérdida de la estructura de normal, infiltración de hemolinfa e hipertrofia del lumen tanto en el ciego hepático anterior como el posterior (Fig. 8.36), con grado de severidad de 1 a 3. Por otra parte, en M1T2, se encontró melanización (GS2) en el ciego hepático anterior en la semana 9 y presencia de vacuolas (GS2) en la semana 10 y 11.

En los organismos de M2, no presentaron alteraciones durante las primeras 4 semanas. Se observó pérdida de la estructura normal, infiltración hemocítica y presencia de vacuolas (GS1) tanto en el ciego hepático anterior como en el posterior en la semana 5. Aunado a estas patologías, a partir de la semana 8, se empezó a observar la desaparición de los pliegues epiteliales presentando hiperplasia hasta el final del cultivo (GS3-4). En la Fig. 8.37 se muestra el ciego hepático anterior de M2 a finales del cultivo donde se observa que perdió los pliegues epiteliales que conforman un ciego hepático anterior normal.

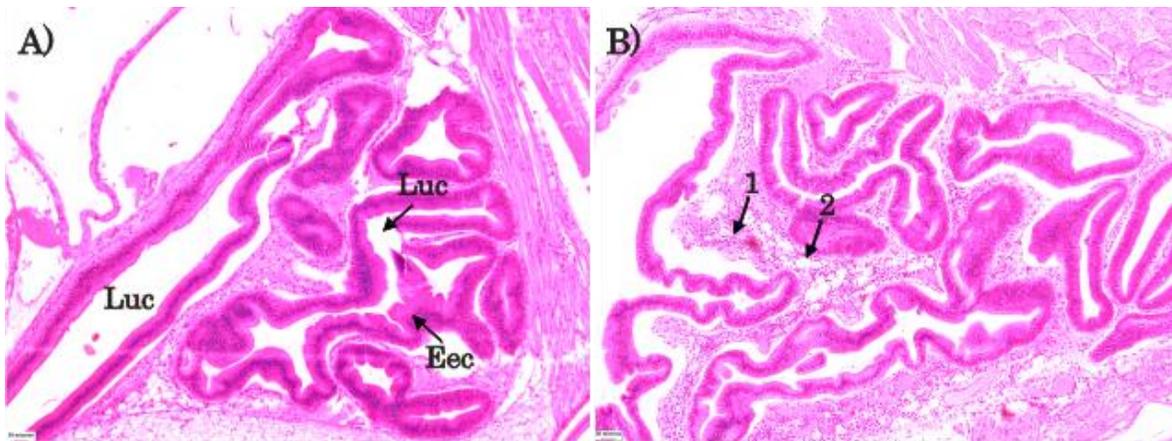


Fig. 8.36. Corte histológico de ciego hepático anterior de *L. vannamei* de M1 donde se observa: A) estructura normal siendo un saco ciego con pliegues epiteliales (Eec) grandes y distintivos que se proyectan dentro del lumen del ciego (Luc); y B) deformación de la estructura, infiltración hemocítica (1) y presencia de vacuolas (2). Tinción H&E. Objetivo 10x.

Como se presenta en la Fig. 8.42g, los mayores daños en M1 se presentaron en la semana 10, teniendo el valor de prevalencia máxima de 33.3% (7.3±10.5%). Sin embargo, en M2 los daños aparecieron a partir de la semana 4 en adelante habiendo un incremento de las lesiones conforme

transcurre el ciclo de cultivo, teniendo el valor de prevalencia máxima de 28.8% (10.6±10.4%) en la semana 11 (Tabla 15).

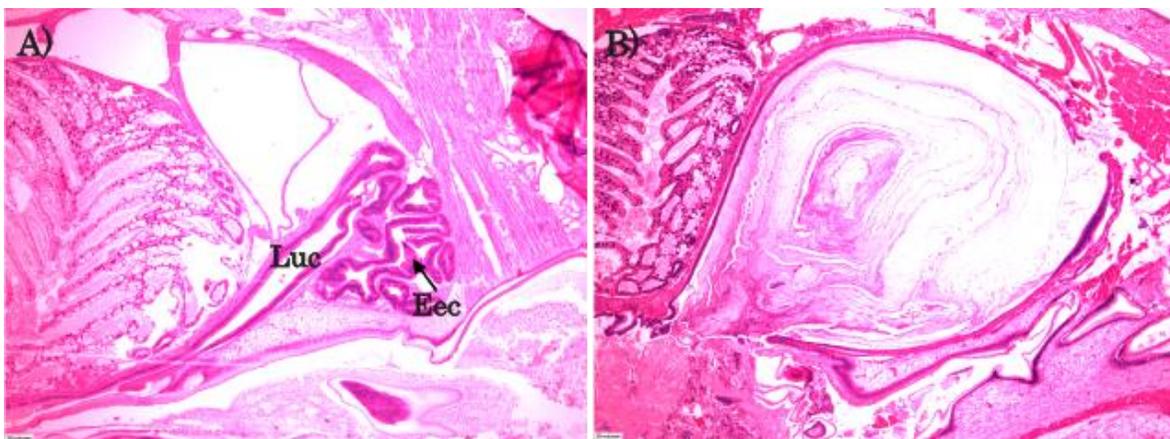


Fig. 8.37. Corte histológico de ciego hepático anterior de *L. vannamei* de M2, donde se observa: A) estructura normal siendo un saco ciego con pliegues epiteliales (Eec) grandes y distintivos que se proyectan dentro del lumen del ciego (Luc) y B) desaparición de los pliegues epiteliales dejando un gran espacio. Tinción H&E. Objetivo 4x.

8.4.7.2. Bioensayo de confirmación

Los organismos analizados en el inicio del experimento y en el control del bioensayo (GS0), se presentaron normales.

- T1. Se observó inflamación e infiltración hemocítica (de 24 a 48 h), infiltración de hemolinfa (GS1) (192 h) y melanización (GS2) en las paredes del ciego hepático anterior (240 h).
- T2. Presentaron inflamación e infiltración hemocítica en GS1 (de 216 a 240 h).
- T3. Se encontró infiltración hemocítica y de hemolinfa en el ciego hepático anterior en grado de severidad de 2 a 3 durante todo el periodo de experimentación.

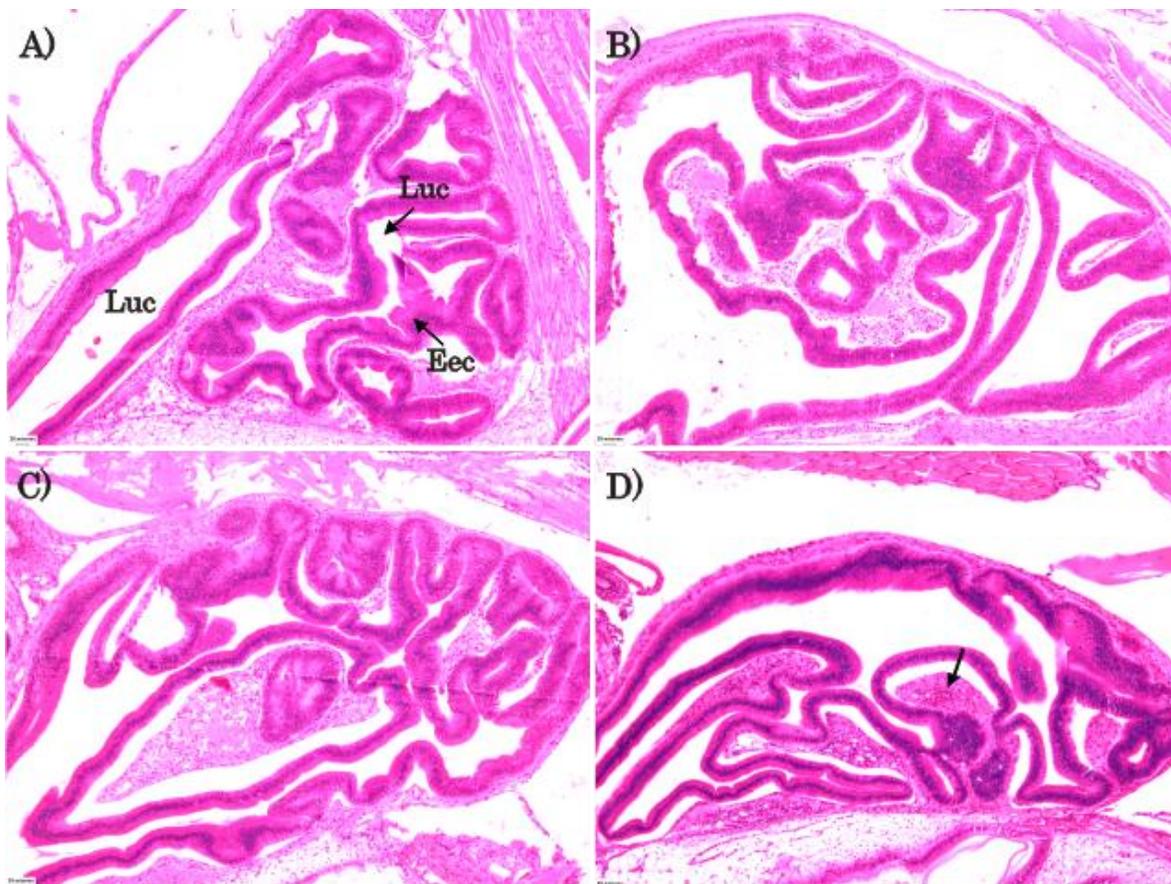


Fig. 8.38. Corte histológico de ciego hepático anterior de *L. vannamei*. A) Control con ciego hepático normal; B) T1 y C) T2 con pérdida de la estructura normal; D) T3 con pérdida de la estructura normal e infiltración hemocítica (flecha). Tinción H&E. Objetivo 10x.

8.4.7.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en ciegos hepáticos

Las signologías más representativas durante todo el experimento fueron la inflamación e infiltración hemocítica además de la atrofia del órgano con deformación de los pliegues (Fig. 8.38). Siendo que el efecto causado por los compuestos de nitrógeno pueden dañar los pliegues del ciego hepático ocasionando una atrofia en su función principal que es la de secretar enzimas para la digestión del alimento (Tabla 1), la nutrición del organismo repercute

en las defensas y la entrada de cualquier patógeno libre o tóxico que se encuentre en el ambiente. Además que una mala nutrición puede repercutir en el ciclo de muda del organismo, y por lo tanto, disminuir su crecimiento.

Con respecto a éste órgano, no se tiene mucha información al respecto, ya que primordialmente no se tiene la certeza de la función que realiza éste órgano, sin embargo, se puede relacionar con la función de otras especies, como en el caso de los peces. Bell y Lightner (1988) solamente describen y detallan la morfología de éste órgano, y mencionan cómo se debe de observar en un organismo sano. Por otro lado, no se encuentra en la literatura disponible que daños pudieran presentarse en caso de intoxicación del organismo.

8.4.8. Músculo

El músculo del camarón juega un papel importante en el movimiento de las articulaciones de los apéndices mediante los pares musculares antagónicos (aductor/abductor y elevador/depresor), está constituido por proteínas las cuales están distribuidas a lo largo del mismo, y pueden ser de tres tipos: sarcoplasmáticas, estromales y miofibrilares (Shahidi, 1992). Los músculos del cefalotórax son pequeños y se encuentran involucrados con el movimiento de los apéndices. El músculo abdominal está formado por seis segmentos que contienen masa muscular la cual es primordialmente responsable de la respuesta de escape del organismo, ya que la rápida contracción de los músculos oblicuos causan la flexión en el abdomen, el abdomen dorsal extiende la cola y el transversal mantiene la forma del abdomen durante esta locomoción (Alday-Sanz, 2010).

8.4.8.1. Cultivo de camarón

De la primera a la quinta semana no se observaron alteraciones en músculo de las muestras de M1, los daños iniciaron en la semana 7 con necrosis en el músculo abdominal (GS2); continuando en la semana 9, con presencia de

encapsulaciones en cefalotórax, infiltración hemocítica y nódulos hemocíticos (GS2) (Fig. 8.39); y en el resto de las semanas los organismos no presentaron alteraciones.

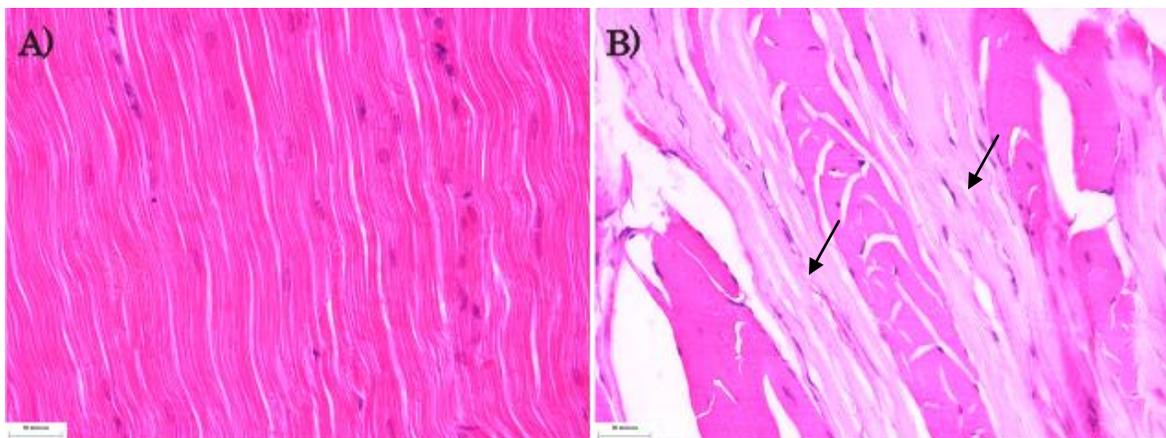


Fig. 8.39. A) Corte histológico de *L. vannamei* de M1 de músculo normal; B) necrosis muscular (flechas). Tinción H&E. Objetivo 40x.

En los organismos analizados de M2, no se observaron daños en el músculo durante las primeras 4 semanas, las alteraciones como infiltración hemocítica y necrosis (GS2) aparecieron en la semana 7, continuando hasta la semana 10 con nódulo hemocítico (GS2) en el músculo abdominal (Fig. 8.40) y material necrótico cerca del órgano linfoide (GS3). Como se muestra en la Fig. 8.42 h, no se observa una tendencia clara de los daños en el músculo puesto sus valores oscilan durante todo el cultivo a partir de la semana 5 para M1 y a partir de la semana 4 para M2. En el caso de M1 tuvo una prevalencia máxima de 31.3% ($4.3 \pm 8.2\%$); y en M2 tuvo una prevalencia máxima de 31.3% ($11.5 \pm 9.2\%$) mencionado anteriormente (Tabla 15).

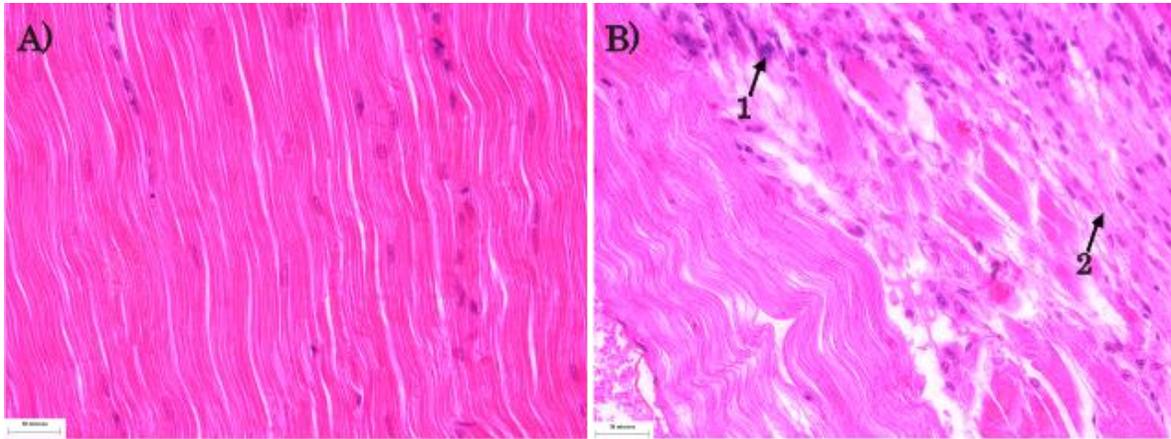


Fig. 8.40. A) Corte histológico de *L. vannamei* de M2 de músculo normal; B) infiltración hemocítica severa (1) y necrosis muscular (2). Tinción H&E. Objetivo 40x.

8.4.8.2. Bioensayo de confirmación

En el inicio del experimento y en el control, los organismos que se muestrearon se observaron como aparentemente normales.

T1. Los organismos analizados presentaron necrosis (GS2) en cefalotórax y abdomen (de 72 a 240 h).

T2. Se observó necrosis (GS2) en cefalotórax y abdomen (de 24 a 96 h), infiltración hemocítica (GS1) (120 h), cápsulas, melanización y necrosis (GS3) en los segmentos abdominales 1 y 6 (240 h).

T3. Se encontró infiltración hemocítica (GS1) (48 h), necrosis (GS3) en abdomen y cefalotórax (de 72 a 240 h).

8.4.8.3. Relación entre los compuestos del nitrógeno y las alteraciones en músculo

Las signologías de infiltración hemocítica y necrosis que se presentan en la mayoría de las ocasiones durante el cultivo de camarón y del bioensayo (Fig. 8.41), se puede deber posiblemente a la exposición de concentraciones altas y al

sinergismo en la toxicidad de amonio y nitritos ocasionando que el sistema de defensa del camarón (hemocitos) se acumulen en ciertas zonas abdominales para contrarrestar la intoxicación.

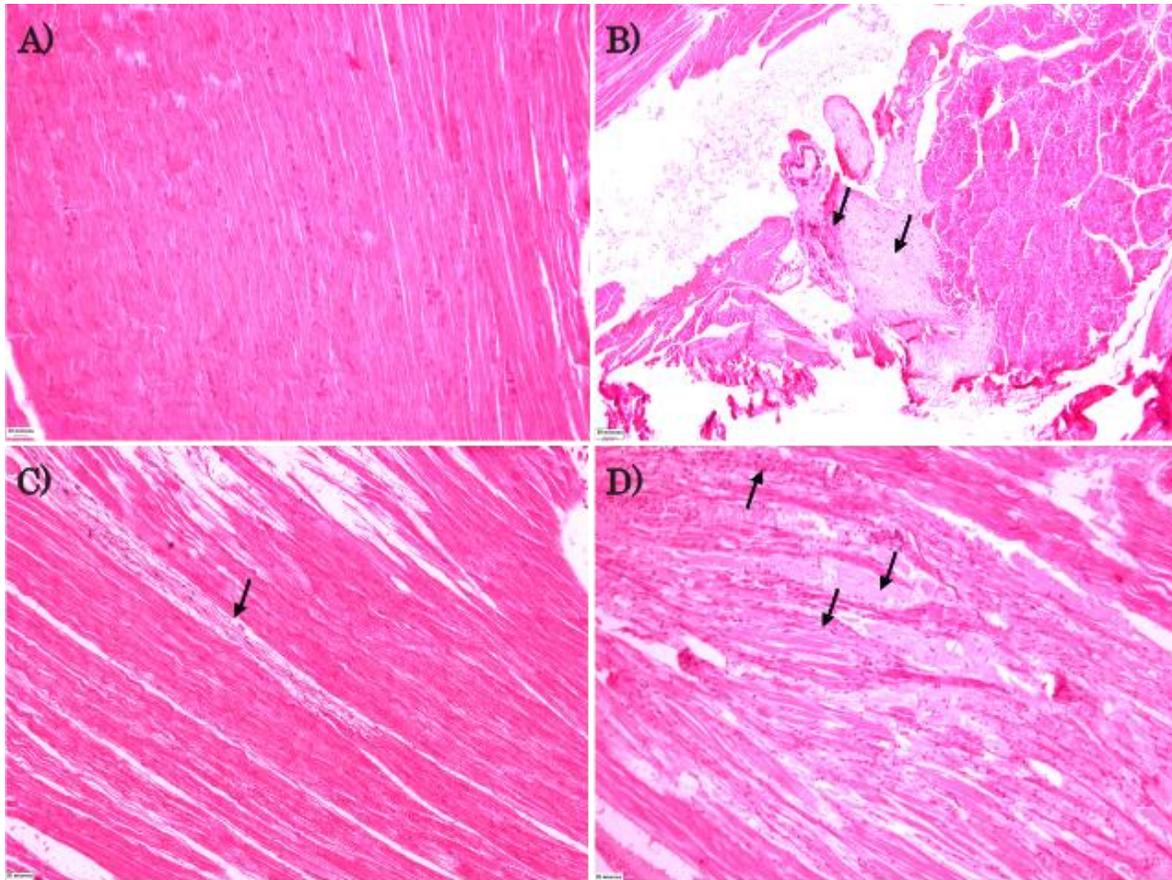


Fig. 8.41. A) Corte histológico de *L. vannamei* de músculo normal del tratamiento control; B) T1 con necrosis e infiltración hemocítica (flechas), C) T2 infiltración hemocítica y necrosis (flechas); D) T3 con necrosis e infiltración hemocítica y de hemolinfa (flechas). Tinción H&E. Objetivo 10x.

Tanto en el bioensayo como en el cultivo de camarón, la mayor incidencia de la infiltración hemocítica se presentó en el último segmento abdominal. Debido a que el músculo abdominal es el tejido interno más conspicuo, es decir, es el tejido de mayor masa corporal, y se puede identificar a simple vista; las

condiciones patológicas son frecuentemente notadas a través de la intensa pigmentación del exoesqueleto en ciertos peneidos. Existen numerosas enfermedades virales, bacterianas, fúngicas y protozoarias del músculo (Lightner, 1993) así como las condiciones idiopáticas (Lakshmi *et al.*, 1978) que muestran cambios obvios en el músculo. En la mayoría de las enfermedades infecciosas, la afectación en el músculo ocurre como parte de la infección sistémica y frecuentemente como parte de señales de mortalidad inminente (Alday-Sanz, 2010).

Keating *et al.* (2007) realizaron un estudio exponiendo al camarón *L. vannamei* a diferentes concentraciones de cadmio, y observaron que pocos camarones mostraron una forma angular, y degeneración de las miofibras con fibrosis, además de que las lesiones típicamente se encontraban a lo largo de la parte distal del músculo, es decir, en el sexto segmento del camarón, que al igual que en este estudio, la mayor parte afectada se encontró en el último segmento abdominal. Sin embargo, en un estudio realizado por Sarathi *et al.* (2007) donde infectaron al camarón *Fenneropenaeus indicus* con *Vibrio alginolyticus*, observaron una infiltración severa en el músculo estriado acompañado de melanización.

La Tabla 15 muestra el valor mínimo, máximo y la media (con su desviación estándar) de la prevalencia de los daños en los diferentes órganos y tejidos del camarón en los estanques de M1 y M2, teniendo como valor mínimo de 0% en todos los órganos para ambos módulos correspondiente a las primeras semanas del cultivo de camarón. De manera general, las patologías presentadas en el bioensayo se pueden asociar probablemente con las afectaciones que se obtuvieron en el ciclo de cultivo, ya que presentaron las mismas signologías. Una vez observados todos estos órganos correspondientes al bioensayo elaborado, cabe mencionar que de todos estos daños y alteraciones

causados, no están asociados con algún agente etiológico infeccioso (*i.e.*, virus, bacterias, hongos y protozoarios).

Tabla 16. Mínimos, máximos y medias (\bar{x}) con desviación estándar (s) de las prevalencias (%) en los estanques de camarón en cada módulo (M1 y M2) a lo largo del ciclo de cultivo.

	M1			M2		
	Mínimo	Máximo	$\bar{x} \pm s$	Mínimo	Máximo	$\bar{x} \pm s$
Hepatopáncreas	0.0	40.3	19.4±15.3	0.0	50.7	24.1±18.8
Órgano linfoide	0.0	44.4	15.9±15.6	0.0	49.1	19.2±17.5
Glándula antenal	0.0	38.9	22.7±14.7	0.0	50.0	26.8±17.2
Branquias	0.0	38.3	20.8±13.1	0.0	43.7	22.9±14.5
Intestino	0.0	50.0	15.2±16.6	0.0	50.0	23.7±20.9
Ciegos hepáticos	0.0	33.3	7.3±10.5	0.0	28.8	10.6±10.4
Corazón	0.0	33.3	10.9±11.8	0.0	33.3	11.1±12.8
Músculo	0.0	18.8	3.8±5.9	0.0	19.2	10.15±7.3

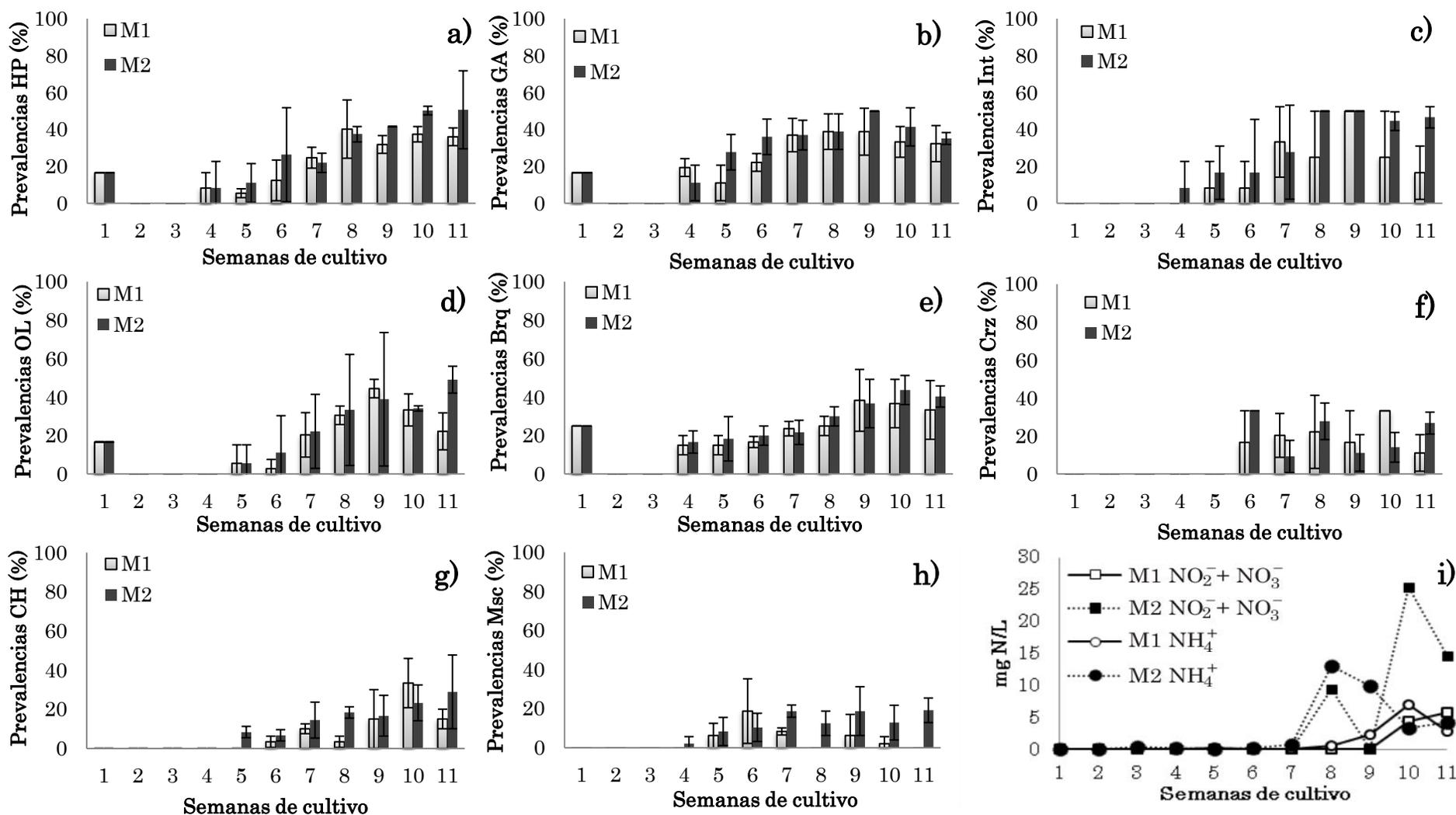


Fig. 8.42. Prevalencias de los órganos y tejidos de a) hepatopáncreas (HP); b) glándula antenal (GA); c) Intestino (Int); d) órgano linfoide (OL); e) branquias (Brq); f) corazón (Crz); g) ciegos hepáticos (CH); h) músculo (Msc) del camarón (*L. vannamei*) a baja salinidad (1.9 g/L); i) concentraciones de nitritos+nitratos y amonio para cada módulo (M1 y M2) a lo largo del ciclo de cultivo experimental.

En la Fig. 8.43, se puede observar claramente cuáles fueron los órganos más afectados para cada tratamiento, presentándose en el tratamiento 2 y 3 en la mayoría de los casos las mayores prevalencias. Se muestra que el órgano más dañado fue la glándula antenal y las branquias, dado que son los órganos responsables de mantener la homeostasis del organismo (osmoregulación) además de ser los más sensibles ante la respuesta a los tóxicos (amonio y nitrito).

Después se encuentra el daño en el hepatopáncreas, entra al sistema digestivo, llega al hepatopáncreas, causa atrofia y alteraciones en éste órgano perturbando el almacenamiento de las reservas de energía, interviniendo en el ciclo de muda y el crecimiento del camarón, dado que el hepatopáncreas tienen la función de desintoxicación del organismo, lo excreta permitiendo su paso al intestino donde éste tóxico deteriora la mucosa intestinal produciendo enteritis hemocítica. Finalmente, afecta los ciegos hepáticos, interrumpiendo totalmente la nutrición del camarón, que al tratar de eliminar el tóxico deja de alimentarse y de gastar energía para su crecimiento enfocándose en la eliminación del tóxico.

En paralelo a los daños ocasionados, se encuentra el órgano linfóide, éste órgano es capaz de detectar partículas y moléculas extrañas del organismo, lo que responde ante la entrada del tóxico tratando de encapsularlo, fagocitarlo y expulsarlo del organismo mediante la formación de esferoides. El músculo es afectado mediante el ciclo de muda del camarón, ya que una vez que éste ha sido expuesto (ecdisis) al medio al no tener la capa protectora (cutícula), se vuelve vulnerable ante cualquier agente. Después el corazón, al reconocer que el organismo se encuentra en problemas, tiene que transportar una gran cantidad de hemocitos al lugar donde se están viendo afectados los órganos.

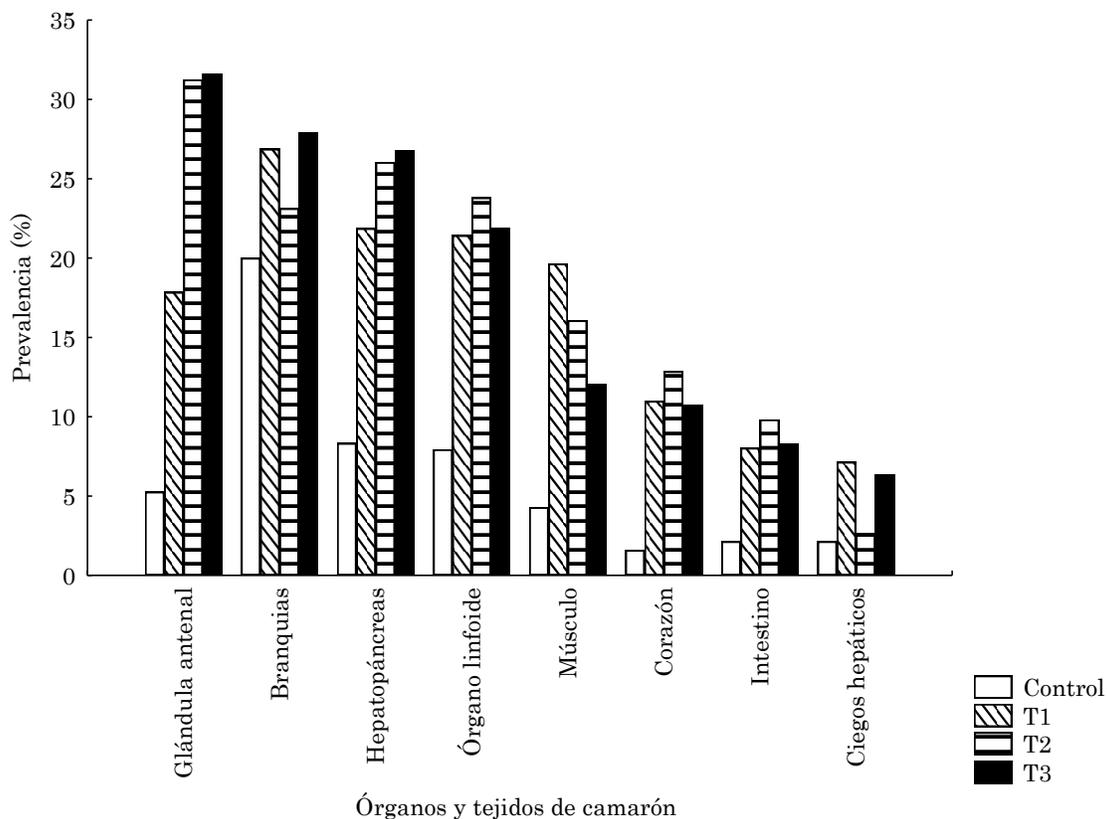


Fig. 8.43. Prevalencias en porcentaje de los diferentes órganos y tejidos de *L. vannamei* exponiéndolo a diferentes concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- en agua de baja salinidad (1.9 g/L) en un período de 240 h (T1= 4mg/L N- NH_4^+ y 1 mg/L N- NO_2^- ; T2= 8 mg/L N- NH_4^+ y 1.5 mg/L N- NO_2^- ; T3= 13 mg/L N- NH_4^+).

8.5. Relación de los compuestos nitrogenados con las alteraciones de los órganos y tejidos de camarón a baja salinidad

De acuerdo a los resultados anteriores de calidad de agua e histología, en esta sección se analiza la posible existencia de la relación entre la concentración de las formas inorgánicas nitrogenadas con las prevalencias de las afecciones en los distintos órganos y tejidos del camarón. Para esto se aplicaron dos pruebas estadísticas: correlación lineal simple (sección 8.5.1) y chi-cuadrada con una prueba *a posteriori* de Dunnett (sección 8.5.2).

8.5.1. Aplicación del análisis de correlación lineal simple

Como un primer paso de la aplicación de la estadística simple, se realizaron los análisis de correlación lineal para comprobar la posible dependencia de cada una de las variables estudiadas, tales como, las prevalencias de los órganos y tejidos del camarón respecto a las concentraciones de los compuestos de nitrógeno (nitrógeno amoniacal total, amonio no-ionizado, nitritos, nitratos y nitrógeno inorgánico disuelto).

En la Tabla 16, se presentan los resultados de los análisis de correlación lineal entre los distintos órganos y tejidos del camarón en los módulos de cultivo de camarón (M1 y M2) con respecto a las concentraciones de las diversas formas de compuestos nitrogenados estudiados. En esa tabla se muestra que en M2 se presentó un mayor número de casos de correlaciones significativas que en M1. Esto se puede deber a que en M2 se tiene una mayor densidad de siembra y en consecuencia, se presentaron mayores concentraciones de los compuestos de nitrógeno (TAN, NH_3 , NO_2^- , NO_3^- y NID) que en M1.

En M1, se observa que la glándula antenal, intestino y músculo no tuvieron correlaciones significativas ($p \leq 0.05$), que probablemente se pueda deber principalmente a la densidad de siembra aplicada ya que hubo una

acumulación significativa de sólidos y compuestos nitrogenados como para causar altas afectaciones a los organismos en dichos órganos. Se observó que se tiene un mayor número de correlaciones significativas ($p < 0.05$) para el nitrógeno amoniacal total y amonio no-ionizado que para las demás especies químicas del N, por otra parte, no se obtuvo ninguna correlación significativa para el caso del nitrito.

En M2, se observa que la mayoría de las prevalencias de los órganos y tejidos del camarón se correlacionan con casi todos los compuestos de nitrógeno, exceptuando las prevalencias de corazón y músculo, las cuales no tuvieron una correlación significativa con ninguna forma de nitrógeno. Esto puede deberse a que los factores externos ya mencionados pudieran estar afectando, sin tener una tendencia clara de dependencia que se pudiera dar con los compuestos del nitrógeno. Además, se encontró que el nitrógeno inorgánico disuelto presenta el mayor número de casos de correlaciones altamente significativas ($p \leq 0.005$) con 3/8 de los órganos y tejidos del camarón estudiados. Así mismo, la prevalencia de afecciones del intestino presenta un mayor número de casos de las correlaciones altamente significativas ($p \leq 0.005$) con respecto a los compuestos del nitrógeno a excepción del nitrito, con quien no presentó correlación alguna, mientras que los nitratos presentaron una correlación significativa ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, los órganos que arrojaron prevalencias de afección correlacionadas significativamente con todos los compuestos del N, fueron: el órgano linfóide, hepatopáncreas y ciegos hepáticos. Esto, probablemente puede estar relacionado a tratarse de órganos blancos, característicos por su sensibilidad ante la respuesta a un tóxico, además de que se encuentran bajo la influencia de otros factores externos, característicos del cultivo a cielo abierto.

Se puede concluir, que con base a éstos resultados hay evidencia de daños provocados por los compuestos nitrogenados y, principalmente de la diferencia en las densidades de siembra en M1 y M2, por lo que se recomienda realizar más estudios enfocados a la interacción causa-efecto de los compuestos nitrogenados trabajando con un mayor número de bioensayos aplicando diseños experimentales multivariados y/o multifactoriales dependiendo de lo que se quiera demostrar en lo específico.

Tabla 17. Resultados del análisis de correlación lineal entre parámetros químicos vs. prevalencia de afección en cada órgano y tejido del camarón blanco (*L. vannamei*) (n =11; $\alpha =0.05$). Intersecciones en blanco representan correlaciones no significativas ($p>0.05$). Números resaltados en negritas representan correlaciones altamente significativas ($p<0.005$).

	Glándula antenal	Órgano linfoide	Hepatopáncreas	Corazón	Intestino	Branquias	Ciegos hepáticos
M1							
TAN	ecuación	y=4.4506x+10.66	y=4.5123x+14.017	y=3.722x+6.483		y=4x+15.99	y=4.6318x+1.7227
	r	0.62	0.64	0.69		0.66	0.96
	p	≤0.05	≤0.05	≤0.05		≤0.05	≤0.005
NH ₃	ecuación	y=67.919x+10.661	y=68.852x+14.017	y=56.816x+6.4818		y=61.039x+15.99	y=70.67x+1.7241
	r	0.62	0.64	0.69		0.66	0.96
	p	≤0.05	≤0.05	≤0.05		≤0.05	≤0.005
NO ₂ ⁻	ecuación						
	r						
	p						
NO ₃ ⁻	ecuación						y=4.3635x+3.6132
	r						0.77
	p						≤0.05
NID	ecuación		y=2.3954x+14.017			y=2.0339x+16.383	y=2.299x+2.2993
	r		0.63			0.63	0.89
	p		≤0.05			≤0.05	≤0.005
M2							
TAN	ecuación	y=35.103x+20.003	y=2.6611x+11.342	y=2.611x+16.374		y=3.7045x+12.788	y=1.3973x+6.1749
	r	0.61	0.69	0.63		0.80	0.60
	p	≤0.05	≤0.05	≤0.05		≤0.005	≤0.05
NH ₃	ecuación	y=35.103x+20.003	y=40.644x+11.366	y=39.931x+16.388		y=56.551x+12.828	y=21.346x+6.1867
	r	0.61	0.69	0.63		0.80	0.61
	p	≤0.05	≤0.05	≤0.05		≤0.005	≤0.05
NO ₂ ⁻	ecuación		y=24.013x+14.085	y=29.629x+17.777		y=21.701x+18.338	y=17.019x+6.6794
	r		0.62	0.71		0.67	0.729
	p		≤0.05	≤0.05		≤0.05	≤0.05
NO ₃ ⁻	ecuación		y=1.3772x+13.285	y=1.7204x+16.7		y=1.6316x+16.715	y=1.2322x+17.668
	r		0.63	0.74		0.63	0.68
	p		≤0.05	≤0.05		≤0.05	≤0.05
NID	ecuación		y=1.269x+9.7582	y=1.4597x+13.226		y=1.5942x+11.863	y=1.0252x+15.331
	r		0.78	0.84		0.83	0.77
	p		≤0.005	≤0.005		≤0.005	≤0.005

8.5.2. Aplicación de la prueba de Chi-cuadrada

Como se menciona en la sección de materiales y métodos, se realizó la prueba de chi-cuadrada comparando el control con los módulos 1 y 2 durante las semanas 5 y 6 con el objetivo de demostrar que durante este tiempo los organismos dentro del cultivo se encontraban aparentemente “sanos” y fueron comparables con el control, el cual, este último, estuvo bajo condiciones controladas durante el mismo tiempo de experimentación. En ésta prueba se encontró una asociación en hepatopáncreas, corazón y músculo y se aplicó una prueba *a posteriori* de Dunnett (Zar, 1984). En ésta prueba se demuestra estadísticamente que la mayoría de los órganos y tejidos del camarón del cultivo se encontraron normales para un ambiente de baja salinidad hasta la semana 6.

Sin embargo, los resultados obtenidos en la prueba de chi-cuadrada referente a la asociación encontrada (hepatopáncreas, corazón y músculo) se pueden atribuir a los cambios fisiológicos y estructurales que sufre el organismo durante su desarrollo, durante la ecdisis, dichos cambios se ven reflejados directamente en los túbulos del hepatopáncreas, como se observa en la Fig. 8.47, se tiene el porcentaje de los organismos que se encontraban en los diferentes estadios de muda. En el caso del tratamiento control del bioensayo confirmatorio, el 14.3% se encontraba en intermuda, el 21.4% en premuda, el 28.6% en muda y por último el 35.7% en postmuda. En los organismos de M1, el 16.7% se mostraba en intermuda, el 33.3% en premuda, el 16.7% en muda y el 33.3% en postmuda. Y por último en los organismos de M2, el 16.7% se presentaba en intermuda, el 41.7% en premuda, el 25.0% en muda y finalmente, el 16.7% en postmuda. Esto muestra que la mayoría de los organismos se encontraban en premuda y postmuda, siendo que dichas observaciones se deben a cambios del desarrollo natural que tiene el camarón en su crecimiento, por lo que se considera normal.

El ciclo de muda en los crustáceos es un mecanismo de defensa contra bacterias, hongos y parásitos que se encuentran adheridos al exoesqueleto (Villalón, 1991; Molina-Poveda *et al.*, 2002). Durante este proceso, el camarón presenta algunos procesos metabólicos asociados con el crecimiento, en los cuales incluyen la degradación del viejo exoesqueleto y la síntesis del nuevo, donde la concentración de los metabolitos sanguíneos y las reservas energéticas varía entre estadios, de acuerdo a los cambios metabólicos que son indispensables para la realización de la ecdisis.

A lo que respecta al sistema inmune del camarón, se han observado cambios en la concentración de los hemocitos y en diversos mecanismos inmunológicos asociados a los hemocitos ya que los cambios de la cutícula durante el estadio de muda pueden facilitar la infección del organismo (Le Moullac *et al.*, 1997). Cheng *et al.* (2003) mencionan que la actividad de la fenoloxidasa, la actividad fagocítica y la eficiencia de depuración de *M. rosenbergii* a la bacteria *L. garvieae* fue alta durante el estadio de intermuda, resultando más resistente el organismo en esta etapa. Tsing *et al.* (1989) presentan en postlarvas de *M. japonicus* una disminución en la concentración de hemocitos y alcanzando el mínimo en la etapa de postmuda, incrementando en intermuda y alcanzando el máximo en premuda. Le Moullac *et al.* (1997) muestran que el conteo total de hemocitos en *L. stylirostris* medido en intermuda fue significativamente más bajo ($p < 0.1\%$) que lo observado en los estadios de premuda y postmuda, mientras que la actividad de la fenoloxidasa fue significativamente más alto ($p < 2\%$) en intermuda que en la etapa de premuda.

En camarones peneidos la cutícula es esclerotizada y no es permeable en intermuda, mientras que el desprendimiento de la vieja cutícula podría permitir la entrada de bacterias a través de la cutícula nueva durante las etapas de premuda (Le Moullac *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2003). En el estado de

premuda temprana el hepatopáncreas y los músculos comienzan a movilizar las reservas necesarias para la construcción de la cutícula nueva, mientras que en la premuda tardía el resultado de dicha construcción es la reducción de las reservas atrofiando dichos órganos (Le Moullac *et al.*, 1997; Alday-Sanz, 2010).

El corazón se ve afectado por la osmoregulación del organismo al encontrarse en un medio de agua de mar diluida, se activa el mecanismo de hiperregulación, lo que aumenta la irrigación de hemolinfa haciendo que éste órgano trabaje a un mayor ritmo para compensar la absorción de Na⁺ y Cl⁻ del medio externo y de esta manera mantener un estado de balance estable (Mantel, 1983).

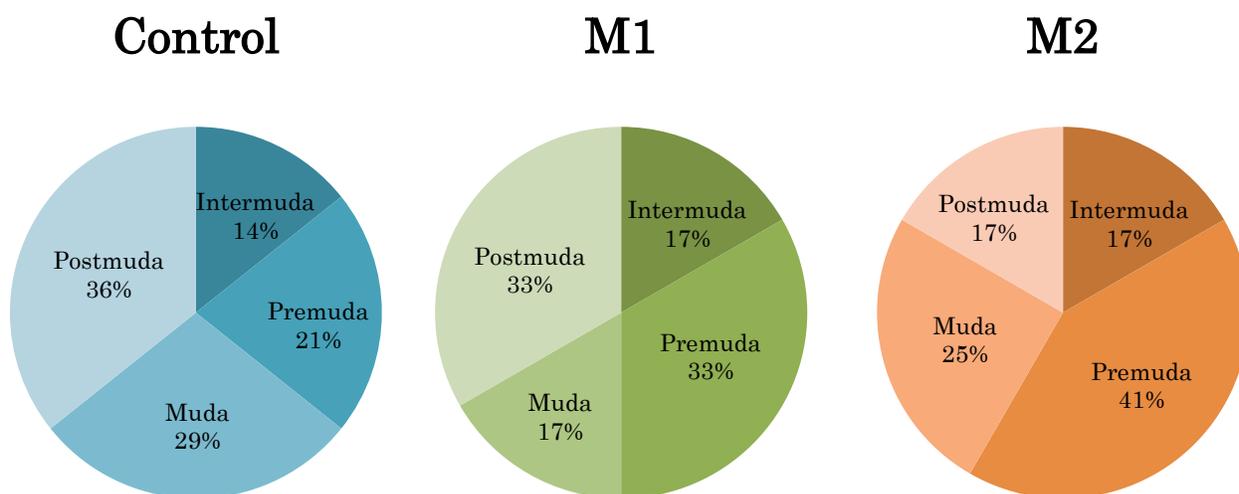


Fig. 8.44. Porcentajes de estadio de muda de los organismos analizados en el control del experimento (n=14), y en los módulos M1 (n=12) y M2 (n=12) del cultivo de camarón en las semanas 5 y 6.

En la prueba *a posteriori*, el hepatopáncreas demostró que la prevalencia de daños en el control y el módulo 1 no son significativamente diferentes, pero éstos a su vez son significativamente diferentes de la prevalencia de daños en los camarones del M2. Lo que se puede deber a la diferencia entre éstos los dos módulos (M1 y M2) por la diferente densidad de siembra entre ellos. En el

corazón se muestra una diferencia significativa entre la prevalencia de afección del control con respecto a los módulos M1 y M2. En el caso del músculo, a pesar de que la prueba de chi-cuadrada demuestra una asociación entre tratamientos, la prueba *post hoc* muestra que no se encontraron diferencias significativas entre los módulos, lo que se debe probablemente al grado de aleatoriedad asociado a dicha prueba para discriminar las diferencias a pesar de que evidentemente el control es diferente a los módulos M1 y M2 (Tabla 17).

Con lo anterior, se puede inferir que durante las semanas 5 y 6 del cultivo en los módulos 1 y 2 la prevalencia de afecciones en los distintos órganos del camarón no son estadísticamente diferentes a los de los tratamientos, demostrando que la salud del camarón hasta la 6 semana del cultivo (cielo abierto) de camarón era aceptable desde este punto de vista. Como se puede observar en la Tabla 17, las diferencias estadísticamente probadas no pueden asociarse directamente a las condiciones evaluadas en las corridas experimentales M1 y M2.

Tabla 18. Prevalencias de las afecciones (%) de los órganos y tejidos significativamente asociados ($p < 0.05$) de control y de los módulos 1 y 2 del cultivo de camarón durante las semanas 5 y 6. Letras diferentes significa que las medias de los valores son significativamente ($p < 0.05$) diferentes entre los tres distintos casos que se comparan en un mismo renglón.

	Control	M1	M2
Músculo	1.4 ^a	12.5 ^a	18.1 ^a
Hepatopáncreas	13.1 ^a	9.5 ^a	23.8 ^b
Corazón	3.3 ^a	30.0 ^b	30.7 ^b

Como una segunda prueba, se globalizaron las semanas 10 y 11 de los módulos 1 y 2, ya que en estas semanas se presentaron los mayores problemas tanto de mortalidad como de un aumento significativo en las concentraciones

de amonio y nitrito dentro de los estanques, además de ser las concentraciones utilizadas en T1 y T2 del bioensayo de confirmación e igualar el tiempo de experimentación de aproximadamente 10 días. Del total de los órganos y tejidos analizados, la prueba mostró una asociación significativa en la mayoría de los siguientes órganos: hepatopáncreas, glándula antenal, branquias, corazón, músculo, ciegos hepáticos y otros, excluyendo al órgano linfoide e intestino. En la prueba *post hoc* se muestran en la Tabla 18 aquellos órganos y tejidos que responden a los efectos causados por el nitrógeno como son:

(a) **hepatopáncreas**, se encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) en el control con todos los tratamientos del bioensayo de confirmación, entre T1 y los módulos del cultivo (M1 y M2), entre el tratamiento T2 y M2, y a su vez entre los módulos del cultivo de camarón a cielo abierto; por otra parte, el tratamiento T2 y el módulo M1 no son significativamente diferentes, indicando la influencia del nitrógeno sobre el órgano. Según Barbieri (2009) la exposición al amonio en ambientes acuáticos produce muchos cambios fisiológicos en crustáceos, incluyendo alteraciones metabólicas asociadas con el consumo de energía, interfiriendo en el ciclo de muda;

(b) en la **glándula antenal**, el control es significativamente diferente ($p < 0.05$) a los módulos. Los daños expresados como porcentaje de prevalencia causados entre tratamientos y entre módulos no son significativamente diferentes, así como en T2 y M1;

(c) en el **corazón**, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en el control con los tratamientos y con los módulos del cultivo de camarón, mientras que entre los tratamientos con ambos módulos (M1 y M2) no tienen diferencias significativas;

(d) en **músculo**, las diferencias significativas ($p < 0.05$) se encuentran entre el control con los tratamientos T1, T2, y el módulo M2. No hubo diferencias

significativas ($p < 0.05$) entre el control y M1, ni en los tratamientos con respecto a M2. Esto muestra que el músculo en el cultivo en M1 se mantuvo normal durante el ciclo de cultivo sin que los factores externos le causaran algún efecto; los daños observados en los tratamientos tienen coincidencias con el porcentaje de prevalencia de daños con el M2, por lo que se puede inferir que los daños presentes en éste módulo fueron por la toxicidad del nitrógeno.

Por otra parte, como se observa en la Tabla 18, se muestran los demás órganos donde no se encontró asociación con los compuestos nitrogenados:

(a) **branquias**, el control no fue significativamente ($p < 0.05$) diferente a los tratamientos T1 y T2, mostrando que las concentraciones utilizadas (T1 = 4 mg/L de N-TAN + 1 mg/L N-NO₂⁻ y T2 = 8 mg/L N-TAN + 1.5 mg/L N-NO₂⁻) en dichos tratamientos durante 10 días no alcanzaron los niveles suficientes para causar daños sobre éste órgano, de alguna manera esto se ve reflejado en el hecho de que los valores de la concentración letal media para las 96 h de exposición (CL₅₀-96-h) determinadas por Lin y Chen (2001) en juveniles de *L. vananemi* fueron de 24.39 mg N-NH₄/L, o sea seis veces más altas que las trabajadas en nuestros experimentos. Sin embargo, esta última comparación debe de hacerse con cautela porque el valor de la CL₅₀ determinado por estos autores fue calculado para organismos expuestos a una salinidad de 15 g/L. Romano y Zeng (2007a) de manera similar a nuestro estudio correlacionaron el daño ocasionado en branquias inducido por amonio con la toxicidad de amonio a través del desarrollo de juveniles de *P. pelagicus*. La prueba estadística evidenció que la prevalencia de los módulos no fueron significativamente ($p > 0.05$) diferentes entre sí, pero si hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y los tratamientos, esto demuestra que los daños ocasionados a este órgano fueron provocados probablemente por otros factores, principalmente por protozoarios y sólidos suspendidos, los cuales se observaron en el análisis histológico.

(b) **ciegos hepáticos**, el control es diferentemente significativo ($p < 0.05$) a T1 y a los módulos del cultivo (M1 y M2); en el tratamiento T1 con el control y a los módulos del cultivo (M1 y M2) pero no es significativamente diferente ($p > 0.05$) de T2. Sin embargo, el tratamiento T2 se encuentra asociado al control y a T1, pero es significativamente diferente ($p < 0.05$) de M1 y M2. Por otra parte, ambos módulos (M1 y M2) no tienen diferencias significativas ($p > 0.05$), por lo tanto, no hay asociación de las alteraciones presentadas en los módulos de cultivo (M1 y M2) con los tratamientos del bioensayo (T1 y T2).

Tabla 19. Prevalencias de las afecciones (%) de los órganos y tejidos significativamente asociados ($p < 0.05$) de los tratamientos del bioensayo de confirmación (T1 y T2) y de los módulos experimentales (M1 y M2) durante las semanas 10 y 11. Letras diferentes significa que las medias de los valores son significativamente ($p < 0.05$) diferentes entre los tres distintos casos que se comparan en un mismo renglón o fila.

	Control	T1	T2	M1	M2
Hepatopáncreas	12.2 ^a	20.5 ^b	28.2 ^{bc}	34.0 ^c	43.6 ^d
Glándula antenal	19.2 ^a	15.4 ^a	25.6 ^{ab}	32.0 ^b	38.5 ^b
Branquias	21.5 ^a	25.4 ^a	22.3 ^a	36.1 ^b	42.3 ^b
Corazón	6.1 ^a	30.3 ^b	24.2 ^b	33.3 ^b	33.3 ^b
Músculo	1.3 ^a	20.5 ^b	19.2 ^b	1.3 ^a	17.9 ^b
Ciegos hepáticos	1.7 ^a	5.8 ^b	4.2 ^{ab}	20.8 ^c	22.5 ^c

De manera general, se pudieron evidenciar diferencias marcadas en los porcentajes de prevalencia de daño en los tejidos y órganos de juveniles de *L. vannamei* entre los tratamientos del bioensayo con los módulos del cultivo a cielo abierto, debido a las diferentes condiciones a las que estuvieron expuestos los camarones en cada uno de estos experimentos; en el cultivo experimental a cielo abierto los organismos se sometieron a un ambiente a la intemperie bajo las condiciones climáticas, con la presencia de material suspendido como

fitoplancton, bacterias y protozoarios (trama trófica), sólidos (como detritus y polvo), alimento formulado no consumido y heces de los organismos; mientras que en el bioensayo los organismos se mantuvieron en condiciones más controladas de temperatura, oxígeno, luz y limitada presencia de sólidos (suspendidos y de fitoplancton), por los recambios totales cada 24 h, teniendo como única variable las concentraciones de nitrógeno; esto para descartar aquellos factores externos a los que estuvieron expuestos los organismos del cultivo, para poder observar los daños que debieron de haber provocado presumiblemente sólo las concentraciones de los compuestos nitrogenados dentro de los estanques y poder asociar los daños y/o alteraciones causados.

Por su parte, entre los dos módulos M1 y M2, se pudo observar una diferencia muy marcada de la prevalencia de daños en órganos y tejidos la cual se debió esencialmente por las diferencias en la densidad de siembra y sus implicaciones.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Las variables de calidad del agua durante el ciclo de cultivo del camarón *L. vannamei* fueron adecuadas para un buen desarrollo del cultivo, ya que la temperatura osciló de 28.9 a 33.0°C y de 28.7 a 32.8 °C, el oxígeno disuelto de 6.7 a 8.8 mg/L y de 6.6 a 9.0 mg/L, el pH de 7.4 a 9.6 y de 7.5 a 9.7, y la conductividad eléctrica fluctuó de 2695.1 a 3357.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y de 2839.9 a 3408.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para el M1 y M2, dichos valores se encuentran dentro del intervalo considerado óptimo para el crecimiento del camarón.
2. La concentración promedio de amonio total para M1 y M2 fueron de 0.001 a 6.99 mg/L de N-TAN y de 0.001 a 13.14 mg/L de N-TAN. En M1 los niveles de amonio fueron altos pudiendo afectar el desarrollo y supervivencia del camarón, mientras que en M2 los niveles de amonio fueron más altos que en M1, cercanos a la CL_{50} para esta misma especie pero para una salinidad de 15 g/L; en este módulo se registró ciertamente una alta mortandad (87.8%), la cual ocurrió principalmente en la semana 10.
3. La concentración promedio de nitritos para M1 y M2 fue de 0.001 a 1.31 mg/L de N- NO_2^- y de 0.001 a 1.28 mg/L de N- NO_2^- . Aparentemente, estos niveles no representan un riesgo para la salud del camarón. Sin embargo, no se puede descartar el efecto sinérgico que pudiera darse entre nitrito y amonio.
4. La concentración promedio de nitratos para M1 y M2 fueron de 0.001 a 4.85 mg/L de N- NO_3^- y de 0.001 a 24.15 mg/L de N- NO_3^- . Al igual, que para los nitritos, estos niveles no representan un riesgo para la salud del camarón.

5. Con lo que respecta al nitrógeno inorgánico disuelto (NID) se tuvo una variación de 0.01 a 11.32 mg/L de N-NID en M1 y de 0.01 a 28.73 mg/L de N-NID en M2. En M1 y M2, la clorofila *a* fluctuó de 3.3 a 330.1 mg/m³ y de 3.1 a 348.5 mg/m³, y los SST variaron de 1.0 a 69.3 mg/L y de 1.7 a 112.4 mg/L, respectivamente.
6. El análisis en fresco permitió examinar las características externas del camarón, encontrándose melanización multifocal, coloración rojiza en apéndices, flacidez y opacidad muscular en ambos módulos (M1 y M2), mientras que en las características internas, se pudo detectar una atrofia evidente en branquias (presencia de melanización, necrosis, materia orgánica y fitoplancton con GS=1-3 y hepatopáncreas GS=2 y 4) de los organismos en M1 y M2. Por otro lado, en hepatopáncreas se observó atrofia y deformaciones tubulares en diferentes grados de severidad conforme transcurría el cultivo, además de presentar un color gris-opaco, señal de alteraciones como la ausencia de lípidos en los túbulos en las últimas semanas del cultivo para ambos módulos. Solamente en el intestino no se observaron daños o alteraciones. Este cuadro de manifestaciones mediante el análisis en fresco nos indicó que había una problemática severa dentro de los estanques en términos de calidad de agua.
7. En el análisis histológico, la prevalencia media de los órganos y tejidos del cultivo de camarón fue de 22.1±15.1 y 27.4±19.7% en hepatopáncreas; de 18.2±15.9 y 21.8±21.9% en órgano linfoide; de 25.9±13.9 y 30.4±15.5% en glándula antenal; 23.6±12.9 y 26.1±13.2% en branquias; de 17.2±20.4 y 27.0±22.8% en intestino; de 7.6±10.4 y 11.9±12.1% en ciegos hepáticos; de 10.9±11.8 y 11.1±12.8% en corazón; de 4.3±8.2 y 11.5±9.2% en músculo; y de 14.8±16.8 y 24.1±19.2% en otros en M1 y M2.

8. Se observó que el comportamiento de las alteraciones en los diferentes órganos y tejidos del camarón de mayores a menores daños en los módulos de cultivo fue hepatopáncreas (HP), glándula antenal (GA), intestino (Int), órgano linfoide (OL), branquias (Brq), corazón (Crz), ciegos hepáticos (CH), y músculo (Msc), esto se representa como sigue:

$$HP > GA > Int > OL > Brq > Crz > CH > Msc$$

9. En el bioensayo de confirmación la prevalencia mediante el análisis histológico de los órganos y tejidos del camarón fue de 18.8, 21.9, 26.0 y 26.8% en hepatopáncreas; de 19.0, 21.4, 23.8 y 21.9% en órgano linfoide; de 17.3, 17.9, 31.3, 31.6% en glándula antenal; de 23.5, 26.9, 23.1 y 27.9% en branquias; de 8.6, 8.0, 9.8 y 8.3% en intestino; de 2.1, 7.1, 2.7 y 6.3% en ciegos hepáticos; de 1.6, 11.0, 12.9 y 10.7% en corazón; de 4.3, 19.6, 16.1 y 12.0% en músculo; y de 0.0, 0.0, 4.5 y 6.8% en otros, siendo en control, T1 (4 mg/L de N-NH₄⁺ y 1 mg/L de N-NO₂⁻), T2 (8 mg/L de N-NH₄⁺ y 1.5 mg/L de N-NO₂⁻), y T3 (13 mg/L de N-NH₄⁺), observándose los mayores daños en los diversos órganos y tejidos del camarón en T2 y T3.
10. La secuencia de los daños provocados por los compuestos nitrogenados durante el bioensayo o los tratamientos fue: glándula antenal, branquias, hepatopáncreas, órgano linfoide, músculo, corazón, intestino y ciegos hepáticos, que se representa de la siguiente manera:

$$GA > Brq > HP > OL > Msc > Crz > Int > CH$$

11. Se demostró mediante el análisis estadístico (Chi-cuadrada) que los daños provocados por los compuestos nitrogenados se asociaron significativamente ($p < 0.05$) a los siguientes órganos durante el cultivo: hepatopáncreas, glándula antenal, corazón y músculo.
12. Conforme se desarrolló el ciclo de cultivo, y tendieron a aumentar las concentraciones de los compuestos de nitrógeno junto con los demás

factores que conllevan el cultivo (alimento no consumido, heces, proliferación de fitoplancton y bacterias) aumentan las prevalencias y/o afectaciones en la salud de los organismos.

13. Al presentarse casos de infección por bacterias, se recomienda realizar aislamientos, con pruebas microbiológicas y de PCR para identificar el patógeno, poder realizar un mejor diagnóstico y/o descartar factores externos que puedan afectar el desarrollo del cultivo de camarón.
14. Se recomienda realizar un análisis de sulfuros (H_2S , HS^- y S^{2-}) en el agua de los estanques en futuros estudios de este tipo, para poder discriminar, si estos compuestos están o no contribuyendo a la afectación de la salud de los camarones.
15. De manera general y a partir de los resultados obtenidos, es evidente la necesidad de continuar con este tipo de estudios para corroborar los daños y/o alteraciones que provocan los compuestos nitrogenados en los diferentes órganos y tejidos del camarón blanco *L. vannamei* y poder establecer las relaciones causa-efecto, para lo que se recomienda emplear bioensayos controlados en el corto y mediano plazo en baja salinidad (<2 g/L) exponiendo a los camarones de manera individual y en mezclas a los compuestos nitrogenados. Se deben de realizar más estudios también a nivel microcosmos y mesocosmos, para ver la interacción del camarón *L. vannamei* con todos los componentes de calidad de agua así como temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, G., F. Valle. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Research Developments in Microbiology*. 4: 333-348.
- Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J.G., Pérez-Castañeda, R., Palacios-Monzón, A., Trujillo-Rodríguez, T., De la cruz-Hernández, N.I. (2010). Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in American white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(3): 464-470.
- Alarcón-Silva, S.G. (2013). Calidad del agua y balance de nutrientes (N y P) en el cultivo integrado de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), tomate (*Lycopersicum esculentum*) y lechuga (*Lactuca sativa*) utilizando agua de baja salinidad y cero recambio. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar, UNAM, México, 121 p.
- Alatorre-Jacome, O., Trejo-García, F., Soto-Zarazua, G.M., Rico-García, E. (2012). Techniques to assess fish productivity in Aquaculture farms and small fisheries: An overview of Algebraic Methods. *Journal of Applied and Sciences*, 12 (9): 888-892.
- Albrecht, J. (2007). Ammonia toxicity in the central nervous system. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 261-276.
- Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., Espinoza, V., Vanegas, C. (1999a). Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30 (1): 90-97.
- Alcaraz, G., Espinoza, V., Vanegas, C. y Carrara, X.C. (1999b). Acute effect of ammonia and nitrite on respiration of *Penaeus setiferus* postlarvae under

different oxygen levels. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 98-106.

Alday-Sanz, V. (2010). *The shrimp book*. Nottingham: Nottingham University Press.

Allan, G.L. y Maguire C.B. (1991). Lethal concentrations of low dissolved oxygen and effects os short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 94: 27-37.

Allan, G.L., Maguire, G.B. y Hopkins, S.J. (1990) Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. *Aquaculture*, 91: 265-280.

Allen, D., Boyd, C.E., Samocha, T.M. (2004). Acclimating Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*, to inland, Low-Salinity Waters. Southern Regional Aquaculture Center.

Al-Mohanna, S. y Nott, J.A. (1989). Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda) during the moult cycle. *Mar. Biol.*, 101: 535-544.

Alonso, A. y Camargo, J.A. (2003). Short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 70: 1006-1012.

Alonso-Rodríguez, R. y Páez-Osuna, F. (2003). Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, 219: 317-336.

Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna, F., Gárate-Lizárraga, I. (2004). El fitoplancton en la camaronicultura y larvicultura: importancia de un buen manejo. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM y Comité estatal de sanidad Acuícola de Sinaloa, México, 147 p.

- Álvarez, J., C. Agurto, J. Obregón, and L. Peroza. (2003). Detención de Baculovirus penaei y de casos de vibriosis en *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris* en una granja de la costa occidental de Venezuela. Revista Científica (Maracaibo), 13: 255-262.
- Angraeni, M.S. y Owens, L. (2000). The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon* *Diseases of Aquatic Organisms*, 40: 85-92.
- Angulo, C.J., A. Mejía y R. Engel. (2005). Cultivo experimental de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. Panorama Acuícola, 1(1): 10-13.
- Araneda M., Pérez, E.P., Gasca-Leyva, E. (2008). White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight. *Aquaculture*, 283: 13-18.
- Arzola González, J.F., Flores Campaña, L.M., Izabal Ceja, A., Gutiérrez Rubio, Y. (2008). Crecimiento de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en un estanque rústico a baja salinidad, *Revista AquaTIC*, n° 28: 8-15 p.
- Atwood H.L., S.P. Young y J.R. Tomasso. (2003). Survival and growth of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae in low-salinity and mixed salt environments. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(4): 518-523.
- Audelo-Naranjo, J.M., Martínez-Córdova, L.R., Voltolina, D. (2010). Nitrogen budget in intensive cultures of *Litopenaeus vannamei* in mesocosms, with zero water exchange and artificial substrates. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45 (3): 519-524.
- Balbi, F., Rosas, J., Velásquez, A., Cabrera, T., Maneiro, C. (2005). Aclimatación a baja salinidad de camarón marino *Litopenaeus vannamei*

(Boone, 1931) provenientes de criaderos comerciales, *Revista de Biología Marina y Ocenografía*, 40 (2): 109-115.

Barroco, M.A., Perazzolo, L.M., Rosa, R.D. (2008). Capítulo 6. Inmunología del camarón. En *Guía técnica: Patología e inmunología de camarones peneidos*, Vielka-Morales, Q. y Cuéllar-Anjel, J. (Eds.). OIRSA, Panamá, 169-211 p.

Barbieri, E. (2009). Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967, Crustacea). *Ecotoxicology*, 18 (3): 312-318.

Bautista, M.N., Lavilla-Pitogo, C.R., Subosa, P.F., Begino, E.T. (1994). Aflatoxin B₁ contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of preadult shrimp. *J. Sci. Food Agricult.*, 65: 5-11.

Bell, T.A. y Lightner, D.V. (1988). *A handbook of normal penaeid shrimp histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 75 p.

Bojórquez-Mascareño, E.I. y Soto-Jiménez, M.F. (2013). Effects of Natural Diet on Growth on White-Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* under experimental Mesocosms emulating an intensive culture system. *J. Aquac. Res. Development*, 4: 163.

Boyd, C.E. (1989). *Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming*. Fisheries and Allied Aquacultures Departamental Series No. 2, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 482 p.

Boyd, C.E. (1982). *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier, Amsterdam, 318 pp.

Boyd, C.E. (2001). Inland shrimp farming and the environment. *World Aquaculture*, 5 (3): 10.

- Boyd, C.E. y Fast, A.W. (1992). Chapter 23. Pond monitoring and management. In: Fast, A.W. y Lester, L.J. (Eds.). *Marine shrimp culture: Principles and practices*. Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam. P. 497-513.
- Boyd C. E., Tucker, C.S. (1998). *Pond Aquaculture Quality Management*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 720 p.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., Leung-Trujillo, J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, 122: 136-146.
- Bückle, L.F., Barón, B., Hernández, M. (2006). Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environmental. *Revista de Biología Tropical*, 54: 745-753.
- Buitimea-Duarte, L.E. (2012). Calidad de agua y balance de masas de Na⁺, k⁺, Ca⁺⁺, y Mg⁺⁺ en el cultivo intensivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) utilizando agua de mar diluida. Tesis de Maestría. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora, Unidad Académica Navojoa, 141 p.
- Burford, M.A. (2000). Fate and transformation of dietary N in penaeid prawn aquaculture ponds. PhD thesis. The university of Queensland, Brisbane, Australia.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R. H., Pearson, D.C. (2003). Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219: 393-411.
- Burford, M.A., y Glibert, P.M. (1999). Short-term N cycling in early and late growth-phase shrimp ponds. *Aquac. Res.*, 30: 215-227.

- Burford, M.A., y Lorenzen, K. (2004). Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediment remineralization. *Aquaculture*, 229: 129-145.
- Burford, M.A. y Williams, K.C. (2001). The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. *Aquaculture*, 198: 79-93.
- Burgents, J.E., Burnett, L.E., Stabb, E.V., Burnett, K.G. (2005). Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and comparative Immunology*, 29: 681-691.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.*, revisited. *J. Parasitol.*, 83: 575-583.
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A. (2005a). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58: 1255-1267.
- Camargo, J.A. y Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environmental International*, 32: 831-849.
- Campbell, J.M. (1973). Nitrogen excretion. In: Prosser, C.L. (Ed.). *Comparative Animal Physiology*. Third edition. W.B. Sanders, Philadelphia, U.S.A. p. 279-315.
- Casillas, H.R., Nolasco, S.H., García G.T., Páez-Osuna, F. (2007). Water quality, chemical fluxes and production in semi-intensive Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture ponds utilizing two different feeding strategies, *Aquacultural Engineering*, 36: 105-114.

- Castille, F.L., Lawrence, A.L. (1981). The effect of salinity on the osmotic and chloride concentration in the haemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 68A: 75-85.
- Castro, C. La acuicultura rebasa a la pesca tradicional. *Panorama acuícola magazine*. Disponible: http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2012/10/25/la_acuicultura_rebasa_a_la_pesca_tradicional_cauahatemoc_castro.html
- Castillo-Soriano, F.A., Ibarra-Junquera, V., Olivos-Ortiz, A., Barragán-Vázquez, F.J., Meyer-Willerer, A.O. (2010). influence of wáter supply chemistry on White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture in low-salinity and zero-water exchange ponds. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5 (3): 376-386.
- Chen, J.C. y Chen, S.F. (1992). Accumulation of nitrite in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103C: 477-481.
- Chen, J.C. y Chen, S.F. (1996). Changes of osmotic and electrolyte concentrations in the haemolymph of *Penaeus japonicas* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114C: 35-38.
- Chen, J.C. y Cheng, S.Y. (1993). Haemolymph osmolality, acid-base balance and shift of ammonotelic to urotelic excretory pattern of *Penaeus japonicas* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106C (3): 733-737.
- Chen, J.C. y Cheng, S.Y. (1995). Changes of oxihemocyanin and protein levels in the hemolymph of the *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite, *Aquatic Toxicology*, 33: 215-226.

- Chen, J.C. y Kuo, Y.Z. (1992). Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicas* juveniles. *Aquaculture*, 104: 249-260.
- Chen, J.C. y Kou, Y.Z. (1993). Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 109: 177-185.
- Chen, J.C. y Lai, S.H. (1992). Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicas* adolescents exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102C (1): 129-133.
- Chen, J.C., Ting, Y.Y., Lin, J.N., Lin, M.N. (1990). Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 66: 247-253.
- Cheng, S.Y., Tsai, S.J., Chen, J.C. (2002). Accumulation of nitrate in the tissues of *Penaeus monodon* following elevated ambient nitrate exposure after different time periods. *Aquat. Toxicol*, 56: 133-146.
- Cheng, S.Y. y Chen, J.C. (2002). Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicas* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicol*, 61: 181-193.
- Cheng, W., Juang, F.M., Li, J.T., Lin, M.C., Liu, C.H., Chen, J.C. (2003). The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garvieae* in relation to the moult stage. *Aquaculture*, 218: 33-45.
- Chien, Y.-H. (1992). Water quality requirements and management for marine shrimp culture. In: Wyban, J. (Ed.), *Proceedings of the special session on shrimp farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp. 144-156.

- Cho, C., J. Hynes, K. Wood, Yoshida, H. (1994). Development of high-nutrient dense, low population diets and prediction of aquaculture wastes using biological approaches. *Aquaculture* 124: 293-305.
- Claybrook, D.L. (1983). Nitrogen metabolism. In L.H. Mantel (ed.), *The Biology of Crustacea, Vol. 5 – Internal. Anatomy and Physiology Regulation*. Academic Press, New York: 163-213.
- Clifford III, C.H. (2000), *Manual de operaciones de Super Shrimp*, 102 p.
- Collins, A., Russell, B., Walls, A., Hoang, T. (2005). Inland prawn farming studies into the potential for inland marine prawn farming in Queensland. Queensland Department of Primary Industries and Fisheries (DPI&F). Australia, 79 pp.
- Colt, J.E. y Armstrong, D.A. (1981). Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and mollusks. *Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture*. Fish Culture Section of the American Fisheries Society (FCS Publ. 1): 34-47.
- Cuartas, E.I., Díaz, A.C., Petriella, A.M. (2002). Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del Langostino *Pleoticus muelleri* (Bate) (Crustacea, Penaeoidea). *Rev. Invest. Desarr. Pesq.*, 15: 5-13.
- Dall, W., B.J. Hill, P.C., Rotlishberg, D.J. Sharpless. (1990). The biology of the Penaeide. In: J.H.S. Blaxter & A.J. Southward (eds.). *Adv. Mar. Biol.*, 27: 1 – 489 p.
- Dalla-Via, G.J. (1986). Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicas*. II. Free amino acids. *Aquaculture*, 55: 307-316.
- Dalla-Via, G.J. (1987). Salinity responses in brackish water populations of the freshwater shrimp *Palaemonetes antennarius* –I Oxygen consumption. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A: 471-478.

- Davis, D.A., Arnold, C.R., (1998). The design management and production of a recirculating raceway system for the production of marine shrimp, *Aquacultural Engineering*, 17: 193-211.
- Davis, D.A., Boyd, C.E., Rouse, D.B., Saoud, P. (2005). Effect of Potassium, Magnesium and Age on Growth and survival of *Litopenaeus vannamei* Post-Larvae reared in Inland Low Salinity well waters in West Alabama. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36: 403-406.
- Davis, A., Samocha, T.M., Boyd, C.E. (2004). Acclimating Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to inland, low-salinity waters. SRAC Publication No. 2601, 8 p.
- De la Peña, L. D., C. R. Lavilla-Pitogo, and M. G. Parner. (2001). Luminiscent vibrios associated with mortality in pond-cultured shrimp, *Penaeus monodon* in the Philippines: species composition. *Fish Pathology*, 36: 133-138.
- Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E., Re, A.D. (2001). Effects of temperatura and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*. *Marine Freshwater Behavior and Physiology* 34: 93-104.
- Doughtie, D.G. y Rao, K.R. (1983). Ultraestructural and histological study of degenerative changes in the antennal glands, hepatopancreas, and midgut of grass shrimp exposed to two Dithiocarbamate biocides. *Journal of invertebrate pathology*, 41: 281-300.
- Eddy, F.B. y Williams, E.M. (1987). Nitrite and freshwater fish. *Chem. Ecol.*, 3: 1-38.
- Esparza-Leal, H., Ponce-Palafox, J.T., Valenzuela, W., Arredondo, J.L., García-Ulloa, M. (2010). Effects of density on growth and survival of juvenile

Pacific White shrimp, *Penaeus vannamei*, reared in low-salinity well water. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41: 648-654.

Espinosa-Plasencia, A., M.C. Bermúdez-Almada. (2012). La acuicultura y su impacto al medio ambiente. Disponible en: http://www.ciad.mx/archivos/revista-dr/RES_ESP2/RES_Especial_2_10_Bermudez.pdf

Fanjul-Moles, M.L. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapods crustaceans: Review and update *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 142: 390-400.

FAO. (2013). National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - México. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de Montero Rodríguez, M. In: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. [Citado 22 May 2013]. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es

Fast, A.W. y Lester L.J. (1992). *Marine shrimp culture: Principles and practices*. Elsevier, Amsterdam. 862 p.

Fegan, D., WB/NACA/WWF/FAO. (2001). Dealing with disease: an industry perspective. Pages 28-30 in R. Subasinghe, J. R. Arthur, M. J. Phillips, M. B. Reantaso, editors. Thematic review on management strategies for major diseases in shrimp aquaculture. The World Bank, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, World Wildlife Fund and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Consortium Program on Shrimp farming and the Environment. Proceedings of a workshop held in Cebu, Philippines. November 16, 1999.

- Flaherty, M. and Vandergeest, P. (1998). "Low salt" shrimp aquaculture in Thailand: Goodbye coastline hello Khon Kaen! *Environ. Manag.*, 22: 817–835.
- Forster, R.P. y Goldstein, L. (1969). Formation of excretory products. In: Hoar, W. y Randall, R. (Eds.). *Fish Physiology*. Vol. 1. Academic Press, New York. P. 313-350.
- Freire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C. (2008). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151A: 272-304.
- Frías-Espericueta, M., Páez-Osuna, F. (2001). Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones. *Camaronicultura y Medio Ambiente*. El Colegio de Sinaloa, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México, 270 pp.
- Gibson, R. y Barker, P.L. (1979). The decapods hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 17: 285-346.
- Godínez-Siordia, D.E., Chávez-Sánchez, M.C., Gómez-Jiménez, S. (2011). Acuicultura epicontinental del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14 (1): 55-62.
- Godínez-Siordia, D.E., González-Ochoa, O., Hernández-Díaz, A., García-Triana, A., Gamboa-Delgado, J., Arce-Ibarra, J.G., Godínez-Siordia, E.M. (2012). Principales patógenos virales de camarón en América y su relación con ambientes de baja salinidad, *Ra Ximhai* 8 (3): 61-69.
- Godoy, M. (2013). Patología en acuicultura. Edema branquial: daño agudo no infeccioso. www.marcosgodoy.com

- Godoy, M. (2015). Patología en acuicultura. Telangiectasia branquial en trucha arcoíris (*Oconrhyinchus mykiss*): observaciones mediante técnica de montaje en fresco. <http://goo.gl/d7WH2Y>
- Gómez, S., Urias, A., Vázquez, F., Hernández, G. (2004). Ammonia efflux rates and free amino acid levels in *Litopenaeus vannamei* postlarvae during sudden salinity changes. *Aquaculture*, 233: 573-581.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., Guerra-Flores, A.L. (2001). Cap. 14. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En *Camaronicultura y Medio Ambiente*, Páez-Osuna, F. (ed.). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y El colegio de Sinaloa, México, 273-295 p.
- Gong, H., Jiang, D.H., Lightner, D.V., Collins, C., Brock, D. (2004). A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert. *Aquaculture Nutrition* 10: 227-236.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. (1983). *Methods of Seawater Analysis*. Second, Revised and Extended Edition. Deerfield Beach, Florida: Verlag Chemie; 419 p.
- Green, B.W. (2008). Stocking strategies for production of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in amended freshwater in inland ponds. *Aquaculture Research*, 39: 10-17.
- Gross, A., Abutbul, S., Zilberg, D. (2004). Acute and chronic effect of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei*, cultured in low salinity brackish water. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35: 315-321.
- Gruber, N. (2008). The Marine Nitrogen cycle: Overview and challenges. En Capone, D.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R. y Carpenter, E.J. (ed.).

Nitrogen in the Marine Environment. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands, 1-50 pp.

Guerrero-Olazarán, E., Cab-Barrera, E.L., Galán-Wong, L.J., Viader-Salvadó, J.M. (2004). Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto-López, M.G., Villareal, D., Scholz, U., González, M. (eds.). Avances en nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México. 16-19 Noviembre, 2004, 245-258 pp.

Gutiérrez-Salazar, G.J., Molina-Garza, Z.J., Hernández-Acosta, M., García-Salas J.A., Mercado-Hernández, R., Galaviz-Silva, L. (2011). Pathogens in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) and their relationship with physicochemical parameters in three different culture systems in Tamaulipas, Mexico, *Aquaculture*, 321: 34–40.

Harris, R.R. y Coley, S. (1991). The effects of nitrite on chloride regulation in the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana (Crustacea, Decapoda). *J. Comp. Physiol.*, 161B: 199-206.

Hopkins, J.S., Sandinifer, P.A., Browdy, C.L. (1995). A review of water management regimes which abate the environmental impacts of shrimp farming: In Browdy, C.L., and Hopkins, J.S., editors. Swimming through water, Proceedings of the special session on shrimp farming, World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 157-166 pp.

Huberman, A. (2000). Shrimp endocrinology: A review. *Aquaculture*, 191: 191-208.

Jensen, F.B. (1996). Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Aquat. Toxicol.*, 34: 95-104.

- Jensen, F.B. (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 135A: 9-24.
- Jiang, D., Lawrence, A.L., Neill, W.H., Gong, H. (2000). Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 253: 193-209.
- Jory, D.E. (1995). Feed management practices for a healthy pond environment. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the special session on shrimp farming. Aquaculture '95*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 118-143 pp.
- Keating, J., Delaney, M., Meehan-Meola, D., Warren, W., Alcivar, A., Alcivar-Warren, A. (2007). Histological findings, cadmium bioaccumulation, and isolation of expressed sequence tags (ests) in cadmium-exposed, specific pathogen-free shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Journal of Shellfish Research*, 26 (4): 1225-1237.
- Kruse, D.N. (1995). Parasites of the commercial shrimp *Penaeus aztecus* Ives, *P. duorarum* Bur-kenroad, and *P. setiferus* (Linnaeus) Tulane stud. *Zool.* 7: 123-144.
- Kuhn, D.D., Drahos, D.D., Marsh, L., Flick-Jr., G.J. (2010). Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 43: 78-82.
- Laramore, S. (2001). Effect of Low Salinity on Growth and Survival of Postlarvae and Juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(4): 385-392.
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., Acuacop. (1997). Haematological and phenoloxidase activity changes in

the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 7: 227-234.

Leavell HR y Clark EG. (1965). Preventive medicine for the doctor in his community. 3a. ed. New York: McGraw-Hill.

Lewis, W.M. y Morris, D.P. (1986). Toxicity of nitrite to fish: a review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115: 183-195.

Lezama-Cervantes, C., Paniagua-Michel, J.J., Zamora-Castro, J. (2010). Biorremediación de los efluentes de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(1): 129-142.

Liebigh, J. (1840). Chemistry and its applications to agriculture and physiology. London: Taylor and Walton.

Lightner, D.V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. (ed.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 p.

Lightner, D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the western hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 110-130.

Lin, S.C., Liou, C.H., Cheng, J.H. (2000). The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 127: 121-129.

Lin, Y., Chen, J. (2001). Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259: 109-119.

- Liu, Y.C., Li, F.H., Wang, B., Zhang, Q.L., Luan, W., Zhang, X.J., Zhang, J.H. (2007). A transglutaminase from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), full-length cDNA cloning, tissue localization and expression profile after challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 576-588.
- Lloyd, R. y Orr, L.D. (1969). The diuretic response by rainbow trout to sublethal concentrations of ammonia. *Water Research*, 3: 335-344.
- Loyless J.C y Malone R.F. (1998). Evaluation of air-lift pump capabilities for water delivery, aeration and degasification for application to recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*. vol. 18, 117-133.
- Lucena, A., Leonardi, G., Pichardo, G., Farci, G. (2006). Sobrevivencia de las larvas de camarón a baja salinidad. *Educare*, 10 (1). ISSN: 1316-6212.
- Magnum, C.P., Silverthorn, S.U., Harris, J.L., Towle, D.W., y Krall, A.R. (1976). The relationship between blood pH, ammonia excretion and adaptation to low salinity in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Zoology*, 195: 129-136.
- Mangum, C.P. (1982). On the relationship between P_{50} and the mode of gas exchange in tropical crustaceans *Pacific Science* 36: 403-410.
- Maningas, M.B.B., Kondo, H., Hirono, I., Saito-Taki, T. y Aoki, T. (2008). Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunology. *Molecular Immunology*, 45: 1269-1275.
- Mantel, L.H. y Bliss, D.E. (1983). *The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and physiological regulation*. Volume 5. Academic Press, New York, 471 p.
- Mantel, L.H. y Farmer, L.L. (1983). Osmotic and ionic regulation. In: Mantel, L.H. (Ed.), *The biology of the Crustacea. Internal Anatomy and Physiological Regulation*, vol. 5. Academic Press, New York, 53-161 pp.

- Mariscal-Lagarda, M.M., Esquer-Méndez, J.L., Páez-Osuna, F. (2010). Shrimp study uses low-salinity groundwater in Sonora, Mexico. *Global Aquaculture Advocate*, 13 (E3): 42-43.
- Mariscal-Lagarda, M.M., Páez-Osuna, F., Esquer-Méndez, J.L., Guerrero-Monroy, I., Romo del Vivar, A., Félix-Gastelum, R. (2012). Integrated cultura of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and tomato (*Lycopersicum esculentum Mill*) with low salinity groundwater: management and production. *Aquaculture* 366: 76-84.
- Mariscal-Lagarda, M.M., Páez-Osuna, F., Esquer-Méndez, J.L., Guerrero-Monroy, I., Romo-Del vivar, A., Brito-Solano, K.Y., López-Pérez, D.N., Alonso-Rodríguez, R. (2014). Water Quality in an integrated culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) – tomato (*Lycopersicon esculentum*) using low salinity groundwater in Sonora, México. *Expl Agric.*, 50 (2): 306-319.
- Martínez.Córdova, L.R., Martínez, M., Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante?. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25: 181-196.
- Martínez-Córdova, L.R., Porchas-Cornejo, M.A., Villareal-Colmenares, H., Calderón-Pérez, J.A., Naranjo-Paramo, J. (1998). Evaluation of three feeding strategies on the cultura of the White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in low water exchange ponds, *Aquacultural Engineering* 17: 21-28.
- Maynard, D.M. (1960). Chapter 5 Circulation and heart function. In *The Physiology of the Crustacea. Vol 1 Metabolism and Growth*, 161-226 pp. Waterman, T.H. (Ed.). Academic Press, New York.

- McGraw, W.J., Davis, D.A., Teichert-Coddington D., Rouse, D.B. (2002). Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. *Journal of World Aquaculture Society*, 33 (1): 78-84.
- McGraw, W.J., Scarpa, J. (2004). Mortality of freshwater acclimated *Litopenaeus vannamei* associated with acclimation rate, habituation period, and ionic challenge, *Aquaculture* 236: 285-296.
- McMahon, B.R. (1995). The physiology of gas exchange, circulation, ion regulation, and nitrogenous excretion: An integrative approach. In *Biology of the Lobster Homarus americanus*, 497-517 pp. Factor, J.R. (Ed.). Academic Press, New York.
- McMahon, B.R. (2001). Control of cardiovascular function and its evolution in Crustacea. *J. Exp. Biol.*, 204: 923-932.
- McMahon, B.R. y Wilkens, J.L. (1983). Ventilation, perfusión and oxygen uptake. In *The Biology of Crustacea 5 Internal Anatomy and Physiological Regulation*, 289-372 pp. Bliss, D.E. (Ed.). Academic Press, New York.
- Meraz-Bautista, Y.N. (2008). Evaluación de la calidad del agua y flujos químicos durante el cultivo semi-intensivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) utilizando agua de pozo con baja salinidad y tasa de recambio cero. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica Mazatlán, 65 p.
- Millero, F. (1996). *Chemical Oceanography*. CRC Press, Boca Raton, Fla. 469 p.

- Miranda, I., Valles, J.L., Sánchez, R., Álvarez, Z. (2010). Cultivo del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en agua dulce, Revista Científica, vol. XX, núm. 4: 339-346.
- Molina, C., Orellana, P. (2001). Efecto de la salinidad y la relación proteína/energía en el rendimiento de *Litopenaeus vannamei*. Panorama acuícola 65, 53-55.
- Molina-Poveda, C., scobar, V., Gamboa-Delgado, J., Cadena, E., Orellana, F., Piña, R. (2002). Estrategia de alimentación de acuerdo a la demanda fisiológica del juvenil *Litopenaeus vannamei* (Boone). En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marine, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México, pp. 98-113.
- Montemayor-Leal, J., Mendoza-Alfaro, R., Aguilera-González, C., Rodríguez-Almaraz, G. (2005). Moléculas sintéticas y extractos animales y vegetales como atractantes alimenticios para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Revista Aquatic, 22: 1-10.
- Morales-Covarrubias, M.S. (2010). Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. 2da Ed. Trillas, CIAD, México, 180 p.
- Morales-Covarrubias, M.S. (2013). Camarón Análisis en Fresco, herramienta de diagnóstico. 1era. edición. CIAD-OIRSA, p.p. 86.
- Morales-Covarrubias, M.S., Ruiz-Luna, A., Moura-Lemus, A.P., Solís Montiel, V.T., Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica, Revista Científica, FCV-LUZ 21 (5): 434 – 446.

- Moreira, S.D., Medeiros, S.S., Pereira, L.L.F., Romano, L.A.; Wasielesky, W., Cupertino, B.E.L. (2011). The use of probiotic during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. *Aquaculture Research*, 1-10 p.
- Moriarity, D.J.W. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151: 333-349.
- Morris, S., Taylor, A.C. (1985). The respiratory response of the intertidal prawn *Palaemon elegans* (Rathke) to hypoxia and hyperoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A: 439-633.
- Moss M.S, Arce M.S., Argue J.B., Otoshi A.C., Calderon O.R.F., Tacon J.G.A., (2001). Greening of the blue revolution: efforts toward environmentally responsible shrimp culture, Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Baton Rouge, USA. 1-19 p.
- Moss, M.S. (2002). Marine shrimp farming in the western hemisphere: Past problems, presents solutions and future visions. *Fisheries Science* 10, 1-20.
- Needham, A.E. (1961). The problem of metahaemocyanin. *Nature (London)* 189: 306-307.
- Norzagaray Campos M., Muñoz Sevilla P., Sánchez Velasco L., Capurro Filograsso L., Llánés Cárdenas O. (2012). Acuicultura: estado actual y retos de la investigación en México, *Revista AquaTIC*, no. 23: 20-25.
- Ogle, J.T., K. Beaugez y J.M. Lotz. (1992). Effect of salinity of survival and growth of postlarval *Penaeus vannamei*, *Gulf Research Report* 8: 415-421.
- Olivas-Valdéz, J.A., J. Cásarez-Martínez. (2003). Observaciones sanitarias de camarones cultivados a baja salinidad, *Boletín de PRONALSA*, 3(23): 6-8.

- Olivas-Valdéz, J.A., Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeómans, R. (2010). Patógenos que afectan el cultivo de *Litopenaeus vannamei* en ambiente marino y dulceacuícola en el estado de Baja California, México. REDVET, Revista electrónica de Veterinaria, 11 (3): 1-25.
- Owens, L., De-Beer, S., Smith, J. (1991). Lymphoidal parvovirus-like particles in Australian penaeid prawns. Diseases of Aquatic Organisms, 11: 129-134.
- Páez-Osuna, F. (2001). Camaronicultura y medio ambiente. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM y El Colegio de Sinaloa, México. 448 p.
- Páez-Osuna, F., Ramírez-Reséndiz, G., Ruíz-Fernández, A.C., Soto-Jiménez, M.F. (2007). La contaminación por Nitrógeno y Fósforo en Sinaloa: Flujos, Fuentes, Efectos y Opciones de Manejo. En: La serie Las lagunas Costeras de Sinaloa. UNAM, El Colegio de Sinaloa. (Páez-Osuna, F., Ed.). México, D.F., 304 pp.
- Páez-Osuna, F., Ruíz Fernandez A.C. (2001). La Calidad del Agua en la Camaronicultura: Conceptos, Manejo y Normatividad en el libro Camaronicultura y Medio Ambiente, (Editor). UNAM y El Colegio de Sinaloa, México. 448 p.
- Páez-Osuna, F., Ruíz Fernandez A.C. (2001). Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones. En el libro Camaronicultura y Medio Ambiente, Páez-Osuna, F. (Ed). UNAM y El Colegio de Sinaloa, México. 448 p.
- Páez-Osuna, F. y Valencia-Castañeda, G. (2013). Cap. 1. Calidad del agua en cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con baja salinidad. En Morales-Covarrubias, M.S. (Ed.). Camaronicultura en agua de baja salinidad, Trillas, México, 9-23 p.

- Panikkar, N.K. (1968). Osmotic behavior of shrimp and prawns in relation to their biology and culture. FAO Fisheries Report 57: 527-538.
- Parsons, T.R., Maita, Y., Lally, C.M. (1984). A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Oxford: Pergamon, 173 p.
- Paschke, K., Cumillaf, J.P., Loyola, S., Gebauer, P., Urbina, M., Chimal, M.E., Pascual, C., Rosas, C. (2010). Effect of dissolved oxygen level on respiratory metabolism, nutritional physiology, and immune condition of southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae). Mar. Biol. 157: 7-18.
- Pérez- Linares, J., Cadena, M., Rangel, C., Unzueta Bustamante, M. L., Ochoa, J. L. (2003). Effect of *Schizothrix calcicola* on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Penaeus vannamei*) postlarvae. Aquaculture. 218: 55-65.
- Pérez-Velázquez, M., González-Félix, M.L., Jaimes-Bustamante, F., Martínez-Córdova, L.R., Trujillo-Villalba, D.A. (2007). Investigation of the effects of salinity and dietary protein level on growth and survival of Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture society, 38 (4): 475-485.
- Pequeux, A. (1995). Osmotic regulation in crustaceans. Journal Crustacean Biology, 15: 1-6.
- Piedrahita, R.H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture 226 (1-4): 35-44.
- Ponce-Palafox, J.T.; González-Salas, R.; Romero-Cruz, O.; Febrero-Toussaint, I.; Arredondo-Figueroa, J.L.; Esparza-Leal, H.; García-Ulloa, G.M. (2005). Enfermedades del camarón de agua dulce *Macrobrachium tenellum* y *M. rosenbergii* durante el cultivo comercial en estanques rústicos, en

empresas rurales. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET 6 (12).
Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.

- Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A., Ross, L.G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157: 107-115.
- Prapaiwong, N. y Boyd, C.E. (2012). Water temperature in inland, low salinity shrimp ponds in Alabama. *Journal of Applied Aquaculture*, 24(4): 334-341.
- Puello-Cruz, A.C. (2013). Nutrición en cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con baja salinidad. En Morales-Covarrubias, M.A. (Ed.). *Camaronicultura en agua de baja salinidad*, Trillas, México, 24-40 p.
- Racotta, I.S. y Hernández-Herrera, R. (2000). Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 125: 437-443.
- Rakocy, J.E., Losordo, T.M., Masser M.P. (1992). Recirculating aquaculture tank production systems: integrating fish and plant culture, Southern Regional Aquaculture Center, nº 452, pp.1-6.
- Raven, J.A. (1984). A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. *New Phytol.* 98: 593-625.
- Re, D., Díaz, F., Sierra, E., Gómez-Jiménez, S. (2004). Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity. *Ciencias Marinas*, 30: 443-453.
- Redfield, A.C. (1958). The biological control of chemical factor in the environment. *American Scientist*, 46: 205-222.

- Regnault, M. (1987). Nitrogen excretion in marine and fresh –water crustacean. *Biological Review* 62: 1-24.
- Reid, B., Arnold, C.R. (1992). The intensive culture of the penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone in a recirculating raceway system. *Journal of the World Aquaculture Society* 23: 146-153.
- Riegel, J.A. y Cook, M.A. (1975). Recent studies of excretion in Crustacea. In: Wessing, A. (Ed.), *Excretion. Fortschritte der Zoogie* 23. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany, 48-74 pp.
- Robles, C. (1997). Alteraciones fisiológicas de postlarvas y juveniles del camarón blanco *Penaeus setiferus* (Crustacea: Decápoda) por efecto del amoníaco. Tesis de grado en Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Rodríguez, Jenny. (2013). Capítulo 3: Inmunología del camarón en sistemas de cultivo. Manejo de situaciones de estrés. En *Camaronicultura en agua de baja salinidad*; Morales-Covarrubias, M.S. (Ed.), México, 136 p.
- Romano, L.A. y F. Cueva. (1988). Lesiones histológicas branquiales atribuibles a tóxicos en *Odonthestes bonariensis* (Cul. Y Val., 1835). *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* 19 (2): 135-142.
- Romano, N. y Zeng, C. (2007). Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated histological gill alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, 266: 246-254.
- Romano, N. y Zeng, C. (2013). Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapods crustaceans: a review on factors influencing in their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1): 1-21.

- Rosales-Ortega, R. (2012). Triada epidemiológica. Mesa de epidemiología XLVII Congreso Nacional AMVEC 2012. <http://www.engormix.com/MA-porcicultura/sanidad/articulos/mesa-epidemiologia-triada-epidemiologica-t4358/165-p0.htm>
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., Wormhoudt, A.W. (2002). An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268: 47-67.
- Roy, L., A. Davis. (2010). Requirements for the culture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters: water modification and nutritional strategies for improving production. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola X- Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de noviembre, San Nicolás de los Garza, N.L., México. ISBN en trámite. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 61-78 pp.
- Roy, L., Davis, D.A., Saound, I.P., Henry, R.P. (2007). Effects of varying levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth and respiration of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture*, 262: 461-469.
- Roy, L.A., Davis, D.A., Whitis, G.N. (2009). Pond-to-pond variability in post-larval shrimp, *Litopenaeus vannamei*, survival and growth in inland low-salinity waters of west Alabama. *Aquaculture Research*, 40: 1823-1829.
- Rusaini y Owens, L. (2010). Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 29: 367-377.

- Russo, R.C. (1985). Ammonia, nitrate and nitrite. Pages 455-557 in G.M. Randall, and S.R. Petrocelli, editors. Fundamentals of aquatic toxicology, Hemisphere, Washington, USA.
- Sakamoto, T., Van Phung, C., Cotera, A., Duy, K., Nguyen, N. y M. Yokozawa. (2009). Analysis of rapid expansion of inland aquaculture and triple rice-cropping areas in a coastal area of the Vietnamese mekong delta using MODIS time-series imagery, Landscape and Urban Planning, 92: 34-46.
- Salas, H.G. (2003). Crecimiento y sobrevivencia del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) a diferentes salinidades. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias del Mar, UAS, México.
- Samocha, T.M., Lawrence, A.L., Collins, C.R., Emberson, C.R., Harvin, J.L., Van Wyk, P.M. (2001). Development of integrated, environmentally sound, inland shrimp production technologies. Pages 64-75 in C.L. Browdy and D.E. Jory (Eds.). The new wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming Aquaculture, 2001. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Samocha, T.M. Lawrence, A.L., Collins, C.A., Castille, F.L., Bray, W.A., Davies, C.J., Lee, P.G., Wood, G.F. (2004). Production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in high density greenhouse enclosed raceways using low salinity groundwater. Journal of Applied Aquaculture 15: 1-19.
- Samocha, T.M., Lawrence, A.L., Pooser, D. (1998). Growth and survival of juvenile *Litopenaeus vannamei* in low salinity water in a semi-closed recirculating system, The Israeli Journal of Aquaculture 50: 55-59.
- Sans-Fonfría, R. y Ribas, J.P. (1989). Ingeniería ambiental: contaminación y tratamientos. Productica Series, Marcombo, 148 pp.

- Saoud, I., Davis, A., Rouse, D. (2003). Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture*, 217: 373-383.
- Sarathi, M., Ahmed, V.P.I., Venkatesan, C, Balasubramanian, G., Prabavathy, J., Hameed, A.S.S. (2007). Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 271 (1-4): 8-20.
- Saunier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy, and D. Ansquer. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191: 133-144.
- Scott, G. y Crunkilton, R.L. (2000). Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia* y *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2918-2922.
- Selye, H. (1973). Homeostasis and heterostasis. *Perspect. Biol. Med.*, 16: 1-5.
- Shahidi, F. (1992). Prevention of lipid oxidation in muscle foods by nitrite and nitrite-free compositions. In *Lipid Oxidation in Food*. Edited by A.G. St. Angelo. ACS Symposium Series 222. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 161-182.
- Shuler, D.J., Boardman, G.D., Kuhn, D.D., Flick, G.J. (2010). Acute toxicity of ammonia and nitrite to pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. *Journal of the World Aquaculture society*, 41(3): 438-446.
- Smith, D.M., Burford, M.A., Tabrett, S.J., Irvin, S.J., Ward, L. (2002). The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 207: 125-136.
- Sowers, A.D., Tomasso, J.R. (2006). Production Characteristics of *Litopenaeus vannamei* in Low-salinity water augmented with mixed salts. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(2): 214-217.

- Sritunyalucksana, K. y Söderhäll, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191: 53-69.
- Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. e Ingraham, J.L. (1976). *General Microbiology*. Macmillan, London, 871 pp.
- Stewart, N.T., Boardman, G.D., Helfrich, L.A. (2006). Characterization of nutrient leaching rates from settled rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) sludge. *Aquacult. Eng.*, 35: 166-178.
- Talavera, V., Zapata, L.M., Sánchez, D. (1998a). Influencia de la temperatura en los camarones. *Boletín Nicovita* 3 (2). Disponible en www.nicovita.com.pe
- Talavera, V., Zapata, L.M., Sánchez, D. (1998b). Enteritis hemocítica en camarones cultivados. *Boletín Nicovita* 3 (2). Disponible en www.nicovita.com.pe
- Tahon, J.P., Van Hoof, D., Vinckier, C., Witters, R., De Ley, M., Lontie, R. (1988). The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *Biochem. J.*, 249: 891-896.
- Thoman, E.S., E.D. Ingall, D.A. Davis & C.R. Arnold. (2001). A nitrogen budget for a closed, recirculating mariculture system. *Aquacult. Eng.*, 24: 195-211.
- Tomasso, J.R., Simco, B.A., Davis, K.B. (1979). Chloride inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Fish. Res. Board. Can.*, 36: 1141-1144.
- Travis, D.F. (1955). The molting cycle of the spiny lobster *Panulirus argus* Latreille. II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol. Bull.*, 108: 88-112.

- Travis, D.F. (1957). The molting cycle of the spiny lobster *Panulirus argus* Latreille. IV. Post-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol. Bull.*, 113: 451-479.
- Trece, G.D., Hamper, L. (2000). Achieving environmentally friendly shrimp farming in Texas, USA. *World Aquaculture*, 31(2): 49-54.
- Tsing, A., Arcier, J.M., Brehelin, M. (1989). Haemocytes of penaeids and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.*, 53: 64-77.
- Tucker, C.S., Boyd, C.E. (1985). Water quality. In water quality (Channel catfish culture ponds), ed. C.S. Tucker, pp. 135-227. *Developments in aquaculture and fisheries science*, Elsevier, Netherlands.
- UNESCO. (1979). Ninth report of the joint panel on oceanographic tables and standards. *Unesco technical papers in marine science*, París, 30: 33 p.
- Uribarren-Berrueta, T. (2013). TREMATODOS. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trematodos.html>
- Valenzuela-Quñonez, W., G. Rodríguez y H. Esparza. (2010). Cultivo intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (BOONE) en agua de pozo de baja salinidad como alternativa acuícola para zonas de alta marginación. *Ra Ximbai* 6(1): 1-8.
- Valdéz, G., Díaz, F., Re, A.D., Sierra, E. (2008). Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica* 18.

- Vargas-Albores, F. y Ochoa, J.L. (1992). Variation of pH, osmolality, sodium and potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 102: 1-5.
- Van Wyk, P., Scarpa, J., (1999). Water quality requirements and management, Florida Department of Agriculture and Consumer Services (eds.), USA, pp. 141-161.
- Villalon, J. (1991). Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp, p. 104.
- Wang, J.K, (2003). Conceptual design of a microalgae-based recirculating oyster and shrimp system. *Aquacultural Engineering* 28: 37-46.
- Wright, P.A. (1995). Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*, 198: 273-281.
- Wuditsin, I., Boyd, C.E. (2011). Possible potassium and magnesium limitations for shrimp survival and production in low-salinity pond waters in Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42: 766-777.
- Wyban, J., Sweeney, J.N. (1991). Intensive shrimp production technology. High Health Aquaculture Inc., Hawaii, 158 pp.
- Wyban, J., W.A. Walsh, and D.M. Godin. (1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 138: 267-279.
- Zar, J.H.(1984). *Biostatistical Analysis*. 2d. Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 718 p.
- Zarain-Herzberg, M. (2003). Estrategias y acciones en materia de infraestructura y tecnología en acuicultura: El caso del cultivo del

camarón. Boletín Programa Nacional de Sanidad Acuícola y Red de Diagnóstico. 3(23):1-5.

Zarain-Herzberg, M. y F. Asencio. (2001). Taura syndrome in México: Follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*. 193:1-9 p.

Zendejas, H. J., (1999). Manual para la alimentación y manejo del camarón, Purina, S.A de C.V., México, D.F., 20 p.

11. ANEXOS

ANEXO I. Determinación de clorofila *a*

La determinación de clorofila *a* descrito por Parsons *et al.* (1984) es la siguiente:

Soluciones y materiales:

-Filtros GF/F

-Acetona al 90% (99.5%)

Procedimiento:

1. Se pasa la muestra de agua a través de filtros GF/F.
2. El filtro se coloca en un tubo de ensayo y se le agregan 5 ml de acetona al 90%.
3. El filtro es exprimido contra las paredes del recipiente utilizando una vara con punta de teflón y un taladro rodillo.
4. La solución final es vaciada a un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 ml, el tubo se enjuaga con 2 ml más de acetona al 90% la solución restante se agrega al tubo de centrifuga.
5. Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos con la finalidad de aislar los residuos del filtro.
6. De la solución final se toma una alícuota de 3 ml y se vacían en una celda.
7. Se lee en el espectrofotómetro uv-visible a una longitud de onda de 750 nm (blanco).
8. También se realizan las lecturas a 664, 647 y 630 nm. A cada una de estas lecturas se les realiza la corrección del blanco y los resultados se denotan con E_{664} , E_{647} y E_{630} .

9. Para calcular la cantidad de pigmento en la muestra se utiliza la siguiente ecuación:

$$Cl\ a \left(\frac{mg}{m^3} \right) = \frac{C (v)}{V} \quad y,$$

$$C = 11.85 E_{664} - 1.54 E_{647} - 0.08 E_{630}$$

donde: C = concentración de clorofila a en $\mu\text{g/ml}$
E = absorbancia a diferentes longitudes de onda
v = volumen de acetona en ml
V = volumen de agua en litros

ANEXO II. Determinación de análisis en fresco

La siguiente metodología para la determinación de análisis en fresco fue tomado de Morales-Covarrubias (2010).

Materiales

- Microscopio compuesto con objetivos de 4x, 10x, 40x, 60x y 100x
- Bata blanca de laboratorio
- Solución salina estéril
- Goteros
- Agua corriente
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Cajas petri
- Estuche de disección
- Guantes látex

Procedimiento

1. Los organismos se pesan y se miden para obtener el peso y tamaño promedio.
2. Se realiza una inspección de los organismos para detectar cambios en su coloración blanca normal translúcida a las siguientes coloraciones: coloración amarillenta, opacidad muscular, transparencia, coloración rojiza, melanización y necrosis, así como también se pueden observar edemas, cutícula delgada o suave, y deformaciones en el rostrum y en el abdomen.
3. Disectar el organismo y se selecciona una pequeña porción de cada tejido u órgano. Las porciones se colocan en porta objetos limpios. Se toma una

muestra de urópodos, se deposita en el porta objetos con una gota de solución salina para detectar el estadio de muda.

4. Al tomar la porción de tejido u órgano, se les adicionan unas gotas de agua de mar estéril y se pone el cubreobjetos; debe procurarse que en la muestra no se formen burbujas que puedan interferir. Las muestras de tejido que se tomaron son:

a. *Región oral*. Con las tijeras finas, se toma una pequeña porción y se coloca en un porta objetos luego se vierten una gotas de agua de mar y se presiona ligeramente al poner el cubreobjetos y facilitar la búsqueda de bacterias filamentosas y detritus del fondo de los estanques.

b. *Branquias*. Con las tijeras finas, se elimina el exoesqueleto que cubre las branquias. Se toma una pequeña porción y se coloca en el portaobjetos para buscar: cambios en la coloración de los filamentos branquiales (melanización, necrosis, áreas blanquecinas bien definidas), presencia de protozoarios (*Zoothamnium sp*, *Epistylis sp*, *Acineta*, *Ascophris*, *Bodo sp*), bacterias filamentosas (*Leucothrix mucor* y *Flexibacter sp*), detritus del fondo de los estanques, restos de microalgas, hongos, aglomerados de bacterias, melanizaciones y deformaciones. Para detectar cuerpos de inclusión viral en branquias por improntas, es necesario fijarlas en solución Davidson modificada (AFA, alcohol-formaldehído-ácido clorhídrico) si van a ser procesadas de manera inmediata; si este no es el caso, se pueden fijar en la solución Davidson (AFA, alcohol-formaldehído-ácido clorhídrico), que se utiliza para fijar a los organismos para histología.

- c. *Hepatopáncreas*. Se elimina todo el exoesqueleto del cefalotórax para descubrir el hepatopáncreas y el estómago. Se observa la coloración, el tamaño del hepatopáncreas para decidir si hay atrofia (reducción de tamaño) o hipertrofia (aumento del tamaño) del órgano. Con unas pinzas se retira la membrana que cubre el hepatopáncreas y con un bisturí se parte por la mitad para observar la coloración del fluido, textura, melanización y necrosis tubular. Se toma una pequeña muestra y se coloca en un portaobjetos para buscar: *Baculovirus penaei*, *Monodon baculovirus*, gregarinas (en todos sus estadios), cúmulos de bacterias, deformación tubular, nódulos hemocíticos, encapsulación, melanización y necrosis de los túbulos. También debe observarse la cantidad de lípidos presentes, desprendimiento del epitelio de los túbulos del hepatopáncreas y acumulación dentro de vacuolas citoplasmáticas de los hepatocitos de una sustancia de color verde oscuro. Para la realización de improntas e histología es necesario fijar los órganos y tejidos conforme al diagnóstico elegido.
- d. *Intestino*. El abdomen se separa del cefalotórax, del telson y de los urópodos para facilitar la extracción del intestino. Por la parte posterior se localiza el intestino, que puede contener o no hilo fecal); con ayuda de una pinza fina, se extrae con cuidado y se coloca en el portaobjetos, procurando extenderlo. Luego se vierten unas gotas de agua de mar y se presionar ligeramente al poner el cubreobjetos. AL observar la muestra en el microscopio, se tienen que buscar gregarinas, inflamación, nematodos, cuerpos de oclusión de *Monodon baculovirus* y *Baculovirus penaei*.

- e. *Músculo y gónadas*. Se toma un apequeña muestra de músculo y de las gónadas. Se coloca en un portaobjetos y se presiona para facilitar la búsqueda de microsporidios. Si estos tejidos fueron parasitados, se deben de observar las masas de esporas que de acuerdo con su tamaño y forma indican el tipo de parásito que lo está afectando. También en músculo se debe de hacer un corte transversal y ponerlo entre dos portaobjetos y observar a 4X para buscar larvas de helmintos y nematodos anisáquidos (hacen zoonosis en humanos).
5. Las muestras ya preparadas se analizan en el microscopio, iniciando con el objetivo de menor aumento y finalizando con el mayor. Debido a su rápida descomposición, la primera muestra que se analiza es la del hepatopáncreas; después se estudian las de las branquias, región oral, luego el intestino y finalmente el músculo.

ANEXO III. Determinación de análisis histológico

La determinación del análisis histológico que se muestra a continuación fue tomado de Bell y Lightner (1988) y Morales-Covarrubias (2010).

Materiales:

- Microscopio compuesto con objetivos de 4x, 10x, 40x, 60x y 100x.
- Navajas de disección
- Pinzas de disección
- Tabla de disección
- Pizetas
- Guantes
- Resina
- Jeringas desechables (1 mL, 3 mL y 5 mL)
- Hematoxilina
- Eosina Y
- Solución de Davidson (AFA, alcohol-formaldehído-ácido acético)
- Solución de Davidson modificada (AFA, alcohol-formaldehído-ácido clorhídrico)
- Etanol absoluto
- Etanol 70%
- Xileno
- Contenedores para muestras

Soluciones:

Solución Davidson: 330 mL de alcohol etílico al 95%, 220 mL de formaldehído al 37-39%, 115 mL de ácido acético glacial y 335 mL de agua destilada. La solución se almacena a una temperatura $\leq 25^{\circ}\text{C}$.

Solución de hematoxilina-eosina de Mayer-Bennet: 1000 mL de agua destilada caliente, 1 g de hematoxilina, 0.2 g de yodato de sodio, 90 g de alumbre de aluminio y potasio, 1 g de ácido cítrico y 50 g de hidrato de cloral.

Solución de eosina-floxina: 100 mL de solución stock de eosina (solución acuosa de eosina “Y” al 1%), 10 mL de solución stock de floxina (solución acuosa de floxina B al 1%), 780 mL de alcohol etílico al 96% y 4 mL de ácido acético.

Procedimiento

Selección de la muestra

1. Se toman organismos con características externas de camarón sano y enfermo con o sin mortandad registrada ya sea por un muestreo aleatorio o no aleatorio.

Fijación de los organismos

2. En la fijación de muestras debe de tomarse en cuenta el estadio de los organismos, ya que de éste depende el tiempo en que permanece en la solución fijadora. Para lograr una buena fijación de los organismos, se debe de considerar que la cutícula es una barrera que impide la penetración del fijador; por tanto, es necesario inyectar las muestras de postlarvas en adelante, ya que la simple inmersión en la solución fijadora provocaría una mala fijación. La solución fijadora para preservar los tejidos de los organismos es la de Davidson (alcohol-formaldehído-ácido acético). El volumen de la solución fijadora debe de ser 10 veces el volumen del organismo por fijar. Debe de inyectarse todo el organismo, en especial el hepatopáncreas y más adelante se realizará un corte con tijeras en la parte ventral, que inicie en el sexto segmento abdominal y que termine cerca del pedúnculo ocular. También se realizarán cortes en la región del cefalotórax para una mejor penetración del fijador.

3. La muestra se sumerge en el resto de la solución fijadora y se mantendrá allí durante un tiempo, que dependerá del estadio de vida del organismo. Después de este tiempo transcurrido, se desecha la solución fijadora y se enjuaga con agua destilada.

4. Se adiciona a la muestra alcohol etílico al 70% donde permanece por un tiempo indefinido.

Embebido en parafina

5. Se sacan las muestras del alcohol al 70% y se ponen sobre una superficie limpia para realizar la disección. Mediante un solo corte de navaja se separa el cefalotórax y el abdomen.

6. Cortar longitudinalmente el cefalotórax para obtener dos disecciones, cortar y desechar los pleópodos y pereiópodos de la muestra si no van a ser estudiados.

7. De la primera sección, se toma una porción de las branquias retirando la cutícula y haciendo un corte de 8 mm de grosor, para depositarlas en el contenedor de deshidratación.

8. Efectuar un corte ventral longitudinal del abdomen, y poner en el contenedor ambos segmentos (cefalotórax y abdomen); luego se realiza un corte transversal para obtener el sexto segmento abdominal y colocarlo en el recipiente de deshidratación.

9. Las muestras son deshidratadas y bañadas en parafina de la siguiente manera:

- a. Dos baños separados (de 1h cada uno) de alcohol etílico al 70%.
- b. Dos baños separados (de 1h cada uno) de alcohol etílico al 80%.
- c. Dos baños separados (de 1h cada uno) de alcohol etílico al 96%.

- d. Dos baños separados (de 1h cada uno) de alcohol etílico absoluto.
 - e. Dos baños separados (de 1h cada uno) de xileno.
 - f. Dos baños separados (de 1h cada uno) de parafina.
10. Para el embebido de parafina, las muestras se colocan en moldes para formar los bloques, con la ayuda de un centro de embebido o de forma manual.
11. Los bloques son expuestos a 1 hr en solución descalcificadora para después ser cortados con un microtomo a 5 μm para su posterior tinción.
12. La tinción utilizada para muestras de camarón es la hematoxilina-eosina/floxina de Mayer-Bennet, la cual consta de:
- a. Dos baños separados de xileno (de 5 minutos cada uno)
 - b. Dos baños separados de etanol absoluto (de 10 inmersiones cada uno)
 - c. Dos baños separados de etanol al 95% (de 10 inmersiones cada uno)
 - d. Dos baños separados de etanol al 80% (de 10 inmersiones cada uno)
 - e. Dos baños separados de etanol al 50% (de 10 inmersiones cada uno)
 - f. Seis enjuagues con agua destilada
 - g. Sumergir las muestras de 4 a 6 minutos en hematoxilina-eosina de Mayer-Bennet.
 - h. Sumergir las muestras de 4 a 6 minutos en un recipiente con agua que tenga flujo continuo.
 - i. Sumergir las muestras por 2 minutos en eosina-floxina
 - j. Dos baños separados de etanol al 95% (de 10 inmersiones cada uno)
 - k. Dos baños separados de etanol absoluto (de 10 inmersiones cada uno)

- l. Cuatro baños separados de xileno (de 10 inmersiones cada uno).
- m. Montar con resina sintética.
- n. Etiquetar para su diagnóstico posterior.

13. Observación e interpretación

