



# UNIVERSIDAD DE SONORA

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

POSGRADO EN BIOCENCIAS

---

**EFFECTO DE ALIMENTOS CON DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE HARINA DE PESCADO SOBRE  
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y  
COMPOSICIÓN DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus  
vannamei*) Y DE LOS BIOFLÓCULOS EN CULTIVO A  
BAJA SALINIDAD.**

**TESIS**

que para obtener el grado de:

**DOCTORA EN BIOCENCIAS**

presenta:

**ANGÉLICA MORENO ARIAS**

Hermosillo, Sonora, México

Febrero de 2017

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

## **DERECHOS DE AUTOR**

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Doctora en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

---

**Angélica Moreno Arias**

Autor

---

**Dra. Nohemí Gámez Meza**

Coordinadora del Programa de Doctorado en Biociencias

EFECTO DE ALIMENTOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HARINA DE  
PESCADO SOBRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y COMPOSICIÓN DEL  
CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) Y DE LOS BIOFLÓCULOS EN CULTIVO  
A BAJA SALINIDAD.

T E S I S

que para obtener el grado de:

DOCTORA EN BIOCENCIAS

presenta:

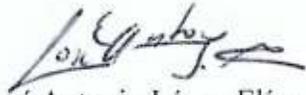
ANGÉLICA MORENO ARIAS

Hermosillo, Sonora, México.

Febrero del 2017

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis intitulada “EFECTO DE ALIMENTOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HARINA DE PESCADO SOBRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y COMPOSICIÓN DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) Y DE LOS BIOFLÓCULOS EN CULTIVO A BAJA SALINIDAD”, presentada por Angélica Moreno Arias, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de doctor en Biociencias.



Dr. José Antonio López Elías

Director de tesis



Dr. Anselmo Miranda Baeza

Co-director de tesis



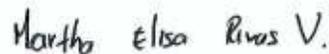
Dr. Luis Rafael Martínez Córdova

Sinodal secretario



Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez

Sinodal



Dra. Martha Elisa Rivas Vega

Sinodal

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi familia, especialmente a mis padres por estar a mi lado durante mi trayecto estudiantil, les agradezco de corazón su confianza y apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Sonora, particularmente al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) por el apoyo que la institución me brindó como estudiante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo que me brindó a través de la beca para estudiante.

A la Universidad Estatal de Sonora (UES), especialmente al laboratorio de investigación y de nutrición de la Unidad Navojoa por permitirme el acceso a sus instalaciones. A los técnicos Jesús Alberto Lizárraga Armenta y Ernestina Santana por su asesoría durante mi estancia.

Al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD) principalmente al Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros. Agradezco a las Maestras María Gisela Carvallo Ruiz, Guillermina García Sánchez y María Elena Lugo Sánchez por el conocimiento que compartieron conmigo siempre con una excelente actitud.

A los miembros del comité de tesis Dr. José Antonio López Elías, Dr. Anselmo Miranda Baeza, Dr. Luis Rafael Martínez Córdova, Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez y Dra. Martha Elisa Rivas Vega, por mostrarse siempre en la mejor disposición para sacar adelante este proyecto y mejorarlo con cada sugerencia.

A la coordinadora del posgrado en Biociencias Dra. Nohemí Gámez Meza y a la M.C. Dolores Vásquez del Castillo, quienes facilitaron cada paso en este posgrado.

A mis compañeros del DICTUS Perla Urquidez Bejarano, Diana Fimbres Olivarría, Diana Medina Félix, Ana Lucía Gómez Ramírez, Emmanuel Villanueva, Iván González y Jesús Encinas por crear un ambiente de trabajo inigualable.

A mis compañeros de la UES muchas gracias por hacerme sentir en casa e invitarme a formar parte de su gran equipo de trabajo. Gracias Jesús Alberto Lizárraga Armenta, José Alberto

Huerta Rábago, Alfredo Félix Muñoz, Eden Gabriel Miranda Servín, Edgar Castro Carlon y Estrella Lara Camacho.

A mis compañeros del CIAD por recibirme en su laboratorio y asesorarme en el uso de equipos y materiales Hugo Enrique Ramírez Guerra, Andrés Álvarez Armenta, Luis Eduardo Mora Cota y Rey David Vargas.

A Martín Rodrigo Acedo Valdez por ser fuente de inspiración y fortaleza. Gracias por apoyarme incondicionalmente durante estos años.

## RESUMEN

En la actualidad se ha implementado el uso de bioflóculos y la alimentación a base de harinas vegetales en sustitución de harina de pescado en cultivos de camarón. Se trabajó con un cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) en estadio de postlarva y juvenil en baja salinidad (5‰) en el cual se produjeron bioflóculos mediante la manipulación de la razón C:N, para evaluar el efecto de cuatro alimentos experimentales (0, 10, 20 y 30% de harina de pescado) y un alimento comercial (control), sobre calidad del agua, crecimiento, comunidad bacteriana, actividad enzimática digestiva, composición proximal y perfiles de ácidos grasos y aminoácidos del camarón y bioflóculos. El desarrollo de bioflóculos contribuyó a mantener buena calidad del agua en todos los tratamientos. Algunos cambios significativos ( $p < 0.05$ ) ocurrieron durante el cultivo, siendo más evidentes aquellos relacionados con compuestos nitrogenados, SST y clorofila-a, así como en la comunidad bacteriana, la cual tuvo un incremento de microorganismos benéficos (6.01 a 7.91 y 6.65 a 8.23 Log UFC/mL) y disminución de *Vibrio* (3.44 a 1.54 UFC/mL). En cuanto a actividad enzimática digestiva, se observaron valores más altos en los sistemas con bioflóculos comparado con sistema de agua clara. Los ácidos grasos y aminoácidos esenciales estuvieron presentes en ambas fuentes de alimento (formulado y bioflóculos); la proporción de estos nutrientes en bioflóculos y camarón fueron independientes del alimento, mientras que la relación n-3/n-6 fue diferente entre alimentos y bioflóculos; en tanto que las muestras de camarón no tuvieron diferencias. En conclusión, el cultivo de postlarvas y juveniles de camarón a baja salinidad en sistemas con bioflóculos, utilizando dietas con menor contenido de harina de pescado, puede ser exitoso, ya que no se observaron diferencias en crecimiento y supervivencia. Los bioflóculos pueden contribuir a mejorar la calidad del agua, proveer alimento de alta calidad y nutrientes esenciales en estos sistemas.

## ABSTRACT

In recent years, biofloc technology and fishmeal substitution in feed have been implemented in aquaculture. A shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae and juvenile culture under low-salinity (5‰) conditions in which bioflocs were produced by manipulation of C:N ratio, was experimentally evaluated to assess the effect of four experimental feeds (with 0, 10, 20 and 30% of fishmeal, substituted by vegetable meal mix) and a commercial feed as control, on the water quality, growth performance, bacterial community, digestive enzymatic activity, proximate composition, fatty acid and amino acid profile of shrimp and biofloc. The development of biofloc contributed to maintain good water quality in all the treatments. Some significant changes ( $p < 0.05$ ) occurred over the culture age ( $p < 0.05$ ), the most evident related to nitrogen compounds, TSS and chlorophyll-a, as well as bacterial community with the increase of heterotrophic and nitrifying bacteria (from 6.01 to 7.91 and from 7.65 to 8.23 Log CFU/mL) and the decrease of *Vibrio* (from 3.44 to 1.54 CFU/mL). Regarding digestive enzymatic activities, it was shown greater values in the biofloc system compared with clear water system. Essential fatty acids and amino acids were found in the two feed sources (experimental feed and biofloc) with variations, nevertheless the proportion of these nutrients in biofloc and shrimp were independent of the composition of the experimental feed. Different n-3/n-6 ratios were found in feed and biofloc among treatments, nevertheless these variations were not observed in the shrimp tissue samples. In conclusion, low-salinity shrimp nursery and culture can be successfully developed with minimum inclusion of fishmeal in feeds when bioflocs are produced, without significant effect on growth response and survival. Biofloc can maintain good water quality, and provide high quality feed and essential nutrients in these systems.

## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
<b>APROBACIÓN</b> .....	ii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I. ANTECEDENTES</b> .....	3
I.1. Situación actual del cultivo de camarón en sistemas con bioflóculos ..	3
I.2. Formación de los bioflóculos y sus características biológicas .....	4
I.3. Aprovechamiento de los bioflóculos como alimento y suplemento alimenticio .....	5
I.4. Sustitución de harina de pescado en alimento para camarón .....	8
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	10
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	11
II.1. General .....	11
II.2. Particulares .....	11
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
IV.1. Formulación y elaboración de los alimentos experimentales .....	12
IV.2. Cultivo experimental .....	12
IV.3. Parámetros de calidad del agua .....	15
IV.4. Indicadores de crecimiento y supervivencia .....	16
IV.5. Carga bacteriana del agua de cultivo .....	16
IV.6. Determinación de actividad enzimática digestiva .....	17
IV.7. Composición química proximal .....	18

	PÁGINA
IV.8. Perfil de aminoácidos .....	19
IV.9. Perfil de ácidos grasos .....	20
IV.10. Análisis estadístico .....	21
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
V.1. Parámetros de calidad del agua .....	23
V.1.1. Calidad del agua en el bioensayo con postlarvas .....	23
V.1.2. Calidad del agua en el bioensayo con juveniles .....	27
V.2. Aclimatación y parámetros productivos .....	29
V.2.1. Aclimatación de las postlarvas .....	29
V.2.2. Parámetros productivos en el bioensayo con postlarvas .....	30
V.2.3. Parámetros productivos en el bioensayo con juveniles .....	32
V.3. Carga bacteriana del agua de cultivo .....	34
V.4. Determinación de actividad enzimática digestiva .....	36
V.5. Composición química proximal .....	38
V.6. Perfil de aminoácidos .....	42
V.7. Perfil de ácidos grasos .....	49
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Concentración de NAT, N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> en el agua durante el cultivo de postlarvas de <i>L. vannamei</i> . 0, 10, 20, 30 y C, corresponden a los tratamientos con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado; C corresponde al alimento comercial.	26
2	Crecimiento semanal de las postlarvas de <i>L. vannamei</i> durante el cultivo experimental. C, 0, 10, 20, y 30, corresponden a los tratamientos: al alimento comercial (C) y experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado.	31

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Formulación de alimentos experimentales. Los tratamientos 30, 20, 10 y 0, contienen 30, 20, 10 y 0% de harina de pescado, respectivamente.	13
2	Protocolo de aclimatación de <i>L. vannamei</i> a baja salinidad (5%).	13
3	Parámetros de calidad del agua durante los 28 días de cultivo de postlarvas de <i>L. vannamei</i> (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). Los valores son media ( $\pm$ DE).	24
4	Parámetros de calidad del agua el primer día del experimento de juveniles de <i>L. vannamei</i> (día 1). Media ( $\pm$ DE) con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 = alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente).	28
5	Parámetros de calidad del agua el último día del experimento de juveniles de <i>L. vannamei</i> (día 35). Media ( $\pm$ DE) con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 = alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente).	29
6	Supervivencia y crecimiento obtenidos al finalizar el cultivo de postlarvas de <i>L. vannamei</i> (día 28) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ).	31
7	Parámetros productivos de los juveniles de <i>L. vannamei</i> cultivados durante 35 días (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias $\pm$ DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).	33
8	Densidad (Log UFC/mL) de bacterias en agua de cultivo al inicio (día 1) y al final (día 35) del experimento con juveniles de <i>L. vannamei</i> (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 and 30% de harina de pescado, respectivamente). Sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). Los valores son medias $\pm$ DE de las determinaciones.	35
9	Actividad enzimática digestiva (abs/min/mg proteína) del hepatopáncreas de las postlarvas de <i>L. vannamei</i> cultivadas durante 28 días (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos	36

experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente) y un sistema de recirculación con agua clara como control (tratamiento R). Diferentes letras en la misma fila son diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores son media ( $\pm$  DE).

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 10 | Composición proximal (base seca) de los bioflóculos al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias $\pm$ DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).                                | 39 |
| 11 | Composición proximal (base seca) del músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> al final (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias $\pm$ DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).                    | 40 |
| 12 | Aminoácidos totales en alimento para camarón (g/100g muestra) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias $\pm$ DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).  | 43 |
| 13 | Aminoácidos totales en bioflóculos (g/100g muestra) al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias $\pm$ DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).                                | 44 |
| 14 | Aminoácidos totales en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> (g/100g muestra) al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias $\pm$ DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). | 47 |
| 15 | Razón de aminoácidos esenciales (A/E) e índice de aminoácidos esenciales (IAAE) en alimento para camarón (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente).  | 48 |
| 16 | Razón de aminoácidos esenciales (A/E) e índice de aminoácidos esenciales (IAAE) en bioflóculos al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente).  | 48 |

- 17 Ácidos grasos (como % lípidos) en el alimento para camarón (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). 51
- 18 Ácidos grasos (como % lípidos) en los bioflóculos al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). 53
- 19 Ácidos grasos (como % lípidos) en músculo de juveniles de *L. vannamei* de camarón al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). 54

## INTRODUCCIÓN

En los últimos seis años, la camaronicultura mexicana ha disminuido notoriamente su producción, de 130,000 toneladas en 2008 a 86,000 toneladas en 2014 (FAO, 2016), debiéndose principalmente a las numerosas enfermedades que afectan a los organismos, algunas de ellas como consecuencia de las malas prácticas de cultivo. Actualmente se están desarrollando nuevas tecnologías con un enfoque sustentable y bioseguro. Los sistemas cerrados o con mínimo recambio de agua presentan una opción prometedora para el cultivo de camarón. Estos sistemas además de mejorar el aprovechamiento de recursos como agua, terreno y alimento, incrementan la bioseguridad y mejoran significativamente la producción final (Crab *et al.*, 2012).

Una de las tecnologías desarrolladas en estos últimos años es aquella que incluye el uso de los bioflóculos en los sistemas de producción de camarón y tilapia (De Schryver *et al.*, 2008). El desarrollo de bioflóculos en los sistemas de mínimo o cero recambios mantiene el equilibrio de compuestos nitrogenados tóxicos a la vez que promueven el crecimiento de microorganismos con propiedades benéficas para el camarón. La investigación del cultivo de organismos acuáticos en sistemas con bioflóculos se ha desarrollado, en mayor medida con temas relacionados a la calidad de agua y la respuesta productiva de los organismos cultivados (Azim y Little, 2008). En general, estos estudios concluyen que estos sistemas son una alternativa que mejora la supervivencia y mantiene producciones estables (Martínez-Córdova *et al.*, 2015).

Los bioflóculos, al ser agregados de microorganismos desarrollados en el agua tienen características (alto porcentaje de proteínas y buena fuente de lípidos) que permiten su aprovechamiento como alimento vivo (Avnimelech, 2007; Ekasari *et al.*, 2010). Esta propiedad permite reducir la cantidad de proteína en los alimentos balanceados.

Adicionalmente se minimiza la descarga de efluentes hacia los sistemas acuáticos. Recientemente, la composición y estructura de bioflóculos desarrollados en diferentes ambientes de cultivo ha sido tema de interés en diversas investigaciones; sin embargo el conocimiento de las estructuras que conforman sus proteínas y lípidos (aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente), así como su efecto en el tejido del camarón, son limitados.

Por otro lado, la harina de pescado es el ingrediente más utilizado como fuente de proteína en alimentos balanceados para cultivar diversas especies acuáticas; sin embargo la alta demanda de este insumo encarece los alimentos y contribuye a la contaminación del agua de cultivo. En respuesta a esto se han desarrollado alimentos balanceados sin harina de pescado o con una mínima proporción de ésta, utilizando fuentes alternativas de origen animal o vegetal como sustituto. Algunos estudios recientes han demostrado que es posible cultivar camarón y tilapia utilizando alimentos con harinas vegetales en sistemas de mínimo recambio de agua (Avnimelech, 2007; Megahed, 2010).

Recientemente se ha investigado el efecto funcional de estos agregados más allá del alimento vivo, incluyendo propiedades de digestibilidad que confieren al alimento, actividad enzimática digestiva y los beneficios relacionados con la inhibición de bacterias patógenas (Xu y Pan, 2012; Becerra-Dórame *et al.*, 2012).

El presente estudio se realizó con la finalidad de conocer cómo varía: 1) la actividad enzimática digestiva de los organismos cultivados y 2) la composición de los bioflóculos y del camarón cultivado a baja salinidad, al sustituir harina de pescado por harina vegetal en los alimentos balanceados. Los resultados pueden ser utilizados en el diseño de alimentos específicos para sistemas hiper-intensivos de mínimo recambio de agua.

## **I. ANTECEDENTES**

### **I. 1. Situación actual del cultivo de camarón en sistemas con bioflóculos**

En años recientes se ha observado un menor desempeño en la producción, así como baja supervivencia del camarón de cultivo debido a la presencia y diseminación de enfermedades (bacterianas y virales) (Sampaio *et al.*, 2010). Debido a esto, los acuacultores han explorado nuevas estrategias para mejorar el rendimiento del cultivo, destacando los sistemas cerrados en dos vertientes: con recirculación de agua y con mínimo recambio (Crab *et al.*, 2012).

Los sistemas de mínimo recambio de agua son aquellos en los que un volumen mínimo es intercambiado entre el medio natural y el de cultivo. Sus principales características son la bioseguridad y la optimización de insumos como tierra, agua y alimento (Ray *et al.*, 2011). Estos sistemas permiten densidades de siembra superiores a 300 individuos por m<sup>2</sup> obteniendo supervivencias de 90%, y logran una reducción del uso de agua de hasta 400 veces en sistemas con bioflóculos (Sampaio *et al.*, 2010) y de 24 veces en sistemas de recirculación de agua (Poleo *et al.*, 2011).

Los sistemas con bioflóculos estimulan el desarrollo microbiano y mejoran la eficiencia del uso de nutrientes. Audelo-Naranjo *et al.* (2012a) realizaron un estudio en el que se utilizó únicamente el alimento natural promovido en un sistema con mínimo recambio y se observó que éste fue suficiente para nutrir a los organismos cultivados; sus resultados indican que es posible eliminar el costo de alimento formulado y de intercambio de agua; además de mantener buena calidad del agua y rendimientos cercanos a 1000 kg/ha. Los principales beneficios de los sistemas con bioflóculos son: el desarrollo de bacterias y microalgas que transforman materia orgánica y compuestos nitrogenados tóxicos en biomasa, la cual complementa la nutrición de los organismos cultivados, el aporte nutricional de los microorganismos, y un menor uso de espacio y agua.

El cultivo de camarón en sistema con bioflóculos ha sido exitoso en países como Brasil, EUA y Belice (Moreira de Souza *et al.*, 2013).

## **I.2. Formación de los bioflóculos y sus características biológicas**

La formación de los bioflóculos se lleva a cabo principalmente manteniendo la razón carbono:nitrógeno (C:N) en el cultivo entre 12:1 y 20:1 para promover el desarrollo de bacterias heterotróficas. Para ello es necesario añadir una fuente de carbono externa, actualmente se han estudiado diversas fuentes de carbón de las que destacan la azúcar, melaza, harinas vegetales, entre otras. Adicionalmente, estos sistemas requieren una aireación vigorosa la cual ayuda a mantener la elevada tasa respiratoria de bacterias, ciliados, zooplancton y organismos cultivados, al mismo tiempo que permite que la materia orgánica se mantenga suspendida en la columna de agua, impidiendo su sedimentación (Poleo *et al.*, 2011).

Cuando la razón de C:N es óptima para el crecimiento de bacterias heterótrofas, estas son capaces de metabolizar la materia orgánica generada dentro del sistema y permiten el desarrollo de otros organismos superiores. Los conglomerados microbianos abundantes en bacterias heterótrofas remueven mayor cantidad de nitrógeno amoniacal (Martínez-Córdova *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el desarrollo de bioflóculos permite mantener los niveles de compuestos tóxicos dentro de lo recomendado; Audelo-Naranjo *et al.* (2012b) reportaron que los niveles de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) en el sistema con biopelículas fue hasta de 22 y 39% inferior, respectivamente que en un cultivo con agua clara.

El desarrollo de los bioflóculos involucra interacciones físicas, químicas y biológicas entre la materia orgánica y sustrato físico, en el cual interviene un amplio rango de organismos como bacterias, protozoarios, rotíferos, nematodos, copépodos, entre otros, los cuales son fuente de alimento para las especies cultivadas (Emerenciano *et al.*, 2013c). En el interior de estos sistemas se llevan a cabo una serie de procesos: el organismo en cultivo toma el nitrógeno orgánico en forma de sólidos suspendidos (bioflóculos), así mismo las excretas del organismo y el exceso de alimento son colonizados principalmente por bacterias (Avnimelech y Kochba, 2009). Por otro lado, se ha observado que las bacterias heterótrofas colonizan el intestino del camarón confiriéndole un posible efecto probiótico (Emerenciano *et al.*, 2013c).

Algunas especies del género *Vibrio* son consideradas patógenas para el camarón y son un constante peligro en la industria acuícola al amenazar la salud de los organismos cultivados. Se ha observado que mantener una comunidad de bacterias benéficas en el cultivo

puede ayudar en la prevención del brote de bacterias patógenas tipo *Vibrio* e incluso, contribuyen a mejorar el estatus inmunológico como lo demostró Aguilera-Rivera *et al.* (2014) en un cultivo de *L. vannamei* en sistema con bioflóculos.

Las bacterias quimioautótrofas juegan un rol esencial en el equilibrio del sistema de cultivo al contribuir con la reducción de compuestos nitrogenados tóxicos que deterioran la calidad del agua de estos sistemas y de los cuerpos aledaños que reciben los efluentes acuícolas. Estas bacterias utilizan al amoníaco (N-NH<sub>3</sub>) y al nitrito (N-NO<sub>2</sub>) como sustratos, dos compuestos tóxicos cuando se acumulan en los cultivos acuícolas (Hagopian y Riley 1998).

### **I.3. Aprovechamiento de los bioflóculos como alimento y suplemento alimenticio**

Los bioflóculos formados sirven de suplemento alimenticio para los organismos en cultivo (Sampaio *et al.*, 2010), la ingestión activa ha sido demostrada mediante estudios que analizan el tracto intestinal de camarón blanco (Loureiro *et al.*, 2012; Viau *et al.*, 2012); así mismo, se ha demostrado mediante el uso de isótopos estables que los organismos cultivados pueden incorporar los nutrientes de los bioflóculos como parte de su biomasa representando esto entre un 18 y 29% del total (Burford *et al.*, 2004).

El ajuste de la razón C:N permite el desarrollo de diversos tipos de bioflóculos, en el cual se presentan diferentes proporciones de fitoplancton (cianobacterias, diatomeas, clorofitas y cianofitas), ciliados, flagelados, rotíferos y nematodos, entre otros (Loureiro *et al.*, 2012; Viau *et al.*, 2012). Indistintamente del tipo de bioflóculos, los agregados aportan proteínas, lípidos y carbohidratos (Martínez-Córdova *et al.*, 2015) que permiten que los organismos mayores los aprovechen en todo momento, ya que se encuentran permanentemente en suspensión en la columna de agua. Los resultados obtenidos en diversos estudios demuestran que dicha productividad natural tiene un efecto positivo en supervivencia, crecimiento, ganancia de peso, consumo de alimento y factor de conversión alimenticia del camarón (Wasielesky *et al.*, 2006; Emerenciano *et al.*, 2011; Becerra-Dórame *et al.*, 2011).

Emerenciano *et al.* (2012a; 2013c) indicaron que los análisis proximales de los bioflóculos desarrollados en cultivos de camarón *L. vannamei* y *F. duorarum* tienen un buen aporte de proteína 26.3%, 18.4% y 25%, respectivamente, así como un contenido bajo de lípidos 0.7%, 0.3% y 0.6%, respectivamente. La composición de nutrientes de los bioflóculos suele variar entre cultivos debido a los organismos que se desarrollan en ellos (Ekasari *et al.*, 2010). Los estudios de Crab *et al.* (2010) han resaltado la importancia que tiene la fuente de carbono en el desarrollo de los bioflóculos, sugiriendo que éste es el principal factor que influye en el contenido de proteínas, lípidos y cenizas. Otros estudios han observado que la edad del cultivo también influye en la composición de los bioflóculos (Schveitzer *et al.*, 2013).

Por el contrario, autores como Azim y Little (2008) y Megahed (2010), han comparado la composición de los bioflóculos desarrollados en cultivos de tilapia y camarón, respectivamente, con diferente contenido de proteína en el alimento balanceado (de 24 y 35% para tilapia y de 16 a 31% para camarón) y López-Elías *et al.* (2015) con diferentes contenidos de harina de pescado en la dieta, sin encontrar diferencia significativa en el contenido de proteínas y lípidos de los agregados. Los estudios mencionados concluyen que la calidad nutricional de los bioflóculos puede ser independiente del contenido de proteína, así como del origen de los ingredientes presentes en los alimentos balanceados.

Ballester *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la reducción de nivel de proteína (25, 20, 35, 40 y 45%) en alimento para juveniles de *Farfantepenaeus paulensis* cultivado con bioflóculos, sin observar efectos significativos en el desarrollo y respuesta productiva del camarón, confirmando la importancia de estos agregados como fuente de nutrientes. Incluso los bioflóculos se ha aprovechado para producir harina. Kuhn *et al.* (2010) utilizaron la harina procedente de bioflóculos desarrollados en un cultivo de tilapia como ingrediente de dietas de camarón, reduciendo el contenido de harina de pescado sin efectos negativos en el desarrollo de los crustáceos. Estos estudios resaltan la importancia que tiene el alimento vivo al complementar el alimento formulado, logrando una mayor variedad de nutrientes que se reflejan en los parámetros productivos (Viau *et al.*, 2012).

Investigaciones recientes se han encaminado a evaluar los perfiles de ácidos grasos y aminoácidos de los bioflóculos, con el fin de verificar si son adecuados para satisfacer los

requerimientos nutricionales de peces y camarones (Voltolina *et al.*, 2013). Los microorganismos, principalmente las bacterias se encuentran compuestas por un perfil de aminoácidos muy completo (Viau *et al.*, 2012). El conocimiento de la estructura de la comunidad de los bioflóculos y su valor nutricional ayudará a desarrollar formulaciones de alimento costo-efectivas. Investigadores como Ju *et al.* (2008a) y Ekasari *et al.* (2014b) indican que los bioflóculos tienen proteína de alta calidad debido a la presencia de aminoácidos esenciales, capaces de cubrir los requerimientos nutricionales del camarón.

En cuanto al contenido de ácidos grasos esenciales, Emerenciano *et al.* (2012a) estudiaron dicho perfil, encontrando un importante aporte nutricional para el desarrollo gonadal de los camarones (*L. vannamei*). Adicionalmente, se reportaron resultados positivos en la producción de huevos y porcentaje de desove de dos especies de camarón (*L. stylirostris* y *F. duorarum*) (Emerenciano *et al.*, 2012b; 2013a). Por otro lado, Ekasari *et al.* (2010) han resaltado el efecto que tiene la fuente de carbono (al comparar glucosa y glicerol) sobre el contenido de ácidos grasos n-3 y n-6 en los bioflóculos, así como la mayor producción de ácido docosahexaenóico (DHA) en bioflóculos desarrollados en agua salada en comparación con los desarrollados en agua dulce.

Las enzimas que forman parte de la pared extracelular de ciertos microorganismos que son ingeridos por los camarones pueden conferirle características favorables para la digestión de ingredientes, este tema ha sido motivo de estudios recientes como los de Xu y Pan (2012) y Xu *et al.* (2013) en los cuales se reportó una mejoría en la actividad enzimática digestiva (proteasa, amilasa, celulasa y lipasa) en diferentes órganos (glándula digestiva, estómago e intestino) del camarón cultivado (*L. vannamei*) con bioflóculos, en comparación con los cultivados en agua clara. De manera similar, se observó un incremento en la actividad enzimática digestiva (proteasas, amilasa y lipasa) en un grupo de postlarvas de camarón al ser tratadas con un aditivo a base de bacterias probióticas, lo cual además tuvo efectos benéficos en la supervivencia (Zhou *et al.*, 2007).

Estos resultados sugieren que los microorganismos que conforman los bioflóculos tienen un efecto positivo en la actividad enzimática digestiva de *L. vannamei* facilitando la digestibilidad y absorción del alimento.

#### **I.4. Sustitución de harina de pescado en alimento para camarón**

La proteína es el componente más importante al elaborar alimentos para acuicultura, pero a la vez es escaso y por lo tanto costoso (Wilson, 2002). Es por ello que otro tema de reciente investigación en la actividad acuícola es la sustitución de harina de pescado de los alimentos. La harina de pescado es producida principalmente a partir de la pesca de pequeños peces pelágicos, como sardinas y anchovetas, por lo tanto se trata de un recurso limitado. El uso de harina y aceite de pescado contribuye a incrementar la presión sobre las pesquerías, las cuales están pobremente reguladas (Watanabe, 2002; Olsen y Hasan, 2012).

A pesar de que la harina de pescado es considerada un ingrediente esencial en los alimentos para camarones marinos debido al balance de nutrientes, existen estudios que muestran que la factibilidad de cultivar camarón utilizando harinas vegetales (soya y canola) como sustitutos de la harina de pescado (Suárez *et al.*, 2009). Aún existen incógnitas a cerca de la calidad de estos alimentos, ya que la harina de pescado es un ingrediente rico en aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA n-3 y n-6, por sus siglas en inglés), vitaminas y minerales (Scopel *et al.*, 2011).

La mayor dificultad al momento de sustituir la harina de pescado es encontrar ingredientes digeribles, sin factores antinutricionales y que cumplan con los requerimientos dietarios del organismo para el cual se diseña el alimento (Glencross *et al.*, 2009), además de las cantidades adecuadas de ácidos grasos esenciales (n-3 y n-6) encontrada en harinas provenientes de especies marinas, no se encuentran en cantidades suficientes en ingredientes de origen vegetal u otros sustitutos (Martínez-Córdova *et al.*, 2016).

Los bioflóculos desarrollados dentro de los cultivos acuícolas pueden llegar a suplementar parte del déficit de aminoácidos y ácidos grasos esenciales en dietas con baja o nula inclusión de harina de pescado. Recientemente, Roy *et al.* (2009) lograron reemplazar la harina de pescado con fuentes alternativas de origen animal y vegetal en dietas de camarón sin afectar el crecimiento, supervivencia y factor de conversión alimenticia (FCA).

El uso de proteína proveniente de los microorganismos ayuda a reducir costos de producción de alimentos (Hussain *et al.*, 2014). Estudios como el de Bauer *et al.* (2012)

comprobaron que la sustitución completa de harina de pescado con fuentes alternativas de origen vegetal (pasta de soya) y harina de bioflóculos, no afecta el crecimiento, FCA, ni supervivencia de *L. vannamei*, y a pesar de que se observó en el alimento formulado una deficiencia de ciertos aminoácidos esenciales (lisina, histidina, treonina, fenilalanina y metionina) se concluyó que la productividad natural actuó como fuente suplementaria de nutrientes.

Valle *et al.* (2015) evaluaron el efecto del reemplazo gradual de harina de pescado (a niveles de 10, 20, 30 y 40%) en alimentos para larvas de camarón por proteína hidrolizada de pescado y harina de bioflóculos, concluyendo que la sustitución fue exitosa. De manera similar los resultados obtenidos por Scopel *et al.* (2011) sugieren que la reducción de hasta el 40% de harina de pescado puede llevarse a cabo en cultivos superintensivos de *L. vannamei* con bioflóculos sin interferir en el desempeño zootécnico sin afectar la calidad de agua. Similarmente, un estudio de Ju *et al.* (2008b) indicó que la adición de bioflóculos (íntegro o sus fracciones) complementó los nutrientes presentes en los alimentos formulados con microelementos que beneficiaron el crecimiento del camarón. Esto se debió a que ciertos nutrientes presentes en la harina de pescado pueden ser sustituidos por el alimento vivo que se encuentra presente en forma de bioflóculos.

Este tipo de acciones permiten que en un futuro la demanda de harina y aceite de pescado para la formulación de dietas sea menor (Avnimelech *et al.*, 2008), reduciendo así los costos de producción y fomentando la sustentabilidad en la acuicultura.

Los resultados de estos estudios proponen que los bioflóculos son un importante aporte de nutrientes para los organismos en cultivo y que es posible reemplazar el contenido de harina de pescado de las formulaciones alimenticias, sin embargo las propiedades nutricionales de los bioflóculos suelen ser muy dinámicas (Ekasari *et al.*, 2010).

Por lo que resulta de mucha importancia analizar con detalle el efecto de los alimentos elaborados con ingredientes alternativos a la harina de pescado sobre la actividad enzimática digestiva y composición del tejido de camarón así como en los parámetros productivos.

## **II. HIPÓTESIS**

La formación de los bioflóculos depende de los desechos (restos de alimentos, heces, mudas y organismos muertos) presentes en la columna de agua, así como de la razón C:N, por lo que modificar el contenido harina de pescado en el alimento balanceado puede influir en la composición nutricional de los bioflóculos desarrollados en los cultivos a baja salinidad, los cuales, al ser una fuente complementaria en la nutrición del camarón influirán en la actividad enzimática digestiva y en la composición del tejido del mismo.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1. General**

Evaluar el efecto de alimentos balanceados con diferentes concentraciones de harina de pescado sobre la actividad enzimática digestiva, composición del músculo del camarón y de los bioflóculos en un cultivo de postlarvas y juveniles de *L. vannamei* a baja salinidad.

#### **III.2. Particulares**

1. Evaluar el efecto del alimento suministrado sobre la concentración de bioflóculos generados (sólidos suspendidos totales), compuestos nitrogenados y calidad del agua.
2. Comparar el crecimiento y la supervivencia final del camarón en función del alimento suministrado.
3. Determinar la abundancia de bacterias heterótrofas viables, bacterias nitrificantes cultivables y bacterias tipo *Vibrio* en agua de cultivo en función del alimento suministrado.
4. Evaluar la actividad enzimática digestiva del hepatopáncreas del camarón (tripsina, proteasa, amilasa y lipasa) en función del alimento suministrado.
5. Determinar la composición proximal, perfil de ácidos grasos y perfil de aminoácidos del alimento, bioflóculos y músculo abdominal del camarón en diferentes tratamientos.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. Formulación y elaboración de los alimentos experimentales**

Se formularon cuatro alimentos balanceados isoproteicos (35%) e isolipídicos (7%). Con cuatro niveles de sustitución de harina de pescado (Tabla 1). Los ingredientes utilizados para sustituir la harina de pescado fueron una mezcla de harinas vegetales (pasta de soya, maíz, trigo y sorgo). Los alimentos experimentales se diseñaron para cubrir los requerimientos nutricionales para el camarón blanco (*L. vannamei*). En el balanceo de los ingredientes de los alimentos se utilizó el software NUTRION 5 PRO<sup>MR</sup>.

Los alimentos se elaboraron con el apoyo del laboratorio de nutrición acuícola de la Universidad Estatal de Sonora (UES) Unidad Navojoa. Las harinas fueron cernidas a través de una malla con apertura de 250  $\mu\text{m}$  con las cuales se preparó una mezcla seca (siguiendo la formulación de cada alimento) a la cual se añadió lecitina de soya y aceite de pescado en las cantidades indicadas, además de agua tibia (40°C) hasta formar una pasta que posteriormente pasó por una maquina peletizadora manteniendo un diámetro de 2 mm/pellet. A continuación los alimentos fueron secados en horno a 45°C durante 12 horas y almacenados en un ambiente seco hasta su uso.

### **IV.2. Cultivo experimental**

Se realizaron dos bioensayos independientes en los laboratorios de la UES. Uno con postlarvas y el otro con juveniles de camarón blanco. Los organismos se obtuvieron del laboratorio de producción de postlarvas (SRY Promotora Acuícola S.A. de C.V. ubicado en Las Bocas, Sonora) y de la granja de engorda (Gez Acuícola S.A. ubicada en Huatabampo, Sonora), respectivamente. En ambos casos los organismos se recibieron en el laboratorio de

investigación de la UES-Navjoa y se mantuvieron en reposo por 24 horas antes de iniciar la aclimatación a baja salinidad (5‰) como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Formulación de alimentos experimentales. Los tratamientos 30, 20, 10 y 0, contienen 30, 20, 10 y 0% de harina de pescado, respectivamente.

Ingrediente (g/kg)	Tratamiento			
	30	20	10	0
Harina de pescado	300.0	200.0	100.0	0.0
Pasta de soya	190.0	363.9	539.8	715.0
Harina de maíz	366.1	140.0	104.5	140.0
Harina de trigo	50.0	150.0	150.0	50.0
Harina de sorgo	10.3	51.5	10.0	5.0
Aceite de pescado	32.5	43.5	44.6	38.9
Lecitina de soya	10.0	10.0	10.0	10.0
Premezcla vitaminas	8.0	8.0	8.0	8.0
Premezcla minerales	5.0	5.0	5.0	5.0
Fosfato dibásico sodio	5.0	5.0	5.0	5.0
Cloruro de colina	2.0	2.0	2.0	2.0
Vitamina C	1.0	1.0	1.0	1.0
BHT	0.1	0.1	0.1	0.1
Alginato de sodio	20.0	20.0	20.0	20.0
Total	1000	1000	1000	1000

**Tabla 2.** Protocolo de aclimatación de *L. vannamei* a baja salinidad (5‰).

Día	Velocidad (‰ por hora)	Duración (horas)	Salinidad inicial (‰)	Salinidad final (‰)
1	2.0	8	35	19
2	1.0	8	19	11
3	0.5	8	11	7
4	0.4	5	7	5

En el primer experimento se utilizaron postlarvas de *L. vannamei* (PL15) para evaluar la actividad enzimática digestiva, calidad del agua y parámetros productivos. En el segundo, se utilizaron juveniles de entre 4.7 y 4.9 g de peso para evaluar la composición del tejido, de los bioflóculos producidos y los parámetros productivos. Los dos bioensayos se desarrollaron a baja salinidad (5‰) y con aireación constante suministrada con piedras aireadoras de 1 pulgada cúbica y un soplador eléctrico de 0.3 HP. Al tratarse de un sistema cerrado, no se realizaron recambios de agua y únicamente se recuperaron los niveles de agua perdidos por evaporación.

Una semana previa a la siembra se realizó un proceso de maduración de los tanques de cultivo según la técnica descrita por López-Elías *et al.* (2015). Una vez que los organismos fueron sembrados se mantuvo una razón de carbono:nitrógeno de 20:1 (C:N = 20:1) durante los primeros 10 días de cultivo y posteriormente se redujo a 12:1. Para la estimación de la razón de C:N se determinó el contenido de ambos elementos (C y N) en el alimento y se complementó con azúcar sin refinar como fuente de carbono, siguiendo las indicaciones de Avnimelech (2007). El azúcar fue agregada diariamente a la columna de agua.

Las unidades experimentales consistieron en contenedores cilíndricos con capacidad de 250 litros, con volumen útil de 200 litros. Se utilizaron 3 réplicas por cada tratamiento. Los tratamientos consistieron en los alimentos previamente descritos con diferente contenido de harina de pescado (0, 10, 20 y 30%), así como un alimento comercial para camarón (Camaronina; Agribrands Purina Mexico, S.A. de C.V) como control externo. Los cinco alimentos fueron isoproteícos, isolipídicos e calóricos.

En el primer experimento se utilizaron postlarvas con peso inicial promedio de 7 mg y tuvo una duración de 28 días. Se mantuvo una densidad de siembra de 600 organismos/m<sup>3</sup> y se alimentaron a una razón de 25% de su biomasa al día.

En el segundo experimento se utilizaron juveniles de *L. vannamei* con peso de 4.7 a 4.9 g a una densidad de siembra de 280 organismos/m<sup>3</sup>. Las unidades experimentales fueron las mismas que en el primer experimento (tanques de 250 L con volumen de 200L). Se alimentaron con el 3% de su biomasa durante 35 días. La fuente de carbono, el protocolo de adición, las técnicas de medición de variables y las condiciones de cultivo fueron las mismas

que las descritas previamente en el bioensayo con postlarvas. En este experimento, a diferencia del primero, se tomaron muestras de agua de cultivo para analizar la comunidad bacteriana (Unidades formadoras de colonias de bacterias heterótrofas, nitrificantes y tipo *Vibrio*) al inicio y final del experimento. Al finalizar el bioensayo se tomó la sección abdominal de los camarones y una muestra de los bioflóculos generados en cada tratamiento para determinar en ambos casos la composición proximal, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos.

### **IV.3. Parámetros de calidad del agua**

En este estudio se realizaron dos bioensayos, el primero con postlarvas y el segundo con juveniles de *L. vannamei*. En ambos casos se midieron los principales parámetros de calidad del agua con el fin de determinar si los alimentos formulados tuvieron un efecto significativo sobre éstos.

En ambos experimentos diariamente se midieron temperatura y oxígeno disuelto con un analizador multiparamétrico (YSI 58 Incorporated, Yellow Springs, Ohio, USA). La salinidad fue evaluada con el uso de un refractómetro ATAGO (ATAGO Company, Minato-ku, Tokyo, Japan) y el pH se determinó con un potenciómetro (Denver Instruments; Bohemia, New York, USA). Estas determinaciones se realizaron directamente en cada contenedor experimental.

La alcalinidad, clorofila-a, sólidos suspendidos totales (SST) y compuestos nitrogenados (nitrógeno amoniacal total, nitritos y nitratos) fueron evaluados semanalmente. La alcalinidad se midió como CaCO<sub>3</sub> y fue determinada por un método colorimétrico (APHA, 1989), la clorofila-a se midió utilizando un fluorímetro Turner Designs (Turner Designs, Sunnyvale, Ca, USA) el cual previamente fue calibrado de acuerdo a la técnica tradicional descrita por Strickland y Parsons (1972). Los niveles de SST y de nitrógeno amoniacal total (NAT) fueron determinados con un espectrofotómetro EPOCH (BioTek Company, Winoosky, Vermont, USA) utilizando una longitud de onda de 630 nm para SST y de 640 nm para NAT siguiendo el método de indofenol (APHA, 1989). Los nitritos y nitratos fueron evaluados con un espectrofotómetro HACH DR 2800 (HACH Company, Loveland, Colorado, USA) con

longitudes de onda de 507 y 355 nm según los métodos de diazotización (5807; HACH, 2007) y reducción de cadmio (8039; HACH, 2007), respectivamente.

#### **IV.4. Indicadores de crecimiento y supervivencia**

Al finalizar los periodos de cultivo se evaluaron los indicadores de crecimiento como se describe a continuación:

$$\text{Ganancia de peso} = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

$$\text{Ganancia semanal de peso} = \frac{\text{ganancia de peso}}{\text{semanas de experimento}}$$

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

$$\text{Supervivencia} = 100 \times \frac{\text{conteo final de organismos}}{\text{conteo inicial de organismos}}$$

$$\text{Factor de conversión alimenticia (FCA)} = \frac{\text{cantidad de alimento agregado}}{\text{ganancia de peso}}$$

#### **IV.5. Carga bacteriana en el agua de cultivo**

Al inicio y al final del experimento se tomó una muestra de la columna de agua de cultivo de cada tanque experimental con un tubo de ensayo estéril agitándose en vórtex y tomándose una sub-muestra de 100 µL para proceder con la siembra de bacterias. Dependiendo de la cantidad de bacterias se realizaron diluciones (1:100 y 1:1,000, respectivamente).

Para la siembra se utilizó la técnica de vaciado en placa (APHA, 1989). Por cada tanque se sembraron un total de 9 placas de Petri (3 por cada tipo de bacterias). Para el cultivo de bacterias heterótrofas viables se usó el agar marino 2216 (Atlas, 2010), las bacterias tipo *Vibrio* fueron cultivadas en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS); después de la siembra fueron incubados a temperatura de  $30 \pm 1$  °C (incubadora VWR 1510E; VWR, PA, USA) durante  $24 \pm 2$  h. Para cultivar las bacterias nitrificantes se utilizó el medio 221 del American Type Culture Collection (Atlas, 2010), considerando su baja tasa de replicación el periodo de incubación fue de 14 días a  $30 \pm 1$  °C. En todos los casos, al final del periodo de cultivo se calculó el total de colonias formadas y se reportó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), posteriormente este valor fue transformado a logaritmo (Log).

#### **IV.6. Determinación de actividad enzimática digestiva**

Al final del experimento con postlarvas, se colectaron 5 organismos al azar de cada unidad experimental y se usaron para evaluar la actividad enzimática digestiva. Adicionalmente, se tomó una muestra de camarones cultivados en agua clara como control sin bioflóculos (blanco), los cuales se asignaron como el tratamiento R.

El hepatopáncreas de los organismos se extrajo manualmente, para posteriormente homogeneizarse en 3 volúmenes de agua destilada fría (4°C), y centrifugarse a 3,500 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue utilizado como extracto enzimático para las posteriores determinaciones.

Primeramente, de cada muestra se calculó el contenido de proteína total soluble mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albúmina bovina (Sigma-Aldrich) como estándar. Las lecturas de actividad enzimática digestiva se realizaron en un espectrofotómetro UV-1280 (Shimadzu Corporation, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan) y los resultados se expresaron como absorbancia/minuto/mg de proteína (abs/min/mg proteína).

Para la determinación de la actividad tipo tripsina se mezclaron 20 µL del extracto enzimático y 1.25mL de buffer Tris (50mM, pH 7.5) con CaCl<sub>2</sub> 20mM y 50 µL del sustrato

(benzoyl-arg-p-nitroanilide BAPNA 0.1 mM). Luego de 10 minutos, la reacción enzimática fue detenida con 0.25mL de ácido acético (30%), la absorbancia fue leída a 410 nm. La actividad de la tripsina se reportó como unidades de actividad (Abs 410/min)/mg proteína.

Para la determinación de la actividad de amilasa se mezclaron 5 µL del extracto enzimático con 500 µL de buffer Tris-HCl (50mM, pH 7.5) y 500 µL del sustrato (almidón soluble 1%). Después de 10 minutos de incubación se añadieron 200 µL de carbonato de sodio 2N y 1.5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS); la mezcla se agitó y se hirvió en un baño María por 15 minutos, posteriormente se añadieron 7.3 mL de agua destilada. La absorbancia fue leída a 550nm. Las unidades de amilasa se reportaron como unidades (Abs 550/min)/mg proteína.

Para la determinación de la actividad de las lipasas se mezclaron 10 µL del extracto enzimático, 100 µL de taurocolato de sodio 100 mM, 1900 µL de buffer Tris HCl (50 mM, pH 7.2) y 20 µL del sustrato (4-Nitrofenil estearato 200 mM) las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente. Luego de 30 minutos, se añadió una solución de 20 µL del reactivo Fast Blue BB 100 mM, 200 µL de ácido tricloroacético 0.72 N y 2.71 mL de etanol:ethyl acetato (1:1). La absorbancia se determinó a 540 nm. Las unidades de lipasa se reportaron como unidades (Abs 540/min)/mg proteína.

Para la determinación de la actividad de las proteasas totales se mezclaron 10 µL del extracto enzimático con 230 µL de buffer Tris HCl (50 mM, pH 7.5) y 500 µL del sustrato (azocaseína 2%); posteriormente se agitó la mezcla y luego de 10 minutos, se detuvo la reacción enzimática con la adición de 500 µL de ácido tricloroacético (20%). Las muestras se centrifugaron (3,000 rpm, durante 15 minutos a 4°C) tomándose la fase superior para determinar la lectura en el espectrofotómetro. La absorbancia se determinó a 440 nm. Las unidades de proteasas se reportaron como unidades (Abs 440/min)/mg proteína.

#### **IV.7. Composición química proximal**

Se tomaron muestras de los alimentos (experimentales y comercial), bioflóculos y camarón (sección abdominal) de cada tratamiento por triplicado al final del experimento y se

procesaron en un liofilizador. Las muestras secas fueron utilizadas para determinar la composición química proximal (humedad, cenizas, proteína cruda, lípidos y fibra) siguiendo los métodos oficiales de la AOAC (2005), para lo cual se realizaron determinaciones gravimétricas para humedad y cenizas, así como digestiones de proteína cruda con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (método de Kjeldahl) y de éter de petróleo para lípidos crudos (método de Soxhlet). Mientras que el contenido total de carbohidratos fue determinado por diferencia de peso y la fibra se estimó mediante digestión con NaOH y de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### **IV.8. Perfil de aminoácidos**

El perfil de aminoácidos se determinó en el Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Se realizaron tres tipos de análisis (aminoácidos libres, primarios y secundarios) para obtener el perfil de aminoácidos totales.

Para la extracción de aminoácidos libres se utilizó la muestra en fresco. Ésta fue tratada con ácido tricloroacético (7.5%), se homogenizó con el vástago y se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman #1 para eliminar sólidos y se mantuvo en congelación a -80°C en pequeñas alícuotas (5 ml) hasta su cuantificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante el método modificado por Vázquez-Ortiz *et al.* (1997).

Para la determinación de aminoácidos primarios y secundarios de las proteínas, la muestra fue previamente liofilizada y luego desgrasada por el método de Goldfish. Se realizó una hidrólisis ácida (ácido clorhídrico 6 N) durante 6 horas a 150°C, posteriormente se procedió con una serie de lavados con agua; a continuación se resuspendió la muestra con un buffer de citratos (pH 2.2). Esta solución fue utilizada para la cuantificación de aminoácidos primarios.

La determinación de los aminoácidos libres y primarios presentes en las muestras se realizó en un solo proceso usando OPA (orto-ftalaldehído) como agente derivatizante. La inyección tuvo una concentración aproximada de aminoácidos de 2µg/mL. La muestra se

procesó con una fase móvil A (buffer de acetato de sodio pH 7.2) y B (metanol 100%). Se utilizó una columna Agilent Zorbax 300 extend-C18 (3.5 µm, 4.6 x 150 mm) y un detector de fluorescencia a 350 nm de excitación y 450 nm de emisión.

Por otra parte, la cuantificación de los aminoácidos secundarios se realizó con una curva de concentraciones conocidas de prolina e hidroxiprolina utilizando NBD-Cl (4-Chloro-7-nitrobenzofurazan al 0.2% en metanol) como agente derivatizante. La derivatización se realizó manualmente al momento de preparar las muestras que serían inyectadas. Se utilizó una columna Agilent Eclipse AAA (3.5 µm, 4.6 x 150 mm), la fase móvil “A” estuvo compuesta por buffer de acetato de sodio con metanol (9.5%) mientras que la fase móvil “B” consistió en metanol.

Se calcularon la razón de aminoácidos esenciales (A/E) y el índice de aminoácidos esenciales (IAAE) en alimento y bioflóculos de acuerdo a las fórmulas reportadas por Peñaflorida (1989) que se describen a continuación:

$$\text{Razón de aminoácidos esenciales (A/E)} = \frac{aa_1}{AA_1}$$

$$\text{Índice de aminoácidos esenciales (IAAE)} = \sqrt[n]{\frac{aa_1}{AA_1} \times \frac{aa_2}{AA_2} \times \dots \times \frac{aa_n}{AA_n}}$$

Donde  $aa_1$  corresponde al contenido de un determinado aminoácido esencial en el alimento (balanceado o bioflóculos) y  $AA_1$  corresponde al contenido del mismo aminoácido en el tejido del camarón. Los valores de A/E y IAAE mayores a 1.00 se reportan como 1.00.

#### **IV.9. Perfil de ácidos grasos**

El análisis de perfil de ácidos grasos se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros del CIAD, para lo cual se utilizaron muestras del alimento, tejido de camarón y de los bioflóculos, todas ellas previamente liofilizadas.

En alimento y tejido de camarón los lípidos se extrajeron de las muestras liofilizadas siguiendo el método de Folch (Folch *et al.*, 1957). Para ello, se preparó una mezcla de cloroformo y metanol (1:1), y se homogenizó a 13,000 rpm (IKA® T25). La derivatización de los ácidos grasos se llevó a cabo en condiciones de oscuridad y en una atmósfera de nitrógeno. Se evaporaron los solventes a 60°C y posteriormente se añadió diclorometano y una solución de hidróxido de sodio en metanol y trifluoruro de boro (14% en metanol) siguiendo el método de la AOAC 969.33 (AOAC, 2000). Finalmente se añadió agua y hexano, así como un flujo de nitrógeno al transferir la muestra a un microinserto dentro de un vial para mantenerla en congelación (-80°C) hasta su análisis por cromatografía de gases.

Para extraer los lípidos de las muestras de los bioflóculos, se utilizó el método descrito por Ryckebosch *et al.* (2012). La muestra recibió una mezcla de cloroformo y metanol (1:1), y se homogenizó en vórtex por 30 segundos. Los solventes se evaporaron a 60°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Para la derivatización se utilizó una mezcla de ácido sulfúrico (1% en metanol) y tolueno, la solución se incubó al menos 8 h a 50°C. Finalmente, se añadió hexano y una solución de NaCl (5%). La muestra recibió un flujo de nitrógeno y fue transferida a un vial y congelada (-80°C) hasta su análisis.

La determinación del perfil de ácidos grasos de todas las muestras se llevó a cabo mediante la inyección de 1 µL del extracto (previamente descrito) en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890 Series) equipado con una columna analítica de sílice modelo Agilent DB-23 (diámetro de 0.25 mm, grosor de 0.25µm y longitud de 60m). El gas acarreador fue N<sub>2</sub> y el modo de detección por ionización de flama (FID). La identificación de los ácidos grasos fue basada en una mezcla de ácidos grasos estandarizada como referencia (Supelco 37 Component FAME Mix by Sigma-Aldrich®).

#### **IV.10. Análisis estadístico**

Los resultados de ambos bioensayos (parámetros de calidad del agua, parámetros productivos, actividad enzimática digestiva abundancia de bacterias, composición proximal, perfil de aminoácidos y ácidos grasos) fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía

ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) con el software Statistica v. 7.0 (StatSoft, Inc. 2000). Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se procedió con la prueba de Tukey HSD.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1. Parámetros de calidad del agua

#### V.1.1. Calidad de agua en el bioensayo con postlarvas

Los parámetros de calidad del agua durante el cultivo no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos (Tabla 3), con medias globales de 25.33 a 25.43 °C, 5.78 a 5.96 mg/L, 8.42 a 8.47, 238.3 a 250.0 mg CaCO<sub>3</sub>/L, 33.28 a 48.43 mg/L y 19.09 a 23.32 µg/L para temperatura, oxígeno disuelto (OD), pH, alcalinidad, sólidos suspendidos totales (SST) y clorofila a (Chl-a), respectivamente.

En este bioensayo la temperatura no fue controlada por lo que los valores variaron de 25.33 a 25.43°C de manera uniforme en todos los tratamientos a causa de las condiciones ambientales en el laboratorio. El intervalo se mantuvo dentro de los rangos recomendados para el desarrollo de la especie (Ray *et al.*, 2011).

Los valores de OD no mostraron diferencias entre tratamientos. Si bien, se observó una ligera disminución alrededor del día 14, el valor mínimo registrado durante los 28 días fue de 5.3 mg/L. Algunos cultivos experimentales de *L. vannamei* en baja salinidad reportan altas concentraciones de OD (de 7 a 8 mg/L) (Esparza-Leal *et al.*, 2010; Maica *et al.*, 2012). Sin embargo los niveles que se mantuvieron en el presente estudio no afectaron la fisiología de los organismos, ya que los mínimos recomendados pueden llegar hasta 3.5 mg/L.

Los valores de alcalinidad fueron similares en todos los tratamientos manteniéndose siempre entre 238.3 y 250.0 mg CaCO<sub>3</sub>/L. Maica *et al.* (2012) reportaron una alcalinidad promedio de 159 mg CaCO<sub>3</sub>/L a una salinidad similar (4‰) y un incremento a medida que aumentó la salinidad. Roy *et al.* (2010) menciona que es recomendable mantener esta variable por encima de 75 mg CaCO<sub>3</sub>/L para conservar la capacidad buffer del agua de cultivo.

**Tabla 3.** Parámetros de calidad del agua durante los 28 días de cultivo de postlarvas de *L. vannamei* (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). Los valores son media ( $\pm$  DE).

Variable	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Temperatura (°C)	25.33 $\pm$ 0.13	25.33 $\pm$ 0.12	25.43 $\pm$ 0.10	25.37 $\pm$ 0.17	25.37 $\pm$ 0.06
OD (mg/L)	5.96 $\pm$ 0.25	5.78 $\pm$ 0.07	5.94 $\pm$ 0.13	5.90 $\pm$ 0.08	5.88 $\pm$ 0.17
pH	8.47 $\pm$ 0.02	8.44 $\pm$ 0.02	8.47 $\pm$ 0.02	8.44 $\pm$ 0.04	8.42 $\pm$ 0.03
Alcalinidad (mg/L)	243.3 $\pm$ 8.27	238.3 $\pm$ 8.27	243.3 $\pm$ 9.33	242.5 $\pm$ 5.77	250.0 $\pm$ 10.65
SST (mg/L)	48.43 $\pm$ 7.98	33.28 $\pm$ 3.37	37.37 $\pm$ 8.2	36.74 $\pm$ 7.17	43.08 $\pm$ 13.47
Clorofila-a ( $\mu$ g/L)	19.09 $\pm$ 0.88	22.37 $\pm$ 1.03	23.32 $\pm$ 3.00	22.67 $\pm$ 1.60	20.83 $\pm$ 1.48
NAT (mg/L)	0.89 $\pm$ 0.16	0.48 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.14	0.63 $\pm$ 0.25	0.62 $\pm$ 0.18
N-NO <sub>2</sub> (mg/L)	5.58 $\pm$ 0.71	4.86 $\pm$ 0.23	5.08 $\pm$ 0.26	6.31 $\pm$ 0.67	5.83 $\pm$ 0.71
N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	5.83 $\pm$ 3.53	7.43 $\pm$ 1.30	6.47 $\pm$ 1.61	7.03 $\pm$ 2.84	6.19 $\pm$ 1.62

OD: Oxígeno disuelto

SST: Sólidos suspendidos totales

NAT: Nitrógeno amoniacal total

El pH se mantuvo en valores promedio de 8.6 durante los primeros 14 días para todos los tratamientos, y para el día 21 se observó una ligera disminución (8.3). Sin embargo, estos valores se encontraron dentro del rango recomendado para el cultivo de camarón, ya que algunos autores recomiendan mantenerlo entre 7.0 y 9.0 (Hagopian y Riley, 1998). Así mismo se ha reportado que este parámetro disminuye con el incremento de la salinidad del agua de cultivo (Esparza- Leal *et al.*, 2010; Maica *et al.*, 2012).

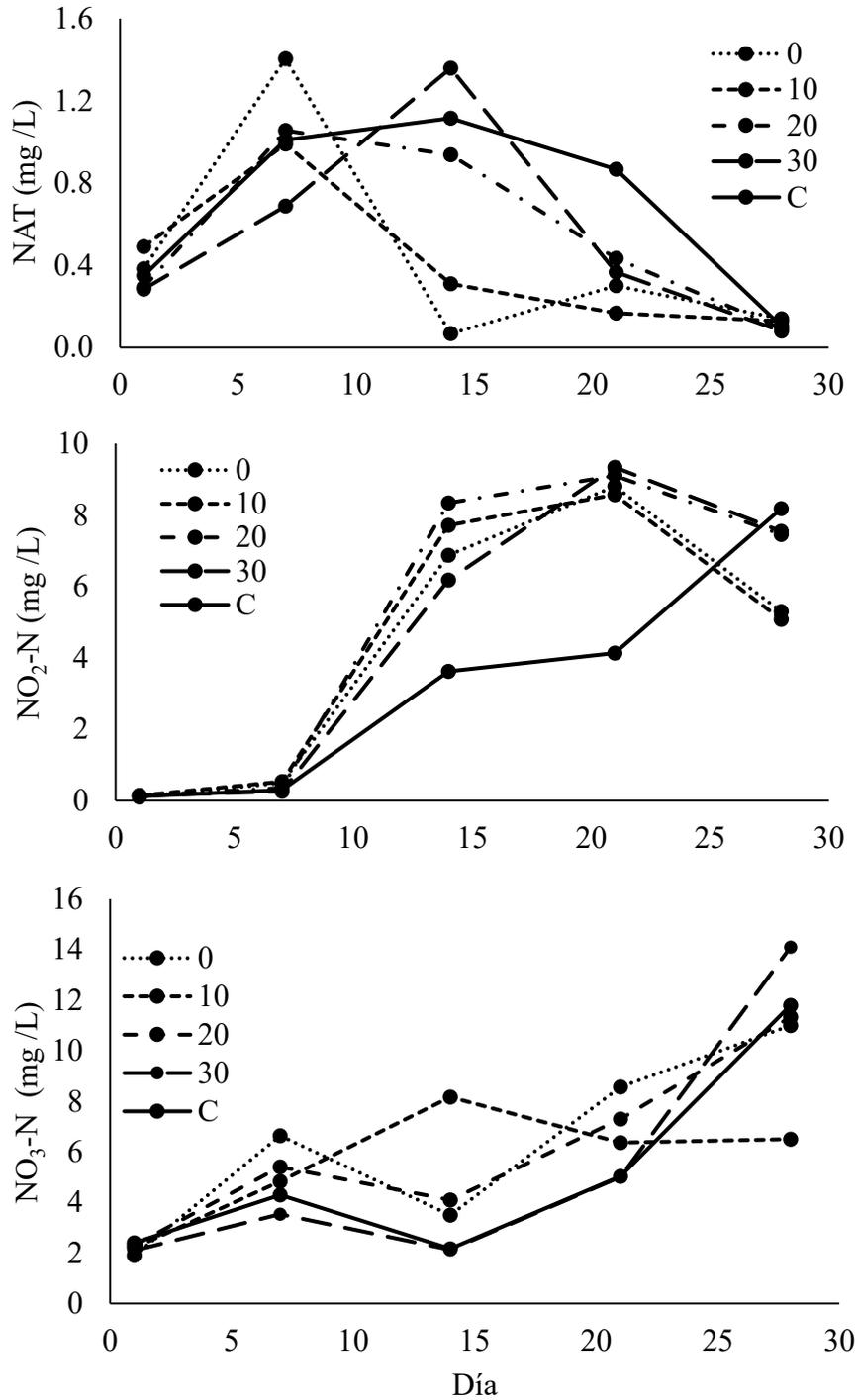
En cuanto al contenido de SST, éstos estuvieron entre 33.28 y 48.42 mg/L. Se observó el incremento de este parámetro en el todos los tratamientos a través del tiempo de cultivo, sin diferencias significativas entre tratamientos. La tendencia encontrada se esperaba debido a que se trabajó sin recambios de agua.

Las concentraciones de clorofila-a variaron de 19.09 a 23.32  $\mu$ g/L. Se registró un incremento conforme avanzó el periodo de cultivo, esta tendencia fue esperada debido al

aumento de nutrientes en la columna de agua, los cuales fomentan el desarrollo de microalgas. Las concentraciones obtenidas en éste estudio son inferiores a las reportadas por Maica *et al.* (2012) quienes encontraron valores promedio de de 61.3 µg/L en un cultivo de camarón a baja salinidad. Las diferencias en los niveles de clorofila-a en los sistemas de bioflóculos se deben a las condiciones de cultivo que pueden variar ampliamente, desde los niveles registrados en este estudio hasta concentraciones superiores a 400 µg/L (Decamp *et al.*, 2007).

De manera similar, los valores de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (N-NO<sub>2</sub>) y nitratos (N-NO<sub>3</sub>) variaron durante el tiempo de cultivo con medias de 0.40 a 0.89, 4.86 a 6.31 y de 5.83 a 7.43 mg/L, respectivamente. La Figura 1 muestra la dinámica de estos tres compuestos nitrogenados: mientras que la concentración de NAT disminuye lentamente, la concentración de N-NO<sub>2</sub> incrementa hacia el día 14; para el día 21 una vez que el NAT y N-NO<sub>2</sub> han disminuido, la concentración de N-NO<sub>3</sub> incrementa, de manera que para el día 28 éste compuesto es el que se encuentra en mayor concentración. Puede observarse que todos los tratamientos tuvieron una alta concentración de N-NO<sub>3</sub>, seguida de N-NO<sub>2</sub> y finalmente de NAT, la prueba de ANOVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos. En general, las concentraciones de NAT y N-NO<sub>2</sub> fueron menores a 0.5 y 8.0 mg/L, respectivamente, y disminuyeron a través del tiempo de cultivo, mientras que el N-NO<sub>3</sub> incrementó. La respuesta observada en las concentraciones de compuestos nitrogenados (NAT, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub>) coincide con los reportes de Maica *et al.* (2012) y Xu *et al.* (2013) que corresponden a cultivos de camarón en bioflóculos.

En el presente ensayo se observó que la adición de azúcar y el ajuste de la razón de C:N (12:1) permitió el desarrollo microbiano que conllevó a la formación de los bioflóculos y al control de las concentraciones de NAT y N-NO<sub>2</sub>. En los sistemas de cultivo con bioflóculos, los niveles de NAT suelen ser altos durante los primeros días y disminuir durante los días subsecuentes a medida que incrementan las concentraciones de N-NO<sub>2</sub> a causa del establecimiento bacterias capaces de metabolizar el NAT (Xu y Pan, 2014; Scopel *et al.*, 2011; Furtado *et al.*, 2015b; Schweitzer *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Concentración de NAT, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> en el agua durante el cultivo de postlarvas de *L. vannamei*. 0, 10, 20, 30 y C, corresponden a los tratamientos con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado; C corresponde al alimento comercial.

En los sistemas de cero recambio de agua los compuestos nitrogenados se controlan favoreciendo el desarrollo de bacterias heterótrofas, mediante la adición de fuentes adicionales de C. En éste estudio se observó que las razón inicial C:N de 20:1 y el posterior ajuste de 12:1 después de los primeros 10 días, fomentaron el desarrollo de las bacterias heterótrofas, lo que permitió la formación de los bioflóculos y el control de las concentraciones de NAT y N-NO<sub>2</sub>. Las bacterias heterótrofas y nitrificantes son las encargadas de inmovilizar el nitrógeno inorgánico y convertirlo en biomasa microbiana (Avnimelech, 2007), que puede ser aprovechada como alimento vivo (Yuniasari y Ekasari, 2010; Martínez-Córdova *et al.*, 2015).

#### V.1.2. Calidad de agua en el bioensayo con juveniles.

En el segundo bioensayo solo se midieron las variables del agua al inicio y al final del cultivo, los cuales se muestran en las tablas 4 y 5, respectivamente. Durante el tiempo de cultivo se observó en todos los tratamientos una disminución en los niveles de OD (de 4.9 a 3.3 mg/L), pH (de 8.1 a 7.0), alcalinidad total (de 186.7 a 86.7 mg CaCO<sub>3</sub>/L) y NAT (de 3.8 a 0.3 mg/L), a la vez que se registró un incremento de SST (de 82.5 a 202.9 mg/L), Chl-a (de 44.8 a 115.5 µg/L), N-NO<sub>2</sub> (de 0.8 a 1.9 mg/L) y N-NO<sub>3</sub> (de 6.4 a 37.3 mg/L). Las tendencias coinciden con las observadas en el primer bioensayo.

Con excepción de la clorofila-a, el resto de las variables de calidad del agua no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos al final del cultivo. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en cultivo con postlarvas (bioensayo 1). En el caso de los compuestos nitrogenados, esto debido a que todos los tratamientos tuvieron el mismo contenido de proteína (35%) independientemente de la fuente (harina de pescado o harina vegetal).

Los promedios finales de N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> fueron mayores en el experimento con juveniles, lo cual se debió a la mayor biomasa cultivada. A pesar de esto todos los compuestos derivados del metabolismo del nitrógeno se encontraron dentro de los rangos recomendados para cultivo de camarón (Furtado *et al.*, 2015a; Xu y Pan, 2012).

**Tabla 4.** Parámetros de calidad del agua el primer día del experimento de juveniles de *L. vannamei* (día 1). Media ( $\pm$  DE) con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 = alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente).

Variable	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	28.8 $\pm$ 0.7	28.4 $\pm$ 0.1	28.6 $\pm$ 0.5	28.7 $\pm$ 0.2	29.0 $\pm$ 0.7
OD (mg/L)	4.9 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.4
pH	7.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	8.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	8.0 $\pm$ 0.0 <sup>bc</sup>	8.0 $\pm$ 0.0 <sup>cd</sup>	8.1 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>
Alcalinidad (mg/L)	183.3 $\pm$ 5.8	180.0 $\pm$ 10.0	186.7 $\pm$ 5.8	186.7 $\pm$ 5.8	183.3 $\pm$ 5.8
SST (mg/L)	66.1 $\pm$ 25.2	58.3 $\pm$ 8.3	52.8 $\pm$ 18.7	82.5 $\pm$ 23.0	57.9 $\pm$ 15.2
Clorofila-a ( $\mu$ g/L)	44.8 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>	25.6 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	31.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	28.2 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	30.2 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>
NAT (mg/L)	3.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	3.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
N-NO <sub>2</sub> (mg/L)	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	6.4 $\pm$ 2.6	5.3 $\pm$ 1.3	6.2 $\pm$ 2.4	6.2 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 1.1

OD: Oxígeno disuelto

SST: Sólidos suspendidos totales

NAT: Nitrógeno amoniacal total

En cultivos con juveniles y adultos, Schweitzer *et al.* (2013) sugieren mantener los valores de SST entre 400 y 600 mg/L para que la tasa de nitrificación sea apropiada. En el presente estudio, los valores de SST fueron más bajos (entre 52.8 y 202.9 mg/L) y similares a los reportados por Ekasari *et al.* (2014a) y Furtado *et al.* (2015b), sin embargo la tasa de nitrificación no se vio afectada.

**Tabla 5.** Parámetros de calidad del agua el último día del experimento de juveniles de *L. vannamei* (día 35). Media ( $\pm$  DE) con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 = alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente).

Variable	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	28.9 $\pm$ 0.7	28.6 $\pm$ 0.2	28.6 $\pm$ 0.6	28.7 $\pm$ 0.2	29.1 $\pm$ 0.6
OD (mg/L)	3.8 $\pm$ 1.0	3.4 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.5
pH	7.0 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.2
Alcalinidad (mg/L)	90.0 $\pm$ 0.0	93.3 $\pm$ 15.3	86.7 $\pm$ 5.8	96.7 $\pm$ 15.3	103.3 $\pm$ 5.8
SST (mg/L)	202.9 $\pm$ 44.2	157.2 $\pm$ 63.0	148.8 $\pm$ 3.0	156.4 $\pm$ 50.6	107.4 $\pm$ 36.0
Clorofila-a ( $\mu$ g/L)	115.5 $\pm$ 8.6 <sup>b</sup>	60.3 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	64.8 $\pm$ 11.3 <sup>a</sup>	69.1 $\pm$ 11.5 <sup>a</sup>	65.4 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
NAT (mg/L)	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0
N-NO <sub>2</sub> (mg/L)	1.9 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 1.2	0.9 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.7
N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	22.7 $\pm$ 1.2	37.3 $\pm$ 11.4	37.3 $\pm$ 8.3	35.3 $\pm$ 3.1	29.3 $\pm$ 2.3

OD: Oxígeno disuelto

SST: Sólidos suspendidos totales

NAT: Nitrógeno amoniacal total

## V.2. Aclimatación y parámetros productivos

### V.2.1. Aclimatación de las postlarvas

La supervivencia durante el periodo de aclimatación de las postlarvas fue del 92%, al final del cual los organismos alcanzaron un peso individual promedio de 24.2 mg. El periodo de aclimatación duró aproximadamente 96 horas y se obtuvo una supervivencia mejor a la reportada por Esparza-Leal *et al.* (2010), quien reportó un intervalo de 81–87% al aclimatar a la misma especie a una salinidad menor (1‰) por periodos de 80 y 100 horas. La alta supervivencia obtenida, también se debe a que se utilizó un protocolo de aclimatación

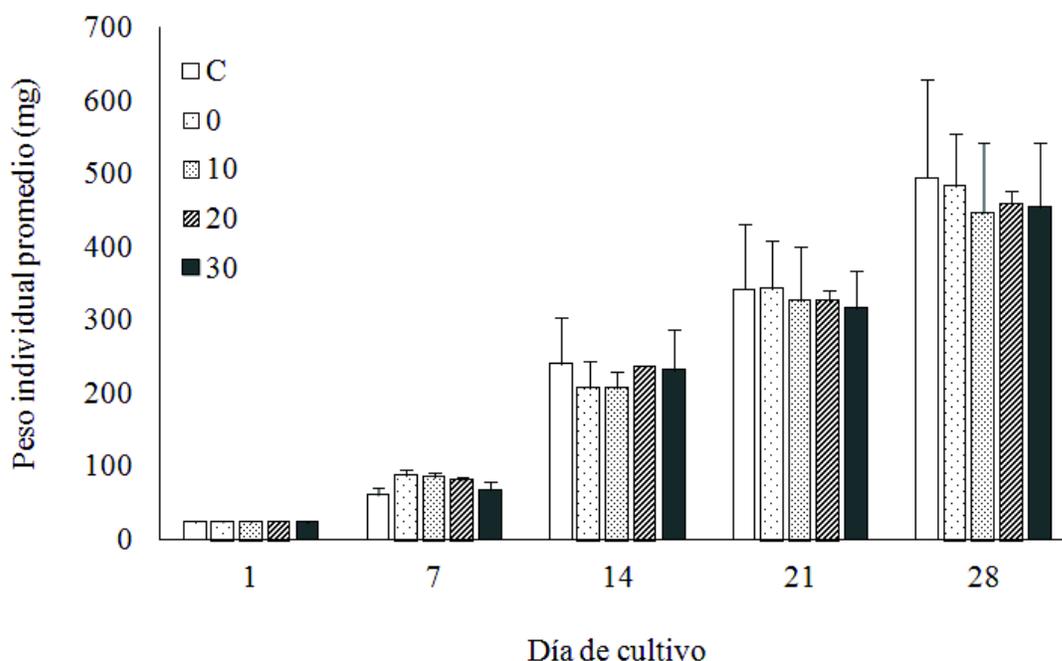
previamente probado con éxito (Páez-Osuna, 2011), con ligeras modificaciones consistentes en alargar el periodo de aclimatación para llegar a una salinidad final menor.

La capacidad osmorreguladora de los organismos está directamente relacionada al tamaño de las branquias, por lo que ésta tiende a ser más eficiente en organismos de mayor edad (Álvarez *et al.*, 2004). McGraw *et al.* (2002) sugieren que para aclimatar exitosamente postlarvas a baja salinidad, éstas deben tener al menos 10 días en este estadio (PL10). Roy *et al.* (2010) recomiendan una reducción máxima de 4‰/h hasta alcanzar la salinidad deseada. En este estudio todas estas recomendaciones fueron tomadas en cuenta durante el proceso de aclimatación y los resultados obtenidos sugieren que el protocolo diseñado fue apropiado para postlarvas de 15 días (PL15).

#### V.2.2. Parámetros productivos en el bioensayo con postlarvas

Al iniciar el experimento con las postlarvas alimentadas con diferentes contenidos de harina de pescado, se tuvo un peso inicial de 24.2 mg/individuo. En general el peso mostró una tendencia exponencial en función del tiempo de cultivo (Figura 2); después de 28 días de cultivo, el peso individual final registrado fluctuó entre 445.6 y 495.0 mg, sin diferencias significativas entre tratamientos.

La respuesta productiva de los organismos (Tabla 6) fue más alta en comparación con los resultados reportados por otros estudios similares. La supervivencia fue parecida entre tratamientos (entre 80.2 y 88.7%) y sin diferencias significativas. En un ensayo llevado a cabo en laboratorio y en granja por Roy *et al.* (2009) compararon alimentos alternativos para *L. vannamei*, se obtuvieron supervivencias de 91 y 98% en una salinidad de 4‰ sin diferencias significativas entre alimentos, mientras que Maica *et al.* (2012) obtuvieron supervivencia de 72.7% a la misma salinidad.



**Figura 2.** Crecimiento semanal de las postlarvas de *L. vannamei* durante el cultivo experimental. C, 0, 10, 20, y 30, corresponden a los tratamientos: al alimento comercial (C) y experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado.

**Tabla 6.** Supervivencia y crecimiento obtenidos al finalizar el cultivo de postlarvas de *L. vannamei* (día 28) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ).

Variable	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Peso inicial (mg)	24.2 ± 1.9	24.2 ± 1.9	24.2 ± 1.9	24.2 ± 1.9	24.2 ± 1.9
Peso final (mg)	495.0 ± 134.0	481.9 ± 73.4	445.6 ± 96.3	457.6 ± 18.4	454.0 ± 87.4
Supervivencia (%)	81.3 ± 5.9	83.6 ± 12.6	80.2 ± 12.6	88.7 ± 4.7	83.7 ± 4.0

### V.2.3. Parámetros productivos en el bioensayo con juveniles.

El bioensayo con juveniles, éste se inició con organismos de peso individual entre 4.7 y 4.9 g, los cuales alcanzaron peso promedio de 10.6 a 11.9 g al finalizar el experimento, y al igual que en el bioensayo con postlarvas, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos.

Los valores promedio de ganancia de peso semanal estuvieron entre 5.7 y 7.1 g, la ganancia semanal de peso fue de 1.1 a 1.4 g/semana. La tasa de crecimiento específica estuvo entre 2.2 y 2.6%/día, la supervivencia varió de 93.3 a 100% y el factor de conversión alimenticia se mostró similar con valores de 1.7 a 1.8 (Tabla 7). La prueba de ANOVA no mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

La ganancia de peso del camarón obtenida en este estudio fue mayor a la reportada por Furtado *et al* (2015a y 2015b) quienes reportaron un intervalo de 0.44 a 0.8 y de 0.9 a 1.05 g/semana, respectivamente, así como a los resultados reportados por Schweitzer *et al.* (2013) quienes reportaron valores promedio de 0.61 a 0.75 g/semana. Por otro lado, Wasielesky *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares a los del presente estudio con una ganancia de peso de 1.2 g/semana al cultivar camarón con alimentos altos en proteína (35g/kg).

La harina de pescado es considerada un ingrediente esencial en los alimentos formulados para acuicultura por su perfil nutricional, e incluso se ha demostrado que los alimentos comerciales que contienen de 30 a 35% de proteína pueden tener bajas inclusiones de harina de pescado (de 75 a 125g/kg) sin comprometer el crecimiento del camarón (Megahed, 2010). El presente estudio confirma la importancia de los bioflóculos como alimento vivo en términos de supervivencia y crecimiento de camarones peneidos, indicando que la reducción de harina de pescado, así como la inclusión de una mezcla de harinas vegetales no afectó el desarrollo del camarón. No obstante, es importante tener en cuenta la necesidad de balancear adecuadamente las dietas de los organismos con ambas fuentes de alimento para cubrir los requerimientos nutricionales tomando en cuenta que bajo las condiciones de este estudio, los bioflóculos aportaron una mayor diversidad de nutrientes (Viau *et al.*, 2012).

Wasielesky *et al.* (2006) compararon el cultivo de *L. vannamei* bajo condiciones de: a) agua clara, b) agua con alto desarrollo de microorganismos y c) una mezcla de ambas. Sus

resultados mostraron una mejoría en la supervivencia al comparar los organismos en agua con alto desarrollo de microorganismos (76%) contra los del agua clara (38%); en su estudio concluyeron que las bacterias heterótrofas, el fitoplancton y otros microorganismos presentes promovieron un mejor crecimiento.

**Tabla 7.** Parámetros productivos de los juveniles de *L. vannamei* cultivados durante 35 días (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Variable	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Peso inicial (g)	4.8 $\pm$ 0.0	4.7 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.1
Peso final (g)	11.9 $\pm$ 0.8	10.7 $\pm$ 1.0	10.6 $\pm$ 0.1	11.1 $\pm$ 0.5	11.3 $\pm$ 0.9
Ganancia de peso (g)	7.1 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 1.1	5.7 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.7	6.5 $\pm$ 0.9
GPS (g/semana)	1.4 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
TCE (%/día)	2.6 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.2
Supervivencia (%)	100 $\pm$ 0.0	98.3 $\pm$ 2.9	96.7 $\pm$ 5.8	93.3 $\pm$ 5.8	96.7 $\pm$ 2.9
FCA	1.7 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>

GPS: ganancia peso semanal

TCE: tasa de crecimiento específico

FCA: factor de conversión alimenticia

En este mismo sentido, Megahed (2010) reportó que el camarón tiene mejor crecimiento en sistemas con bioflóculos en comparación con los sistemas tradicionales, aun cuando estos utilicen alimento con alto contenido de proteína; estos resultados son explicados por el reciclamiento de nutrientes en el sistema así como por la riqueza nutricional que aportan los microorganismos.

En general, la alta supervivencia confirmó la buena tolerancia de la especie al cultivo a baja salinidad (Maica *et al.*, 2012); así mismo tuvieron una buena respuesta al reemplazo de harina de pescado en el alimento, ya que los parámetros productivos fueron similares entre todas las dietas experimentales, incluido el alimento comercial utilizado como control.

Estos resultados demuestran la posibilidad de sustituir la harina de pescado por una mezcla de harinas vegetales en alimentos diseñados para cultivo de camarón en sistemas de cero o mínimo recambio de agua, siempre y cuando una fuente de alimento natural como los bioflóculos, sea incluida.

### V.3. Carga bacteriana del agua de cultivo

La abundancia de bacterias heterótrofas y nitrificantes al iniciar el experimento (día 1) varió de 6.01 a 6.30 Log UFC/mL para las bacterias heterótrofas, de 7.65 a 7.79 Log UFC/mL para las bacterias nitrificantes y de 2.11 a 3.44 Log UFC/mL para las bacterias tipo *Vibrio* (Tabla 8). Al comparar entre tratamientos no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ).

Por otro lado, al final del bioensayo (día 35) se observó un incremento en la cantidad de bacterias heterótrofas alcanzando promedios de 7.66 a 7.91 Log UFC/mL y en las bacterias nitrificantes con concentraciones de 8.15 a 8.23 Log UFC/mL. En cuanto a las bacterias tipo *Vibrio* se observó una disminución con relación al primer muestreo con valores promedio entre 1.54 y 2.00 Log UFC/mL (Tabla 8). Al comparar entre tratamientos no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ).

Como era esperado, la cantidad de bacterias heterótrofas y nitrificantes incrementaron significativamente entre el inicio y el final del experimento, mientras que, con excepción del tratamiento C, las bacterias tipo *Vibrio* disminuyeron. En general, los valores obtenidos en éste estudio fueron menores a los reportados previamente (Ekasari *et al.*, 2014a). Los estudios relacionados con la abundancia de bacterias en sistemas con bioflóculos son escasos, sin embargo, las tendencias encontradas en el presente estudio coinciden con los reportes de Huerta-Rábago (2014), quien monitoreó un cultivo de tilapia roja en sistema de bioflóculos en agua salada (35‰) y con Cortés-Duarte (2015), quien desarrolló un cultivo de camarón blanco *L. vannamei* en bioflóculos con salinidad de 20‰.

Timmons *et al.* (2002) indican que la temperatura, salinidad, alcalinidad y pH, tienen un efecto altamente significativo en el desarrollo de bacterias en sistemas acuícolas. En este

experimento, se encontraron valores adecuados para el desarrollo de microorganismos, de acuerdo a Ballester *et al.* (2010) y Hagopian y Riley (1998) estas bacterias se desarrollan adecuadamente a temperaturas entre 19.2 y 26.7°C y pH entre 6.4 y 7.8.

**Tabla 8.** Densidad (Log UFC/mL) de bacterias en agua de cultivo al inicio (día 1) y al final (día 35) del experimento con juveniles de *L. vannamei* (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 and 30% de harina de pescado, respectivamente). Sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p>0.05$ ). Los valores son medias  $\pm$  DE de las determinaciones.

	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Inicial (día 1)					
Heterótrofas	6.01 $\pm$ 0.10	6.27 $\pm$ 0.19	6.13 $\pm$ 0.24	6.22 $\pm$ 0.29	6.30 $\pm$ 0.18
Nitrificantes	7.75 $\pm$ 0.14	7.79 $\pm$ 0.08	7.77 $\pm$ 0.15	7.65 $\pm$ 0.12	7.78 $\pm$ 0.07
<i>Vibrio</i>	2.49 $\pm$ 2.16	3.44 $\pm$ 0.29	2.11 $\pm$ 1.82	3.44 $\pm$ 0.29	2.92 $\pm$ 0.13
Final (día 35)					
Heterótrofas	7.66 $\pm$ 0.35	7.75 $\pm$ 0.15	7.85 $\pm$ 0.15	7.91 $\pm$ 0.06	7.90 $\pm$ 0.03
Nitrificantes	8.23 $\pm$ 0.06	8.18 $\pm$ 0.12	8.18 $\pm$ 0.08	8.16 $\pm$ 0.04	8.15 $\pm$ 0.08
<i>Vibrio</i>	2.98 $\pm$ 0.16	2.00 $\pm$ 1.17	1.99 $\pm$ 1.22	1.89 $\pm$ 1.69	1.54 $\pm$ 1.49

UFC: Unidades formadoras de colonias

La disminución de las bacterias tipo *Vibrio* también puede atribuirse a la limitación de nutrientes y exclusión competitiva, efecto similar observado por Haslun *et al.* (2012) y Aguilera-Rivera *et al.* (2014) quienes utilizaron cepas de bacterias probióticas. Por otro lado, Ekasari *et al.* (2014a) también reportaron una inhibición en el crecimiento de bacterias tipo *Vibrio* en cultivo de camarón con bioflóculos.

En el presente estudio, el establecimiento de los microorganismos benéficos (bacterias heterótrofas y nitrificantes) previo a la siembra de organismos fue importante para fomentar el desarrollo de bacterias que ayudaron a prevenir enfermedades en los camarones mediante la inhibición de bacterias tipo *Vibrio*. Además, se ha reportado que altas concentraciones de

bacterias benéficas en el agua de cultivo pueden mejorar el mecanismo de respuesta inmune (Kim *et al.*, 2014). Lo anterior indica que el uso de los bioflóculos puede proteger a los organismos cultivados contra enfermedades causadas por algunos agentes patógenos (Suita *et al.*, 2015).

#### V.4. Determinación de actividad enzimática digestiva

La actividad enzimática digestiva de las postlarvas cultivadas durante 28 días con los alimentos experimentales y comerciales (bioensayo 1) se observa en la Tabla 9. El valor más alto fue para la actividad tipo tripsina y el menor para la lipasa.

La actividad tipo tripsina en el tratamiento 0 fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la del resto de los tratamientos con un valor promedio de 0.718 abs/min/mg proteína. En los tratamientos C y R se obtuvieron las medias más bajas de esta actividad con valores de 0.177 y 0.120 abs/min/mg proteína, respectivamente; éstos fueron significativamente menores a las actividades digestivas del resto de los tratamientos, a excepción de la obtenida en el tratamiento 20.

**Tabla 9.** Actividad enzimática digestiva (abs/min/mg proteína) del hepatopáncreas de las postlarvas de *L. vannamei* cultivadas durante 28 días (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente) y un sistema de recirculación con agua clara como control (tratamiento R). Diferentes letras en la misma fila son diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores son media ( $\pm$  DE).

Actividad enzimática	Tratamiento					
	C	0	10	20	30	R
Tripsina	0.177 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.718 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.323 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.217 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	0.351 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.120 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
Proteasa	0.088 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.181 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.056 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	0.062 $\pm$ 0.00 <sup>bc</sup>	0.049 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.051 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
Amilasa	0.233 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	0.130 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.391 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.122 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.024 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.141 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Lipasa	0.016 $\pm$ 0.003 <sup>ab</sup>	0.025 $\pm$ 0.003 <sup>ab</sup>	0.013 $\pm$ 0.002 <sup>bc</sup>	0.006 $\pm$ 0.005 <sup>c</sup>	0.027 $\pm$ 0.001 <sup>ab</sup>	0.010 $\pm$ 0.00 <sup>bc</sup>

El hecho de que la actividad tipo tripsina resultara significativamente mayor en los organismos que consumieron el alimento sin harina de pescado (tratamiento 0) sugiere que los ingredientes utilizados para sustituirla son menos digeribles, según lo reportado por Pedroza-Islas *et al.* (2004); no obstante, se observó una relación poco clara con relación al contenido de harina de pescado en el alimento y la actividad tipo tripsina.

Becerra-Dórame *et al.* (2012) reportaron una alta actividad tipo tripsina en camarones cultivados con bioflóculos dominados por microorganismos heterotróficos. La presencia de bacterias heterótrofas promueve la actividad enzimática digestiva gracias a las enzimas que estas liberan al medio a través de sustancias poliméricas extracelulares (Xu y Pan, 2012; Xu *et al.*, 2013). Debido a que el cultivo en agua clara (tratamiento R) no contaba con la presencia de bioflóculos como el resto de los tratamientos, los valores de la actividad enzimática digestiva del camarón en este tratamiento fueron menores.

La actividad de las proteasas también fue significativamente diferente entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) con valores de 0.181 abs/min/mg proteína para el tratamiento 0, disminuyendo en el resto de los tratamientos a valores de 0.049 a 0.088 abs/min/mg proteína. Los resultados de Xu y Pan (2012) confirman que el incremento de la razón de C:N en cultivo de camarón de un 15 a 20 puede incrementar la actividad de las proteasas en comparación con cultivos con agua clara.

En cuanto a la actividad de las amilasas, el promedio más alto fue encontrado en el tratamiento 30 con una media de 1.024 abs/min/mg proteína, el cual fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la del resto de los tratamientos, cuyos valores se mantuvieron entre 0.121 y 0.391 abs/min/mg proteína. Becerra-Dórame *et al.* (2012) reportaron valores de 0.21 a 0.28 abs/min/mg proteína, similares a los reportados en los tratamientos 0, 10, 20 y C de este estudio.

En la actividad de las lipasas se observaron valores desde 0.006 hasta 0.027 abs/min/mg proteína, siendo significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos 0, 30 y C, mientras que el tratamiento 20, tuvo el valor más bajo.

No se observó una tendencia clara entre la actividad enzimática digestiva de los organismos y el contenido de harina de pescado o vegetal en los diferentes alimentos, esto puede deberse a que la respuesta digestiva de los organismos estuvo influenciada por otros factores extrínsecos e intrínsecos propios del diseño experimental (Becerra-Dórame *et al.*, 2012).

A pesar de que no se encontraron diferencias entre los tratamientos con diferente contenido de harina de pescado, la actividad enzimática digestiva de los organismos cultivados en bioflóculos fue superior a la de aquellos que se mantuvieron en agua clara (tratamiento R). Los resultados de este estudio confirmaron que los bioflóculos pueden ser capaces de facilitar la digestión y la absorción de nutrientes como se ha mencionado en otros estudios (Xu y Pan, 2012; Xu *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos son consistentes a los reportados por Suita *et al.* (2015) quienes desarrollaron dos experimentos con postlarvas de *L. vannamei* de diferentes edades (PL1-15 y PL16-30) en sistemas de bioflóculos comparándolos con un sistema control (tradicional de agua clara), observando que los túbulos del hepatopáncreas de los organismos cultivados con bioflóculos habían incrementado en grosor y en la cantidad de células productoras de enzimas (células B).

De manera indirecta se demostró que los microorganismos que conforman los bioflóculos son capaces de mejorar la fisiología digestiva de los camarones. Por otro lado, los microorganismos presentes en los tratamientos (bacterias, hongos, protozoarios) fueron altamente eficientes para consumir y digerir los restos de proteína de los alimentos, indistintamente de su origen (animal o vegetal).

#### **V.5. Composición química proximal**

La composición proximal de los bioflóculos desarrollados en el bioensayo con juveniles se determinó al finalizar el cultivo experimental y presentó un alto contenido de proteína (464-544 g/kg) y bajo contenido de lípidos (5-8 g/kg), sin diferencia significativa entre tratamientos ( $p>0.05$ ) (Tabla 10).

Los valores de proteína cruda fueron mayores a los previamente reportados (Emerenciano *et al.*, 2011; Xu y Pan, 2012; Xu y Pan, 2014), este resultado puede ser a causa de la baja salinidad en el cultivo, condiciones en las que los microorganismos tienden a acumular menor cantidad de minerales (Maicá *et al.*, 2012). El contenido de lípidos es menor al reportado por Xu y Pan, (2012) y Xu y Pan (2014), pero similar a lo reportado por Ballester *et al.* (2010) y Emerenciano *et al.* (2011).

**Tabla 10.** Composición proximal (base seca) de los bioflóculos al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Proteína cruda (g/kg)	501 $\pm$ 41	464 $\pm$ 83	544 $\pm$ 55	499 $\pm$ 92	492 $\pm$ 35
Carbohidratos (g/kg)	199 $\pm$ 22	174 $\pm$ 29	196 $\pm$ 27	201 $\pm$ 23	169 $\pm$ 33
Lípidos (g/kg)	8 $\pm$ 4	8 $\pm$ 5	5 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 4
Cenizas (g/kg)	262 $\pm$ 16 <sup>ab</sup>	289 $\pm$ 31 <sup>bc</sup>	243 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	238 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	305 $\pm$ 6 <sup>c</sup>
Fibra (g/kg)	17 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	9 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 3 <sup>a</sup>

Un perfil con alto contenido de proteína y bajo contenido de lípidos, es típico de los consorcios dominados por bacterias (Becerra-Dórame *et al.*, 2011). En el presente estudio, bajo los resultados de composición proximal de los bioflóculos y las condiciones de cultivo que prevalecieron (baja salinidad, razón C:N y poca iluminación) permiten inferir que los bioflóculos estuvieron compuestos en gran parte por biomasa bacteriana y en menor proporción por organismos fotoautótrofos, ya que el contenido de clorofila-a fue bajo.

El contenido de harina de pescado en los alimentos no se tradujo en un cambio significativo en el contenido de proteína en los bioflóculos. Esta observación fue reportada previamente por López-Elías *et al.* (2015) en un cultivo de tilapia con diferente contenido de harina de pescado en el alimento.

Se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de cenizas y de fibra. El contenido de cenizas fue significativamente más alto en el tratamiento 30 (305 g/kg) y más

bajo en el tratamiento 20 (238 g/kg). En cuanto al contenido de fibra, éste fue más alto en el tratamiento C (17 g/kg), mientras que el resto de los tratamientos estuvo entre 5 y 9 g/kg (Tabla 10), sin diferencia entre los alimentos experimentales.

Las diferencias del contenido de cenizas y fibra no mostraron una tendencia clara en relación con el contenido de harina de pescado en el alimento. En el presente estudio, el contenido de cenizas fue menor el reportado por Xu y Pan (2014) donde las concentraciones variaron de 400 a 600 g/kg. Sin embargo, los cultivos con baja salinidad suelen tener menor cantidad de cenizas, de acuerdo a lo reportado por Maicá *et al.* (2012) quienes determinaron niveles de 260 g/kg en un cultivo con salinidad de 4‰, condiciones salinas similares a las del presente estudio.

El contenido de fibra de los bioflóculos (5-17 g/kg) fue menor a los valores previamente reportados por Suárez *et al.* (2009), quienes reportaron valores entre 18 y 35 g/kg. En el caso de los alimentos experimentales utilizados en el presente estudio, la variación puede deberse al contenido de harinas vegetales en la formulación. Entre los tratamientos, el control (C) fue el que obtuvo mayor contenido de fibra, asociado al alto contenido de SST en la columna de agua, probablemente porque la fibra funcionó como un sustrato de adhesión para los microorganismos.

Por otro lado, la composición proximal del músculo del camarón no fue significativamente diferente en términos de proteína cruda, carbohidratos, lípidos y cenizas (Tabla 11).

**Tabla 11.** Composición proximal (base seca) del músculo de juveniles de *L. vannamei* al final (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Proteína cruda (g/kg)	481 $\pm$ 39	482 $\pm$ 36	489 $\pm$ 40	508 $\pm$ 38	498 $\pm$ 26
Carbohidratos (g/kg)	399 $\pm$ 47	400 $\pm$ 32	405 $\pm$ 35	383 $\pm$ 63	410 $\pm$ 31
Lípidos (g/kg)	56 $\pm$ 13	41 $\pm$ 14	40 $\pm$ 9	42 $\pm$ 8	35 $\pm$ 4
Cenizas (g/kg)	56 $\pm$ 4	64 $\pm$ 14	57 $\pm$ 4	58 $\pm$ 4	52 $\pm$ 4
Fibra (g/kg)	9 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	14 $\pm$ 5 <sup>c</sup>	9 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	4 $\pm$ 4 <sup>a</sup>

López-Tarín (2011) evaluó el efecto de los bioflóculos como complemento de un alimento comercial en crecimiento, supervivencia y FCA del camarón blanco, sus tratamientos consistieron en disminuir la ración del alimento en 0, 15, 30 y 45% complementándolo con bioflóculos; el contenido de proteína en el tejido de camarón se mantuvo entre 740 y 780 g/kg. Wasielesky *et al.* (2006) reportaron un contenido de 780 g/kg de proteína cruda en camarón blanco cultivado con bioflóculos y alimento con 35% de proteína cruda. Por otro lado, Yun *et al.* (2015) reportaron niveles de 800 g/kg de proteína en el músculo de camarón blanco cultivado con bioflóculos y alimento peletizado con 25 y 40% de proteína cruda. En el presente estudio se obtuvieron niveles inferiores con un intervalo de 481 a 508 g/kg sin diferencias significativas entre tratamientos.

Los lípidos y los carbohidratos son compuestos de reserva energética. Se esperaba observar diferencia entre los organismos alimentados con distinta cantidad de harina de pescado; sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos. En cuanto al contenido de lípidos, López-Tarín (2011) reportó niveles de entre 7.4 y 10 g/kg, mientras que Yun *et al.*, (2015) reportaron concentraciones de lípidos de 6.8 a 10.6 g/kg. En el presente estudio el intervalo obtenido varió de 35 a 56 g/kg, el cual es similar al reportado por Wasielesky *et al.*, (2006) quienes reportaron niveles de lípidos de 65 g/kg para *L. vannamei* cultivado con bioflóculos y 35% de proteína en el alimento.

Respecto al contenido de cenizas, López-Tarín (2011) reportó niveles de entre 124 y 145 g/kg con el mismo contenido de proteína en el alimento, las cuales fueron similares a las concentraciones reportadas por Yun *et al.* (2015) con valores entre 123 y 135 g/kg. Los niveles obtenidos en el presente estudio fueron similares a los de Ezquerria-Brauer *et al.*, (2004) quienes reportaron niveles de 56 a 59 g/kg para camarón blanco. Cabe mencionar que las comparaciones de estudios previos corresponden a cultivos de camarón blanco a una salinidad de 35‰ mientras que el presente estudio se realizó a 5‰.

La relación de macromoléculas del tejido analizado se mantuvo de acuerdo a lo esperado, siendo proteína la que tuvo mayor concentración, seguida de carbohidratos y por último los lípidos. Los resultados indican que la sustitución de harina de pescado por harinas

vegetales en los alimentos para el camarón en un sistema de cultivo con bioflóculos no tuvo influencia sobre dicha composición.

#### **V.6. Perfil de aminoácidos**

El perfil de aminoácidos en los alimentos se describe en la Tabla 12, en ella aparecen separados como esenciales y no esenciales de acuerdo a los requerimientos nutricionales de *L. vannamei* según el Consejo Nacional de Investigación (National Research Council, 2011).

Los aminoácidos de mayor concentración fueron el ácido glutámico, que varió de 5.73 a 8.25 g/100g y el ácido aspártico cuyos valores estuvieron entre 2.52 y 4.08 g/100g, en los tratamientos C y 30. En general, se observó una tendencia de incremento del contenido de los aminoácidos esenciales al aumentar el contenido de harina de pescado en los alimentos, probablemente debido a la diversidad de nutrientes.

El perfil de aminoácidos en los bioflóculos también reveló una alta concentración de ácido glutámico (4.18 a 7.85 g/100g; tratamiento 0 y 20) y de ácido aspártico (de 2.87 hasta 5.33 g/100g; tratamiento C y 20). En general, los bioflóculos desarrollados en los tratamientos C y 0 tuvieron menores niveles de aminoácidos esenciales (Tabla 13).

**Tabla 12.** Aminoácidos totales en alimento para camarón (g/100g muestra) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Aminoácidos	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
<b>No esenciales</b>					
Alanina	1.29 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.15 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.39 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.60 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	2.18 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>
Ácido aspártico	2.52 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	3.43 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	3.50 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	3.47 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	4.08 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>
Asparagina	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.02 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
Ácido glutámico	5.73 $\pm$ 0.92	7.07 $\pm$ 0.52	7.41 $\pm$ 0.19	7.26 $\pm$ 0.20	8.25 $\pm$ 2.40
Glutamina	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
Glicina	1.59 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>	1.29 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.58 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.75 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	2.26 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>
Prolina	1.11 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>	1.58 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	1.15 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>
Hidroxiprolina	ND	ND	ND	ND	ND
Serina	0.88 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	1.10 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.13 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	1.49 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>
Taurina	0.03 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.02
Tirosina	0.63 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	1.05 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	1.48 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>
<b>Esenciales</b>					
Arginina	2.20 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	2.73 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	2.88 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	2.84 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	3.37 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>
Histidina	0.81 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.97 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	1.08 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.15 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.43 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>
Isoleucina	1.04 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.36 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	1.51 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	1.57 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	1.87 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>
Leucina	1.97 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	2.35 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	2.57 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	2.67 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	3.44 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>
Lisina	2.45 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.31 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.83 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	3.11 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	4.22 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>
Metionina	0.42 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>
Fenilalanina	1.05 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	1.57 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	1.59 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	1.89 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>
Treonina	0.92 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	1.16 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	1.56 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>
Valina	1.29 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.46 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	1.63 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	1.72 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	2.11 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>
<b>Total</b>					
AANE	13.87 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup>	16.35 $\pm$ 1.37 <sup>ab</sup>	17.67 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	17.50 $\pm$ 0.38 <sup>ab</sup>	21.53 $\pm$ 5.71 <sup>b</sup>
AAE	12.18 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup>	13.80 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	15.55 $\pm$ 0.35 <sup>ab</sup>	16.38 $\pm$ 0.79 <sup>ab</sup>	20.78 $\pm$ 6.47 <sup>b</sup>

Media  $\pm$  DE; ND= no detectado; AANE= aminoácidos no esenciales; AA= aminoácidos esenciales.

**Tabla 13.** Aminoácidos totales en bioflóculos (g/100g muestra) al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Aminoácidos	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
<b>No esenciales</b>					
Alanina	1.78 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.84 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	2.31 $\pm$ 0.56 <sup>ab</sup>	3.52 $\pm$ 1.03 <sup>c</sup>	2.88 $\pm$ 0.40 <sup>bc</sup>
Ácido aspártico	2.87 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	3.00 $\pm$ 0.67 <sup>ab</sup>	3.61 $\pm$ 0.85 <sup>ab</sup>	5.33 $\pm$ 1.51 <sup>c</sup>	4.48 $\pm$ 0.58 <sup>bc</sup>
Asparagina	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Ácido glutámico	4.29 $\pm$ 0.46	4.18 $\pm$ 0.45	5.08 $\pm$ 0.92	7.85 $\pm$ 2.31	6.42 $\pm$ 0.56
Glutamina	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Glicina	1.89 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.86 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	2.35 $\pm$ 0.61 <sup>ab</sup>	3.69 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup>	3.07 $\pm$ 0.38 <sup>bc</sup>
Prolina	0.88 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	0.53 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.45 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	0.46 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	0.33 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
Hidroxiprolina	ND	ND	ND	ND	ND
Serina	0.88 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.19 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	1.37 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>
Taurina	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Tirosina	0.87 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.95 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>	1.35 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup>
<b>Esenciales</b>					
Arginina	1.69 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.71 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.52 <sup>ab</sup>	3.37 $\pm$ 0.99 <sup>c</sup>	2.81 $\pm$ 0.35 <sup>bc</sup>
Histidina	0.69 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.67 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.48 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	1.13 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>
Isoleucina	1.24 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.54 $\pm$ 0.48 <sup>ab</sup>	2.61 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>	2.10 $\pm$ 0.28 <sup>bc</sup>
Leucina	1.93 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	2.47 $\pm$ 0.62 <sup>ab</sup>	4.00 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	3.25 $\pm$ 0.42 <sup>bc</sup>
Lisina	1.45 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.40 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.79 $\pm$ 0.44 <sup>ab</sup>	3.12 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	2.51 $\pm$ 0.28 <sup>bc</sup>
Metionina	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	1.00 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	0.77 $\pm$ 0.14 <sup>bc</sup>
Fenilalanina	1.31 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.53 <sup>ab</sup>	2.94 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	2.32 $\pm$ 0.38 <sup>bc</sup>
Treonina	1.29 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	1.65 $\pm$ 0.40 <sup>ab</sup>	2.70 $\pm$ 0.82 <sup>c</sup>	2.10 $\pm$ 0.37 <sup>bc</sup>
Valina	1.62 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	1.70 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	2.02 $\pm$ 0.59 <sup>ab</sup>	3.24 $\pm$ 0.96 <sup>c</sup>	2.63 $\pm$ 0.34 <sup>bc</sup>
<b>Total</b>					
AANE	13.48 $\pm$ 1.81 <sup>ab</sup>	13.21 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>	16.18 $\pm$ 3.27 <sup>ab</sup>	24.61 $\pm$ 7.24 <sup>c</sup>	19.93 $\pm$ 2.75 <sup>bc</sup>
AAE	11.69 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	11.77 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>	14.84 $\pm$ 3.96 <sup>ab</sup>	24.49 $\pm$ 7.39 <sup>c</sup>	19.66 $\pm$ 2.82 <sup>bc</sup>

Media  $\pm$  DE; ND= no detectado; AANE= aminoácidos no esenciales; AAE= aminoácidos esenciales.

Las concentraciones de aminoácidos esenciales totales de los alimentos y bioflóculos fueron muy similares a los valores previamente reportados para alimento comercial (Ju *et al.*, 2008b), así como en alimentos experimentales con harina de bioflóculos (Kuhn *et al.*, 2010; Bauer *et al.*, 2012), lo mismo ocurrió en estudios relacionados con la inclusión de harinas vegetales para sustitución de harina de pescado (Jatobá *et al.*, 2014).

En el presente estudio se obtuvieron concentraciones bajas en el contenido de treonina y metionina en ambas fuentes de alimento (formulado y bioflóculos); esta observación se había hecho previamente por Ekasari *et al.* (2014b) y se debe probablemente a que la harina de soya suele tener bajas concentraciones de dichos aminoácidos (Suárez *et al.*, 2009). El contenido de ambos aminoácidos en las muestras tuvo un incremento directamente proporcional al del contenido de harina de pescado en los alimentos, sin embargo, el alimento comercial usado como control (tratamiento C) también mostró una deficiencia de estos aminoácidos y únicamente el alimento con mayor contenido de harina de pescado (tratamiento 30) estuvo cercano a cumplir los requerimientos dietarios del camarón.

Por otra parte, las limitaciones de metionina y treonina en la dieta del camarón pueden causar lento crecimiento y bajo FCA (National Research Council, 2009); sin embargo los resultados de los organismos cultivados no reflejaron estos efectos, probablemente porque los requerimientos nutricionales fueron cubiertos al consumir alimento formulado y bioflóculos.

En cuanto a las muestras de tejido de camarón los resultados no mostraron una tendencia clara en el contenido de aminoácidos y la cantidad de harina de pescado en los alimentos, como lo hicieron el alimento y los bioflóculos. El contenido total de aminoácidos no esenciales varió de 20.12 a 23.09 g/100g con altas concentraciones de ácido glutámico (6.83 a 7.37 g/100g) y ácido aspártico (3.81 a 4.36 g/100g), mientras que el contenido total de aminoácidos esenciales fue desde 14.39 hasta 17.44 g/100g, con altas concentraciones de lisina (3.75 a 4.36 g/100g) (Tabla 14).

Los resultados obtenidos indican que en los sistemas con bioflóculos es posible reemplazar la harina de pescado por una mezcla de harinas vegetales sin afectar el balance de aminoácidos esenciales. La evidencia de este estudio y de otros previos han demostrado que el

cultivo de camarón en bioflóculos es una estrategia benéfica para producir biomasa de alta calidad además de aprovechar otros beneficios como la optimización de recursos y la mejora de la calidad del agua (Silva *et al.*, 2013; Martínez-Córdova *et al.*, 2015).

El análisis del A/E mostró que todos los alimentos experimentales carecían de lisina, mientras que el tratamiento 20 y 30 mostraron una deficiencia de arginina y los tratamientos 0 y 10 tuvieron bajos contenidos de metionina (Tabla 15) de acuerdo a las estimaciones hechas por Bauer *et al.* (2012). El cálculo del A/E indica un bajo contenido de arginina y lisina en ambas fuentes de alimento (formulado y bioflóculos), mientras que el contenido de metionina fue bajo en los alimentos 0 y 10.

El valor del IAAE en los alimentos fue superior a 0.90 en todos los tratamientos a excepción del tratamiento 0 (Tabla 15). Por otro lado, el IAAE de los bioflóculos se muestra en la Tabla 16 y de manera similar al IAAE de los alimentos, estos tuvieron un contenido promedio superior a 0.87 en todos los tratamientos, esto se debe principalmente a la habilidad de ciertos microorganismos para llevar a cabo la biosíntesis de los 20 aminoácidos primarios (National Research Council, 2009). Ekasari *et al.* (2014b) indica que los valores de IAAE de los alimentos formulados complementado con los de los bioflóculos, alcanzan niveles adecuados para la nutrición del camarón, pero esto debe ser comprobado mediante una estimación del consumo de ambos alimentos.

En general, independientemente del contenido de harina de pescado en el alimento (de 0 hasta 30%) el perfil de aminoácidos esenciales del alimento, bioflóculos y tejido de camarón no mostró diferencias significativas.

**Tabla 14.** Aminoácidos totales en músculo de juveniles de *L. vannamei* (g/100g muestra) al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Aminoácidos	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
<b>No esenciales</b>					
Alanina	1.94 $\pm$ 0.10	1.95 $\pm$ 0.07	2.28 $\pm$ 0.13	2.26 $\pm$ 0.53	1.96 $\pm$ 0.12
Ácido aspártico	4.09 $\pm$ 0.24	4.23 $\pm$ 0.10	4.36 $\pm$ 0.18	4.19 $\pm$ 1.19	3.81 $\pm$ 0.31
Asparagina	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
Ácido glutámico	7.18 $\pm$ 0.33	7.21 $\pm$ 0.15	7.37 $\pm$ 0.36	7.09 $\pm$ 2.33	6.83 $\pm$ 0.67
Glutamina	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Glicina	3.44 $\pm$ 0.28	3.50 $\pm$ 0.19	3.57 $\pm$ 0.45	3.54 $\pm$ 1.34	3.43 $\pm$ 0.55
Prolina	3.46 $\pm$ 0.46	2.53 $\pm$ 0.47	3.30 $\pm$ 1.07	2.73 $\pm$ 0.69	2.31 $\pm$ 0.34
Hidroxiprolina	ND	ND	ND	ND	ND
Serina	1.13 $\pm$ 0.07	1.15 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.15	1.29 $\pm$ 0.37	1.09 $\pm$ 0.08
Taurina	0.03 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02
Tirosina	0.73 $\pm$ 0.21	0.74 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.29	0.95 $\pm$ 0.45	0.63 $\pm$ 0.03
<b>Esenciales</b>					
Arginina	3.57 $\pm$ 0.28	3.78 $\pm$ 0.09	4.05 $\pm$ 0.31	3.95 $\pm$ 1.20	3.38 $\pm$ 0.37
Histidina	0.87 $\pm$ 0.10	0.86 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.14	0.94 $\pm$ 0.27	0.69 $\pm$ 0.05
Isoleucina	1.12 $\pm$ 0.14	1.08 $\pm$ 0.02	1.15 $\pm$ 0.14	1.12 $\pm$ 0.45	0.86 $\pm$ 0.04
Leucina	2.76 $\pm$ 0.20	2.74 $\pm$ 0.04	2.85 $\pm$ 0.24	2.81 $\pm$ 0.89	2.49 $\pm$ 0.20
Lisina	4.14 $\pm$ 0.29	4.21 $\pm$ 0.13	4.36 $\pm$ 0.48	4.24 $\pm$ 1.68	3.75 $\pm$ 0.37
Metionina	0.60 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.10	0.58 $\pm$ 0.35	0.44 $\pm$ 0.07
Fenilalanina	0.95 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	0.92 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.00 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	0.70 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Treonina	0.98 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.15	1.07 $\pm$ 0.35	0.91 $\pm$ 0.05
Valina	1.39 $\pm$ 0.13	1.35 $\pm$ 0.04	1.40 $\pm$ 0.12	1.43 $\pm$ 0.33	1.14 $\pm$ 0.05
<b>Total</b>					
AANE	22.07 $\pm$ 1.54	21.42 $\pm$ 0.73	23.09 $\pm$ 2.34	22.16 $\pm$ 6.73	20.13 $\pm$ 1.87
AAE	16.41 $\pm$ 1.45	16.55 $\pm$ 0.45	17.44 $\pm$ 1.82	17.20 $\pm$ 5.84	14.39 $\pm$ 1.24

Media  $\pm$  DE; ND= no detectado; AANE= aminoácidos no esenciales; AA= aminoácidos esenciales.

**Tabla 15.** Razón de aminoácidos esenciales (A/E) e índice de aminoácidos esenciales (IAAE) en alimento para camarón (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente).

A/E	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Arginina	0.83	0.87	0.80	0.76	0.69
Histidina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Isoleucina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Leucina	0.96	1.00	1.00	1.00	0.95
Lisina	0.80	0.66	0.73	0.77	0.78
Metionina	0.95	0.49	0.69	0.96	1.00
Fenilalanina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Treonina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Valina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
IAAE	0.95	0.87	0.90	0.94	0.93

**Tabla 16.** Razón de aminoácidos esenciales (A/E) e índice de aminoácidos esenciales (IAAE) en bioflóculos al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente).

A/E	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
Arginina	0.67	0.64	0.63	0.60	0.61
Histidina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Isoleucina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Leucina	0.98	1.00	1.00	1.00	0.95
Lisina	0.49	0.47	0.49	0.52	0.49
Metionina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Fenilalanina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Treonina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Valina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
IAAE	0.88	0.87	0.88	0.93	0.87

## V.7. Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos que componen los alimentos se muestra en la Tabla 17, y se ha clasificado en ácidos grasos esenciales y no esenciales de acuerdo a los requerimientos nutricionales de *L. vannamei* (Glencross, 2009; National Research Council, 2011).

El componente no esencial más abundante fue el C16:0 (ácido palmítico) con valores de 24.11 a 27.84% (tratamientos 10 y C, respectivamente) y el 18:1-cis(n-9) (ácido oleico) con valores entre 11.98 y 13.84% (tratamientos 10 y 30, respectivamente). En cuanto a los ácidos grasos esenciales en los alimentos, el 18:2-cis(n-6) (ácido linoleico) fue el más abundante en todos los tratamientos con un amplio rango de 10.98 a 25.44% (tratamiento C y 0, respectivamente), seguido del 20:5(n-3) (ácido eicosapentaenoico) con valores de 5.70 a 9.09% (tratamiento 30 y C).

El alto contenido de n-6 y bajo contenido de n-3 en el tratamiento 0 es una respuesta que se esperaba a causa de la sustitución total de harina de pescado en este alimento. Como consecuencia, la ausencia de harina de pescado causó un bajo valor en la ración de n-3/n-6 en este mismo tratamiento. Sin embargo, los valores promedio obtenidos en los diferentes tratamientos (de 0.56 a 1.23) son similares a las raciones evaluadas en dietas experimentales por González-Félix *et al.* (2009), quienes reportaron que dichas variaciones no afectan negativamente el crecimiento del camarón.

El contenido de ácidos grasos en los bioflóculos (Tabla 18) también mostró un alto contenido de C16:0 con valores de 29.80 a 34.95%, seguido por el 16:1 (ácido palmitoleico) con un intervalo de 11.52 a 17.39%. Los ácidos grasos esenciales fueron representados en su mayoría por el 18:2-cis(n-6) desde 5.28 hasta 7.29% y el 20:5(n-3) de 3.69 a 4.28%.

El perfil de ácidos grasos de los bioflóculos tuvo un contenido de C16:0, 16:1 y 18:2(n-6) similar a los valores previamente reportados Tacon *et al.* (2002) y Ekasari *et al.* (2010). Así mismo, el contenido de C16:0 fue similar a lo reportado por Martins *et al.* (2014) en su análisis de ácidos grasos de bioflóculos, pero con menor contenido de C20:5 que en el presente estudio.

Respecto a la razón de n-3/n-6 en los bioflóculos, los valores son similares a los reportados por Emerenciano *et al.* (2013b), sin evidencia de que el contenido de harina de pescado en los alimentos haya provocado diferencias en la composición de ácidos grasos de los bioflóculos.

Se ha reportado que las harinas vegetales carecen de ácidos grasos esenciales de cadena larga (Asiedu *et al.*, 1993; Glew *et al.*, 1997) en comparación con la harina y aceite de pescado. En este sentido, dentro de los bioflóculos, existen fuentes de ácidos grasos que pudieran proveerlos; es sabido que las algas se han reportado con alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) (Patnaik *et al.*, 2006). En el presente experimento se demostró que el buen perfil de ácidos grasos de los bioflóculos pudiera complementar la deficiencia de algunos alimentos y contribuir a satisfacer los requerimientos del camarón.

En el perfil de ácidos grasos en el camarón (Tabla 19) mostró que el componente más abundante fue el C16:0 con valores de 21.18 a 23.85%, pero además fueron ricos en contenido de 18:1-cis(n-9) (ácido oleico) con un intervalo desde 12.81 hasta 14.85%. Los ácidos grasos esenciales estuvieron compuestos mayormente por ácido eicosapentaenoico 20:5(n-3) con niveles de 14.70 a 16.44% y el ácido linoleico 18:2-cis(n-6) con un intervalo de 12.02 a 15.33%. Los perfiles de ácidos grasos del camarón no estuvieron afectados por el contenido de harina de pescado en los alimentos experimentales. Los valores son similares a los reportados por Lim *et al.* (1997) quienes cultivaron *L. vannamei* alimentado con dietas que tuvieron varios niveles de aceite de pescado.

Las relaciones de n-3/n-6 variaron entre los alimento (0.53 a 1.23) y los bioflóculos (0.46 a 0.93) (Tabla 17 y 18), sin una relación directa con el contenido de harina de pescado en los alimentos. Cabe destacar que, a pesar de las variaciones observadas en el valor de n-3/n-6 de los alimentos (formulado y vivo), este parámetro se comportó de manera muy uniforme en las muestras del camarón, con valores de 1.23 a 1.58. A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, otros autores reportan diferencias en los perfiles de ácidos grasos de camarón cultivado con distintas fuentes lipídicas (Zhou *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 1997), lo cual puede deberse a variaciones en el experimento, ya que en el presente se contó con alimento formulado así como bioflóculos, esta condición pudo haber cubierto dicho efecto.

**Tabla 17.** Ácidos grasos (como % lípidos) en el alimento para camarón (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Ácidos grasos	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
<b>No esenciales</b>					
C8:0	ND	0.06 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02
C10:0	ND	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C12:0	0.32 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C13:0	ND	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C14:0	7.42 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	6.08 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	6.67 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	6.68 $\pm$ 0.46 <sup>ab</sup>	5.79 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>
C14:1	ND	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C15:0	0.68 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.60 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>
C16:0	27.84 $\pm$ 0.18	25.14 $\pm$ 2.35	24.11 $\pm$ 1.15	24.16 $\pm$ 1.51	27.11 $\pm$ 1.58
C16:1	7.47 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	6.55 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	7.11 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	7.26 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	4.61 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>
C17:0	1.37 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.22 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	1.23 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	1.22 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>
C17:1	0.77 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.69 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.79 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.80 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
C18:0	6.43 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	5.47 $\pm$ 0.60 <sup>ab</sup>	5.05 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	5.16 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	7.05 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>
C18:1-trans(n-9)	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	ND	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	ND
C18:1-cis(n-9)	12.87 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	13.69 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	11.98 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	12.86 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	13.84 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>
C18:2-trans(n-6)	0.48 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	ND
C18:3-trans(n-3)	0.37 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C20:0	0.59 $\pm$ 0.18	0.55 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.11	0.54 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.29
C20:1(n-9)	1.70 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.24 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C20:2(n-6)	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
C21:0	ND	0.11 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.08 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C20:3(n-6)	0.43 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
C20:3(n-3)	ND	0.12 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.05 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
C22:0	0.41 $\pm$ 0.17	0.30 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.06
C22:1(n-9)	0.35 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.07 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C23:0	ND	0.12 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.00
C24:0	ND	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.25 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
C24:1(n-9)	0.64 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>Esenciales</b>					

C18:2-cis(n-6)	10.98 ± 0.22 <sup>a</sup>	25.44 ± 2.35 <sup>c</sup>	20.90 ± 0.38 <sup>bc</sup>	21.34 ± 1.28 <sup>bc</sup>	20.11 ± 2.74 <sup>b</sup>
C18:3-cis(n-3)	1.36 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.97 ± 0.30 <sup>c</sup>	2.54 ± 0.03 <sup>bc</sup>	2.25 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.18 <sup>a</sup>
C20:4(n-6)	1.07 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.45 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.14 <sup>a</sup>
C20:5(n-3)	9.09 ± 0.29 <sup>c</sup>	7.53 ± 0.52 <sup>b</sup>	8.69 ± 0.10 <sup>bc</sup>	9.03 ± 0.52 <sup>c</sup>	5.70 ± 0.70 <sup>a</sup>
C22:6(n-3)	6.41 ± 0.14 <sup>bc</sup>	4.48 ± 0.31 <sup>a</sup>	6.11 ± 0.12 <sup>b</sup>	7.31 ± 0.40 <sup>c</sup>	5.53 ± 0.68 <sup>b</sup>
Total n-3	16.86 ± 0.23 <sup>bc</sup>	15.10 ± 1.12 <sup>ab</sup>	17.39 ± 0.26 <sup>bc</sup>	18.67 ± 1.05 <sup>c</sup>	12.69 ± 1.53 <sup>a</sup>
Total n-6	13.75 ± 0.38 <sup>a</sup>	27.14 ± 2.54 <sup>c</sup>	22.71 ± 0.47 <sup>bc</sup>	23.47 ± 1.41 <sup>bc</sup>	21.52 ± 2.68 <sup>b</sup>
n-3/n-6	1.23 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.56 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.00 <sup>a</sup>

---

Medias ± DE; ND= no detectado

**Tabla 18.** Ácidos grasos (como % lípidos) en los bioflóculos al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Ácidos grasos	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
<b>No esenciales</b>					
C12:0	0.29 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.05
C14:0	6.62 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>	6.03 $\pm$ 1.59 <sup>bc</sup>	4.83 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	5.06 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>	4.23 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
C14:1	0.24 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.41 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	0.32 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.28 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>
C15:0	1.40 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.71 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	1.48 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
C16:0	34.95 $\pm$ 2.23 <sup>b</sup>	31.09 $\pm$ 2.29 <sup>ab</sup>	31.15 $\pm$ 4.99 <sup>ab</sup>	29.80 $\pm$ 3.57 <sup>a</sup>	31.85 $\pm$ 3.98 <sup>ab</sup>
C16:1	11.52 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	17.39 $\pm$ 2.74 <sup>b</sup>	12.96 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>	12.26 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	11.87 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>
C17:0	1.76 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	1.54 $\pm$ 0.59 <sup>bc</sup>	1.49 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.53 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	1.72 $\pm$ 0.09 <sup>bc</sup>
C18:0	8.66 $\pm$ 1.24	6.99 $\pm$ 1.15	7.70 $\pm$ 1.88	7.80 $\pm$ 0.65	7.90 $\pm$ 1.33
C18:1-trans(n-9)	0.38 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	0.93 $\pm$ 0.80 <sup>bc</sup>	1.13 $\pm$ 0.53 <sup>c</sup>	0.42 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
C18:1-cis(n-9)	10.73 $\pm$ 1.62 <sup>b</sup>	9.47 $\pm$ 0.87 <sup>ab</sup>	7.84 $\pm$ 2.72 <sup>a</sup>	10.43 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	10.39 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>
C18:2-trans(n-6)	0.29 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.41 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	0.40 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	0.40 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>
C20:0	0.94 $\pm$ 0.11	0.88 $\pm$ 0.10	1.03 $\pm$ 0.41	0.98 $\pm$ 0.09	0.87 $\pm$ 0.09
C20:1(n-9)	1.10 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
C20:2(n-6)	0.55 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>	0.66 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	0.50 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>
C21:0	0.81 $\pm$ 0.44 <sup>ab</sup>	0.48 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	0.97 $\pm$ 0.39 <sup>ab</sup>	0.68 $\pm$ 0.46 <sup>ab</sup>
C20:3(n-6)	0.40 $\pm$ 0.17	0.80 $\pm$ 0.69	0.64 $\pm$ 0.38	0.51 $\pm$ 0.22	0.74 $\pm$ 0.25
C22:0	1.49 $\pm$ 0.72	1.14 $\pm$ 0.27	0.95 $\pm$ 0.16	1.25 $\pm$ 0.43	1.03 $\pm$ 0.46
C23:0	1.04 $\pm$ 0.52	0.67 $\pm$ 0.36	0.48 $\pm$ 0.27	0.58 $\pm$ 0.20	0.43 $\pm$ 0.18
C24:0	0.94 $\pm$ 0.48	0.72 $\pm$ 0.20	0.85 $\pm$ 0.53	0.61 $\pm$ 0.15	0.75 $\pm$ 0.18
<b>Esenciales</b>					
C18:2-cis(n-6)	5.36 $\pm$ 1.18 <sup>ab</sup>	7.29 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>	5.28 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	6.68 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>	6.49 $\pm$ 1.99 <sup>ab</sup>
C18:3-cis(n-3)	0.52 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	0.66 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	0.61 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
C20:4(n-6)	1.85 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	3.06 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	2.28 $\pm$ 0.97 <sup>ab</sup>	1.64 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.24 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>
C20:5(n-3)	4.28 $\pm$ 1.14	4.14 $\pm$ 1.47	3.70 $\pm$ 1.15	3.69 $\pm$ 0.84	3.92 $\pm$ 1.24
C22:6(n-3)	2.99 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	0.92 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	2.45 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>	3.04 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	3.53 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>
Total n-3	7.79 $\pm$ 1.33	5.72 $\pm$ 1.85	6.72 $\pm$ 1.40	7.35 $\pm$ 1.68	7.87 $\pm$ 2.50
Total n-6	8.44 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	12.26 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>	8.98 $\pm$ 2.60 <sup>a</sup>	9.68 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	10.37 $\pm$ 2.46 <sup>ab</sup>
n-3/n-6	0.93 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.46 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	0.75 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.75 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>

Medias  $\pm$  DE; ND= no detectado

**Tabla 19.** Ácidos grasos (como % lípidos) en músculo de juveniles de *L. vannamei* de camarón al final del experimento (día 35) (C= alimento comercial; 0, 10, 20 y 30 alimentos experimentales con 0, 10, 20 y 30% de harina de pescado, respectivamente). Medias  $\pm$  DE con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Ácidos grasos	Tratamiento				
	C	0	10	20	30
<b>No esenciales</b>					
C14:0	0.48 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.16	0.52 $\pm$ 0.09	0.50 $\pm$ 0.11	0.44 $\pm$ 0.05
C15:0	0.28 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.10	0.28 $\pm$ 0.02
C16:0	22.24 $\pm$ 1.62	21.18 $\pm$ 2.00	23.85 $\pm$ 4.98	21.21 $\pm$ 1.24	21.25 $\pm$ 1.42
C16:1	1.75 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	1.33 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	1.52 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>	1.56 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>	1.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
C17:0	1.34 $\pm$ 0.11	1.38 $\pm$ 0.12	1.45 $\pm$ 0.26	1.44 $\pm$ 0.24	1.34 $\pm$ 0.09
C18:0	14.31 $\pm$ 1.41 <sup>ab</sup>	14.49 $\pm$ 1.55 <sup>ab</sup>	16.35 $\pm$ 2.45 <sup>b</sup>	13.47 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>	13.87 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>
C18:1-trans(n-9)	0.24 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	0.39 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	ND	ND
C18:1-cis(n-9)	14.85 $\pm$ 1.73	13.43 $\pm$ 0.88	12.81 $\pm$ 4.00	13.65 $\pm$ 1.31	14.84 $\pm$ 1.39
C18:2-trans(n-6)	0.16 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	ND	ND
C20:0	0.55 $\pm$ 0.25	0.75 $\pm$ 0.12	0.60 $\pm$ 0.17	0.60 $\pm$ 0.16	0.66 $\pm$ 0.10
C20:1(n-9)	0.98 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.67 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
C20:2(n-6)	1.31 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	1.90 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>	2.01 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	1.56 $\pm$ 0.61 <sup>ab</sup>	1.76 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>
C21:0	0.09 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
C20:3(n-6)	0.10 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.14 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
C20:3(n-3)	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.19 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.14 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
C22:0	0.44 $\pm$ 0.12	0.38 $\pm$ 0.18	0.45 $\pm$ 0.19	0.27 $\pm$ 0.13	0.48 $\pm$ 0.17
C23:0	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	ND	0.12 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.08 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
C24:0	0.19 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.25 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
<b>Esenciales</b>					
C18:2-cis(n-6)	12.02 $\pm$ 2.35 <sup>a</sup>	14.08 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	15.33 $\pm$ 1.60 <sup>b</sup>	13.49 $\pm$ 1.35 <sup>ab</sup>	14.07 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>
C18:3-cis(n-3)	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.47 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
C20:4(n-6)	3.61 $\pm$ 0.42	3.90 $\pm$ 0.22	4.42 $\pm$ 1.36	4.24 $\pm$ 0.42	4.34 $\pm$ 0.35
C20:5(n-3)	15.13 $\pm$ 1.15	15.26 $\pm$ 1.10	14.74 $\pm$ 1.66	16.44 $\pm$ 1.95	14.70 $\pm$ 1.19
C22:6(n-3)	11.30 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	10.72 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	11.48 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	13.36 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup>	12.12 $\pm$ 1.37 <sup>ab</sup>
Total n-3	27.01 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup>	26.79 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>	27.06 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>	30.54 $\pm$ 3.71 <sup>b</sup>	27.46 $\pm$ 2.21 <sup>ab</sup>
Total n-6	17.36 $\pm$ 2.46 <sup>a</sup>	20.35 $\pm$ 1.02 <sup>bc</sup>	22.13 $\pm$ 1.51 <sup>c</sup>	19.76 $\pm$ 1.87 <sup>b</sup>	20.31 $\pm$ 1.44 <sup>bc</sup>
n-3/n-6	1.58 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	1.32 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.23 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.54 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.36 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>

Medias  $\pm$  DE; ND= no detectado

## VI. CONCLUSIONES

El contenido de harina de pescado puede reducirse en los alimentos mediante la sustitución con harinas vegetales, sin afectar parámetros de calidad del agua, composición proximal y crecimiento de postlarvas (PL15) y juveniles de *L. vannamei* en un cultivo con bioflóculos.

El uso de un sistema con bioflóculos provee alimento vivo, así como mejora la calidad del agua y la actividad enzimática digestiva de los organismos cultivados.

La comunidad microbiana establecida en los bioflóculos fue capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias tipo *Vibrio* y favoreció el de organismos benéficos (bacterias heterótrofas y nitrificantes).

Los resultados de esta investigación sugieren que los bioflóculos tienen un alto potencial como alimento vivo, rico en nutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) que puedan suplementar alimentos elaborados con bajo contenido de harina de pescado.

A pesar que ninguna de las dos fuentes de alimento (formulado y bioflóculos) por sí sola es adecuada para la nutrición del camarón, el uso de ambas simultáneamente pudiera cubrir sus requerimientos nutricionales.

El perfil de ácidos grasos y aminoácidos de los bioflóculos y del tejido del camarón resultaron ser independientes de la composición de los alimentos.

## VII. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se sugiere indagar en las siguientes líneas de investigación:

Estimar el consumo total de alimento vivo (bioflóculos) en diferentes etapas de cultivo del camarón (postlarva, juvenil y adulto) para realizar el ajuste necesario en calidad y cantidad de alimento formulado de acuerdo a sus requerimientos.

Describir a detalle cuáles microorganismos conforman los bioflóculos y su rol en la actividad enzimática digestiva del camarón en los órganos que conforman su sistema digestivo.

Evaluar la posibilidad de integrar otros sistemas de cultivo que toleren baja salinidad (acuícolas o agrícolas) con el fin de obtener mayor provecho de los recursos empleados (nutrientes, agua y terreno).

Calcular el beneficio económico y ecológico que podría tener un sistema de bioflóculos sin recambio de agua y alimentado con bajo contenido de harina de pescado en comparación con un sistema tradicional.

Analizar cómo influye el contenido de harina de pescado de los alimentos formulados en las propiedades organolépticas (sabor, color, olor, textura) del camarón cultivado con dichas dietas.

Evaluar indicadores de calidad en ambos alimentos (formulado y bioflóculos), tales como digestibilidad, biodisponibilidad y palatabilidad, entre otros.

Investigar el efecto de los aminoácidos libres en el proceso de osmorregulación del camarón blanco a distintas salinidades de cultivo.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davó, A., Escalante, K., Chávez, C., Cuzon, G. & Gaxiola, G., 2014. Probiotic effect of FLOC on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 424, 215-219.
- Álvarez, A.L., Racotta, I.S., Arjona, O. & Palacios, E. 2004. Salinity stress test as a predictor of survival during growout of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 237, 237–249.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th edition. Association of Official Analytical Chemists . Washington,D.C., pp: 24-26.
- AOAC International. 2005. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International.
- APHA. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington D.C.
- Asiedu, M., Nilsen, R., Lie, Ø. & Lied, E. 1993. Effect of processing (sprouting and/or fermentation) on sorghum and maize. I: Proximate composition, minerals and fatty acids. *Food chemistry*, 46(4), 351-353.
- Atlas, R.M. 2010. Handbook of microbiological media. 4rt. Ed. CRC Press. FL, USA. American Public Health Association, Washington D.C.
- Audelo-Naranjo, J. M., Voltolina, D., & Romero-Beltrán, E. 2012a. Culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) with zero water exchange and no food addition: an eco-friendly approach. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40, 441.
- Audelo-Naranjo, J. M., Martínez-Córdova, L. R., Gómez-Jiménez, S., & Voltolina, D. 2012b. Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* without water exchange and with an artificial substrate. *Hidrobiológica*, 22(1), 1-7.
- Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture*. 264:140–147.
- Avnimelech, Y., Verdegem, M. C. J., Kurup, M., & Keshavanath, P. 2008. Sustainable land-based aquaculture: rational utilization of water, land and feed resources. *Mediterr Aquac J*, 1(1), 45-55.
- Avnimelech, Y., & Kochba, M. 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using 15N tracing. *Aquaculture*, 287(1), 163-168.
- Azim, M.E. & Little, D.C. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoors tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29-35.
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., De Abreu, L. & Wasielesky Jr, W. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition* 16(2), 163-172.

- Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M. B., Wasielesky Jr, W., & Poersch, L. H. 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 342, 112-116.
- Becerra-Dorame, M.J., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M. & López-Elías, J.A. 2011. Evaluation of autotrophic and heterotrophic microcosm-based systems on the production response of *Litopenaeus vannamei* intensively nursed without *Artemia* and with zero water exchange. *The Israeli Journal of Aquaculture*.
- Becerra-Dorame, M.J., Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L.R., Rivas-Vega, M.E., Lopez-Elías, J.A. & Porchas-Cornejo, M.A. 2012. Production response and digestive enzymatic activity of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) intensively pregrown in microbial heterotrophic and autotrophic-based systems. *The Scientific World Journal*.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H. & Pearson, D.C. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture* 232 (1), 525-537.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., & Verstraete, W. 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*, 41(4), 559-567.
- Crab, R.; Defoirdt, T.; Bossier, P. & Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. p. 351-356.
- Cortés Duarte, M.A. 2015. Evaluación del efecto de un consorcio de bacterias endémico y otro de una marca comercial en el crecimiento y la sobrevivencia de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado en biofloc con agua a baja salinidad. Tesis de Maestría en Sistemas de Producción Biosustentables. Universidad Estatal de Sonora, Navojoa, Sonora. Navojoa, Sonora, 46 p.
- Decamp O., Conquest L., Cody J., Forster I. & Tacon A.G. (2007) Effect of Shrimp Stocking Density on Size-fractionated Phytoplankton and Ecological Groups of Ciliated Protozoa within Zero-water Exchange Shrimp Culture Systems. *Journal of the World Aquaculture Society* 38, 395-406.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3), 125-137.
- Ekasari, J., Crab, R. & Verstaete, W. 2010. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. *HAYATI Journal of Biosciences* 17(3), 125.
- Ekasari, J., Azhar, M. H., Surawidjaja, E. H., Nuryati, S., De Schryver, P. & Bossier, P., 2014a. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish & shellfish immunology* 41 (2), 332-339.
- Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S. H., Bachtiar, T., Surawidjaja, E. H., Bossier, P. & De Schryver, P. 2014b. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture*, 426, 105-111.
- Emerenciano, M., Ballester, E.L., Cavalli, R.O. & Wasielesky, W. 2011. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture International* 19 (5), 891-901.

- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Mascaró M., M. & Gaxiola, G. 2012a. Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. *Aquaculture International*.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Goguenheim, J. & Gaxiola, G. 2012b. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture Research*, 44: 75–85.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M. & Gaxiola, G. 2013a. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquaculture Research*.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Miquelajauregui, M. M. & Gaxiola, G. 2013b. Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. *Aquaculture international*, 21(5), 987-1007.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Paredes, A. & Gaxiola, G. 2013c. Evaluation of biofloc technology in pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* culture: growth performance, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc. *Aquacult Int.* 10.1007/s10499-013-9640-y.
- Esparza-Leal, H.M., Ponce-Palafox, J.T., Aragón-Noriega, E.A., Arredondo-Figueroa, J.L., García-Ulloa Gómez, M. & Valenzuela-Quiñonez, W. 2010. Growth and performance of the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) cultured in low-salinity water with different stocking densities and acclimation times. *Aquacult. Res.*, 41, 878-883.
- Ezquerria-Brauer, J. M., Bringas-Alvarado, L., Burgos-Hernández, A. & Rouzaud-Sández, O. 2004. Control de la composición química y atributos de calidad de camarones cultivados. *Avances en Nutrición Acuícola VII*, 441-462. Hermosillo Sonora México.
- FAO. Noviembre 2016. Official website Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. Summary tables of fishery statistics: Capture, aquaculture, commodity and food balance sheets. Available on-line at (<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>).
- Folch J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226(1): 497-509.
- Furtado, P.S., Campos, B.R., Serra, F.P., Klosterhoff, M., Romano, L.A. & Wasielesky Jr, W. 2015a. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International* 23 (1), 315-327.
- Furtado, P.S., Poersch, L.H., & Wasielesky Jr, W. 2015b. The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International* 23(1), 345-358.
- Glencross, B. D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2), 71-124.
- Glew, R.H., VanderJagt, D.J., Lockett, C., Grivetti, L.E., Smith, G.C., Pastuszyn, A. & Millson, M. 1997. Amino acid, fatty acid, and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina faso. *Journal of food composition and analysis*, 10 (3), 205-217.
- González-Félix, M. L., Perez-Velazquez, M., Quintero-Alvarez, J. M. & Davis, D. A. 2009. Effect of Various Dietary Levels of Docosahexaenoic and Arachidonic Acids and Different n-3/n-6 Ratios

- on Biological Performance of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Raised in Low Salinity. Journal of the World Aquaculture Society, 40(2), 194-206.
- HACH. 2007. DR 2800 Spectrophotometer. Procedures manual. Available on-line at [www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639982436](http://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639982436).
- Hagopian, D. S. & Riley, J. G. 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. Aquacultural engineering 18 (4), 223-244.
- Haslun, J. A., Correia, E., Strychar, K., Morris, T. & Samocha, T. 2012. Characterization of bioflocs in a no water exchange super-intensive system for the production of food size pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. International Journal of Aquaculture 2, 29-39.
- Huerta-Rábago J.A. 2014. Evaluación poblacional de bacterias heterótrofas, oxidantes de amonio y tipo *Vibrio*, en un cultivo intensivo de tilapia con mínimo recambio de agua utilizando dos sustratos de fijación. Tesis Licenciado en Acuicultura. Universidad Estatal de Sonora, Navojoa, Sonora, 47 p.
- Hussain, A. S., Mohammad, D. A., Ali, E. M. & Sallam, W. S. 2014. Nutrient Optimization for the Production of Microbial Floes in Suspended Growth Bioreactors. Journal of the Arabian Aquaculture Society. Vol. 9, No. 1.
- Jatobá, A., da Silva, B. C., da Silva, J. S., do Nascimento Vieira, F., Mouriño, J. L. P., Seiffert, W. Q. & Toledo, T. M. 2014. Protein levels for *Litopenaeus vannamei* in semi-intensive and biofloc systems. Aquaculture, 432, 365-371.
- Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W. C., & David Horgen, F. 2008a. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. Aquaculture Research, 39(2), 118-133.
- Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L. & Dominy, W. 2008b. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. Aquaculture Nutrition, 14(6), 533-543.
- Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T. & Jang, I. K., 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture Research 45(2), 362-371.
- Kuhn, D. D., Lawrence, A. L., Boardman, G. D., Patnaik, S., Marsh, L. & Flick, G. J. 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 303(1), 28-33.
- Lim, C., Ako, H., Brown, C. L. & Hahn, K. 1997. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. Aquaculture, 151(1), 143-153.
- López-Elías, J. A., Moreno-Arias, A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L. R., Rivas-Vega, M. E. & Márquez-Ríos, E. 2015. Proximate Composition of Bioflocs in Culture Systems Containing Hybrid Red Tilapia Fed Diets with Varying Levels of Vegetable Meal Inclusion. North American Journal of Aquaculture 77 (1), 102-109.
- López-Tarín, F. 2011. Efecto de la sustitución parcial de una dieta comercial complementada con floc en el crecimiento y la sobrevivencia de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en un sistema intensivo con cero recambio de agua. Tesis de Maestría en Ciencias en Tecnologías de Cultivos Acuícolas. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora, Navojoa, Sonora 60p.
- Loureiro, C.K., Wasielesky, W. & Abreu, P.C. 2012. The use of protozoan, rotifers and nematodes as live food for shrimp raised in BFT system. Atlantica, Rio Grande, 34 (1) 5-12.

- Maicá, P. F., de Borba, M. R. & Wasielesky Jr, W. 2012. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. *Aquaculture Research* 43 (3), 361-370.
- Martínez-Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A. & Martínez-Porchas, M. 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7(2), 131-148.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., Emerenciano, M. G. C., Miranda-Baeza, A., & Gollas-Galván, T. 2016. From microbes to fish the next revolution in food production. *Critical reviews in biotechnology*, 1-9.
- Martins, T. G., Odebrecht, C., Jensen, L. V., D'Oca, M. G. & Wasielesky, W. 2014. The contribution of diatoms to bioflocs lipid content and the performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT culture system. *Aquaculture Research*.
- McGraw, J.W., 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. *J. World Aquacult. Soc.*, 33, 78–84.
- Megahed, M.E. 2010. The effect of microbial biofloc on water quality, survival and growth of the green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*) fed with different crude protein levels. *J. Arab. Aquacult. Soc.*, 5, 119- 142.
- Moreira de Souza, D., Godoy, L., Wasielesky, W. & Ballester, E.L.C. 2013. Contribución de los microorganismos en ambientes acuáticos y en sistemas de cultivo. p. 1 – 24. En: *Alimento natural en acuicultura*. Martínez-Córdova, L.R. y Martínez-Porchas, M. AGT Editor. México.
- National Research Council (U.S.). Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.
- Olsen, R. L., Hasan, M. R. 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology* 27 (2), 120-128.
- Páez-Osuna, F. 2011. Metales en camarón de cultivo y silvestre: importancia, efectos y transferencia trófica, 1st edn. ICMYL UNAM, El Colegio de Sinaloa, Univ. Politécnica de Sinaloa, CESUES, Mazatlán, Sinaloa, México.
- Patnaik, S., Samocha, T. M., Davis, D. A., Bullis, R. A. & Browdy, C. L. 2006. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 12(5), 395-401.
- Pedroza-Islas, R., Gallardo, P., Vernon-Carter, E.J., García-Galano, T., Rosas, C., Pascual, C. & Gaxiola, G. 2004 Growth, survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquacult. Nutr.*, 10, 167-173.
- Peñaflorida, V. D. (1989). An evaluation of indigenous protein sources as potential component in the diet formulation for tiger prawn, *Penaeus monodon*, using essential amino acid index (EAAI). *Aquaculture*, 83(3-4), 319-330.
- Poleo, G., Aranbarrio, J. V., Mendoza, L., & Romero, O. 2011. High-density rearing of red-bellied pacu in two closed systems. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(4), 429-437.
- Ray, A. J., Dillon, K. S., & Lotz, J. M. 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquacultural Engineering*, 45(3), 127-136.

- Roy, L. A., Bordinhon, A., Sookying, D., Davis, D. A., Brown, T. W., & Whitis, G. N. 2009. Demonstration of alternative feeds for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters of west Alabama. *Aquaculture Research*, 40(4), 496-503.
- Roy, L.A., Davis, D.A., Saoud, I.P., Boyd, C.A. Pine, H.J. & Boyd, C.E. 2010. Shrimp culture in inland low salinity waters. *Rev. Aquacult.*, 2, 191-208.
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., & Foubert, I. 2012. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 189-198.
- Sampaio, L. A., Tesser, M. B., & Wasielesky, W. 2010. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. *R. Bras. Zootec*, 39, 102-111.
- Schweitzer, R., Arantes, R., Costódio, P. F. S., do Espírito Santo, C. M., Arana, L. V., Seiffert, W. Q. & Andreatta, E. R., 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural engineering* 56, 59-70.
- Scopel, B. R., Schweitzer, R., Seiffert, W. Q., Pierri, V., Arantes, R. D. F., Vieira, F. D. N. & Vinatea, L. A., 2011. Substitution of fish meal in diets for marine shrimp grown in a biofloc system. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 46 (8), 928-934.
- Silva, K. R., Wasielesky, W. & Abreu, P. C. 2013. Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(1), 30-41.
- Suárez, J. A., Gaxiola, G., Mendoza, R., Cadavid, S., Garcia, G., Alanis, G. & Cuzon, G. 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* 289 (1), 118-123.
- Suita, S. M., Cardozo, A. P., Romano, L. A., Abreu, P. C. & Wasielesky Jr, W. 2015. Development of the hepatopancreas and quality analysis of post-larvae Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* produced in a BFT system. *Aquaculture International* 23 (2), 449-463.
- Tacon, A. G. J., Cody, J. J., Conquest, L. D., Divakaran, S., Forster, I. P. & Decamp, O. E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture nutrition*, 8(2), 121-137.
- Timmons, MB; Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerfelt S.T. & Vinci B.J. 2002. *Recirculating Aquaculture Systems* (second ed.) Cayuga Aquaculture Ventures LLC, Ithaca, NY p. 769.
- Valle, B. C. S., Dantas, E. M., Silva, J. F. X., Bezerra, R. S., Correia, E. S., Peixoto, S. R. M., & Soares, R. B. 2015. Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquacult. Nutr.*, 21, 105-112.
- Vázquez-Ortiz, F.A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I. & Hernández-Watanabe, G. 1997. High performance liquid chromatographic determination of free aminoacids in shrimp. *J. Liquid Chromatography*. 18 (10): 2059-2068.
- Viau, V.E., Ostera, J.M., Tolivia, A., Ballester, E.L.C., Abreu, P.C. & Rodríguez, E.M. 2012. Contribution of biofilm to water quality, survival and growth of juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture*, 324, 70-78.
- Voltolina, D., Audelo-Naranjo, J. M., Romerobeltrán, E., Del Rosario Pacheco-Marges, M., & López-Valenzuela, L. 2013. Promoción del perifiton para el cultivo de camarón blanco: hacia una acuicultura ecológica. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 39(2), 179-186.

- Wasiolesky, W., Atwood, H., Stokes, A. & Browdy, C. L. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396-403.
- Watanabe, T., 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science* 68 (2), 242-252.
- Wilson, R.P. 2002. Amino acids and proteins. In: J.E. Halver and R.E. Hardy (Eds), *Fish nutrition*. 3rd edition, Academic Press. San Diego Ca. pp. 143-179.
- Xu, W. J. & Pan, L. Q., 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture* 356, 147-152.
- Xu, W. J., Pan, L. Q., Sun, X. H. & Huang, J. 2013. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquacult. Res.*, 44, 1093-1102.
- Xu, W. J. & Pan, L. Q., 2014. Dietary protein level and C/N ratio manipulation in zero-exchange culture of *Litopenaeus vannamei*: Evaluation of inorganic nitrogen control, biofloc composition and shrimp performance. *Aquaculture Research* 45 (11), 1842-1851.
- Yun, H., Shahkar, E., Katya, K., Jang, I. K. & Bai, S. C. 2015. Effects of bioflocs on dietary protein requirement in juvenile whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 2015, 1-12.
- Yuniasari, D. & Ekasari, J. 2010. Nursery culture performance of *Litopenaeus vannamei* with probiotics addition and different C/N Ratio under laboratory condition. *J. Biosci.*, 17, 115-119.
- Zhou, Q. C., Li, C. C., Liu, C. W., Chi, S. Y. & Yang, Q. H. 2007. Effects of dietary lipid sources on growth and fatty acid composition of juvenile shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 13(3), 222-229