



UNIVERSIDAD DE SONORA

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

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**USO DE MICROALGAS BENTÓNICAS EN
DIFERENTES SUSTRATOS Y SU EFECTO EN LA
RESPUESTA PRODUCTIVA Y CONDICIÓN
FISIOLÓGICA DE JUVENILES DE *Litopenaeus
vannamei* (Boone, 1991)**

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTORA EN BIOCENCIAS

presenta:

ANA LUCÍA GÓMEZ RAMÍREZ

Hermosillo, Sonora, México

31 de enero de 2020

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 **Doctor 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

Ana Lucía Gómez Ramírez

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Doctorado en Biociencias

USO DE MICROALGAS BENTÓNICAS EN DIFERENTES SUSTRATOS Y SU EFECTO
EN LA RESPUESTA PRODUCTIVA Y CONDICIÓN FISIOLÓGICA DE JUVENILES DE
Litopenaeus vannamei (Boone, 1991)

TESIS

Que para obtener el grado de:
DOCTORA EN BIOCENCIAS

presenta:

ANA LUCÍA GÓMEZ RAMÍREZ

Hermosillo, Sonora, México.

31 de enero de 2020

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada "USO DE MICROALGAS BENTÓNICAS EN DIFERENTES SUSTRATOS Y SU EFECTO EN LA RESPUESTA PRODUCTIVA Y CONDICIÓN FISIOLÓGICA DE JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1991)", presentada por Ana Lucía Gómez Ramírez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de doctor en Biociencias.




José Antonio López Elías
Director




Luis Rafael Martínez Córdova
Co-director y Secretario



Luis Fernando Enríquez Ocaña
Sinodal interno



Beatriz Cordero Esquivel
Sinodal externo



Anselmo Miranda Baeza
Sinodal externo

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia, especialmente a mi esposo por todo su apoyo brindado desde el inicio de esta meta y a mis padres, por su confianza y apoyo durante mi etapa estudiantil, les agradezco de corazón.

AGRADECIMIENTOS

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

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

Al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD) principalmente al Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros. Agradezco a la Maestra María Gisela Carvallo Ruiz por el apoyo brindado durante mi estancia en su laboratorio.

A los miembros del comité de tesis Dr. José Antonio López Elías, Dr. Luis Rafael Martínez Córdova, Dr. Luis Fernando Enríquez Ocaña, Dr. Anselmo Miranda Baeza y Dra. Beatriz Cordero Esquivel, 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 Mtro. Álvaro Murguía, Diana Medina Félix, Norma García Lagunas, Jonathan García Morales, por hacer ameno cada día de trabajo. A Diana Fimbres Olivarría por todo su apoyo brindado y por ser siempre un ejemplo.

A Emmanuel Villanueva Gutiérrez por todo su apoyo incondicional y consejos para sacar adelante este proyecto. Gracias por darme la fortaleza y la confianza de para continuar hasta culminar con esta meta.

RESUMEN

Las biopelículas de microalgas bentónicas tienen roles importantes tanto en ecosistemas naturales como en sistemas de producción acuícola. Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas de dos microalgas bentónicas (*Navicula incerta* y *Navicula* sp.) en tres sustratos (malla plástica, tela y madera), bajo condiciones controladas de temperatura y luz. El experimento se desarrolló hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. La biomasa incorporada fue calculada gravimétricamente, y su composición bioquímica por micrométodos. La mayor cantidad de materia seca se obtuvo en *Navicula* sp. en sustrato de tela, mientras que en *N. incerta* la menor se encontró en madera. Se encontraron diferencias significativas en la materia orgánica entre los sustratos y las especies, con valores más altos para *N. incerta* en tela (3.22 g/m²) y más bajos para *Navicula* sp. en madera (0.02 g/m²). El mayor número de células asociadas a la biopelícula fue para *Navicula* sp. en malla plástica (1.24 x 10⁹ cel/m²), mientras que la menor para *Navicula* sp. en madera (0.143 x 10⁹ cel/m²). La red de plástico se consideró el mejor sustrato por la estabilidad de la biopelícula y la facilidad para cosechar la biomasa. Se evaluó también el efecto de la incorporación de biopelículas con *N. incerta* en el material de plástico, sola (BFN) y en conjunto con un probiótico (BFNP), sobre la respuesta productiva y condición fisiológica de juveniles de *L. vannamei*, bajo condiciones de laboratorio, así como sobre algunos parámetros de la calidad del agua y el perfil de ácidos grasos de las biopelículas. El mejor tratamiento en términos de respuesta productiva y condición fisiológica fue BFNP, ya que se obtuvo una mayor supervivencia y un mayor aumento de peso en el tratamiento. Se encontraron diferencias entre los metabolitos analizados en músculo y hemolinfa. Los mayores niveles de proteína en hemolinfa (194.07 mg/ml) en los camarones alimentados con microalgas y probióticos (BFN) pudieran ser atribuidos a una adecuada contribución nutricional de estos microorganismos. Se encontraron diferencias en el perfil de ácidos grasos entre las biopelículas. El ácido graso esencial más abundante fue C20: 5 (n-3) (EPA) con un valor de 28.47% en el tratamiento con probiótico y 28.33% en BFN.

ABSTRACT

Benthic microalgae biofilms have important roles in both natural ecosystems and aquaculture production systems. The biofilm capacity of two benthic microalgae (*Navicula incerta* and *Navicula* sp.) on three substrates (plastic mesh, fabric and wood), were evaluated under controlled conditions of temperature and light. The experiment was conducted up to the exponential growth phase of the microalgae. The biomass incorporated was calculated gravimetrically, and its biochemical composition by micro methods. The highest amount of dry matter was recorded in *N. incerta* in fabric substrate and the lowest was found in wood. The largest number of cells associated with the biofilm was recorded for *Navicula* sp. in plastic mesh (1.24×10^9 cells/m²), while the smaller one for *Navicula* sp. in wood (0.143×10^9 cells/m²). Significant differences in organic matter were found between substrates and species, with higher values for *N. incerta* in fabric (3.22 g m²) and lower for *Navicula* sp. in wood (0.02 g m²). The plastic mesh was considered the best substrate because of the stability of the biofilm and the ease of harvesting the biomass. Additionally, the effect of incorporating biofilms of *N. incerta* on the plastic material, alone (BFN) and with a probiotic (BFNP), on the productive response and physiological condition of *L. vannamei*, as well as on the water quality and fatty acid profile of the biofilms were evaluated. The best treatment in terms of productive response and physiological condition of shrimp, was BFNP, since higher growth and survival of shrimp were observed. The highest levels of hemolymph protein (194.07 mg mL⁻¹) in shrimp fed with microalgae and probiotics (BFN) could be attributed to an adequate nutritional contribution of these microorganisms. The most abundant essential fatty acid was C20: 5 (n-3) (EPA) with a value of 28.47% in BFNP and 28.33% in BFN

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>viii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1. La importancia de los microorganismos como alimento vivo en la acuicultura	3
I.2. Biopelículas de microalgas bentónicas y bacterias probióticas	4
I.3. Las biopelículas como alimento vivo para camarón	5
I.4. Producción a pequeña escala de camarón con biopelículas	6
II. HIPÓTESIS	8
III. OBJETIVOS	9
III.1. Objetivo general	9
III.2. Objetivos específicos	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
IV.1. Selección de materiales para las biopelículas y obtención de las cepas microalgales	10
IV.2. Diseño experimental	10
IV.3. Determinación de biomasa en base seca	11
IV.3.1. Determinación peso seco orgánico	11
IV.3.2. Determinación de cenizas	11
IV.3.3. Composición química y bioquímica	12
IV.3.3.1. Determinación de proteína	12
IV.3.3.2. Determinación de lípidos	12
IV.3.3.3. Perfil de ácidos grasos	13

IV.4.	Efecto de la incorporación de biopelículas de microalgas y microalgas/bacterias como ingredientes probióticos en la dieta del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	13
IV.4.1.	Formación de biopelículas	14
IV.4.2.	Obtención de organismos experimentales y aclimatación preliminar	14
IV.4.3.	Evaluación del efecto de las biopelículas en camarones juveniles	14
IV.4.4.	Análisis de calidad del agua	15
IV.4.5.	Evaluación de carga bacteriana en el cultivo	16
IV.5.	Análisis estadístico	16
V.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	17
V.1.	Biopelículas formadas por <i>Navicula</i> sp. y <i>N. incerta</i> en sustratos de plástico, tela y madera	17
V.1.1.	Materia seca y orgánica de las biopelículas	17
V.1.2.	Densidad celular	19
V.1.3.	Composición bioquímica	21
V.2.	Biopelículas formadas por <i>N. incerta</i> y bacterias probióticas	24
V.2.1.	Análisis de calidad del agua de cultivo	25
V.2.2.	Carga bacteriana del agua de cultivo	28
V.2.3.	Parámetros productivos (crecimiento y supervivencia) de <i>L. vannamei</i>	30
V.2.4.	Respuesta fisiológica de <i>L. vannamei</i>	32
V.2.5.	Perfil de ácidos grasos	37
VI.	CONCLUSIONES	40
VII.	RECOMENDACIONES	42
VIII.	LITERATURA CITADA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Crecimiento de <i>Navicula</i> sp. (a) y <i>N. incerta</i> (b) en sustratos de plástico, tela y madera.	20
2	Media \pm E. E. de amoníaco (TAN) (a), nitrito (NO ₂ -N) (b), fosfato (PO ₄ -P) (c) y nitrato (NO ₃ -N), en tratamientos y control.	27
3	Concentración en hemolinfa y músculo de proteína (a), lactato (b), triglicéridos (c), colesterol (d) y niveles de glucosa (e) en <i>Litopenaeus vannamei</i> durante el bioensayo en los tratamientos y control.	35, 36 y 37

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Peso seco, materia orgánica y densidad celular de las biopelículas formadas por <i>Navicula</i> sp. y <i>N. incerta</i> en sustratos de plástico, tela y madera.	19
2	Composición bioquímica final (%) de las biopelículas formadas por <i>Navicula</i> sp. y <i>N. incerta</i>) en sustratos de plástico, tela y madera.	21
3	Composición bioquímica (%) de biopelículas formadas por <i>N. incerta</i> (BFN) y <i>N. incerta</i> + probiótico (BFNP).	24
4	Parámetros de calidad del agua de <i>Litopenaeus vannamei</i> en los tratamientos BFNP (<i>N. incerta</i> + probiótico), BFN (biofilm de <i>N. incerta</i>) y A (control sin biofilm).	28
5	Abundancia (Log UFC/mL) de bacterias tipo <i>Vibrio</i> en agua de cultivo al comienzo (día 0), a la mitad (día 10) y al final (día 20) del ensayo en juveniles de <i>L. vannamei</i> (BFNP (<i>N. incerta</i>) + probiótico), BFN (biofilm de <i>N. incerta</i>) y A (control sin biofilm).	30
6	Crecimiento de <i>Litopenaeus vannamei</i> en tratamientos BFNP (<i>N. incerta</i>) + biofilm probiótico), BFN (biofilm de microalgas) y A (control sin biofilm).	32
7	Medias \pm E. E. (como % de lípidos) de contenido de ácidos grasos en las biopelículas BFNP (<i>N. incerta</i> + probiótico) y BFN (biopelícula de <i>N. incerta</i>).	38

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco del Pacífico es una de las especies acuícolas de mayor importancia económica a nivel mundial. La camaronicultura se encuentra entre las actividades que mayormente contribuyen a la contaminación por la descarga de efluentes con alto contenido de materia orgánica, nutrientes inorgánicos y sólidos suspendidos, responsables de eutrofización, nitrificación y enterramiento de comunidades bentónicas en los ecosistemas receptores, entre otros muchos impactos (Martínez *et al.*, 2010).

Uno de los retos de la acuicultura es la de llegar a ser una actividad ecológicamente amigable y socialmente responsable. Es por ello que se han venido buscando alternativas que contribuyan a la disminución del impacto provocado a los ecosistemas. Entre estas alternativas se encuentran los cultivos con cero recambio de agua y cultivos en los que se disminuye o no se adiciona alimento balanceado (Silva *et al.*, 2009, Audelo *et al.*, 2012, Xu *et al.* 2012). Dentro de estas últimas estrategias, podemos considerar la promoción y aprovechamiento integral de alimento natural endógeno y exógeno. La biota natural en los estanques es una importante fuente de alimento para el cultivo de camarón ya que puede ser aprovechada en la nutrición de la especie cultivada, pudiendo aportar hasta el 70% de los requerimientos nutricionales del camarón (Martínez-Córdova *et al.*, 2002).

Entre los organismos que contribuyen de manera significativa a la nutrición del camarón, se encuentran las microalgas, debido a su facilidad de proliferación y su adecuado contenido nutricional (Khatoon *et al.*, 2009). Se han utilizado diversas especies de microalgas para la acuicultura; entre ellas las diatomeas, dentro de este grupo, uno de los géneros más importantes es *Navicula*, muchas de cuyas especies son bentónicas (López-Elías *et al.*, 2013).

Las microalgas bentónicas generalmente se adhieren a superficies sumergidas fijas formando biopelículas. Por lo tanto, cultivarlas en sustratos de diferente naturaleza puede influir en su capacidad de adhesión y composición nutricional. Varios estudios han evaluado la capacidad de las microalgas para desarrollar biopelículas sobre diversos sustratos (Christenson y Sims, 2012; Kessano *et al.*, 2014; Khatoon *et al.*, 2007; Khatoon *et al.*, 2009). Las especies del género *Navicula*, es una diatomea bentónica que han demostrado esa capacidad, además de

ser uno de los géneros más abundantes que se encuentran en biopelículas de ambientes naturales (Devi 1995, Patil y Anil 2005).

En las biopelículas de microalgas pueden estar asociados otros microorganismos como las cianobacterias y bacterias, las cuales casi siempre están presentes y se han considerado esenciales para la formación de biopelículas (Barranguet *et al.*, 2005). En un consorcio microbiano, las microalgas y bacterias bentónicas juegan un papel importante en la inicialización y el crecimiento de las biopelículas. Las bacterias son comúnmente los primeros colonizadores y comienzan la biopelícula, pudiendo modificar las condiciones ambientales, favoreciendo la fijación de cianobacterias y algas verdes. Las microalgas están asociadas a las bacterias y les proporcionan nutrientes; el carbono liberado por las microalgas es aprovechado por las bacterias, garantizando el balance de nutrientes y el flujo de energía, incrementando el crecimiento del consorcio. La especie predominante depende de los organismos presentes en el medio o introducidos como inóculo. Un biofilm maduro es capaz de mantener las concentraciones de amonio y fosfato presentes en el medio en niveles bajos. Estudios realizados en sistemas de cultivo mostraron que las algas perifíticas asimilaron el amoníaco y la materia orgánica atrapada de la columna de agua para aumentar su biomasa y, por lo tanto, a medida que aumentó la densidad de algas, la concentración de amoníaco disminuyó (Avnimelech, 1999). Thompson *et al.* (1999) concluyeron que las bacterias de vida libre podrían ser demasiado pequeñas para ser retenidas eficientemente por el aparato de alimentación de las larvas de camarón y podrían ser efectivas solo cuando se encuentran en forma de agregados (bioflóculos) o adheridas a superficies (formando biopelículas).

Se ha observado que el uso de biopelículas ha favorecido significativamente el crecimiento de camarones peneidos, tales como: *Fenneropenaeus paulensis* (Ballester *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2002), *Litopenaeus vannamei* (Audelo-Naranjo *et al.*, 2011; Moss y Moss, 2004) y *P. monodon* (Anand *et al.*, 2013; Khatoon *et al.*, 2007).

I. ANTECEDENTES

I.1. La importancia de los microorganismos como alimento vivo en la acuicultura

El término microorganismo abarca a todos los organismos unicelulares: procariontes autótrofos (cianobacterias) y heterotróficos (bacterias) y eucariontes autótrofos (microalgas) y heterotróficos (protozoarios). Así mismo metazoarios que no pueden apreciarse a simple vista como rotíferos, nematodos y estadios larvales de muy diversas especies (Ramesh *et al.* 1999).

Los microorganismos se han utilizado principalmente como probióticos (Liu *et al.*, 2010), pero en la actualidad se les considera una fuente de biomasa alimenticia directa. Por su pequeño tamaño, se pudiera pensar que no representan una biomasa importante; sin embargo su elevada tasa de replicación, los convierte en una fuente alimenticia importante en la acuicultura (Abreu *et al.* 2007; Ballester *et al.* 2008, 2010; Emerenciano *et al.* 2011, 2012a, b, c).

Las microalgas tienen un papel importante en la acuicultura; son ampliamente utilizados como alimento para las larvas de crustáceos y peces y para los moluscos en sus etapas larvales, juveniles y adultas (Martínez-Córdova *et al.*, 2014). Esto se debe a su composición bioquímica adecuada, ya que son ricas en macronutrientes como proteínas (25-50%), carbohidratos (hasta 40%) y lípidos (aproximadamente 20%); además, contienen fibra, almidón, celulosa, vitaminas (principalmente complejo B y C), pigmentos (carotenoides) y metabolitos secundarios con un papel importante como compuestos activos. La biomasa seca, la materia orgánica y la composición bioquímica de las diversas especies de microalgas pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales, incluida la intensidad de la luz, la salinidad, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes, entre otros (Brown *et al.*, 1997; Olivera, 2002; Li *et al.*, 2007; Cabello- Paisini *et al.*, 2011; Fimbres- Olivarría *et al.*, 2015).

Los microorganismos que forman biopelículas son muy importantes en la transferencia de materia orgánica entre los niveles tróficos, aumentando la eficiencia de las cadenas alimentarias y contribuyendo a mantener la calidad del agua (Azam *et al.*, 1983).

En las biopelículas los microorganismos viven asociados a una matriz auto producida de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), proteínas y carbohidratos, que dan cohesión y facilitan las interacciones entre las especies. Se ha observado que el crecimiento de la biopelícula puede ser afectado por la producción de estos exopolisacáridos (EPS), así como por el periodo de cultivo, disponibilidad de nutrientes y de sustratos (Barranguet *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2015).

Diversos estudios han indicado que las bacterias probióticas pueden proporcionar ventajas en el cultivo de *L. vannamei*, incluida la mejora de la actividad enzimática digestiva, la activación de la respuesta inmune, la promoción del crecimiento y la supervivencia, la mejora de la calidad del agua y la biodegradación del fondo orgánico en los estanques (Nimrat *et al.*, 2012).

Las comunidades microbianas de las biopelículas contienen millones de células procariontes y eucariontes, se disponen en forma de ensamblajes de bacterias, cianobacterias y microalgas principalmente (Sánchez y Torres, 2005). Las microalgas y las bacterias probióticas son conocidas por sus beneficios nutricionales (Ju *et al.*, 2009) y se utilizan ampliamente como suplementos dietéticos para juveniles de camarón (Ju *et al.*, 2009; Wang, 2007).

I.2. Biopelículas de microalgas bentónicas y bacterias probióticas

Los efectos nutricionales de las bacterias no pueden separarse de los efectos probióticos. Actualmente, se pasa por alto la importancia de la comunidad bacteriana que está asociada con alimentos vivos o que es estimulada por la suplementación de alimentos artificiales (Nevejan *et al.*, 2018). La biomasa bacteriana en acuicultura, ha sido mayormente utilizada como probiótico. Dentro de las bacterias más empleadas en este sentido, destacan los géneros *Lactobacillus*, *Vibrio* y especialmente *Bacillus* (Tung *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010, Nimrat *et al.*, 2012).

La importancia del género *Bacillus* radica en que adaptándose al tracto digestivo del camarón, esta bacteria puede formar una asociación simbiótica para mejorar la respuesta fisiológica del huésped. Después de la colonización en el tracto digestivo, *Bacillus* comienza a liberar ciertas enzimas que facilitan la asimilación de nutrientes al camarón y, por lo tanto,

previene problemas intestinales y puede fomentar un mejor índice de crecimiento y supervivencia (Nimrat *et al.*, 2012).

Se han realizado estudios sobre las interacciones entre microalgas y bacterias, estos han revelado que existen relaciones mutualistas y/o parasitarias en el crecimiento de las microalgas. Se ha demostrado que este crecimiento se ve potenciado por factores promotores del crecimiento producidos por bacterias, como el ácido indol-3-acético por ejemplo. Además, en conjunto influyen en los ecosistemas y afectan sinérgicamente la fisiología y el metabolismo de cada uno. Aunque en el pasado las bacterias se han considerado como una contaminación de los cultivos de algas, hoy en día, se consideran prometedoras en biotecnología, ya que algunos estudios recientes han demostrado un efecto positivo de dicha interacción, por ejemplo en el crecimiento y los procesos de floculación, que son los pasos esenciales en la biotecnología de algas. (Fuentes *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2014).

Una biopelícula o biofilm se define como una comunidad de microorganismos, principalmente microalgas, cianobacterias, bacterias, protozoarios y hongos, asociados a una matriz orgánica adherida a superficies sumergidas (Ramesh *et al.*, 1999). Se forma sobre cualquier superficie húmeda, siguiendo un patrón de colonización de cuatro fases: (I) adsorción de compuestos químicos disueltos (macromoléculas) a las superficies (proceso físico espontáneo); (II) colonización bacteriana; (III) colonización de eucariontes unicelulares y (IV) colonización de eucariontes multicelulares (Wahl, 1989).

Las microalgas bentónicas generalmente se adhieren a superficies sumergidas fijas formando biopelículas, por lo que el tipo de sustrato puede influir en su capacidad de adhesión y composición nutricional. Varios estudios han evaluado la capacidad de las microalgas para desarrollar biopelículas sobre muy diversos sustratos (Christenson y Sims, 2012; Kessano *et al.*, 2014; Khatoon *et al.*, 2007; Khatoon *et al.*, 2009).

I.3. Las biopelículas como alimento vivo para camarón

La promoción y el uso integral de alimentos naturales endógenos y exógenos, es una estrategia prometedora que ha demostrado su efectividad a escala experimental (Audelo-Naranjo *et al.*, 2011, 2012; Becerra-Dórame *et al.*, 2011, 2012) y comercial (Azim, *et al.*, 2008; Mridula *et al.*,

2003). La biota natural en los estanques es una fuente importante de alimento para el camarón de cultivo, ya que es capaz de contribuir hasta con el 70% de los requerimientos nutricionales del camarón (Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Martínez-Cordova *et al.*, 2014). Las biopelículas además de representar una fuente importante de alimento; mejora la calidad del agua, el estado nutricional e inmune del camarón y su calidad poscosecha. Estos consorcios se han utilizado en el cultivo de camarones, peces y langosta (Becerra *et al.*, 2011, Gangadhar *et al.*, 2012 Viau *et al.*, 2013, Sakr *et al.*, 2015). Es importante mencionar que en las etapas post larvales o juveniles, los camarones no capturan microorganismos de manera eficiente directamente de la columna de agua, sin embargo, pueden hacerlo cuando están inmovilizados en superficies fijas (biopelículas) o sustratos flotantes (bioflóculos) (Martínez- Córdova *et al.*, 2015, Nevejan *et al.*, 2018).

En cultivos de camarón con cero recambios de agua, se induce la formación de macroagregados o "biopelículas o bioflocs" durante el ciclo de producción con el fin de minimizar o eliminar el recambio de agua y por lo tanto las descargas de aguas residuales, que representan un impacto ambiental por la entrada de nutrientes disueltos a los sistemas receptores (Loureiro *et al.*, 2012).

I.4. Producción a pequeña escala de camarón con biopelículas

El uso de biopelículas y bioflóculos ha sido probado con éxito en diferentes organismos bajo condiciones de cultivo. Becerra-Dórame *et al.* (2011) evaluaron sistemas autotróficos y heterotróficos para la maternización y precría intensiva de *L. vannamei*, utilizando simultáneamente biopelículas y bioflóculos; encontraron que para ambos casos, la respuesta productiva (especialmente supervivencia, biomasa final y FCA), de las postlarvas y juveniles fue superior al control sin biopelículas/bioflóculos. Ferreira-Marinho *et al.* (2016) evaluaron la adición de la microalga bentónica *Navícula* sp., sola y en combinación con alimento formulado, en el desempeño de postlarvas de camarón blanco, *L. vannamei*, encontrando que el crecimiento, la supervivencia, la biomasa final y el FCA fueron mejores en el tratamiento que combinó alimento formulado y la microalga bentónica. Viau *et al.* (2013) indicaron que el uso del biofilm puede considerarse una buena herramienta durante la fase de maternidad del camarón rosa *F.*

brasiliensis, principalmente mejorando la supervivencia a través del mantenimiento de la calidad del agua, ya que las concentraciones de nitrito fueron significativamente más bajas cuando el biofilm estuvo presente. Gatune *et al.* (2014) realizaron un estudio suministrando biopelículas formadas en hojas de mangle en cultivos de postlarvas de camarón tigre *Penaeus monodon*. Los resultados obtenidos revelaron que las hojas de mangle en descomposición son una fuente potencial de ácidos grasos esenciales, especialmente araquidónico, eicosapentaenoico y decosehexaenoico. Audelo-Naranjo *et al.* (2011) evaluaron sustratos artificiales para la formación de biopelículas en el cultivo intensivo de *L. vannamei*. Los resultados mostraron que el crecimiento de los camarones, biomasa final, supervivencia, FCA y factor de conversión económica fue significativamente mejor en los tratamientos con sustratos.

Sharma *et al.* (2011), desarrollaron una biopelícula de *Vibrio alginoliticus*, utilizando hojuelas de quitina como sustrato y tripticasa de soya (TSB) como nutriente para inmunoestimulación oral de *P. monodon*. Los resultados mostraron que la respuesta inmune del camarón fue mejor cuando utilizaron células inmovilizadas en la biopelícula, que cuando utilizaron células libres de la bacteria. Peterson y Curiel (2002) cultivaron la diatomea bentónica *Amphora* sp. en sustratos artificiales en pre-engorda de camarón, obtuvieron mejor tasa de supervivencia, rápido crecimiento y mayor talla promedio.

A pesar de que es conocido que el uso de biopelículas contribuye a la respuesta productiva y la calidad del agua en los sistemas de cultivo, existen pocos estudios sobre el uso de biopelículas formadas a partir de microalgas bentónicas y bacterias probióticas, especialmente en su formación, estabilidad y valor nutricional en detalle, con el fin de verificar si son adecuadas para cumplir con los requisitos nutricionales del organismo cultivado. Por lo tanto, es importante analizar el efecto de las biopelículas en la respuesta fisiológica de los camarones, así como en los parámetros productivos.

II. HIPÓTESIS

La capacidad de formación de biopelículas por parte de microalgas bentónicas, así como su composición y valor nutricional, dependen en gran medida de la especie y del tipo de sustrato al que se adhieren. Su inclusión como alimento complementario del camarón (*Litopenaues vannamei*), ya sea solas o conjuntamente con probióticos, tendrá un efecto positivo en la respuesta productiva y condición fisiológica del camarón.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de las microalgas bentónicas *Navicula incerta* y *Navicula* sp. en tres tipos de sustratos, y evaluar su efecto tanto solas como conjuntamente con bacterias probióticas sobre la respuesta productiva y la condición fisiológica en juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

III.2. Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad de colonización y de formación de biopelículas de dos microalgas bentónicas en tres tipos de sustratos.
2. Caracterizar cualitativa y cuantitativamente la composición químico proximal y de ácidos grasos de las biopelículas formadas por ambas especies de microalgas en cada uno de los sustratos.
3. Evaluar la capacidad de colonización y de formación de biopelículas de las microalgas bentónicas conjuntamente con bacterias probióticas.
4. Evaluar el efecto de estas últimas en la condición fisiológica y la respuesta productiva en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Selección de materiales para las biopelículas y obtención de las cepas microalgales

Para esta investigación las cepas seleccionadas fueron las especies de microalgas bentónicas *Navicula* sp. y *Navicula incerta*. La cepa de *N. incerta* fue proporcionada por la colección del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, México (CICESE) con el número de código NV11, mientras que *Navicula* sp. se obtuvo de la colección del Departamento de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Sonora (DICTUS) en Hermosillo, Sonora, México. Se seleccionaron tres sustratos: malla plástica, tela de yute y madera, considerando sobre todo su costo, disponibilidad y facilidad de uso.

IV.2. Diseño experimental

Para la primera parte del estudio, se realizaron dos ensayos experimentales, uno para cada especie de microalga. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio de una vía con cuatro repeticiones por tratamiento. Los tratamientos consistieron en cada uno de los sustratos seleccionados. Las superficies evaluadas para cada sustrato fueron: 16,380 cm² para malla plástica, 874.8 cm² para madera y 17,550 cm² para tela, y se colocaron como cortinas pendientes de una pieza de madera en acuarios con 45 L de agua marina filtrada, enriquecida con medio estéril “f/2”, con una concentración de 106 µM de metasilicato de sodio Na₂SiO₃ (Guillard y Ryther, 1962). Se inoculó el cultivo con una densidad de 20,000 cel/ml para *Navicula* sp. y 50,000 cel/ml para *N. incerta*. Se cultivaron durante cinco días en condiciones controladas: temperatura (20-22° C), aireación suficiente e iluminación continua, con una irradiancia de 260 µmol m⁻² s⁻¹, mantenida por medio de lámparas de luz fría de 60 watts, además, se proporcionó aireación suficiente en los cultivos. Cada 24h se contó el número de células, tomando al azar 1 cm² del sustrato correspondiente, que se resuspendió vigorosamente en 1 ml de agua de mar estéril, y se observó en un microscopio Carl Zeiss con el objetivo 10X usando una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad (López-Eliás *et al.*, 2012). Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\#cel/mL = (\text{número total de células/número de cuadros contados}) (10^4).$$

Al final de cada experimento, se evaluó la biomasa seca, biomasa orgánica y la ceniza de las biopelículas formadas.

IV.3. Determinación de Biomasa en base seca

IV.3.1. Determinación peso seco orgánico

La biomasa unida a cada sustrato se cosechó y se resuspendió en 5 L de agua marina estéril. Se filtraron tres submuestras de 300 ml de cada una de las tinas a través de filtros de papel Whatman GF/C 47 mm de diámetro y 1.2 μm de retención. Para eliminar las sales presentes se realizó un lavado con formiato de amonio al 15%. Se pesaron los filtros en una balanza digital Ohaus. Se colocaron en cucharillas de aluminio y después se secaron a 65° C de 6-8 horas en una estufa y se pesaron una vez más. Para la biomasa no adherida a los sustratos, las muestras también se tomaron directamente de los acuarios de cultivo al final de la prueba. Los resultados de la materia seca y la ceniza se presentaron como g/m^2 (López-Elías *et al.*, 2012).

IV.3.2. Determinación de cenizas

Se colocaron los filtros utilizados para la determinación de peso seco en cucharillas de aluminio marcadas y se incineraron en una mufla a 480 °C por 16 horas. Posteriormente se colocaron en un desecador por 15 minutos y se registró el peso en una balanza analítica Ohaus.

Ecuaciones para el cálculo de peso seco (total y orgánico) y cenizas (ArredondoVega *et al.*, 1997):

$$\text{PST } (\mu\text{g/mL}) = [(\text{PSFM}) - \text{PSF}] / \text{VF}$$

$$\text{PSI } (\mu\text{g/mL}) = (\text{PSC} - \text{PSF}) / \text{VF}$$

$$\text{PSO } (\mu\text{g/mL}) = \text{PST} - \text{PSI}$$

En donde:

PST, PSI y PSO = pesos seco total, inorgánico (cenizas) y orgánico, en $\mu\text{g/mL}$.

PSF, PSFM y PSC = pesos secos del filtro sin muestra, del filtro con muestra y del filtro con la muestra incinerada, en $\mu\text{g/mL}$.

VF = Volumen de muestra filtrada (en ml).

IV.3.3. Composición química y bioquímica

Para determinar la composición bioquímica de las biopelículas, se utilizaron micrométodos estándar. Para el análisis de proteínas y lípidos se tomaron (por triplicado), 15 ml de cada una de las tinas, un total de 9 muestras y se filtraron en un filtro Whatman GF/C de 25 mm de diámetro. Para eliminar las sales presentes se realizó un lavado con formiato de amonio al 15%. El contenido de carbohidratos totales se calculó como diferencia de la materia seca menos la proteína, los lípidos y las cenizas.

IV.3.3.1. Determinación de proteína

La extracción de proteínas se realizó por la técnica de Clayton *et al.* (1988) que emplea como solvente hidróxido de sodio 0.1N durante un determinado tiempo y temperatura de extracción. Se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Malara y Charra (1972), utilizando albúmina bovina (Sigma- Aldrich) como estándar y se leyó la muestra en un espectrofotómetro a 750 nm.

IV.3.3.2. Determinación de lípidos

La extracción de lípidos se realizó por el método de Bligh y Dyer (1959) modificado por López Elías (2012), la cual se basa en la existencia de un sistema mono o bibásico, según la proporción de los componentes de la mezcla terciaria: cloroformo, metanol y agua. Para la determinación se utilizó el método de Pande *et al.* (1963). Se leyó la muestra en un espectrofotómetro a 590 nm.

IV.3.3.3. Perfil de ácidos grasos

Se colocó la suspensión microalgal en conos Imhoff por duplicado para separar la biomasa del medio líquido. Posteriormente se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. 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 de las biopelículas previamente liofilizadas.

Para la extracción de la fracción lipídica de las muestras, se utilizó el método descrito por Ryckebosch *et al.* (2012). Se le añadió a la muestra 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 fue almacenada en un vial y recibió un flujo de nitrógeno, posteriormente fue congelada (-80°C) hasta su análisis.

La determinación del perfil de ácidos grasos, se llevó a cabo mediante cromatografía de gases (Agilent 6890 Series) utilizando una columna analítica de sílice modelo Agilent DB- 23 (diámetro de 0.25mm, grosor de $0.25\mu\text{m}$ y longitud de 60m). Se inyectó 1 μL del extracto (previamente descrito). El gas acarreador utilizado fue N_2 y el modo de detección por ionización de flama (FID). La identificación de los ácidos grasos se basó en una mezcla de ácidos grasos estandarizada como referencia (Supelco 37 Component FAME Mix by Sigma-Aldrich®).

IV.4. Efecto de la incorporación de biopelículas de microalgas y microalgas/bacterias como ingredientes probióticos en la dieta del camarón blanco *L. vannamei*.

Se seleccionó de la primera fase del estudio, la especie de microalga y el material de sustrato que formó biopelículas con mayor estabilidad y mejor composición para evaluar su efecto en la respuesta productiva y condición fisiológica de los camarones en la fase de pre-engorda.

Adicionalmente se formaron biopelículas de la microalga, en conjunto con un probiótico comercial (Epicin G2), el cual se seleccionó debido a su efecto benéfico probado en camarones.

IV.4.1. Formación de biopelículas

Los cultivos de microalga sola, así como los cocultivos de microalgas-bacterias se realizaron en tinas de 100 litros, utilizando como nutrientes, el medio “F” (Guillard y Ryther, 1962). El cultivo se desarrolló bajo condiciones controladas en el laboratorio del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS), manteniendo temperatura constante (22° C), iluminación ($260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y aireación moderada.

Para las biopelículas con microalga y probiótico se utilizó Epicin G2, el cual tiene en su composición cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *Lactobacillus pumilus* y *Saccharomyces cereveciae*. Las bacterias fueron activadas previamente a la formación de la biopelícula. Para la activación se utilizó melaza y agua de mar, se incubaron a 35° C por 18 h.

Los recuentos de células se realizaron diariamente hasta que se observó la fase de crecimiento exponencial de las microalgas. Se tomaron muestras de biomasa para analizar la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) siguiendo el manual de análisis químico de López-Elías *et al.* (2012) y composición bioquímica de ácidos grasos de acuerdo con la metodología descrita anteriormente (Rockebochs *et al.*, 2012).

IV.4.2. Obtención de organismos experimentales y aclimatación preliminar

El experimento se realizó en el Laboratorio de Acuicultura de DICTUS. Los juveniles *L. vannamei* se obtuvieron de la Granja Acuícola Quinta San Fabián, ubicada en el ejido Cruz de Piedra en Empalme, Sonora, México. Antes del inicio del experimento, los camarones se aclimataron durante 7 días en un tanque al interior (200 L) con aireación constante a 24° C, regulados con aire acondicionado, se alimentaron dos veces al día con un alimento comercial (22.5% de proteínas, 9% de lípidos, Gam Nutrimar).

IV.4.3. Evaluación del efecto de las biopelículas en camarones juveniles

Para evaluar el efecto de los dos tipos de biopelículas (microalgas y microalgas+probiótico) se realizó un experimento simple con tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos evaluados

fueron nombrados como: BFNP (biopelícula de microalga *N. incerta* y probiótico G2), BFN (biopelícula de microalga *N. incerta*) y A (control, sin biopelícula).

Después del desarrollo y la maduración de las biopelículas, las cortinas fueron transportadas e introducidas en las unidades experimentales del cultivo de camarones. Las unidades experimentales consistieron en tanques plásticos con un volumen de 60 L, provistos con 16 organismos (4.9 g de promedio). En los tratamientos con biopelículas, se introdujeron dos cortinas pendiendo de una pieza de madera; en el control no se introdujeron cortinas.

Una vez aclimatados los camarones y colocadas las biopelículas, se inició el experimento, el cual tuvo una duración 20 días. Los camarones fueron alimentados con un alimento comercial (Gam Nutrimar con 22.5 % de PC), en dos raciones diarias de acuerdo con el consumo aparente.

Cada diez días se evaluaron los parámetros productivos de los camarones, así como la condición fisiológica, tomando como indicadores las concentraciones de colesterol, lactato, proteínas, triglicéridos y glucosa en hemolinfa y músculo. Al final del experimento se evaluaron los siguientes parámetros de producción:

$$\text{Supervivencia (\%)} = [100 \times (\text{número final de camarones} / \text{número inicial de camarones})]$$

$$\text{Ganancia de peso total (g)} = \text{peso final} - \text{peso inicial.}$$

IV.4.4. Análisis de calidad del agua

La calidad del agua se monitoreó periódicamente durante el ensayo. La temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto se determinaron diariamente (YSI Multiparameter 556, YSI Handheld Incorporated, Ohio, EE. UU.). Una vez a la semana, se tomó una muestra de agua de cada unidad para determinar las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (TAN), nitratos (NO_3), nitritos (NO_2) y fosfatos (PO_4) con un espectrofotómetro programable HANA (Hanna Instruments, Rumania), utilizando reactivos del fabricante.

IV.4.5. Evaluación de carga bacteriana en el cultivo

La evaluación de las bacterias se realizó antes y después de colocar las biopelículas en las unidades con los camarones, se repitió el análisis a los 10 y 20 días. Se tomó una muestra de la columna de agua de cultivo de cada unidad experimental, la cual se re-suspendió con la ayuda de un vórtex y se tomaron 0.1 ml para siembra directa y 1:10 para dilución, según el número de bacterias. La siembra se realizó utilizando la técnica de vaciado en placa (APHA, 1989). Para cada unidad experimental se utilizaron 3 placas de Petri, 6 placas para cada siembra. Después de la siembra, se incubaron a una temperatura de 30° C durante 24 y 48 h, después de las cuáles se hizo el recuento de colonias. Los cultivos bacterianos se realizaron en agar TCBS (agar tiosulfato citrato biliar sacarosa), un medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de especies de *Vibrio*. Se reportó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), posteriormente fueron transformadas a logaritmo (Log).

El cálculo para el número de UFC se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{UFC / ml} = \text{no. de colonias en placa de Petri} * \text{FD / ml de muestra}$$

IV.5. Análisis estadístico

Previo al análisis de datos se aplicaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para la primera fase (evaluación de la especie de microalga y el material de la cortina), se realizó un análisis de varianza de una vía ANOVA ($\alpha = 0.05$). Los datos se expresaron como media y error estándar (E.E.). Para la segunda fase (parámetros productivos, parámetros de calidad de agua, abundancia de bacterias, parámetros de condición fisiológica y ácidos grasos), se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos vías. En ambos casos, se utilizó una prueba *a posteriori* de Tukey para ordenar los promedios. Todos los análisis estadísticos se realizaron con JMP9 de SAS (SAS, 2010).

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

V.1. Biopelículas formadas por *Navicula* sp. y *N. incerta* en sustratos de plástico, tela y madera.

V.1.1. Materia seca y orgánica de las biopelículas

Para *Navicula* sp. la mayor cantidad de materia seca asociada con la biopelícula se recuperó en la tela (6.64 ± 0.76 g/m²), mientras que en plástico y madera se observó la menor cantidad; entre éstos últimos valores no se encontraron diferencias significativas. Para *N. incerta*, la mayor cantidad de materia seca se obtuvo en tela (6.11 ± 0.62 g/m²), en plástico y madera se obtuvieron los menores valores (Tabla 1). En relación a la materia orgánica, en ambas microalgas se observó la mayor cantidad en plástico y tela (sin diferencias significativas entre éstas), y en madera se obtuvieron concentraciones mucho más bajas (0.02 y 0.07, para *Navicula* sp. y *Navicula incerta*, respectivamente). El tipo de madera seleccionada era demasiado lisa y la biopelícula que se formó sobre ella tenía poca estabilidad y se desagregó en poco tiempo. El sustrato de la tela no mantuvo su consistencia durante el ensayo, y parte de él se incorporó a la biopelícula, además se detectó crecimiento bacteriano de coloración rosada, el cual se contabilizó como biomasa incorporada a la biopelícula, y por lo tanto la materia seca estuvo sobrestimada. Además, fue difícil recuperar esa biomasa debido a la porosidad del material. La malla de plástico, a pesar de no ser el sustrato con la mayor cantidad de materia seca y orgánica adherida, mantuvo su biopelícula mucho más estable durante el ensayo.

La utilización de sustratos en sistemas de cultivo acuícola, fomenta la formación de biopelículas y de esta manera aprovechar esta fuente de alimento vivo. Thompson *et al.* (1999) concluyeron en su investigación, que las bacterias de vida libre podrían ser demasiado pequeñas para ser retenidas eficientemente por el aparato de alimentación de las larvas de camarón y podrían ser efectivas solo cuando se encuentran en forma de agregados o adheridas, por lo que sustratos fomentan la formación de biopelículas y de esta manera aprovechar esta fuente de alimento vivo.

Aunque en el presente trabajo las superficies rugosas mostraron ser más eficientes para la formación de biopelículas con diatomeas bentónicas, los resultados difieren de los reportados

por Sweat y Johnson (2013) quienes encontraron que las diatomeas bentónicas tienen una mayor capacidad de colonizar superficies lisas.

La biopelícula formada sobre el material de madera no fue estable a lo largo del tiempo de cultivo, debido a la textura demasiado lisa del sustrato, lo que probablemente impidió que la biopelícula se adhiriera más adecuadamente. Por otra parte, la tela era muy porosa, lo que permitió que una cantidad aceptable de materia se adhiriera a la biopelícula; sin embargo, el material se degradó al estar sumergida en el agua y por la agitación provocada por la aireación. La malla de plástico tiene una textura muy porosa, lo que permitió una adherencia aceptable de los microorganismos y una excelente estabilidad durante todo el ensayo. Estudios previos han demostrado que las superficies rugosas pueden ser más eficientes para la formación de biopelículas con diatomeas bentónicas (Fernandes Da Silva *et al.*, 2008). Contrariamente Sweat y Johnson, (2013) encontraron que las diatomeas bentónicas tienen una mayor capacidad para colonizar superficies lisas. La textura de la superficie es un factor importante que influye en la unión de microalgas al sustrato. Las superficies rugosas y porosas están asociadas con una mayor adherencia de organismos y materia orgánica debido a un área más grande y una mayor protección contra las fuerzas hidráulicas (Babu, 2011). En otro estudio se demostró que los materiales a base de celulosa como el yute, lograron una mayor fijación que los polímeros sintéticos como el de la malla de plástico (HDPE). La desventaja de los materiales porosos como el tejido de yute utilizado en nuestro estudio, es la dificultad para cosechar la biomasa de algas que crece dentro de los poros (Christenson y Sims, 2012). La adherencia y estabilidad de la biopelícula depende en gran medida también de factores como el tipo de cultivo, el medio de cultivo, además del sustrato (Johnson y Wen, 2010; Shen *et al.*, 2015; Dang y Lovell, 2016; Miao *et al.*, 2019). Algunos parámetros ambientales, como la irradiancia, la temperatura, la salinidad y el contenido de nutrientes, también pueden influir en los patrones de colonización (Tyler y Allen, 2011).

Tabla 1. Peso seco, materia orgánica y densidad celular de las biopelículas formadas por *Navicula* sp. y *N. incerta* en sustratos de plástico, tela y madera.

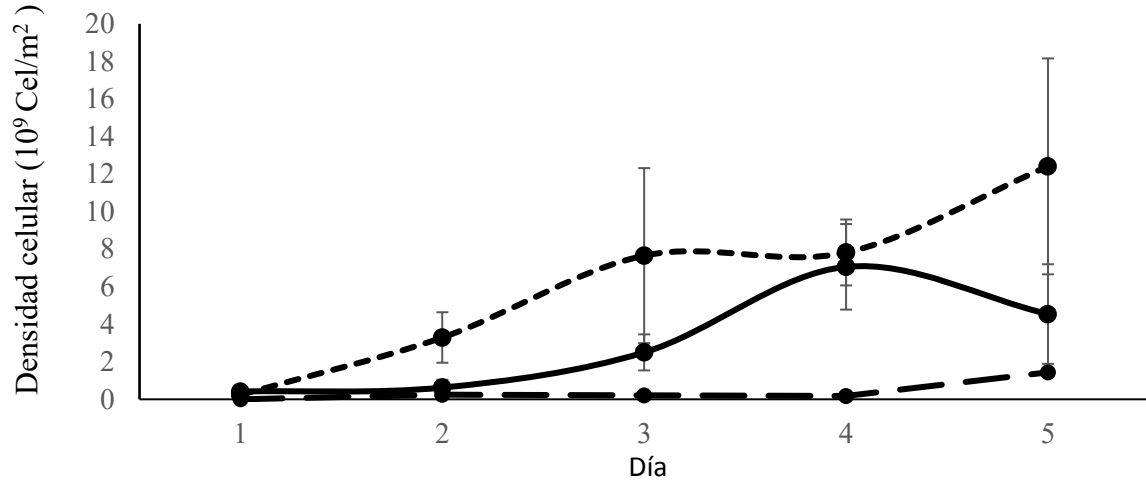
Tratamiento	Peso seco (g/m ²)	Materia orgánica (g/m ²)	Densidad celular final (cel/m ²)
<i>Navicula</i> sp.			
Plástico	2.83 ^a ± 0.23	1.32 ^b ± 0.17	1.24 x 10 ^{9b} ± 0.65 x 10 ⁹
Tela	6.64 ^b ± 0.76	1.56 ^b ± 0.20	0.45 x 10 ^{9a} ± 0.14 x 10 ⁹
Madera	0.30 ^a ± 0.09	0.02 ^a ± 0.01	0.14 x 10 ^{9a} ± 0.058x10 ⁹
<i>N. incerta</i>			
Plástico	4.55 ^b ± 0.31	2.53 ^b ± 0.19	1.10 x 10 ^{9b} ± 0.15 x 10 ⁹
Tela	6.11 ^b ± 0.62	3.22 ^b ± 0.16	0.88 x 10 ^{9ab} ± 0.095 x 10 ⁹
Madera	0.02 ^a ± 0.05	0.073 ^a ± 0.02	0.56 x 10 ^{9a} ± 0.066 x 10 ⁹

Los valores son medias ± E. E. Diferentes letras en una misma columna implican diferencias significativas (p < 0.05).

V.1.2. Densidad celular

En cuanto al número de células de microalgas adheridas a las superficies, se registraron los valores más altos en el sustrato de plástico en ambas especies de microalgas, *Navicula* sp. (1.24 x 10⁹ cel/m²) y *N. incerta* (1.10 x 10⁹ cel/m²). Se observaron los menores valores en los sustratos de madera y tela (Figura 1).

a)



b)

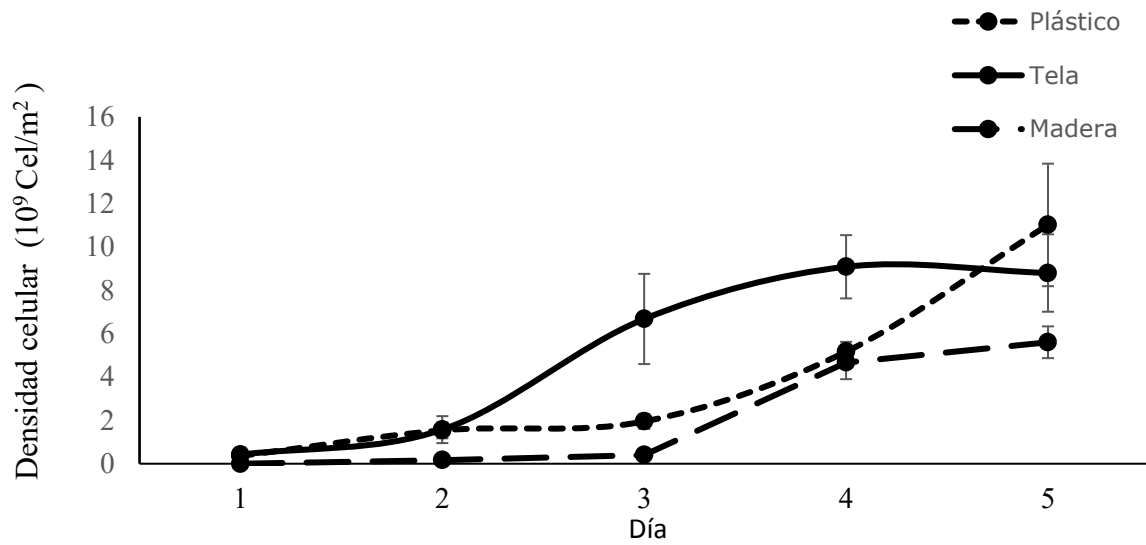


Figura 1. Crecimiento de *Navicula* sp. (a) y *N. incerta* (b) en sustratos de plástico, tela y madera.

V.1.3. Composición bioquímica

Con respecto a la composición bioquímica de la biopelícula, se encontraron diferencias significativas entre las dos microalgas, así como entre los sustratos evaluados. El contenido de proteína fue mayor ($F=6.043$, $P=0.0018$) en las biopelículas formadas por *Navicula* sp. en la tela y madera, mientras que para *N. incerta* fue significativamente mayor en la red de plástico, con respecto a tela y madera. El contenido de lípidos fue mayor para *Navicula* sp. ($F=87.646$, $P=0$) independientemente del sustrato. El mayor contenido de carbohidratos se registró para *N. incerta*. ($F=13.612$, $P=0.001$) en tela y madera (Tabla 2), el menor contenido fue para *Navicula* sp. independientemente del sustrato.

Tabla 2. Composición bioquímica final (%) de las biopelículas formadas por *Navicula* sp. y *N. incerta* en sustratos de plástico, tela y madera.

Efectos principales	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)
<i>Navicula</i> sp.			
Plástico	8.72 ^b ± 0.55	11.90 ^a ± 1.23	37.06 ^a ± 2.38
Tela	12.89 ^b ± 1.92	23.07 ^b ± 2.21	36.67 ^a ± 3.67
Madera	11.84 ^b ± 1.07	21.55 ^b ± 2.02	35.65 ^a ± 3.28
<i>N. incerta</i>			
Plástico	4.76 ^a ± 0.47	19.28 ^c ± 1.53	35.19 ^a ± 3.23
Tela	2.12 ^a ± 0.47	2.63 ^a ± 0.45	58.84 ^b ± 6.67
Madera	2.17 ^a ± 0.18	11.68 ^b ± 0.61	56.30 ^b ± 1.81

Los valores son medias ± E. E. Diferentes letras en la misma columna implican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se han evaluado diversos materiales como sustratos de biopelículas para microalgas móviles como *Chlorella* sp. o especies bentónicas; estos sustratos incluyen espuma de poliestireno, cartón, nylon, telas, vidrio, bambú y muchos otros (Johnson *et al.*, 2010). Contrariamente a los observados en el presente estudio, Azim *et al.* (2002) demostraron que los tubos de cristal y el bambú, debido a sus mayores densidades, podían soportar una comunidad perifítica más diversa que el bagazo de caña y la madera. De manera similar, Khatoon *et al.* (2007) informaron que el bambú, el PVC y las láminas de plástico tenían una colonización de

perifiton adecuada en los estanques de acuicultura de camarones en Malasia. Hashimoto *et al.* (2016) evaluaron las comunidades de diatomeas asociadas con biopelículas en superficies de vidrio sumergidas verticalmente en el Mar de Japón, e informaron que *Navicula* y *Nitzschia* fueron los géneros dominantes en el estudio.

La adherencia y la estabilidad de la biopelícula dependen en gran medida de factores como el tipo de cultivo, el medio de cultivo y el sustrato (Johnson *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2015). Algunos parámetros ambientales, como la irradiancia, la temperatura, la salinidad y el contenido de nutrientes, también pueden influir en los patrones de colonización (Tyler *et al.*, 2011).

Algunas características de los sustratos tienen un efecto significativo en los patrones de colonización; por ejemplo, la textura y la porosidad del tejido favorecen la adherencia y la formación de biopelículas (Viau *et al.*, 2013). Las superficies arrugadas y porosas están asociadas con una mayor adherencia de organismos y materia orgánica debido a un área más grande y una mayor protección contra las fuerzas hidráulicas (Babu, 2011). Esto concuerda con los resultados que se encontraron en el presente estudio, en donde los materiales porosos como la tela y la malla plástica tuvieron mayor capacidad de retener materia seca y orgánica, que un material liso como la madera.

En acuicultura, se ha comprobado que las biopelículas mantienen o mejoran la calidad del agua y la respuesta productiva de diversas especies cultivadas, principalmente peces y camarones. Para promoverlas, se ha utilizado una amplia variedad de sustratos, incluidos materiales degradables (bambú, madera y telas diversas), materiales no degradables (fibra de vidrio, botellas de vidrio, nylon, PVC y láminas de plástico) y materiales especialmente diseñados conocidos como AquamatsTM (Ferreira-Marinho *et al.*, 2016).

Johnson y Wen (2010) realizaron una investigación para producir biocombustibles a partir de la microalga *Chlorella* sp., e informaron que el contenido de biomasa y lípidos estaba fuertemente influenciado por el tipo de sustrato utilizado, siendo la espuma de poliestireno el mejor material para ese propósito (25.65 g/m² de materia seca y 2.31 g/m² de contenido de lípidos). Christenson y Sims (2012) encontraron mayores concentraciones de biomasa microalgal en las superficies de los polímeros naturales (algodón y yute) en comparación con la de los polímeros sintéticos (nylon, polipropileno y acrílico). Aunque una desventaja de los

materiales porosos, como el poliuretano, el yute, la espuma vegetal y la espuma de nylon, es la dificultad de recuperar la biomasa que se incrusta en los poros (Johnson y Wen, 2010).

Es común encontrar diferencias en la composición bioquímica de las microalgas entre especies e incluso entre las mismas especies dependiendo de las condiciones de cultivo. Flores-Vergara (1998) encontró que para las microalgas bentónicas cultivadas en diferentes condiciones de temperatura y de luz, la concentración de proteínas varió del 11 al 69%, la de los carbohidratos del 2 al 40% y la de los lípidos del 1.8 al 45%. Del mismo modo, Fimbres-Olivarria (2015) reportó para *Navicula* sp. valores de 12 al 22% para las proteínas, del 3 al 4% para los carbohidratos y del 14 al 35% para los lípidos. Por otra parte, Courtois *et al.* (2012) para *N. incerta*, encontraron valores de 6 a 8% para lípidos, 13% para proteínas y 20 a 27% para carbohidratos; en nuestro estudio los valores de proteína variaron entre 11.68 y 21.17%. El alto contenido de carbohidratos encontrado en todos los tratamientos (35-58%) podría atribuirse a la presencia de diversas sustancias poliméricas extracelulares (EPS), principalmente polisacáridos excretados por las microalgas, que son ricas en glucosa y galactosa, entre otros carbohidratos (Klein *et al.*, 2014; Van Colen *et al.*, 2014). La producción de estos componentes es afectada por la edad del cultivo, la concentración de nutrientes y el sustrato (Shen *et al.*, 2015). Las EPS juegan un papel importante en el proceso de formación de las biopelículas al facilitar la adhesión y proporcionar nutrientes para las bacterias y otros microorganismos, así como la protección contra las fuerzas hidráulicas (Wingender *et al.*, 1999; Decho, 2000).

En el presente estudio, los perfiles bioquímicos de algunas de las biopelículas formadas por ambas especies en un sustrato particular, específicamente el contenido de proteínas de *Navicula* sp. en tela y *N. incerta* en la red de plástico (aproximadamente 23 y 20%, respectivamente), indican que las biopelículas serían fuentes de alimentación complementarias adecuadas para peces y camarones cultivados.

V.2. Biopelículas formadas por *N. incerta* y bacterias probióticas

En el presente trabajo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para la biomasa seca y orgánica entre los tratamientos durante el bioensayo. El tratamiento con BFNP (biopelícula *Navicula incerta* + probiótico) tuvo mayor cantidad de materia seca con 197 ± 25 g/m². La cantidad de materia orgánica fue ligeramente mayor para el tratamiento con BFN (biopelícula *Navicula incerta*) con 47 ± 6 g/m².

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos en la composición bioquímica de las biopelículas (Tabla 3).

Tabla 3. Composición bioquímica (%) de biopelículas formadas *N. incerta* (BFN) y *N. incerta* + probiótico (BFNP).

Tratamiento	Mat. Seca (g/m ²)	Mat. Orgánico (g/m ²)	Proteínas %	Lípidos %	Carbohidratos %
BFN	149 ^a ± 39	47 ^a ± 6	32 ^b ± 3	6 ^a ± 1	20 ^b ± 2
BFNP	197 ^a ± 25	46 ^a ± 6	19 ^a ± 2	19 ^b ± 1	10 ^a ± 2
Valor de P < 0.05	0.331	0.711	0.015	0.044	0.001

Los valores son medias ± E.E. Diferentes letras en la misma columna implican son diferencias significativas ($p < 0.05$).

La mayor cantidad de proteína se registró en el tratamiento BFN con $32 \pm 3\%$ y la mayor cantidad de lípidos en el tratamiento BFNP con $19 \pm 1\%$. Para los carbohidratos, la mayor cantidad se encontró en el tratamiento en BFN con $20 \pm 2\%$ (Tabla 3). La composición proximal de las biopelículas reportada por diversos autores, varía de 23 a 30% para proteínas, 2 a 9% para lípidos, 25 a 28% para carbohidratos y 16 a 42% para cenizas (Azim *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2002; van Dam *et al.*, 2002; Gangadhar *et al.*, 2017). La mayoría de los acuicultores utilizan dietas formuladas que contienen en su composición: 18-50% de proteína, 10-25% de lípidos, 15-20% de carbohidratos, <8.5% de cenizas, <1.5% de fósforo, agua y trazas de vitaminas y minerales (Craig y Helfrich, 2002). Esto sugiere que la calidad nutricional de las biopelículas

en el presente estudio es adecuada para utilizarse como suplemento dietético en el cultivo de peces y camarones.

Diversos estudios han demostrado que el uso de biopelículas de microalgas y probióticos comerciales en cultivos de camarones *Litopenaeus vannamei*, en aguas interiores, son una buena fuente de alimento vivo y podrían mejorar la calidad del agua y el rendimiento productivo (Anand *et al.*, 2013; Ju *et al.*, 2009). Aunque la composición bioquímica próxima varió ampliamente entre las biopelículas BFN y BFNP, en ambos casos fue adecuada para ser considerada como fuente de alimentación complementaria y podría incorporarse en cultivos tanto de larvas como de camarones juveniles o adultos.

Gómez-Ramírez *et al.* (2019) encontraron para *Navicula incerta* valores de 21% para proteínas, 5% para lípidos y 33% para carbohidratos. De manera similar, Curtois *et al.* (2012) encontraron valores en *N. incerta* de 6 a 8% para lípidos, 13% para proteínas y 20 a 27% para carbohidratos, es decir biopelículas con valores nutricionales menores que las producidas en este estudio, sobre todo para el caso de las proteínas.

V.2.1. Análisis de calidad del agua de cultivo

En los cultivos de camarón, la calidad de agua es un factor de gran relevancia para el desarrollo adecuado de los organismos cultivados. En los bioflocs y biofilms, además de las bacterias heterótrofas y diatomeas, también están presentes las bacterias nitrificantes que metabolizan los compuestos nitrogenados presentes en el agua. Algunas especies del género *Bacillus*, oxidan el amoníaco a nitrito y el nitrito a nitrato, y este proceso reduce la alcalinidad en forma de carbonatos y bicarbonatos (Nimrat *et al.*, 2012). Si estos sistemas se diseñan e implementan de manera adecuada, los compuestos nitrógenos pueden mantenerse a niveles aceptables para la cría de camarones (Furtado *et al.*, 2014).

El nitrato, es el producto final de la nitrificación del amoníaco y es el compuesto nitrogenado menos dañino para los peneidos (Furtado *et al.*, 2014). La dinámica de TAN, NO₂-N, NO₃-N y PO₄-P durante el experimento se muestran en la Figura 1. El patrón fue similar en los tratamientos; se observó un aumento en el día 10 y una reducción al día 20. Se registraron concentraciones promedio de TAN que fluctuaron entre 2.16 y 2.93 mg/L con los mayores

valores en el tratamiento BFNP. Para NO₂-N, los niveles fluctuaron de 0.56 a 1.09 mg/L durante el experimento, al final del cultivo, se observaron valores más bajo que los registrados al inicio del bioensayo en todos los tratamientos. Los valores de NO₃-N fluctuaron entre 0.1 y 3.45 mg/L y se redujeron hacia el final del experimento en todos los tratamientos. Los valores de PO₄-P fluctuaron entre 6.44 y 7.84 mg/L. El nivel más bajo de PO₄-P se encontró en el tratamiento con probióticos (BFNP) hacia la mitad del experimento (4.03 mg/mL), los valores aumentaron al final del bioensayo en todos los tratamientos.

Los niveles de TAN y de NO₃-N estuvieron dentro de los rangos reportados por Martínez-Córdova *et al.* (2015), Villanueva-Gutiérrez *et al.* (2015) y Moreno-Arias (2017) para condiciones controladas de laboratorio para *L. vannamei*. Aunque las concentraciones de TAN estuvieron por encima de lo recomendado, no se observaron mortalidades masivas, probablemente porque esos niveles permanecieron poco tiempo en el sistema. Por el contrario, para nitrito y fosfato en los tratamientos y controles, las concentraciones alcanzaron niveles superiores a los recomendados (Martínez-Córdova, 2009), aunque tampoco en este caso se observó un aumento en la mortalidad de los camarones.

La disminución de TAN y NO₂-N del día 10 al día 20, probablemente se debió a su consumo por parte de las diatomeas, bacterias nitrificantes y las cianobacterias presentes en las biopelículas. Esto concuerda con los reportes de otros autores quienes señalan que el uso de microalgas perifíticas puede reducir significativamente los niveles de TAN en la columna de agua (Ziemann *et al.*, 1992). La baja concentración de amoníaco y nitrito en la acuicultura sin intercambio de agua se logra mediante presencia de bacterias que eliminan estos compuestos a través del proceso de nitrificación (Ebeling *et al.*, 2006). Por otro lado, el amonio también es absorbido por las microalgas que utilizan este compuesto para producir biomasa. (Thompson *et al.*, 2002).

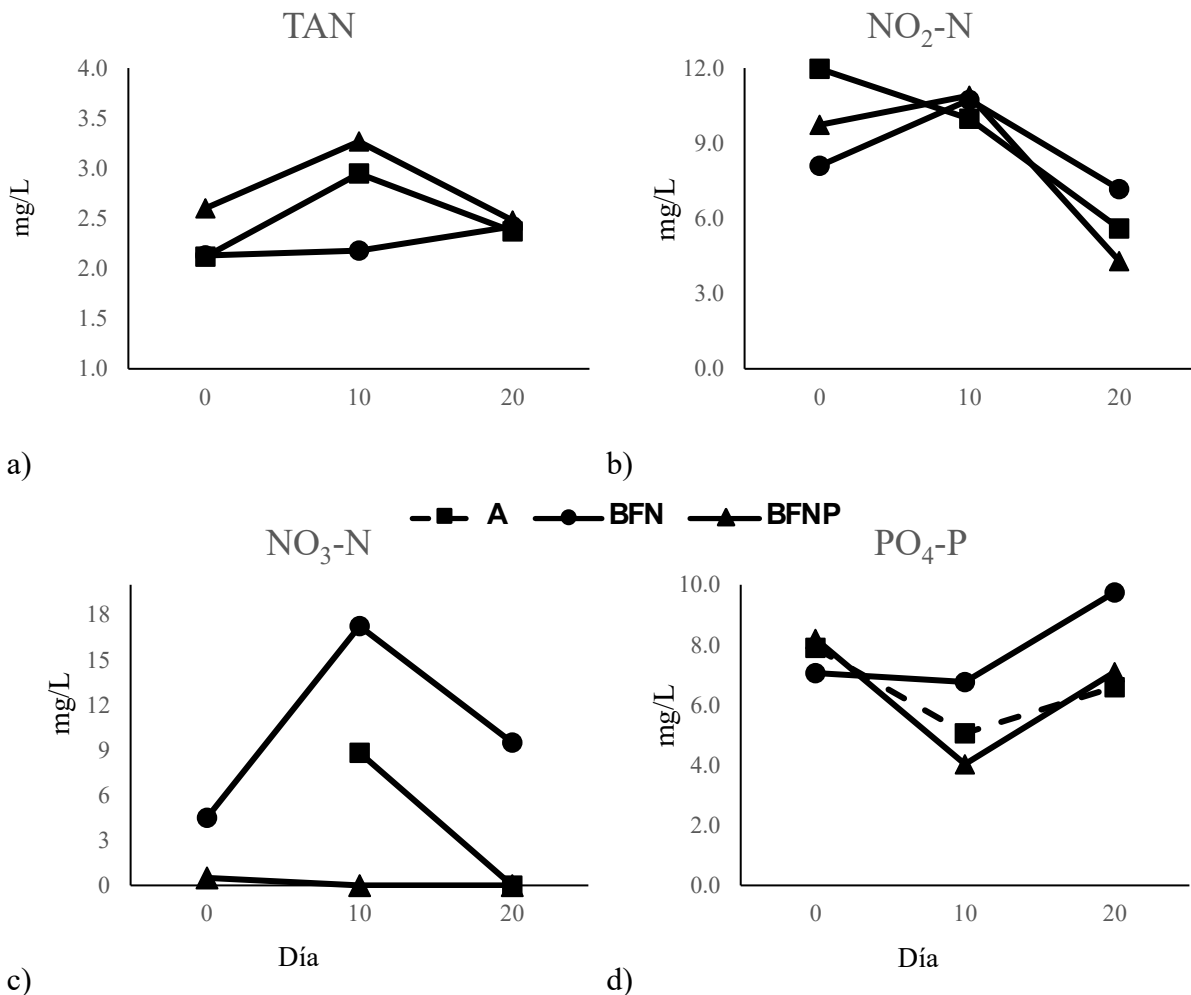


Figura 2. Media \pm E. E. de amoníaco (TAN) (a), nitrito (NO₂-N) (b), fosfato (PO₄-P) (c) y nitrato (NO₃-N), en tratamientos y control.

Los parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua se muestran en la Tabla 4. La temperatura, la salinidad, el pH y el oxígeno disuelto no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($P > 0.05$). La temperatura varió entre 25.21 °C y 25.82 °C. La salinidad varió entre 33.53 y 34.40 UPS, el OD entre 6.05 y 6.43 y el PH entre 7.65 y 7.67.

Tabla 4. Parámetros de calidad del agua de *Litopenaeus vannamei* en los tratamientos BFNP (*N. incerta* + probiótico), BFN (biofilm de *N. incerta*) y A (control sin biofilm).

Parámetros	Tratamientos		
	A	BFN	BFNP
Temperatura (°C)	25.35 ^a ± 0.71	25.82 ^a ± 0.59	25.21 ^a ± 1.27
Salinidad (g L ⁻¹)	33.53 ^a ± 1.98	34.40 ^a ± 0.83	33.96 ^a ± 0.72
OD (mg L ⁻¹)	6.05 ^a ± 0.22	6.42 ^a ± 0.21	6.43 ^a ± 0.2
pH	7.67 ^a ± 0.11	7.65 ^a ± 0.07	7.67 ^a ± 0.08

Los valores son medias ± E. E. de las determinaciones.

En todos los casos, dichos parámetros, estuvieron dentro del rango recomendado para el cultivo, del camarón (Raccotta & Hernández, 2000). Según Martínez-Córdova, (2009) es aceptable un rango de pH de 6 a 8, temperatura de 25 a 32 °C, OD > 3 mg L⁻¹ y salinidad de 15 a 35.

V.2.2 Carga bacteriana del agua de cultivo

No se encontraron diferencias en las bacterias de tipo *Vibrio* en los estanques tratados después del inóculo de las biopelículas y el control (Tabla 5). En todos los tratamientos y el control, la cantidad de bacterias varió de 2.69 a 3.50 Log UFC/mL antes de la inoculación y después de eso, de 1.06 a 4.34 Log UFC/mL. En el tratamiento BFNP se encontró la mayor carga bacteriana 24 horas después de ser colocada la biopelícula al día 10, mientras que en el tratamiento BFN se encontró el menor número de UFC en el día cero, antes de ser colocada la biopelícula. Al comparar entre tratamientos y tiempos de muestreo no se encontraron diferencias significativas (P > 0.05).

Se han registrado densidades bacterianas de 0.2 a 4.3 UFC para cultivos de la mayoría de especies de microalgas, lo que concuerda con los resultados aquí reportados. Particularmente para las algas de la clase Bacillariophyceae, las densidades reportadas son relativamente altas y van de 5.7 a 16.4 UFC (Salvesen *et al.*, 2000). Se ha encontrado que altas concentraciones de bacterias benéficas en el agua de cultivo, pueden mejorar el mecanismo de respuesta inmune del

camarón (Kim *et al.*, 2015). Esto parece haber sucedido en el presente estudio dado que las supervivencias en ambos tratamientos fueron bastante altas y los camarones se observaron sanos.

La abundancia y la composición de la flora bacteriana están directamente relacionadas con las especies de microalgas y su estado fisiológico. Los niveles bacterianos más altos se asocian con microalgas de crecimiento lento en la fase estacionaria (Grossart *et al.*, 2005).

Se ha registrado que varias especies de *Vibrio* son agentes causales de enfermedades en algunas especies de camarones (Wang *et al.*, 2007). Existe un equilibrio dinámico entre las bacterias probióticas y los patógenos. Las biopelículas con probióticos tienden a reducir el número de comunidades de tipo *Vibrio*. Los probióticos activados pueden mejorar la descomposición de la materia orgánica y la reducción de las bacterias patógenas, lo cual puede deberse a la limitación de nutrientes y a la exclusión competitiva, tal como lo reportan Aguilera-Rivera *et al.* (2014) y Moreno-Arias (2017) usando cepas de bacterias probióticas y bioflocs respectivamente. Además, Timmons *et al.* (2002) encontraron que la disminución de bacterias en los sistemas de acuicultura puede atribuirse adicionalmente a las variaciones de temperatura, la salinidad, la alcalinidad y el pH.

Se ha demostrado que el tracto digestivo de peneidos es un ambiente adecuado para que las bacterias del género *Vibrio* se multipliquen y, la activación de cualquier factor de estrés en el sistema de cultivo, puede hacer que el animal sea susceptible a la invasión de cepas patógenas del género (Singh *et al.*, 1998). Por lo tanto, el concepto de alterar esta flora microbiana dominada por *Vibrio* mediante la aplicación de un probiótico antagónico parece prometedor.

Tabla 5. Abundancia (Log UFC/mL) de bacterias tipo *Vibrio* en agua de cultivo al comienzo (día 0), a la mitad (día 10) y al final (día 20) del ensayo en juveniles de *L. vannamei*. BFNP (*N. incerta* + probiótico), BFN (biopelícula de *N. incerta*) y A (control sin biofilm).

Tratamientos	Unidades Formadoras de Colonias (Log UFC/mL)	
	Antes de inocular	Después de inocular
Tiempo 0		
BFNP	3.27 ^a ± 0.26	3.99 ^a ± 0.36
A	3.50 ^a ± 0.05	1.06 ^a ± 0.2
BFN	2.69 ^a ± 0.36	3.31 ^a ± 0.08
Día 10		
BFNP	3.37 ^a ± 0.05	4.34 ^a ± 0.17
A	3.32 ^a ± 0.17	3.86 ^a ± 0.26
BFN	3.30 ^a ± 0.11	3.61 ^a ± 0.14
Día 20		
BFNP	3.29 ^a ± 0.11	3.63 ^a ± 0.15
A	3.40 ^a ± 0.06	3.37 ^a ± 0.19
BFN	3.33 ^a ± 0.07	3.32 ^a ± 0.16

UFC: Unidades formadoras de colonias. Los valores son medias ± E.E.

V.2.3. Parámetros productivos (crecimiento y supervivencia) de *L. vannamei*

Todos los parámetros productivos registrados en el estudio, resultaron mejores en el tratamiento con microalga y bacterias probióticas que en el control, lo cual concuerda con otros trabajos en donde el uso de biopelículas en el cultivo de camarones ha favorecido significativamente el crecimiento de *Fenneropenaeus paulensis* (Ballester *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2002), *L. vannamei* (Audelo-Naranjo *et al.*, 2011; Moss y Moss, 2004) y *P. monodon* (Anand *et al.*, 2013; Khatoon *et al.*, 2007).

Diversos autores han reportado un aumento en el crecimiento de camarones cultivados en presencia de sustratos artificiales y lo asocian a la disponibilidad de materia orgánica particulada de las biopelículas y sugieren que el uso de ellas podría disminuir los efectos negativos de la alta densidad de población durante la fase de cría (Becerra *et al.*, 2012; Martínez- Córdova *et al.*, 2015).

En el presente trabajo, se registraron diferencias significativas en algunos de los parámetros productivos entre los tratamientos. La supervivencia más alta (100%) se registró en el tratamiento BFNP, con diferencias ($p < 0.05$) respecto al control (A) y el tratamiento BFN. La biomasa final mayor se registró en los tratamientos BFNP (109.71 ± 3.581 g) y en el control (99.1 ± 6.048 g), sin diferencias significativas entre estos y el menor valor en BFN (92.02 ± 0.468 g) (Tabla 6). Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo reportado por diversos autores. Ju *et al.* (2009) registraron un crecimiento y supervivencia significativamente altos en *L. vannamei* con dieta suplementada con microalgas. Sivakumar *et al.* (2012) obtuvieron el 80% supervivencia de *Peneus monodon* con respecto al control (20%) cuando suministraron microorganismos benéficos. Kongnum y Hongpattarakere (2012) obtuvieron una supervivencia cerca de 99% de *L. vannamei* cuando se le proporcionaron microorganismos, con respecto al control (68.89%). En el mismo sentido, Moreno-Arias *et al.* (2018), encontraron que *L. vannamei* tuvo un crecimiento significativamente más alto en sistemas con biopelículas-biofloculos en comparación con los sistemas tradicionales, esto se explica por el reciclaje de nutrientes en el sistema, así como por la riqueza nutricional proporcionada por los microorganismos.

Además de ser una fuente de macronutrientes, las microalgas y las bacterias heterótrofas aportan potenciadores inmunológicos (Supamattaya *et al.*, 2005), promotores del crecimiento (Kuhn *et al.*, 2010), compuestos bioactivos (Ju *et al.*, 2008) y estimulantes dietéticos (Xu *et al.*, 2012) que pueden mejorar el rendimiento de crecimiento del camarón cultivado. Por lo tanto, se puede inferir que las microalgas y probióticos en la biopelícula, fueron responsables de mejor respuesta productiva en los juveniles de camarón.

Pandey *et al.* (2014), consideran que el aumento del crecimiento de los camarones cultivados en presencia de sustratos se debe a la disponibilidad de materia orgánica particulada adherida y que el uso de sustratos artificiales podría disminuir los efectos negativos de la alta densidad de población durante la fase de cría. El presente estudio se realizó en condiciones de alta densidad, pese a lo cual la sobrevivencia y el crecimiento del camarón fueron aceptables, muy probablemente debido al efecto benéfico de microalgas y bacterias.

Existe poca información sobre el uso de biopelículas en las que se promueva tanto el desarrollo de microalgas como de bacterias benéficas, como se hizo en el presente estudio. Normalmente las bacterias se incorporan espontáneamente en consorcios microalgales, pero no se les promueve explícitamente. De ahí que nuestros resultados son novedosos en este contexto.

Tabla 6. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei* en tratamientos BFNP (*N. incerta* + biofilm probiótico), BFN (*N. incerta*) y A (control sin biofilm).

	Tratamientos		
	A	BFN	BFNP
Parámetros productivos			
Peso individual inicial (g)	5.19 ^a ±0.35	4.54 ^a ±0.31	5.14 ^a ±0.58
Biomasa inicial (g)	83.05 ^b ±3.206	74.14 ^a ±2.05	82.22 ^b ±5.332
Peso individual final (g)	6.45 ^a ±0.43	6.43 ^a ±0.27	7.01 ^a ± 0.43
Biomasa final (g)	99.1 ^{ab} ±6.048	92.02 ^a ±0.468	109.71 ^b ±3.581
Biomasa ganada (g)	16.05 ^a ±6.70	17.88 ^a ±1.59	27.49 ^b ±3.606
Supervivencia %	97 ^b ±4.82	95 ^a ±3.6	100 ^c ±0

Los valores son medias ± E. E. Diferentes letras en la misma fila, implican diferencias significativas (p< 0.05).

V.2.4. Respuesta fisiológica de *L. vannamei*

La condición fisiológica del camarón al final del ensayo, varió entre los tratamientos en la mayoría de los metabolitos analizados en hemolinfa. Para el músculo no se encontraron diferencias significativas ni entre el tiempo ni entre los tratamientos. También se encontraron diferencias entre los parámetros fisiológicos entre hemolinfa y músculo (Figura 3)

Los parámetros bioquímicos en hemolinfa y músculo, pueden considerarse como indicadores del estado fisiológico, nutricional o inmunológico de los camarones en cultivo (Becerra *et al.*, 2012; Pascual *et al.*, 2003). Los niveles de los metabolitos en hemolinfa varían entre especies y ciclos de muda de los crustáceos, lo que dificulta establecer un parámetro normal (Pascual *et al.*, 2003; Medina-Félix *et al.*, 2017).

Los niveles de proteína en la hemolinfa fluctuaron entre 61.30 y 194.07 mg/mL, sin diferencias significativas entre el día 0 y el día 20 del experimento. Niveles altos de proteína en hemolinfa, indican movilización de este metabolito a los sitios de reserva para la síntesis de tejido, así mismo es indicador de salud hacia la etapa de muda (Rosas *et al.*, 2002). En camarones cultivados al interior, el valor sugerido como óptimo para proteína en hemolinfa es entre 100 mg/ml (Racotta y Palacios, 1998) y 127 mg/ml (Rodríguez *et al.*, 2000), mientras que para músculo el rango va de 61.5 a 90 mg/g (Aparicio- Simón *et al.*, 2010). En nuestro estudio los valores fluctuaron entre 86.5 y 107.52 mg/g de tejido; no se encontraron diferencias significativas ni entre el tiempo ni entre los tratamientos, sin embargo se observó un incremento en el tratamiento BFNP del día 0 al día 20. Los mayores niveles de proteína en los camarones alimentados con microalgas y probióticos pudieran ser atribuidos a una adecuada contribución nutricional de estos microorganismos como fuente protéica.

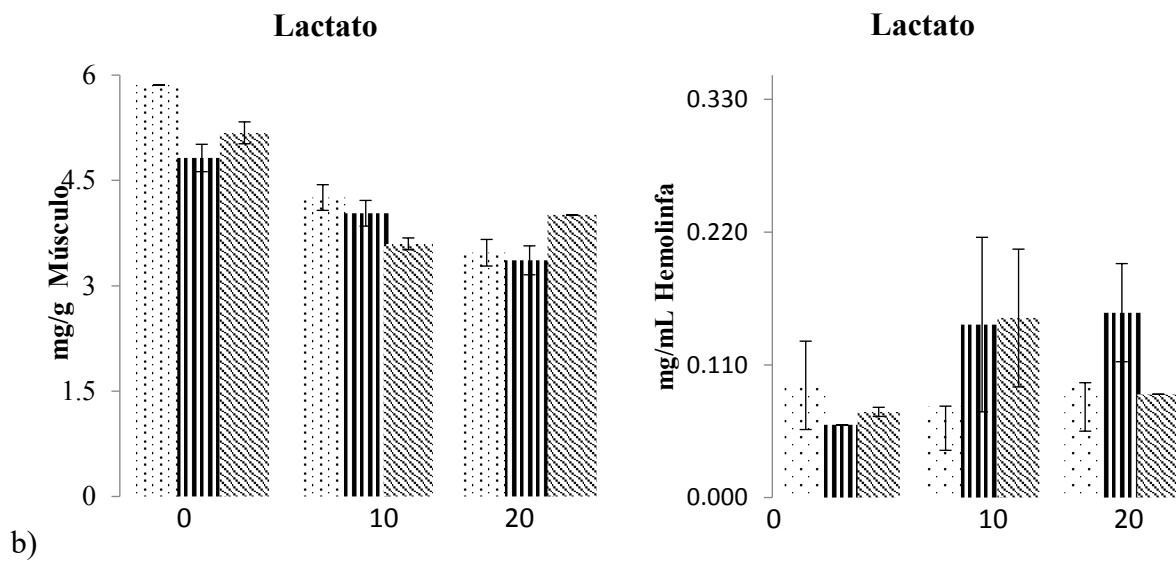
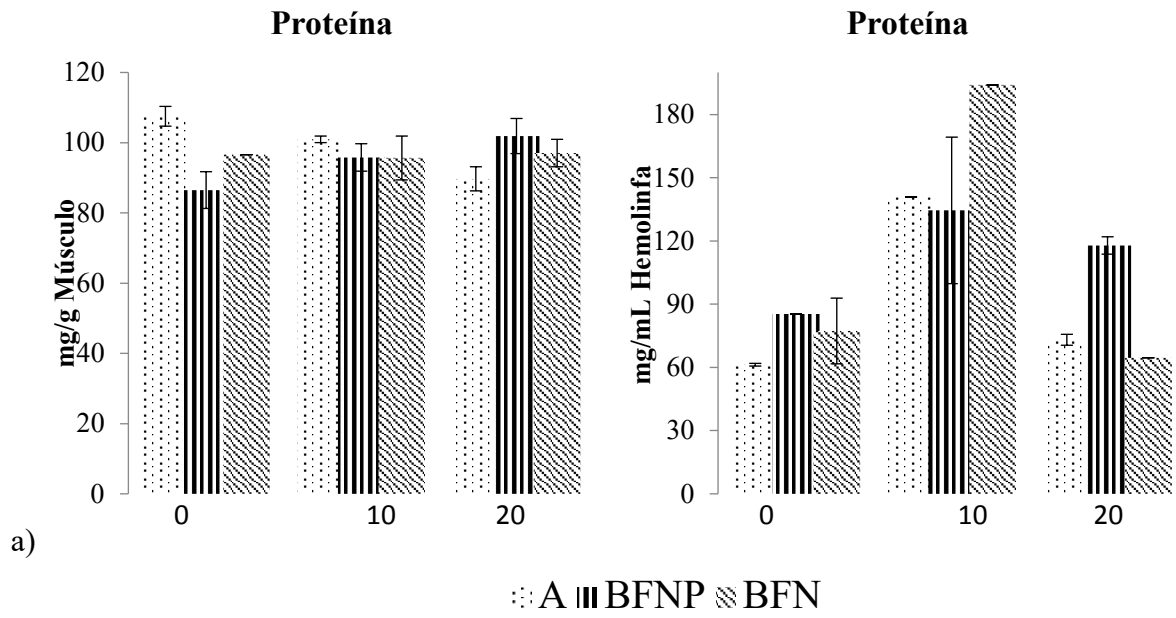
El lactato es comúnmente utilizado como indicador de estrés y es de esperarse que sus niveles se incrementen después de inducir condiciones estresantes. En el presente estudio, no se registraron diferencias significativas en la concentración de lactato entre los tiempos de muestreo en hemolinfa, los cuales variaron desde 0.060 a 0.153 mg/mL; los niveles fueron aumentando durante el tiempo de cultivo, lo cual es esperable dado que el tiempo de confinamiento y la manipulación constituyen factores de estrés. Por el contrario, los niveles musculares disminuyeron con el tiempo de cultivo, oscilando entre 3.36 y 5.86 mg/g. Aun así, los niveles permanecieron adecuados tanto para hemolinfa (0.07 a 0.13 mg/mL) como para el músculo (Medina-Félix *et al.*, 2017).

Los lípidos son la mayor fuente de energía para organismos acuáticos. La utilización de lípidos es una respuesta para que los camarones prosperen a pesar del estrés. Con respecto a los triglicéridos en hemolinfa, se observaron diferencias significativas entre los muestreos y aumentaron con el tiempo de 0.067 a 0.678 mg/mL. En el músculo permanecieron constantes, sin diferencias significativas entre tratamientos o tiempo de muestreo, variando de 0.212 a 0.317 mg/g. Es difícil establecer los parámetros normales en los niveles de triglicéridos de *L. vannamei*. Aun así, se pudo observar que estuvieron dentro de los rangos reportados por diversos autores: en hemolinfa: 1.1 a 5.7 mg/mL (Pascual *et al.*, 2004), 0.50 a 0.75 mg/mL (Aparicio-

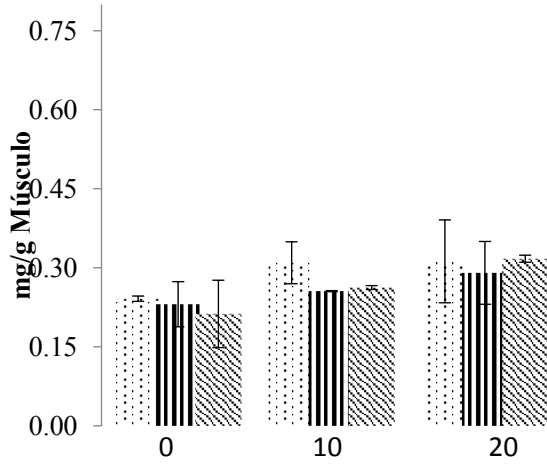
Simón *et al.*, 2010), 0.706-1.1 mg/mL (Medina-Félix *et al.*, 2017); en músculo: 1.9 a 2.9 mg/g (Aparicio- Simón *et al.*, 2010).

En el presente estudio, los niveles de colesterol en la hemolinfa oscilaron entre 0.041 y 0.426 mg/mL; estos valores se encontraron dentro de los reportados en la literatura: 0.20 a 0.33 mg/mL (Becerra-Dorame *et al.*, 2012), 0.24 mg/mL (Pascual *et al.*, 2004), 1.06 mg/mL (Sánchez *et al.*, 2001). En músculo variaron de 0.03 a 0.51 mg/g; estos valores resultaron menores a los reportados por Villanueva *et al.* (2015) quienes registraron valores de 9 mg/g en grupo control y 1.87 mg/g en sus tratamientos. Rosas *et al.* (2002) señalan la dificultad para establecer parámetros normales en colesterol, ya que su concentración depende de varios factores, tales como: dieta, sistema de cultivo, condición de estrés, edad, entre otros. También mencionan que éste metabolito no puede sintetizarse *de novo*, por lo que, junto con los acilglicéridos, son los indicadores vitales para conocer el estado nutricional de los camarones cultivados.

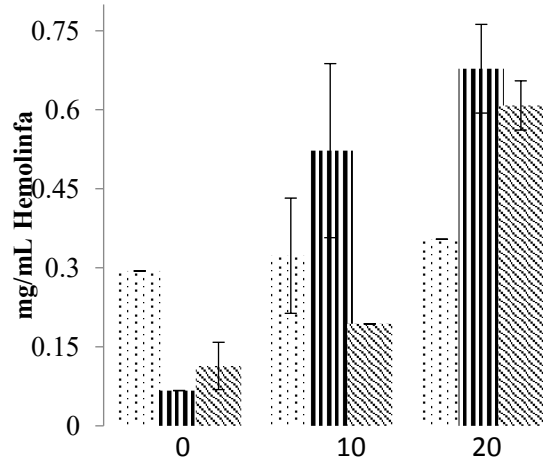
La glucosa es un indicador del metabolismo de carbohidratos e incrementa cuando los organismos están en condiciones de estrés, para ser utilizada como fuente de energía (Aparicio-Simón *et al.*, 2010). En el presente estudio, los niveles de glucosa variaron de 0.57 a 0.87mg/g en músculo y de 2.8 a 6.6 mg/mL en hemolinfa. Los valores más altos se encontraron en A y BFNP. Algunos autores reportan niveles de glucosa en hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* de 0.94 a 1.54 mg/mL (Medina-Félix *et al.*, 2017), mientras que Aparicio- Simón *et al.* (2010) encontraron valores más bajos de 0.17 a 0.36 mg/mL. Los niveles en el músculo estuvieron dentro de los rangos adecuados para la especie, sin diferencias significativas entre tratamientos o tiempo ($P>0.05$). En otros estudios se han reportado rangos de 3.4 a 4.1 mg/g (Villanueva *et al.*, 2015) y 6.32 a 11.4 mg/g (Aparicio- Simón *et al.*, 2010).



Triglicéridos



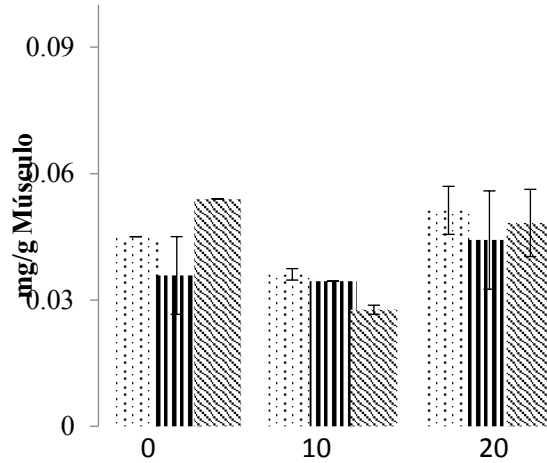
Triglicéridos



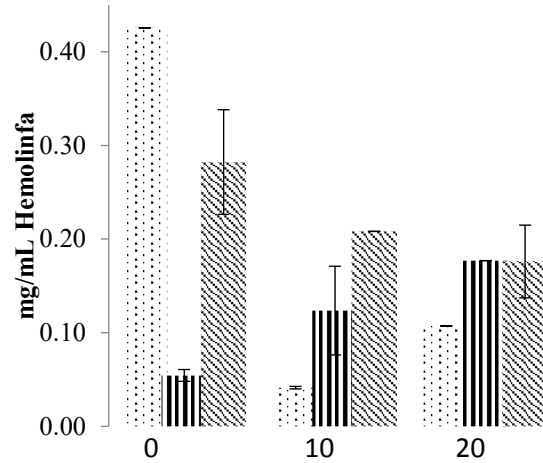
c)

⋯ A ||| BFNP ▨ BFN

Colesterol



Colesterol



d)

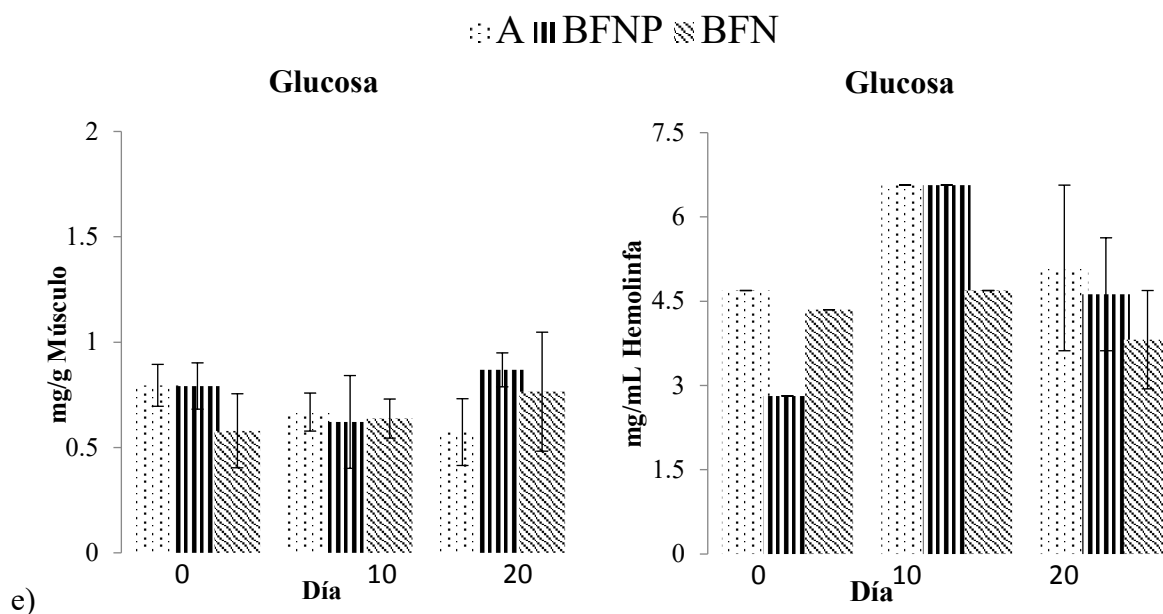


Figura 3. Concentración en hemolinfa y músculo de proteína (a), lactato (b), triglicéridos (c), colesterol (d) glucosa (e) en *Litopenaeus vannamei* durante el bioensayo en los tratamientos y el control. Barras verticales corresponden al error estándar.

V.2.5. Perfil de ácidos grasos

Mover a composición bioquímica

El contenido de los ácidos grasos en las biopelículas se muestra en la Tabla 7, donde se clasifican en esenciales y no esenciales de acuerdo con los requerimientos nutricionales de *L. vannamei* (National Research Council, 2011). Los ácidos grasos no esenciales más abundantes fueron C16:0 (ácido palmítico) con un valor medio de 22.25% de lípidos en el tratamiento BFNP, seguido de C16:1 (ácido palmitoleico) con 37.9% en el tratamiento BFN. El ácido graso esencial más abundante fue C20:5 (n-3) (ácido eicosapentaenoico, EPA) con un valor promedio de 28.47% en el tratamiento BFNP y 28.33% en BFN, seguido de C20:4n6 (n-6) con valores de 2.60 a 2.79%, BFN y BFNP, respectivamente.

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para los ácidos grasos saturados, C14:0 ($F = 47.923$; $P = 0.002$) y C16:0 ($F = 29.208$; $P = 0.006$) y en el ácido graso monoinsaturado C16:1 ($F = 15.840$; $P = 0.016$).

Tabla 7. Medias \pm E. E. (como % de lípidos) de contenido de ácidos grasos en las biopelículas BFNP (*N. incerta*) + probiótico) y BFN (biopelícula de *N. incerta*).

Ácidos grasos	BFN	BFNP
Saturados		
C14:0	6.04 ^a \pm 0.21	6.95 ^b \pm 0.2
C16:0	20.3 ^a \pm 0.29	22.25 ^b \pm 0.3
C18:0	0.8 \pm 0.22	ND
Monoinsaturados		
C16:1	37.9 ^b \pm 0.62	36.9 ^a \pm 3.35
C18:1 cis (n-9)	1.7 \pm 0.47	ND
Poliinsaturados		
C18:2 cis	0.9 \pm 0.23	ND
C20:4n6 (ARA)	2.79 ^a \pm 0.24	2.60 ^a \pm 0.14
C20:5n-3 (EPA)	28.33 ^a \pm 0.62	28.47 ^a \pm 0.95

ND: No detectado.

Diferentes letras en la misma fila implican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La biosíntesis de los lípidos varía dentro de las diferentes especies de diatomeas, sus etapas de crecimiento y los parámetros ambientales. El contenido más alto de PUFAS corresponde al EPA (Chew *et al.*, 2017). En particular en *N. incerta* predomina 16:1 y 20:5 (Yi *et al.*, 2017, Chávez- Medrano, 2008), lo cual concuerda con los valores obtenidos en el presente trabajo. Jiménez y Sánchez, (2016) mencionan que las diatomeas contienen el mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados, entre los diferentes grupos de microalgas. Reportaron que los principales ácidos grasos presentes en *Navicula* sp. son 16:0 (35.5%), 16: 1n-7cis (43.4%) y 20: 5n-3 (EPA) (29.0%).

Las bacterias generalmente carecen de PUFA's, solo algunas especies pueden producir EPA, ácido araquidónico (ARA) y ácido decosaheptaenoico (DHA) (Moreno-Arias *et al.*, 2018). Brown *et al.* (1996), reportan un bajo contenido de lípidos (2.5-9.0% de peso seco) y deficiencia de PUFA's en bacterias; así mismo menciona para levaduras un mayor contenido de ácidos

grasos saturados y monoinsaturados: para 16:0, 19.9% y para 16:1, 43.9%. Esto no se observó en el presente estudio ya que los valores de estos ácidos grasos fueron similares en biopelículas con y sin bacterias probióticas. El contenido de ácidos grasos insaturados (mono y poli), hacen de ellas un elemento nutritivo importante para el desarrollo de los camarones, tanto juveniles como adultos, sobre todo para su reproducción (Emerenciano *et al.*, 2013).

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir lo siguiente:

Las dos microalgas fueron capaces de formar biopelículas en los tres sustratos evaluados; sin embargo, la cantidad de materia seca y orgánica adherida y el número de células de microalgas asociadas con las biopelículas variaron significativamente, siendo el mayor para este estudio el sustrato de plástico. La red de plástico, a pesar de ser el material con la menor cantidad de materia seca y orgánica adherida, se consideró el sustrato adecuado debido a la estabilidad de la biopelícula y la facilidad para recuperar el material.

La composición bioquímica proximal de las biopelículas también varió ampliamente entre especies y sustratos. La composición bioquímica de la biopelícula *N. incerta* en sustrato de plástico fue adecuada para considerarse una fuente de alimentación complementaria para los organismos de cultivo.

La composición bioquímica proximal varió ampliamente entre las biopelículas con solo *N. incerta* (BFN) y biopelícula con *N. incerta* + probiótico (BFNP), esta última fue adecuada como fuente de alimentación complementaria y podría incorporarse en cultivos de larvas y post larvas de camarones, ya que en este trabajo los resultados en crecimiento y supervivencia (97-100%) fueron positivos.

Los mayores niveles de proteína en los camarones alimentados con microalgas/probióticos (BFNP) pudieran ser atribuidos a una adecuada contribución nutricional de estos microorganismos.

Los parámetros de calidad del agua monitoreados durante el experimento, estuvieron dentro del rango recomendado para la especie, sin diferencias significativas entre los tratamientos y el control. El uso de biopelículas ayudó a metabolizar los compuestos nitrogenados del sistema, reduciendo significativamente los niveles de amoníaco y nitrito.

El presente estudio confirma la importancia de la utilización de alimento vivo en el cultivo de camarón, las biopelículas formadas por microalgas y microalgas-bacterias fueron una buena

alternativa que se vio reflejada en mayor supervivencia y crecimiento del camarón en su etapa de preengorda.

VII. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se hacen las siguientes recomendaciones:

- Evaluar otros materiales que podrían ser más adecuados para la formación de biopelículas y al mismo tiempo considerar su disponibilidad, costo y manejo.
- Se requiere más investigación para comprender el mecanismo funcional entre los microorganismos en la biopelícula y cómo funcionan los probióticos en los estanques.
- Será útil generar más información sobre la selección de cepas, si los probióticos son aplicables en cultivos a gran escala.
- Evaluar el perfil de colonización de las biopelículas desde su inóculo hasta su maduración.
- Describir a detalle microorganismos que conforman las biopelículas además de *N. incerta* y las bacterias del probiótico Epicin G2.
- Se recomienda realizar estudios posteriores que consideren el establecimiento en el tracto gastrointestinal de las bacterias probióticas.
- Realizar el perfil de aminoácidos de las biopelículas y camarones, así como el de ácidos grasos de los camarones.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abreu, P. C., E.L.C. Ballester, C. Odebrecht, W. Jr. Wasielesky, R.O. Cavalli, W. Granéli y A.M. Anésio, 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes (d13C and d15N). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347:88–96.
- Aguilera- Rivera, D., D. A. Prieto, K., Escalante, C. Chávez, G. Cuzon y G. Gaxiola. 2014. Probiotic effect of FLOC on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 424, 215-219.
- Anand, P. S. S., M. P. S. Kohli, S. R. Dam, J. K. Sundaray, S. Kumar, A. Sinha, G. H. Pailan y M. K. Sukham. 2013. Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 392–395: 59–68.
- Aparicio-Simón, B., M. Piñón, R. Racotta y I. S. Racotta. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture* 298 (3): 308-314.
- APHA. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington D.C., Estados Unidos de América.
- Audelo, N. J. M., L.R. Martínez, D. Voltolina y J. S. Gómez. 2011. Water quality, production parameters and nutritional condition of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) grown intensively in zero water exchange mesocosms with artificial substrates. *Aquaculture Research* 42: 1371–1377.
- Audelo, N., J. M., D. Voltolina, y B. E. Romero. 2012. Culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) with zero water exchange and no food addition: an eco-friendly approach. *Latin American Journal Aquatic Research* 40(2): 441-447.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227–235.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, R. L. A. Meyer y F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 10:257-263.
- Azim, M. E., M. C. J. Verdegem, H. M. Khatoun, A. Wahab, A. A. van Dam, y M. C. M. Beveridge. 2002. A comparison of fertilization, feeding and three periphyton substrates for increasing fish production in freshwater pond aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture* 212: 227-243.
- Azim, M.E. y T. Asaeda. 2005. Periphyton structure, diversity and colonization. 15-34 p. En: Azim, M.E., Verdegem, M.C.J., van Dam, A. A. y Beveridge, M. (Eds.), *Periphyton: ecology, exploitation and management*. CABI Publishing Co., Wallingford.
- Azim, M.E. y D.C. Little. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 283: 29–35.
- Babu, M. 2011. Effect of Algal Biofilm and Operational conditions on Nitrogen removal in Wastewater Stabilization Ponds. Tesis de Doctorado. Wageningen University, Wageningen, Netherlands.
- Ballester, E. L. C. 2008. Contribuição dos microorganismos para a alimentação do camarão- rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda) em sistemas de cultivo e no estuário da lagoa dos patos. Tesis Doctorado. Universidade Federal do Rio Grande.

- Ballester, E.L.C., P.C. Abreu, R.O. Cavalli, M. Emerenciano, L. Abreu y W. Wasielesky. 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: 163–172.
- Barranguet, C., B. Veuger, S. A. M. Van Beusekom, P. Marvan, J.J. Sinke y W. Admiraal. 2005. Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. *European Journal of Phycology* 40: 1–8.
- Becerra, D. M. J., C. L. R. Martínez, E. J. A. López y P. M. Martínez. 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. *Israelí Journal of Aquaculture*.
- Becerra, D. M. J., C. L. R. Martínez, P. M. Martínez, L. J. Hernández, E. J. A. López, y C. F. Mendoza. 2012. Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. *Aquaculture Research*. doi: 10.1111/are.12033
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemical Physiology* 37: 911-917.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman y G. A. Dunstan. 1996. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331.
- Cabello-Pasini, P., C. A. Macias, V. Abdala, R. N. Korbee y F. L. Figueroa. 2011. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulvarigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 23: 363-369.
- Chávez-Medrano, C. I. 2008. Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de *Navicula incerta*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 116 p.
- Chew, W. K., Y. J. Ying, L. P. Show, H. N. Suan, J. J. Ching, C. T. Ling, D. J. Lee y J. S. Chang. 2017. Microalgae biorefinery: high value products perspectives, *Bioresource Technology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- Christenson, L.B. y R.C. Sims. 2012. Algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by products. *Biotechnology Bioingenierie* 109: 1674-1688.
- Courtois, de V. G., Porta, A., Viera, M. P., Fernández, P. y M. S. Izquierdo. 2012. Effects of density on growth rates for four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. *Journal of Applied Phycology* 24: 1427-1437
- Craig, S. y L.A. Helfrich. 2002. Understanding Nutrition, 420-256 p. Feeds and Feeding. National Register of Access Consultants, Estados Unidos de América.
- Dang, H. y C. R. Lovell. 2016. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80: 91-138.
- Decho, A.W. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20: 1257-1273.
- Devi, P. 1995. Abundance of bacterial and diatom fouling on various surfaces. *Proceeding of the Indian National Science Academy* 3: 231-240.
- Ebeling, J. M., M. B. Timmos y J. J. Bisogni. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257: 346-358.

- Emerenciano, M., E. L. C. Ballester, R.O. Cavalli y W. Wasielesky. 2011. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture International* 19: 891-901.
- Emerenciano, M., E. L. C. Ballester, R. O. Cavalli y W. Wasielesky. 2012a. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research* 43:447-457.
- Emerenciano, M., G. Gaxiola y G. Cuzon. 2012b. Biofloc Technology applied to shrimp broodstock. 217-230 p. En: Avnimelech Y. (Ed). *Biofloc Technology – a practical guide book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, Estados Unidos de América.
- Emerenciano, M., G. Cuzon, J. Goguenheim y G. Gaxiola. 2012c. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture Research* 44:75-85
- Emerenciano, M., G. Cuzon, M. Arévalo, M. M Miquelajauregui y G. Gaxiola. 2013. 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-012-9607-4>.
- Fernandes Da Silva, C., E. Ballester, J. Monserrat, L. Geracitano, W. Wasielesky y P. C. Abreu. 2008. Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: protein and lipid contents. *Aquaculture Nutrition* 14: 507-514.
- Ferreira- Marinho, H., G. Lara, W. Jr. Wilson y P. C. Abreu. 2016. Biofilm versus biofloc: Are artificial substrates for biofilm production necessary in the BFT system? *Aquaculture International* 24: 921-930.
- Fimbres-Olivarría, D., E. J. A López, C. L. R. Martínez, M. E. Carvajal, O. L. F. Enríquez, H. E. Valdéz y B. A. Miranda. 2015. Growth and biochemical composition of *Navicula* sp. cultivated at two light intensities and three wavelengths. *Israeli Journal of Aquaculture* 67: 1-7.
- Flores-Vergara, C. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de microalgas bentónicas cultivado bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidades de luz. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México.
- Furtado, P.S., B.R. Campos, F.P. Serra, M. Klosterhoff, L. A Romano y Jr. W. Wasielesky. 2014. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International* 23 (1): 315-327.
- Fuentes, J.L., I. Garbayo, M. Cuaresma, Z. Montero M. González-del Valle y C. Vílchez. 2016. Impact of microalgae-bacteria interactions production of algae biomass and associated compounds Review. *Marine drugs* 14, 100.
- Gatune, C., A. Vanreusel y M. De Torch. 2014. Sunlight and sediment improve the environment of a litter biofilm-based shrimp culture system. *Aquaculture Environment Interactions* 9: 73-85.
- Gómez-Ramírez, A. L., O. L. F. Enríquez, B. A. Miranda, E. B. Cordero, E. J. A. López y C. L. R. Martínez. 2019. Biofilm- forming capacity of two benthic microalgae, *Navicula incerta* & *Navicula* sp., on three substrates (Naviculales: Naviculacea). *Revista de Biología Tropical* 67(3): 599-607.
- Grossart, H. P., F. Levold, M. Allgaier, M. Simon y T. Brinkhoff. 2005. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology* 7: 860–873.
- Guillard, R. L y J. H. Ryther 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Denotula confervacea* (Cleve) *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.

- Hashimoto, K., H. E., Vasquez, H. Kitamura y C. G. Satuito. 2016. Variation in the abundance of periphytic algae in marine biofilms on glass surfaces submerged in the sea off Shin-Nagasaki Port, Nagasaki, Japan. *Sessile Organisms* 33(2): 29-37.
- Johnson, M. B. y Z. Wen, 2010. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Applied Microbiology Biotechnology* 85: 525-534.
- Jiménez, V. S. y S. M del P. Sánchez. 2016. Growth and fatty acid profiles of microalgae species isolated from the Baja California Peninsula, México. *Latin American Journal Aquatic Research* 44(4): 689-702.
- Ju, Z.Y., I. P. Forster y W. G. Dominy. 2009. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 29: 237-243.
- JMP®. 2010. SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos de América. 1989-2019.
- Khatoon, H., S. Banerjee, F. M. Yusoff, M. Shariff y J. S Bujang. 2007. Formation of periphyton biofilm and subsequent biofouling on different substrates in nutrient enriched brackishwater shrimp ponds. *Aquaculture* 217: 470-477.
- Khatoon, H., S. Banerjee, F. M. Yusoff y M. Shariff. 2009. Evaluation of indigenous marine periphytic *Amphora*, *Navicula* and *Cymbella* grown on substrate as feed supplement in *Penaeus monodon* postlarval hatchery system. *Aquaculture Nutrition* 15: 186-193.
- Kim, B. H., R. Ramanan, D. H Cho, H. M. Oh y H. S. Kim. 2014. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass Bioenergy* 69: 95-105.
- Kim, S. K., Q. Guo y I. K. Jang. 2015. Effect of biofloc on the survival and growth of the postlarvae of three penaeids (*Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis*, and *Marsupenaeus japonicus*) and their biofloc feeding efficiencies, as related to the morphological structure of the third maxilliped. *Journal of Crustacean Biology* 35: 41-50.
- Klein, G., G. Pierre, M. N. Bellon-Fontaine, J. M. Zha, M. Breret, T. Maugard y M. Graber. 2014. Marine diatom *Navicula jeffreyi*: from biochemical composition and physico-chemical surface properties to understanding the first step of benthic biofilm formation. *Journal of Adhesion Science and Technology* 28: 1739-1753.
- Kongnum, K. y T. Hongpattarakere. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology* 32: 170-177.
- Kuhn, D. D., A. L. Lawrence, G. D. Boardman, S. Patnaik, L. Marsh y G. J. Flick. 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 303: 28-33.
- Liu, K. F., C. H. Chiu, Y. Y. Shiu, W. Cheng y C. H. Liu. 2010. Effects of the probiotics, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and shellfish immunology* 28: 837-844.
- López-Elías, J. A., A. N. Huerta, C. A. Murguía y L. L. R. Mercado. 2012. Manual de laboratorio de cultivos de apoyo acuícola. Editorial Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- López-Elías, J. A., O. D. Fimbres, J. L. A. Medina, B. A. Miranda, C. L. R. Martínez y D. M. A. Molina. 2013. Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *Phyton* 82: 4-11.

- Loureiro, K. C., Jr W. Wasielesky y P. C. Abreu. 2012. The use of protozoan, rotifers and nematodes as live food for shrimp raised in BFT system. *Atlantic*, Rio Grande, 34(1): 5-12.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Malara, G. y R. Charra. 1972. Dosage des proteines particulaires selon la éthode de Lowry. 11 p. Université de Paris, Station Zoologique, Villefranche. sur-Mer. Notes de travail, No. 5.
- Martínez Córdova, L.R., T. A. Campaña y C. M. A. Porchas. 2002. Promotion and contribution of biota in low water exchange ponds farming blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). *Aquaculture Research* 33: 27-32.
- Martínez-Córdova, L. M., P. M. Martínez, J. A. López-Elías, T. A., Campaña, B. A. Miranda, E. Ballester y C. M. A. Porchas. 2010. Alimento natural en acuicultura: una revisión actualizada. *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 668-699.
- Martínez-Córdova, L. M., Martínez -Porchas, M., López-Elías J. A. y Enríquez -Ocaña, L. F. 2014. Uso de microorganismos en el cultivo de crustáceos. *Biotecnia* 3: 50-55.
- Martínez-Cordova, L.R., M. Emerenciano, A. B. Miranda y P. M. Martínez. 2015. Microbial- based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture* 7: 131-148.
- Medina-Félix, D., E. J. A. López, C. I. A. Campa, C. L. R. Martínez, G. A. Luna, J. E. Cortez, A. N. Huerta, M. F. Cano y Z. G. M. Burboa. 2017. Survival of *Litopenaeus vannemei* shrimp fed on diets supplemented with *Dunaliella* sp. is improved after challenges by *Vibrio parahaemolyticus*, *Journal of Invertebrate Pathology* 148: 118-123.
- Moreno-Arias, A. 2017. 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. Tesis de Doctorado. Universidad de Sonora. México.
- Moreno-Arias, E. J. A. López, C. L. R. Martínez, S. J. C. Ramírez, R. M. G. Carvallo, S. G., García, S. M. E. Lugo y B. A. Miranda. 2018. Effect of fishmeal replacement with a vegetable protein mixture on the amino acid and fatty acid profiles of diets, biofloc and shrimp cultured in BFT system. *Aquaculture* 483 53-62.
- Moss, K. R. K. y S. M. Moss. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific with shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of World Aquaculture Society*. 35(4): 536-542.
- Miao, L., P. Wang, J. Hou, Y. Yao, Z. Liu, S. Liu y T. Li. 2019. Distinct community structure and microbial functions of biofilms colonizing microplastics. *Science of total environment* 650: 2395-2402.
- Mridula, R. M., J. K. Manissery, P. Keshavanath, K. M. Shankar, M. C. Nandeeshya y K. M Rajesh. 2003. Water quality, biofilm production and growth of fringe-lipped carp (*Labeo fimbriatus*) in tanks provided with two solid substrates. *Bioresource Technology*. 87:263-267.
- National Research Council (U.S.). 2011. Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.
- Nimrat, S., S. Suksawat, T. Boonthai y V. Vuthiphandchai. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology* 159: 443-450.

- Olivera, A. 2002. Valor nutricional de microalgas. *Revista da ABCC* 4(2): 63-68.
- Pande, S., R. P. Khan y T. Venkatasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry* 6: 415-423.
- Patil, J.S. y A. C. Anil. 2005. Biofilm diatom community structure: Influence of temporal and substratum variability. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 21:189-206.
- Peterson, J.J. y J.I. Curiel. 2002. Larvicultura de camarão aprimorada com o uso de diatomáceas. *Revista da ABCC* 4(2):40-42.
- Racotta, I.S. y E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of World Aquaculture Society* 29: 351-356.
- Ramesh, M. R., K.M. Shankar., C.V. Mohan y T.J. Varghese. 1999. Comparison of three plant substrates for enhancing carp growth through bacterial biofilm. *Aquacultural Engineering* 19:119-131.
- Rodríguez, J C. R., M. C. V. Otero, V. Valenzuela y M. M. A Soto. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. 57-71 p. En: Cruz S. L. E, Ricque M. D, Tapia S. M, Olvera N. M. y Civera R. V. (Eds). V Simposio de Nutrición Acuícola. Avances de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo, Mérida, Mexico.
- Rosas, C., C. Pascual, N. López y A. Sánchez. 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque M. D., Tapia S. M., Gaxiola C. M. G. y Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, Quintana Roo, México.
- Ryckebosch, E., K. Muylaert y I. Foubert. 2012. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89(2): 189-198.
- Salvesen, I., K.I. Reitan, J. Skjermo y G. Øie. 2000. Microbial environments in marine larviculture: impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture International* 8: 275-287.
- Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, A. F. Vargas, G. Le Moullac y C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198:13-28.
- Sánchez, P. J. T. y A. M. R. Torres. 2005. Estructura y aspectos biotecnológicos de las comunidades acuáticas microbianas: biopelículas y tapetes microbianos. *ContactoS* 58: 63-71.
- Sakr, E. M., S. M. Shalaby, E. A. Wassef, M. Abdel-Fattah, M. El- Sayed y I. A. Abdel-Monei. 2015. Evaluation of Periphyton as a Food Source for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Juveniles Fed Reduced Protein Levels in Cages. *Journal of Applied Aquaculture* 27(1):50-60.
- Sharma, K. S. R., K. M. Shankar, M. L. Sathayanarayana, R. R. Patil, N. H. D. Swamy y S. Rao. 2011. Development of biofilm of *Vibrio alginolyticus* for oral immunostimulation of shrimp. *Aquaculture international* 19:421-430.
- Shen, Y., H. Zhang, X. Xu y X. Lin. 2015. Biofilm formation and lipids accumulations of attached cultive of *Botryococcus braunii*. *Bioprocess and Biosystem Engineering* 38:481-488.
- Silva, C. S., S. Lima, L. M. Z. Tubosa y C. E. De Souza. 2009. Natural food evaluation and water quality in zero water exchange culture of *Litopenaeus vannamei* fertilized with wheat bran. *Aquaculture International* 17:113-124.

- Singh, I.S.B., P. Lakshmanaperumalsamy y D. Chandramohan. 1998. Bacterial flora of pond reared *Penaeus indicus* (Milne Edwards). *Journal of Aquaculture in the Tropics* 13(2):133- 142.
- Sivakumar, N., M. Sundararama y G. Selvakumar. 2012. Probiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* against vibriosis in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) *African Journal of Biotechnology* 91: 15811-15818.
- Supamattaya, K., S. Kiriratnikom, M. Boonyaratpalin y L. Borowitzka. 2005. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 248:207-216.
- Sweat, L. H. y K. B. Johnson. (2013). The effects of fine scale substratum roughness on diatom community structure in estuarine biofilms. *Biofouling* 29:879-890.
- Thompson, F.L., P.C. Abreu y R.O. Cavalli. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture* 174: 139–153.
- Thompson, F. L., P. C. Abreu y W. Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203:263-278.
- Timmons, M.B., J. M. Ebeling, F.W. Wheaton, S. T. Summerfelt y B.J. Vinci. 2002. *Recirculating Aquaculture Systems*. 769 p. Northeastern Regional Aquaculture Center. Publication No. 01-002. Cayuga Aqua Ventures. Ithaca, New York, Estados Unidos de América.
- Tung, H.T., S. Koshio, R. F. Traifalgar, M. Ishikawa y S. Yokoyama. 2010. Effects of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* on larval and post-larval kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas* Bate. *Journal of the World Aquaculture Society* 41: 16–27.
- Tyler, E. I. y G. D. Allen. 2011. Species and material considerations in the formation and development of microalgal biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92: 283-294.
- Viau, V. E., de S. D. Moreira, E. M. Rodríguez, Jr. W. Wasielesky, P. C. Abreu y E. L. C. Ballester. 2013. Biofilm feeding by postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research* 44: 783-794.
- Villanueva, G. E., C. L. R. Martínez, P. M. Martínez y M. A. Arvayo. 2015. Efecto de la adición de un extracto acuoso de pionilla *Lasianthaea podocephala* en el cultivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* en condiciones de laboratorio. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43(5): 904-911.
- Van Colen, C., G. J. C. Underwood, J. Serôdio y D. Paterson. 2014. Ecology of intertidal microbial biofilms: Mechanisms, patterns and future research needs. *Journal of Sea Research* 92: 2-5.
- van Dam, A. A., M. C. M. Beveridge, M. E. Azim y M. C. J. Verdegem. 2002. The potential of fish production based on periphyton. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12:1-31.
- Wahl, M. 1989 Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* 58:175-189.
- Wang, Y.B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269: 259-264.
- Wingender, J., T. R. New y H. C. Flemming. 1999. Microbial Extracellular Polymeric Substances. 93-112 p. En J. Wingender, T. R. New y H. C. Flemming (Eds.). *What are bacterial extracellular polymeric substances?* Berlin: Springer-Verlag.

- Xu, W. J., P. L. Wing., S.X. Hua y J. Huang. 2012. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero –water exchange culture tanks. *Aquaculture Research* 1–10.
- Yi, Z., M. Xu, X. Di, S. Brynjolfsson y W. Fu. 2017. Exploring valuable lipids in Diatoms. *Frontiers in Marine Science* 4:17. doi: 10.3389/fmars.2017.00017.
- Ziemann, D. A., W. A. Walsh, E. G. Saphore y B. K. Fulton. 1992. A survey of water quality characteristics of effluent from Hawaiian aquaculture facilities. *World Aquaculture Sociated* 23:180-191.