

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE GANDIA
Grado en Ciencias Ambientales



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**



**ESCUELA POLITÈCNICA
SUPERIOR DE GANDIA**

**“Aplicación de un probiótico compuesto por *Bacillus amyloliquefaciens*
para mejorar el sistema inmunológico del camarón blanco *Litopenaeus
vannamei* en sistemas de bioflóculos.”**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autor:

Bianca Ioana Prentu

Tutores:

Silvia Laura Falco Giaccaglia

Ferran Llario Sempere

Gandia, 2016

Resumen.

En este trabajo se evalúa diferentes dosis de un probiótico compuesto por la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado en sistemas de bioflóculos. Los camarones presentaban un peso medio inicial de 0,068 g con una densidad de 200 individuos/m². Se llevaron a cabo tres tratamientos con tres replicas cada uno, cada tratamiento presentaba una concentración distinta de probiótico siendo: el 0% el tratamiento control sin probiótico, el tratamiento con el 100% de la dosis recomendada por el fabricante ($2,86 \cdot 10^7$ UFC/l) y el último tratamiento un 10% de la dosis recomendada ($2,86 \cdot 10^6$ UFC/l). Durante el estudio se controló la calidad del agua. Después de 86 días de experimento se tomaron muestras de la hemolinfa para el análisis inmunológico de los camarones analizando el número total de hemocitos (NTH), el porcentaje de células granuladas y los hialinos y proteína total en suero (PTH). No se observaron diferencias en la calidad del agua entre los distintos tratamientos. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas en el porcentaje de granulocitos e hialinocitos indicando una mejora del sistema inmune en los tratamientos con probiótico debido al aumento de los granulocitos. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas ni para el NTH, ni para las PTH. Estos resultados sugieren que con un 10% de dosis de probiótico se obtiene el mismo resultado que con el 100% hecho que minimiza los costes en la adquisición del probiótico.

Palabras clave: acuicultura, Penaeidae, crustáceo, hemocitos, proteína en hemolinfa.

Abstract.

In this work, are evaluated different doses of a probiotic composed by the bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* for the white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultivated in biofloc systems. The shrimps showed an initial average weight of 0,068 g, with a density of 200 individuals/m². Three treatments were carried out with three replicas each one, each treatment presented a different concentration of probiotic, being: 0% the control treatment without probiotic, 100% treatment the dose recommended by the manufacture ($2,86 \cdot 10^7$ UFC/l) and the last treatment 10% of the recommended dose ($2,86 \cdot 10^6$ UFC/l). Along the study, the water quality was controlled. After 86 days of experiment, hemolymph samples were taken in order to study the immunological system of the shrimps, in which the total number of hemocytes (TNH), the percentage of granular and hyaline cells and total protein in serum (TPH) were analyzed. Differences in water quality between the treatments were not observed. Statistically significant differences were found in the percentage of granulocytes and hyalinocytes suggesting an improvement of the immune system in both treatments with probiotic. However, statistically significant differences were not found nor in the TNH, nor the TPH. This results show that 10% of probiotic dose obtained the same result than the 100%, fact that minimizes costs in the acquisition of the probiotic.

Keywords: aquiculture, Penaeidae, crustacean, hemocyte, hemolymph protein.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Situación de la acuicultura y del camarón blanco.....	1
1.2. Sistema de bioflóculos (BFT) y sus beneficios.....	3
1.3. El uso de probióticos en BFT	4
1.4. Antecedentes	6
2. Objetivos.....	8
3. Material y métodos.....	9
3.1. Diseño y desarrollo del experimento.	9
3.1.1. Origen de los camarones y del agua.	11
3.2. Análisis de la calidad del agua.....	12
3.2.1. Procedimiento parámetros físico-químicos del agua.....	12
3.2.2. Procedimiento análisis nutrientes del agua.....	13
3.3. Análisis del sistema inmunológico	13
3.3.1. Número total de hemocitos (NTH) y porcentaje de granuloso e hialino.....	15
3.3.2. Proteína total en la hemolinfa (PTH).....	16
3.4. Análisis estadístico	16
4. Resultados y discusión	17
4.1. Calidad del agua	17
4.1.1. Parámetros físico-químicos del agua	17
4.1.2. Nutrientes del agua.....	21
4.2. Sistema inmune.....	28
5. Conclusión.....	35
6. Bibliografía	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación de la acuicultura y del camarón blanco

La pesca y la acuicultura son importantes fuentes de alimento, nutrición, ingresos y medios de vida para cientos de millones de personas en todo el mundo. La oferta mundial de pescado aumentó en los últimos años y en 2014 se alcanzó un hito al superar por primera vez la industria acuícola a la pesca de captura en relación a la producción (FAO, 2016) (Figura 1.1).

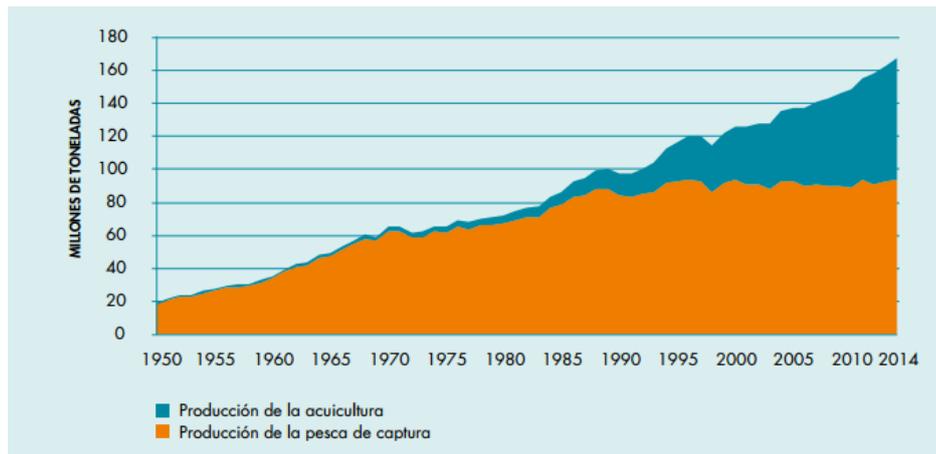


Figura 1.1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (1950-2014) (FAO, 2016).

Así pues, en 2014 la producción acuícola llegó a la cifra de alrededor de 73,8 millones de toneladas de pescado, de los cuales 6,9 millones de toneladas fueron crustáceos, siendo casi toda la producción acuícola destinada al consumo humano (FAO, 2016) (Figura 1.2).

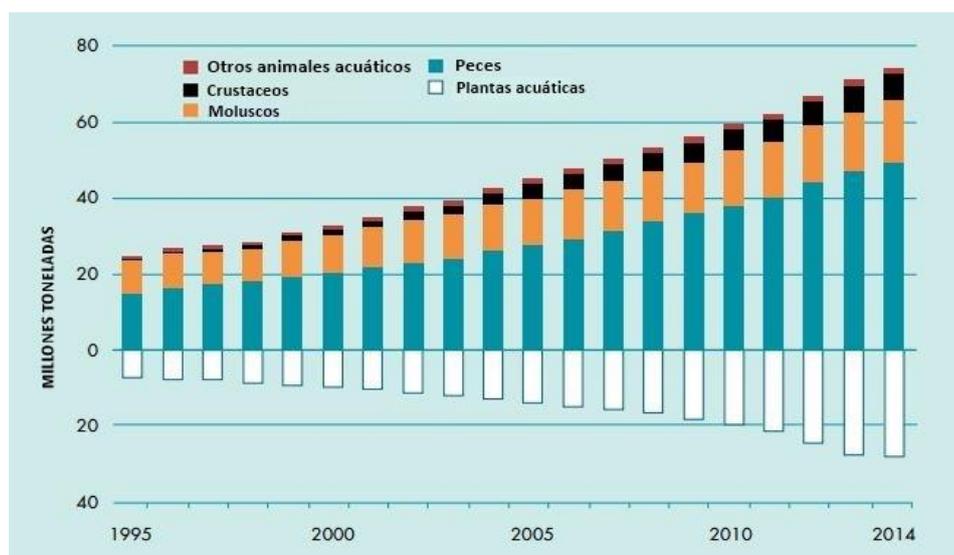


Figura 1.2. Producción acuícola mundial (1995-2014) (FAO, 2016).

Entre los cultivos de crustáceos mediante técnicas acuícolas se encuentra el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la familia Penaeidae (figura 1.3), es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México al Norte, hacia Centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú, en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C durante todo el año (FAO, 2006). Según las estadísticas de FAO (2014), el total de producción acuícola de *L. vannamei* se ha ido incrementando de manera constante pasando de 8 000 toneladas en 1980 a 194 000 toneladas en 1998, tras un declive debido a una interrupción en la producción en América Latina, su producción sufrió un rápido crecimiento gracias a la dispersión de esta especie en Asia, llegando a 1 386 000 toneladas en 2004 y finalmente alcanzando una cifra de 3 668 681 toneladas durante el 2014 (FAO, 2014) (Figura 1.4).



Figura 1.3. *L. vannamei* (Penaeidae).



Figura 1.4. Tendencia de producción acuícola del camarón *L. vannamei* (1950-2014) (FAO, 2014).

Debido a que el cultivo del *L. vannamei* se ha expandido rápidamente en estos últimos años y tomando conciencia del impacto ambiental que produce la acuicultura, cada vez se están implementando técnicas acuícolas más sostenibles (FAO, 2014).

Esta industria acuícola está creciendo muy rápido contribuyendo a la degradación ambiental y a su contaminación (Emerenciano *et al.* 2013), este hecho desemboca en una situación insostenible. Como resultado, es necesario llevar a cabo prácticas acuícolas más ecológicas (Emerenciano *et al.* 2013).

1.2. Sistema de bioflóculos (BFT) y sus beneficios

En relación a la acuicultura las líneas de investigación se enfocan en el aumento de la productividad y en la minimización del impacto ambiental (Crab *et al.* 2012). Las nuevas tecnologías persiguen disminuir o evitar del impacto ambiental que conlleva el recambio de agua durante grandes periodos de tiempo, uno de los sistemas utilizados son los bioflóculos (BFT), considerado como una alternativa eficiente. Este sistema permite un aumento de la densidad de cultivo y una disminución del recambio de agua, mejorando así la calidad del cultivo (Crab *et al.* 2012). Los BFT se han utilizado en numerosos estudios tanto en peces como la Tilapia (Avinmelech *et al.* 1989; Avinmelech, 2007; Crab *et al.* 2009) como camarones tales como los *L. vannamei* (Suita, 2009).

El crecimiento de microorganismos (bioflóculo) minimiza o elimina el recambio de agua, reduciendo el problema del vertido de las aguas acuícolas en los ríos, lagos y estuarios, también el escape de algún organismo cultivado, nutrientes, materia orgánica y patógenos que pueden contaminar el agua receptora. El agua procedente de la acuicultura presenta grandes concentraciones de nitrógeno y fosfatos, nutrientes que inducen al crecimiento de las algas provocando eutrofización de las aguas que reciben el vertido y a la pérdida de recursos naturales (Emerenciano *et al.* 2013).

Los bioflóculos están constituidos por materia orgánica, la cual incluye una mezcla heterogénea de microorganismos (hongos, algas, bacterias, protozoarios y rotíferos) también partículas, coloides, polímeros orgánicos, cationes y células muertas. Estos son de forma irregular, altamente porosos y permeables a los fluidos (Chu & Lee, 2004). La biodiversidad de especies que se alojan en los flóculos, depende de la microbiota que se encuentra en el cuerpo del agua (Ray *et al.* 2010).

Esta tecnología de bioflóculos es una técnica para mejorar la calidad del agua mediante la adición de carbono extra en el sistema acuícola, que puede proceder de fuentes externas o

alimentación con elevado contenido en carbono (Crab *et al.* 2012). La relación de carbono nitrógeno (C/N) debe ser de 20 (Asaduzzaman *et al.* 2008) considerando solo el nitrógeno en forma de amonio el cual es absorbido por las bacterias, que forman los BFT. Para corregir esta relación, se utiliza una fuente rica en carbono como por ejemplo almidón, celulosa, sacarosa, etc. (Avnimelech, 2009), que posteriormente se mantiene en torno a 6. Así pues, el consumo de nitrógeno promovido por el crecimiento bacteriano disminuye la concentración de amonio más rápidamente que la nitrificación (Hargreaves, 2006). Las bacterias heterotróficas consumen los compuestos nitrogenados, convirtiéndolos así en biomasa microbiana rica en proteínas (De Schryve *et al.* 2008; Kuhn *et al.* 2009). Esta proteína microbiana puede ser consumida por los camarones como suplemento nutricional y aumentando su tasa de crecimiento tal como explica Wasielesky *et al.* (2006) y como relata Burford *et al.* (2004), más del 20% de la alimentación diaria consumida por los *L. vannamei* podría ser bioflóculo. Además, este sistema simula los procesos de la cadena trófica de los ecosistemas, ya que buscan cerrar los ciclos de nutrientes.

Otros de los beneficios de los BFT es la reducción de costes con respecto a los sistemas convencionales, ya que se reduce el recambio de agua, posibilitando también que estos cultivos se realicen en zonas alejadas del litoral (Crab *et al.* 2012). Además, al favorecer el incremento de biomasa de los organismos cultivados por alimentarse tanto de pienso como de los bioflóculos, se reducen los costes de alimentación (Emerenciano *et al.* 2013).

1.3. El uso de probióticos en BFT

La intensificación de las actividades acuícolas ha desembocado a que cada vez haya más enfermedades que afectan a los cultivos. Para evitar la proliferación de enfermedades y reforzar el sistema inmunológico de los organismos, se están utilizando fármacos y antibióticos. Estos compuestos son sustancias químicas que pueden acumularse y llegar al consumidor (Holmström *et al.* 2003). Una alternativa en el cultivo de camarones a estas sustancias son los probióticos (Reid *et al.* 2003).

Un probiótico se puede definir como “organismos vivos, que cuando son consumidos en una cantidad adecuada son beneficiosos para los huéspedes” (Reid *et al.* 2003).

Así pues, los probióticos crean un ambiente hostil en los camarones para los patógenos mediante la producción de compuestos inhibidores (bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, lisozimas y proteasas), competición por los nutrientes esenciales, suministro de nutrientes esenciales y enzimas, pudiendo dar como resultado una mejora en la respuesta inmunológica del camarón, evitando la proliferación y desarrollo de enfermedades (Balcázar *et al.* 2007).

Otro de los beneficios de los probióticos es la posibilidad de eliminar compuestos nitrogenados como el amonio y el nitrito (Balcázar *et al.* 2007), que son tóxicos para los camarones llegando a producir mortandad (Lin & Chen 2001, 2003), no todos los probióticos mejoran la calidad del agua, dependiendo esta eliminación del sistema de cultivo. En los sistemas tradicionales estos nutrientes se controlan mediante recambios de agua.

Si bien los efectos más importantes de los BFT son la mejora de la calidad del agua y la nutrición, algunos autores (Crab *et al.* 2012; Emerenciano *et al.* 2013) sostienen que los BFT también tienen un efecto probiótico en los camarones y minimizan las enfermedades y propagación que puedan afectar a estos. Krummenauer *et al.* (2014) señala que los beneficios de los BFT se pueden ver incrementados gracias a la aplicación de probióticos. Sin embargo, algunos autores sostienen que la mayoría de los probióticos no causan un efecto en la calidad del agua en los sistemas de BFT ya que bacterias autóctonas de los bioflóculos impiden la acción de los probióticos sobre la calidad del agua (Vita, 2008; Souza *et al.* 2012).

Uno de los géneros de bacterias más utilizado en probióticos en relación al cultivo de los camarones es el *Bacillus* ya que tienen una gran actividad antimicrobiana hacia los *Vibrio* sp. que son unas de las bacterias patógenas más agresivas (Van Wyk & Scarpa, 1999). Los *bacillus* son bacterias robustas formadas por esporas, que pueden penetrar la barrera gástrica de los camarones e incrementar su flora intestinal, estos producen de forma natural antibióticos, excretan enzimas e inhiben a otras bacterias que compiten por los nutrientes (Moriarty, 1999). Rengpipat *et al.* (1998) y (2000) señala que estos probióticos compuestos por bacterias de *Bacillus* sp. mejoran la supervivencia y el sistema inmunológico del camarón. Además, Vita (2008) encontró mejoras en el tamaño final del *L. vannamei* al utilizar un probióticos.

En relación a la respuesta inmunológica de los camarones su defensa está basada en la inmunidad humoral y celular que detectan y eliminan los microorganismos y parásitos dañinos (Muñoz *et al.* 2000). La respuesta celular del sistema inmune activa células hemocitarias que se fijan a los agentes extraños y los destruyen. Pero para protegerse los camarones no generan inmunoglobinas, pero si moléculas efectoras.

El sistema circulatorio de los camarones es de tipo semi-abierto o abierto y por allí circula la hemolinfa que es el equivalente a la sangre en los mamíferos. Este fluido transporta nutrientes, oxígeno, hormonas y otras moléculas importantes para el funcionamiento de sus órganos según explica Camacho (2012). La hemolinfa está compuesta por una fracción celular, los hemocitos, y también una fracción líquida, el plasma, esta última contiene diferentes factores humorales.

Así pues, el sistema inmune de los camarones actúa de manera integrada protegiéndolos contra las enfermedades y asegurando la integridad corporal y homeostática (Barroco *et al.* 2008).

Los hemocitos que son células fagocíticas se consideran análogos a los leucocitos de los mamíferos, ya que realizan funciones de defensa, reconocimiento y destrucción de agentes externos (Raa, 1996). Los camarones presentan tres tipos de hemocitos que llevan a cabo las reacciones inmunes como la fagocitosis, estas células son las hialinas, semigranulares y las células granulares (Camacho, 2012).

La función de inmunidad de las células hialinas es realizar la fagocitosis, mantienen su forma lisa para poder atacar y desplegarse extensamente para fagocitar sustancias extrañas. Las semigranulares y las granulares además de fagocitar también producen citotoxicidad y causan lisis en las células eucariotas, también presentan la función de encapsulamiento, adhesión, degranulación, melanización y nodulación (Camacho, 2012).

1.4. Antecedentes

En el presente estudio se pretende analizar los efectos de la utilización de un probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens* para reforzar el sistema inmunológico de los camarones blancos *L. vannamei* en sistemas de BFT.

Trabajos anteriores ya se centraron en la aplicación de probiótico en camarones *L. vannamei* infectados por *Vibrio parahaemolyticus* en sistemas de bioflóculo (Krummenauer *et al.* 2014) observando un aumento de los beneficios de los BFT. También Vita (2008) encontró mejoras en el tamaño final de los *L. vannamei* al utilizar *Bacillus* en sistemas de BFT. Al igual que Souza *et al.* (2012) que observó además de un aumento en el crecimiento y supervivencia de los camarones utilizando varios probióticos con *Bacillus* sp., una mejora en el sistema inmunológico de los organismos.

Y tal como muestra el estudio de Camacho (2012), el uso de los probióticos como aditivo en la dieta mejora el rendimiento productivo del camarón y estimula la inhibición en el crecimiento de *Vibrio alginolyticus*, además de mejorar la calidad del agua. Además, Bao (2014) estudió varias especies de *Bacillus* concluyendo que los *B. amyloliquefaciens* son los que más rápido crecimiento muestran y uno de los considerados como mejores promotores de los BFT.

En un trabajo realizado por Llarío *et al.* (2016) en la Universidade Federal do Rio Grande (FURG) se trabajó con el probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens* sobre los camarones *L.*

vannamei, con una concentración del probiótico superior a la recomendada por el fabricante. Los resultados obtenidos fueron que la calidad del agua no se vio mejorada y tampoco el crecimiento y supervivencia de los camarones al utilizar el probiótico a mayor concentración. Pero si se observó un aumento de los hemocitos granulosos, un aumento de la proteína total en suero en la hemolinfa y una disminución del número de células con apoptosis.

Como en el trabajo de la Llario *et al.* (2016) una dosis del probiótico por encima los valores recomendados por el fabricante no repercutió en la calidad del agua, aunque sí se apreció una mejora del sistema inmunológico de los camarones, en este trabajo se pretende estudiar si el probiótico tiene algún tipo de efecto cuando se ensaya con dosis más bajas.

2. OBJETIVOS

El objetivo del trabajo es evaluar el sistema inmunológico de los camarones *L. vannamei* criados en sistemas de bioflóculos expuestos a distintas dosis de la bacteria probiótica *B. amyloliquefaciens*.

Para alcanzar el objetivo general se trabajó con 9 tanques a tres rangos distintos de concentración del probiótico (sin probiótico, a la dosis recomendada por el fabricante y a un 10 % de la misma) por lo que se plantea también los siguientes objetivos específicos.

1. Estudiar si distintas dosis de un probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens* influye sobre la calidad del agua en sistemas BFT.
2. Analizar si se produce un cambio en el sistema inmunológico de los camarones en presencia del probiótico *B. amyloliquefaciens* a las dosis ensayadas.
3. Estudiar el rango de dosis más adecuado para alcanzar una mejora en el sistema inmunológico de los camarones.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño y desarrollo del experimento.

El estudio se realizó en el invernadero de la Escola Politècnica Superior de Gandia (EPSG) (figura 3.1). Se utilizaron 9 tanques de 3,2 m² cada uno con 2240 litros de agua por tanque y aireación continua donde se llevó a cabo el crecimiento de los camarones *L. vannamei* (figura 3.2). Los camarones entraron a los tanques con un peso aproximado de 0.068 g el día 11 de mayo del 2016 y se les alimentó con pienso comercial (Le Gouessant), administrándoseles una cierta cantidad en función de la biomasa calculada de las biometrías quincenales, siguiendo así el protocolo establecido por Jory *et al.* (2001). El cultivo de los camarones se llevó a cabo con un sistema de bioflóculos (BFT).



Figura 3.1. Invernadero de la Escola Politècnica Superior de Gandia (EPSG).



Figura 3.2. Aspecto de uno de los tanques (2240 litros), con aireación forzada.

Durante el periodo experimental, los tratamientos realizados fueron 3 (tabla 3.1.), con tres réplicas cada uno. El primero fue el tratamiento control (0%) donde no se utilizó el probiótico. En otro de los tratamientos (100%) se utilizó la dosis del probiótico recomendada por el fabricante de 20 g/semana/m³, es decir, 2,86 g/día/m³ ya que el probiótico se administra diariamente. Como la dosis recomendada es por m³ y en este trabajo se dispone de 9 tanque con 2,240 m³ cada uno, la dosis que le corresponde a cada tanque es de 6,40 g por día. El probiótico utilizado compuesto por *B. amyloliquefaciens* tiene 1,10¹⁰ UFC/g así pues hay que añadir a cada tanque una dosis de 6,4·10¹⁰ UFC (es decir una concentración de 2,86·10⁷UFC/l). En cuanto al último tratamiento se utiliza una concentración del 10% de la dosis recomendada por el fabricante, 0,64 gramos, es decir, 6,4· 10⁹UFC por tanque UFC (una concentración de 2,86·10⁶UFC/l). El modo de aplicación del probiótico fue directamente en el agua y la densidad de camarones utilizados fue 200 individuos/m².

Tabla 3.1. Tratamientos realizados y dosis del probiótico administrada.

Tratamientos	Tratamiento Control 0% probiótico	Tratamiento 10% probiótico	Tratamiento 100% probiótico
Dosis del probiótico	0	0,64 g	6,40 g

Los camarones fueron alimentados dos veces al día y se les administró el probiótico diariamente. Además, se realizaron controles de calidad de agua donde se midió: temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, nutrientes (amonio, nitrito, nitrato y fosfato), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos sedimentables (S. Sedimentables).

El día 4 de agosto de 2016, al llegar a los 86 días de la introducción de los camarones en los tanques, se extrajeron 5 individuos de cada unidad experimental, es decir 45 individuos y se determinó el número total de hemocitos (NTH), el porcentaje de células, concretamente de los hialinos (%H) y los granulados (%G) y también la proteína total en la hemolinfa (PTH). Además, se pesó cada organismo extraído.

3.1.1. Origen de los camarones y del agua.

Los camarones utilizados para llevar a cabo el experimento son de la especie *L. vannamei*, proceden de Estados Unidos concretamente de la ciudad de Florida. La empresa proveedora se llama Shrimp Improvement Systems (SIS), esta empresa fue la escogida para la obtención de las larvas de *L. vannamei* debido a que es una de las empresas que cumplía los requisitos de salud pública que demanda la Comisión Europea para la importación de organismos vivos. El transporte de estas larvas se realizó en avión y en automóvil hasta la escuela en bolsas de 6 litros, donde la mitad del volumen de éstas estaba ocupado por el agua y las larvas y el volumen restante por aire enriquecido en oxígeno para favorecer el traspaso de oxígeno al agua. Una vez llegadas a la EPSG las larvas de *L. vannamei* fueron sometidas a un preengorde para su posterior transferencia a los tanques del invernadero donde comenzó el experimento.

En relación al agua utilizada para el cultivo de los camarones, procede del puerto de Gandia (Valencia). Para adecuar el agua a las necesidades de los camarones se le bajó la salinidad a 22,5, valor elegido debido a que la salinidad que toleran los *L. vannamei* está entre 5 y 42 siendo un valor en torno a 20 el óptimo de salinidad (Ponce-Palafox *et al.* 1997). Además, el agua se cloró con 1 mg/l de cloro y posteriormente se decloró con 1 mg/l de ácido ascórbico (vitamina C) (Krummenauer *et al.* 2014) para así ser apta para el cultivo de los camarones. En relación a la temperatura el mejor crecimiento se obtiene con una temperatura en torno a 25 a 35°C (Ponce-Palafox *et al.* 1997).

Tras la introducción de los organismos en el agua, la generación de compuestos inorgánicos como amonio, y la aparición de partículas orgánicas como restos de pienso, excrementos, organismos muertos, etc., crean un caldo de cultivo donde empiezan a desarrollarse bacterias, fitoplancton y otro tipo de organismos, tales como rotíferos y protozoos. Todos estos organismos se van agregando entre si formando flóculos y desarrollándose así poco a poco el sistema de bioflóculos (BFT).

3.2. Análisis de la calidad del agua

Como se ha mencionado en el apartado del desarrollo del experimento, la calidad de agua se controlaba diariamente para poder actuar en caso de algún cambio indeseable que pudiera afectar a la supervivencia de los camarones y al desarrollo del experimento. Las mediciones y análisis realizados durante el experimento corresponden a parámetros físico-químicos y nutrientes. En la siguiente tabla (tabla 3.2) se muestra la frecuencia de realización de cada análisis.

Tabla 3.2. Análisis y frecuencia de realización.

	Diariamente	Semanalmente
Temperatura	2	
Salinidad	2	
Oxígeno disuelto	2	
pH	1	
Amonio		4
Nitrito		4
Fosfato		4
Nitrato		2
SST		1
S. sedimentables		1

3.2.1. Procedimiento parámetros físico-químicos del agua

Para llevar a cabo el control de los parámetros físico-químicos se utilizaban los siguientes instrumentos de medición. (tabla 3.3)

Tabla 3.3. Instrumentos de medición para el control de los parámetros físico-químicos.

Parámetros físico-químico	Instrumento de medición
Temperatura (°C)	Conductímetro WTW Multi 340i
Salinidad	
Oxígeno disuelto (mg/l)	Oxímetro óptico YSI
Oxígeno disuelto (%)	
pH	pHmetro Crison basic 20 +

Otros de los parámetros medidos fueron los sólidos suspendidos totales, se realizaban una vez por semana, se recogía la muestra de agua de cada tanque y se pasaba un determinado volumen de agua que dependía de la carga de sólidos suspendidos por los filtros previamente secados de 0,45 μm de tamaño de poro, estos se secaban y se obtuvo el cálculo de los SST por diferencia de peso tal como explica la metodología de Baumgarten *et al.* (2010).

Y por último los sólidos sedimentables, necesarios para llevar un control de los flóculos en el sistema de BFT, para realizar el control se utilizó un cono Imhoff llenándolo con un litro de agua de cada tanque y dejando decantar los sólidos durante 15 minutos (Avinmelech, 2007).

3.2.2. Procedimiento análisis nutrientes del agua

Para verificar la óptima calidad de agua se realizaron análisis de los nutrientes del agua. En la siguiente tabla (tabla 3.4) se muestran las técnicas de medición empleadas para los distintos parámetros.

Tabla 3.4. Métodos para el control de los parámetros químicos.

Parámetro	Métodos de análisis
Amonio (N-NH_4^+ mg/l)	Reacción colorimétrica mediante la metodología de Koroleff (1972) descrita en (Baumgarten <i>et al.</i> 2010)
Nitrito (N-NO_2^- mg/l)	Reacción colorimétrica de Bendschneider & Robinson (1952) descrito en (Baumgarten <i>et al.</i> 2010)
Fosfato (P-PO_4^{3-} mg/l)	Reacción colorimétrica de (Murphy & Riley, 1962) descrita en (Baumgarten <i>et al.</i> 2010)
Nitrato (N-NO_3^- mg/l)	Determinación mediante el análisis por diferencia de nitritos más nitratos utilizando la metodología descrita en (Baumgarten <i>et al.</i> 2010)

3.3. Análisis del sistema inmunológico

Transcurrido los 86 días se realizó un estudio del sistema inmunológico de los *L. vannamei*, que consistió en la extracción de la hemolinfa de 5 camarones de cada tanque (9 tanques) entre el cuarto y el quinto pleópodo (figura 3.1) o por la ranura superior de la cabeza y el principio del cuerpo mediante una jeringuilla de 1 ml (figura 3.2). Cada camarón se pesó para obtener el peso por tratamiento y total de los camarones extraídos para el análisis inmunológico. La finalidad de la extracción fue determinar el número total de hemocitos (NTH), el porcentaje de hialinos (%H) y granuloso (%G) y las proteínas en el suero de la hemolinfa (PTH).



Figura 3.1. Extracción de la hemolinfa entre el cuarto y el quinto pleópodo.

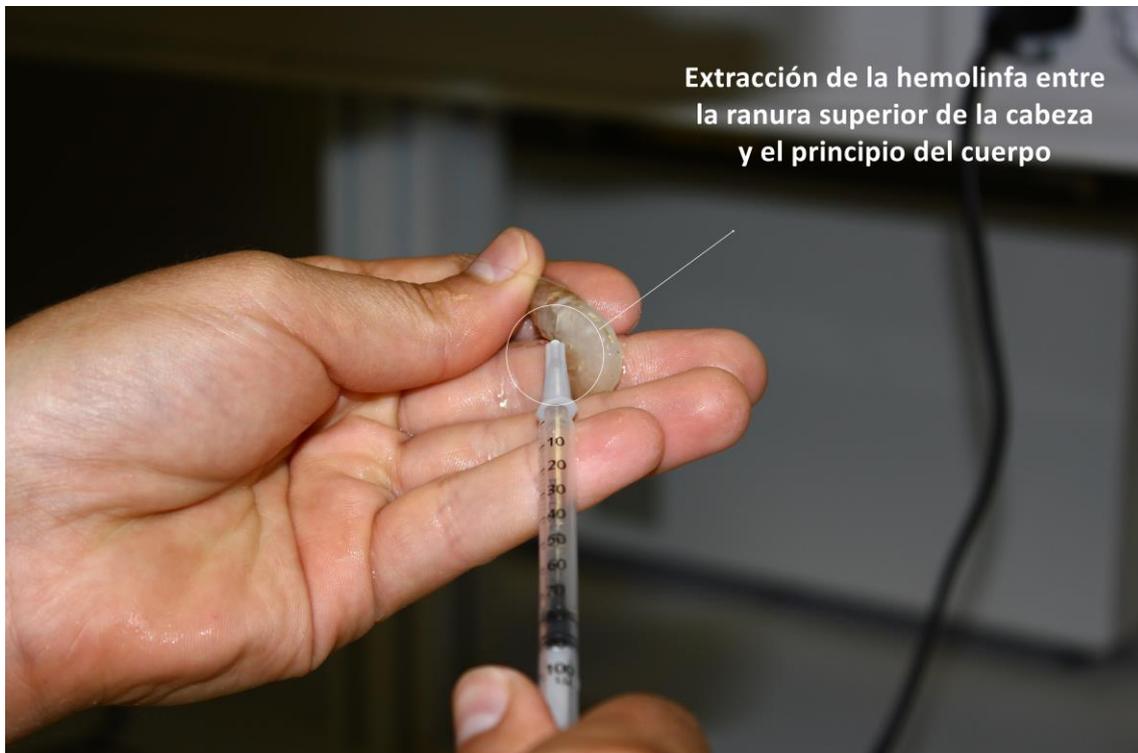


Figura 3.2. Extracción de la hemolinfa entre la ranura superior de la cabeza y el principio del cuerpo

3.3.1. Número total de hemocitos (NTH) y porcentaje de granulados e hialinos

Para realizar el conteo del número total de hemocitos se coloca en un tubo Eppendorf 20µl de la hemolinfa extraída y se le añade 80µl de solución Alsever que es un anticoagulante. Se homogeniza la muestra y se coloca 15µl de la mezcla en una cámara Neubauer siguiendo la metodología descrita por Weibel (1980). Posteriormente se observó al microscopio (Leica DM 2500 y Olympus CH30) con el objetivo de 40X.

Se cuentan los hemocitos granulados (en este trabajo los semigranulosos y granulados fueron incluidos dentro del mismo grupo) y los hialinos (figura 3.3) de los 45 camarones, unas 300 células por camarón y se calcula el número total de hemocitos teniendo en cuenta el volumen (mm³) de las celdas de la cámara de Neubauer contadas, la dilución y los números de hemocitos contados (granulosos e hialinos) (ecuación 1.).

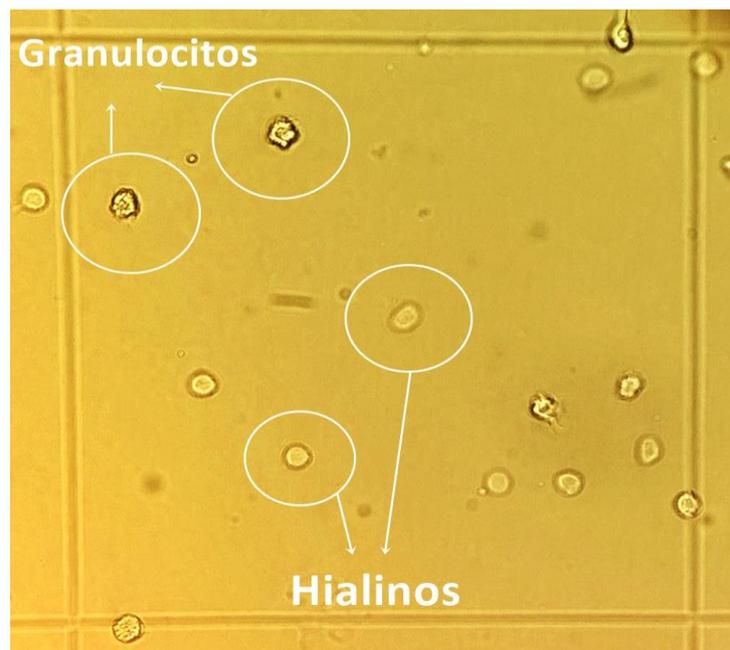


Figura 3.3. Hemocitos granulados e hialinos en una celda de 0,2 x 0,2 mm en la cámara de Neubauer.

$$N^{\circ} \text{ total de homocitos (cel/mm}^3) = \left(\frac{n^{\circ} \text{ total de células contadas}}{\text{volumen (mm}^3)} \right) \cdot \text{Dilución} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Para obtener el porcentaje de hemocitos granulados e hialinos se utilizan las siguientes ecuaciones (ecuación 2 y ecuación 3.)

$$\% \text{ hemocitos granulados} = \frac{n^{\circ} \text{ hemocitos granulados} \cdot 100}{n^{\circ} \text{ total de hemocitos}} \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$\% \text{ hemocitos hialinos} = \frac{n^{\circ} \text{ hemocitos hialinos} \cdot 100}{n^{\circ} \text{ total de hemocitos}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

3.3.2. Proteína total en la hemolinfa (PTH).

Para realizar el análisis de la proteína total se utiliza el suero de la hemolinfa extraída del camarón colocando 0,5 ml de esta en un tubo Eppendorf y dejándola en la nevera 24 h. Luego se centrifuga a 11000 rpm durante 10 minutos, separando así el suero del coágulo. En suero es donde se determina la concentración de proteína, tal como describe el método de Lowry *et al.* (1951).

3.4. Análisis estadístico

En relación a los datos del sistema inmunológico, se realizó un análisis estadístico de comparación de varianzas (ANOVA) mediante el programa estadístico Statgraphics® para evaluar las diferencias entre los tres tratamientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del monitoreo de los parámetros físico-químicos del agua y del sistema inmunológico de los *L. vannamei*.

4.1. Calidad del agua

4.1.1. Parámetros físico-químicos del agua

En la tabla 4.1 se muestran los valores de temperatura (Tª), salinidad, oxígeno disuelto (OD) y pH, tanto la media de cada uno como el valor mínimo y máximo por tanque.

Tabla 4.1. Media (valor superior), mínimo y máximo (valor inferior) de cada parámetro físico-químico según tanque.

Tratamiento	Tanque	Temperatura (°C)	Salinidad	O.D (mg/l)	O.D (%)	pH
0% Probiótico	1	29,1 (23,7-31,0)	22,5 (22,3-22,7)	6,0 (4,7-7,2)	95,8 (78,9-106,6)	7,9 (7,2-8,6)
	5	28,9 (23,9-31,3)	22,5 (22,3-22,7)	6,1 (5,3-6,9)	96,5 (62,7-105,4)	8,0 (7,4-8,9)
	10	28,9 (24,0-30,9)	22,5 (22,4-22,7)	6,1 (5,2-6,9)	96,6 (83,0-104,3)	8,0 (7,4-8,6)
10% Probiótico	2	28,7 (23,4-30,5)	22,5 (22,4-22,7)	6,0 (5,1-7,0)	95,0 (81,0-105,5)	8,0 (7,4-8,6)
	3	29,0 (24,0-30,9)	22,5 (22,3-22,7)	6,1 (5,4-6,9)	97,7 (87,3-104,8)	8,0 (7,3-8,6)
	9	28,1 (23,3-30,4)	22,5 (22,2-22,7)	6,1 (5,3-7,0)	95,6 (82,7-105,3)	8,0 (7,4-8,9)
100% Probiótico	4	28,9 (23,6-31,2)	22,5 (22,2-22,7)	6,1 (5,1-6,9)	97,0 (82,3-105,0)	8,0 (7,5-8,6)
	6	28,4 (23,7-30,7)	22,5 (22,3-23,5)	5,9 (4,7-6,9)	93,4 (74,4-105,3)	8,0 (7,5-8,7)
	8	28,0 (23,9-30,1)	22,5 (22,3-22,7)	6,2 (5,7-6,9)	97,7 (88,2-105,4)	8,0 (7,5-8,6)

De manera global la media de la temperatura de todo el periodo experimental fue de 28,7 °C con un mínimo de 23,3 y un máximo de 31,3, siendo valores óptimos entre 20 y 30°C para el crecimiento del camarón (Ponce-Palafox *et al.* 1997). Como se presenta en la figura 4.1 se observa un incremento de la temperatura durante los primeros 10 días, consecuencia de la época del año para luego, mantenerse relativamente constante el resto del tiempo.

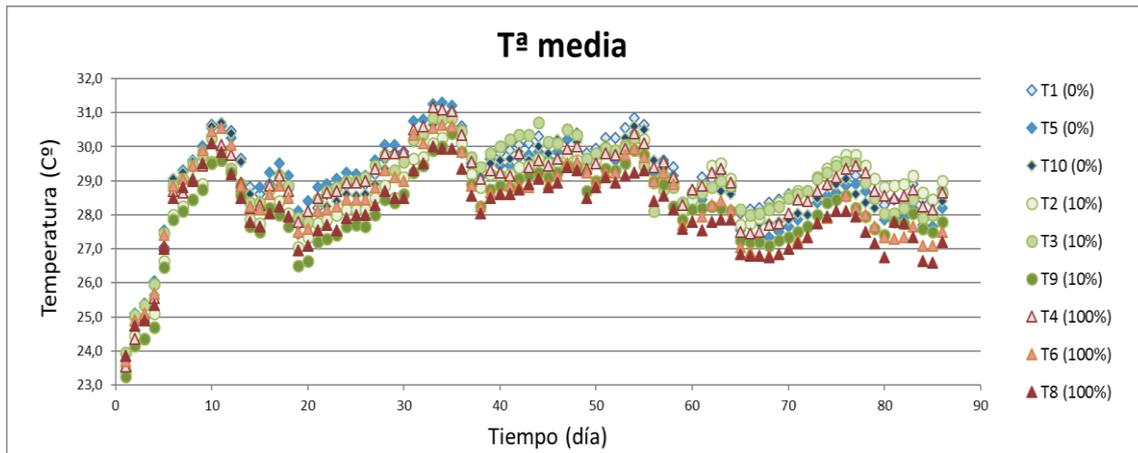


Figura 4.1. Evolución de la temperatura media diaria (°C) de cada tanque y tratamiento.

Respecto a la salinidad la media de todo el experimento fue de 22,5, llegando a un mínimo de 22,2 y a un máximo de 25,6. Las salinidades más altas son debido al aumento de la temperatura que provoca una mayor evaporación, esto se compensaba con agua dulce cuando el valor de esta superaba 22,5. Así pues, respecto a la salinidad no se encontraron diferencias entre los tratamientos siendo un valor de salinidad en torno a 20 el óptimo para los *L. vannamei* (Ponce-Palafox *et al.* 1997) llegando a tolerar valores de hasta 40 de salinidad (Menz & Blake, 1980) por lo que los valores medios y máximos obtenidos no representaron ningún problema para los organismos.

El oxígeno disuelto no presentó variaciones entre los tanques ni tratamientos ya que fue controlado mediante la introducción de aire. Se obtuvo una media global de 6,1 mg/l y 96,2% de saturación, un valor mínimo de 4,7 mg/l y 62,7% de saturación y un máximo de 7,2 mg/l y 106,6% de saturación. El nivel crítico de oxígeno para los *L. vannamei* está por debajo de 2 mg/l (Villareal *et al.* 1994) por lo que en todo momento se superó ampliamente este valor.

En relación al pH los valores extremadamente bajos pueden estresar al camarón y disminuir la supervivencia, los pH moderadamente bajos no afectan a la supervivencia, pero pueden ser un factor adverso para su crecimiento, así pues, los niveles de entre 7,3 a 9 son aceptados para el cultivo (Brock & Main, 1994). Los pH obtenidos presentaron una media global de 8,0, un mínimo de 7,2 y un máximo de 8,9 obteniendo así valores adecuados para el cultivo ya que según Ray (2010) los pH mayores a 7 son los más óptimos.

En función de los resultados obtenidos se puede decir que los valores de temperatura (T^a), salinidad, oxígeno disuelto (OD) y pH se mantuvieron siempre dentro de los límites óptimos para el cultivo de camarones (Van Wyk & Scarpa, 1999).

En relación a los sólidos los valores obtenidos por tanque tanto la media como el mínimo y máximo se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Media (valor superior), mínimo y máximo (valor inferior) de los sólidos suspendidos totales y los sólidos sedimentables según tanque.

Tratamiento	Tanque	SST (g/l)	S. Sedimentables (ml/l)
0% Probiótico	1	0,123 (0,005-0,293)	2 (<0,1-5)
	5	0,150 (0,007-0,396)	4 (<0,1 -12)
	10	0,148 (0,002-0,409)	2 (<0,1-7)
10% Probiótico	2	0,145 (0,002-0,325)	6 (<0,1-31)
	3	0,132 (0,005-0,217)	3 (<0,1 -8)
	9	0,172 (0,003-0,467)	4 (<0,1-11)
100% Probiótico	4	0,175 (0,002-0,645)	5 (<0,1-30)
	6	0,187 (0,002-0,489)	6 (<0,1-24)
	8	0,161 (0,002-0,450)	4 (<0,1-9)

De manera global durante los 86 días del experimento los sólidos suspendidos presentaron una media de 0,155 g/l, con 0,002 y 0,645 g/l de mínimo y máximo respectivamente. Según Avnimelech (2009) la concentración no debe ser superior a un rango de entre 200-400 mg/l, en nuestro caso algunos tanques obtuvieron valores ligeramente más altos de manera puntual. Las concentraciones de los SST durante los primeros días fueron cercanas a cero ya que el agua estaba libre de sólidos. A partir del día 15 fueron en aumento, hasta alcanzar el rango más adecuado de sólidos y coincidiendo con los cambios de agua que empezaron a realizarse el día 56 a causa de las altas concentraciones de nitritos, las concentraciones de los sólidos se ven fluctuados tal como se muestra en la figura 4.2.

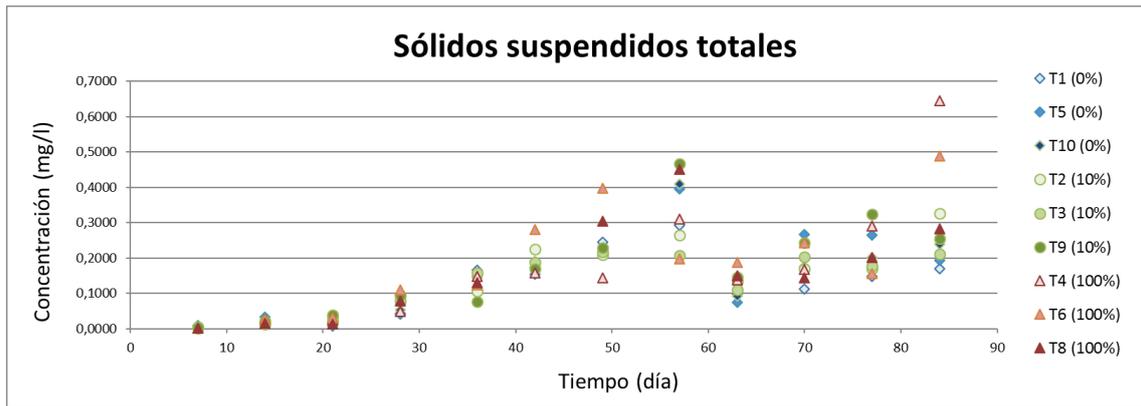


Figura 4.2. Evolución de los sólidos suspendidos totales de cada tanque y tratamiento

En cuanto a los sólidos sedimentables el rango de volumen de los flóculos suele estar entre 1-40 ml/l (Avnimelech, 2009), en este caso de manera global los tanques presentaron una media de 4 ml/l, un mínimo de <0,1 ml/l y un máximo de 31 ml/l. Así pues, los valores se encontraron dentro del rango marcado por Avnimelech (2009). El tanque que mayor sedimentación presentó fue el 2 con un 10% de probiótico seguido por el tanque 4 con un 100% de probiótico los demás tanques también presentaron una sedimentación importante por eso podemos afirmar que los valores no tienen un efecto diferenciado entre los 3 tratamientos. Como se observa en la figura 4.3 los primeros días el volumen de sólidos sedimentables fue cercano a cero, esto es debido a que el bioflóculo aún no estaba formado. A partir del día 30 los valores van en aumento y como en el caso de los SST se producen fluctuaciones alrededor del día 60 debido a los cambios de agua realizados para el control de los nitritos.

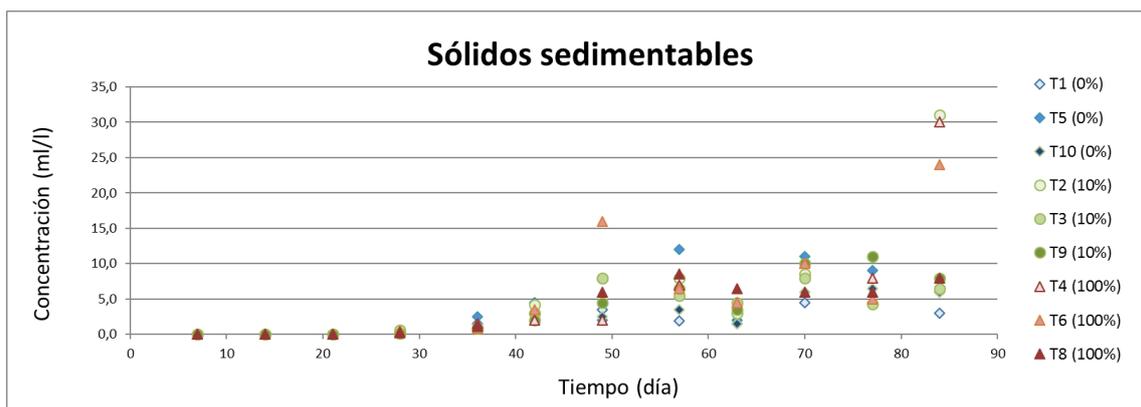


Figura 4.3. Evolución de los sólidos sedimentables de cada tanque y tratamiento.

Así pues, los resultados de los sólidos suspendidos totales y los sólidos sedimentables están dentro de las concentraciones recomendadas por Avimelech (2009) y Ray *et al.* (2010). Además, como se ha mencionado antes los resultados de los sólidos fluctuaron durante los últimos días del experimento a causa de los cambios de agua que se llevaron a cabo en todos los tanques

debido a los altos niveles alcanzados por los nitritos, cambios de agua que empezaron a realizarse el día 56 del experimento, por lo que, al producirse recambios de agua la sostenibilidad del bioflóculo también pudo haber disminuido.

Según Bao (2014) el probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens* tendría un potencial para la formación de bioflóculos, pero en este experimento como demuestran los datos de sólidos la evolución de estos es progresiva en el tiempo y sin diferencias entre los tratamientos.

4.1.2. Nutrientes del agua

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en relación a los nutrientes del agua, amonio, nitritos, nitratos y fosfatos obtenidos durante los 86 días del experimento. En la tabla 4.3 se encuentra la media, el mínimo y máximo de los valores por tanque y en la tabla 4.4 la media obtenida de los 4 nutrientes por tratamiento.

Tabla 4.3. Media (valor superior), mínimo y máximo (valor inferior) de los de los nutrientes del agua según tanque.

Tratamiento	Tanque	Amonio (mg N-NH ₄ ⁺ /l)	Nitritos (mg N- NO ₂ ⁻ /l)	Nitratos (mg N-NO ₃ ⁻ /l)	Fosfatos (mg P- PO ₄ ³⁻ /l)
0% Probiótico	1	0,11 (<0,01-1,05)	10,48 (<0,01-25,22)	0,25 (<0,01-0,94)	0,66 (<0,01-2,02)
	5	0,27 (<0,01-1,28)	9,16 (<0,01-21,94)	0,33 (<0,01-1,01)	0,74 (0,01-2,14)
	10	0,17 (<0,01-1,00)	9,18 (<0,01-21,56)	0,25 (<0,01-0,73)	0,70 (0,01-2,08)
10% Probiótico	2	0,18 (<0,01-0,70)	9,60 (<0,01-23,08)	0,36 (<0,01-1,53)	0,71 (<0,01-2,20)
	3	0,16 (<0,01-1,01)	9,69 (<0,01-23,62)	0,31 (<0,01-1,41)	0,72 (<0,01-2,00)
	9	0,73 (<0,01-3,91)	9,42 (0,01-22,03)	0,15 (<0,01-0,66)	0,74 (<0,01-2,03)
100% Probiótico	4	0,25 (<0,01-1,88)	7,21 (<0,01-18,55)	0,18 (<0,01-0,86)	0,59 (0,01-2,04)
	6	0,16 (<0,01-0,74)	6,25 (<0,01-16,25)	0,26 (<0,01-2,52)	0,70 (<0,01-2,74)
	8	0,12 (<0,01-0,42)	8,03 (<0,01-20,49)	0,20 (<0,01-0,76)	0,63 (0,01-2,06)

Tabla 4.4. Media de los de los nutrientes del agua según tratamiento.

Tratamiento	Amonio (mg N-NH ₄ ⁺ /l)	Nitritos (mg N- NO ₂ ⁻ /l)	Nitratos (mg N-NO ₃ ⁻ /l)	Fosfatos (mg P- PO ₄ ³⁻ /l)
0% Probiótico	0,18	9,60	0,28	0,70
10% Probiótico	1,07	9,57	0,27	0,72
100% Probiótico	0,53	7,16	0,21	0,64

Se determinó una concentración media del amonio de cada tratamiento de 0,18 mg N-NH₄⁺/l con el 0% del probiótico, 1,07 mg N-NH₄⁺/l con un 10% y 0,53 con el 100% de probiótico. No se observa diferencias entre los tratamientos, pero como se muestra en la figura 4.4 el tanque 9 con un 10% del probiótico presentó una subida entre los días 36 al 40 de hasta 3,91 mg N-NH₄⁺/l.

Del día 20 al 45 como se observa en la figura 4.4, se detectaron los máximos valores del amonio, estas máximas concentraciones se controlaban con la adición de sacarosa cuando se superaba 1 mg N-NH₄⁺/l (Asaduzzaman *et al.* 2008). Según Lin & Chen (2001) el “valor de seguridad” de amonio para los *L. vannamei* es de 3,55 mg N-NH₄⁺/l cuando la salinidad es próxima a los 25, siendo la Dosis Letal 50 (DL50) de 66,38 mg N-NH₄⁺/l. En este caso, sólo el tanque 9 llegó a superar el nivel de seguridad alcanzándose el máximo de 3,91 mg N-NH₄⁺/l. Pasando los 45 días los valores del amonio se mantuvieron próximos a cero en todos los tratamientos debido a la oxidación del amonio a nitrito por las bacterias nitrosomonas (Gomez-Gil *et al.* 2000).

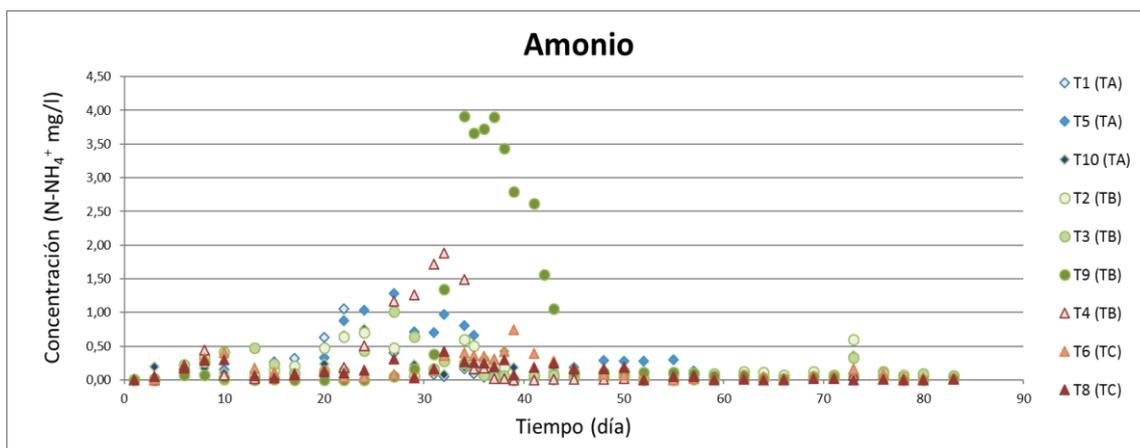


Figura 4.4. Variación de la concentración de amonio (N-NH₄⁺ mg/l) por tanque y tratamiento.

En relación a los nitritos (N-NO_2^- mg/l) el máximo de concentración de todo el experimento fue de 25,22 mg N-NO_2^- /l, valor que le corresponde al tanque 1 con 0% de probiótico, superando así el “valor de seguridad” de nitritos de 15,2 mg N-NO_2^- /l para una salinidad de 25 según Lin & Chen (2003). Las medias de las concentraciones por tratamiento fueron de 9,60 mg N-NO_2^- /l con 0% probiótico, 9,57 mg N-NO_2^- /l con un 10% y 7,16 mg N-NO_2^- /l con 100% de probiótico, así pues, ninguno de los tanques superó el valor de DL50 de 274,1 mg N-NO_2^- /l (Lin & Chen, 2003). Como se muestra en la figura 4.5 la concentración de nitritos se mantuvo cercano a cero durante los 20 primeros días y superó los 15,2 mg N-NO_2^- /l de valor óptimo transcurrido los 50 días del experimento coincidiendo con los valores cercanos a cero del amonio. Debido a que los nitritos superaron en numerosas ocasiones el nivel de seguridad, se llevaron a cabo renovaciones del agua en todos los tanques, cambiando hasta la mitad del volumen de cada tanque (unos 1000 l). No se observaron diferencias entre los tres tratamientos.

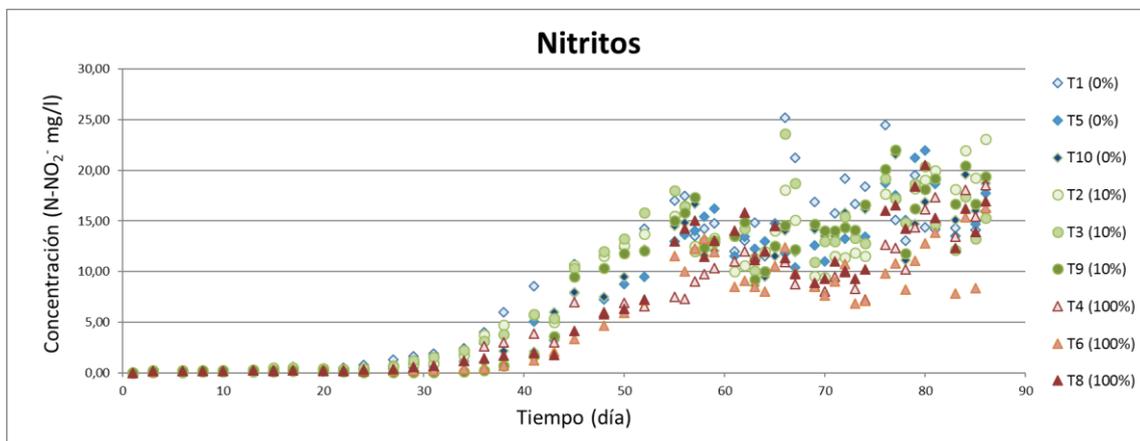


Figura 4.5. Variación de la concentración de nitrito (N-NO_2^- mg/l) por tanque y tratamiento.

La evolución de los nitritos aumenta después del máximo de amonio similar a la evolución que observó Ray *et al.* (2009) consecuencia de las bacterias nitrificantes concretamente de las *Nitrosomonas* que oxidan el amonio a nitrito (Gomez-Gil *et al.* 2000) (figura 4.6).

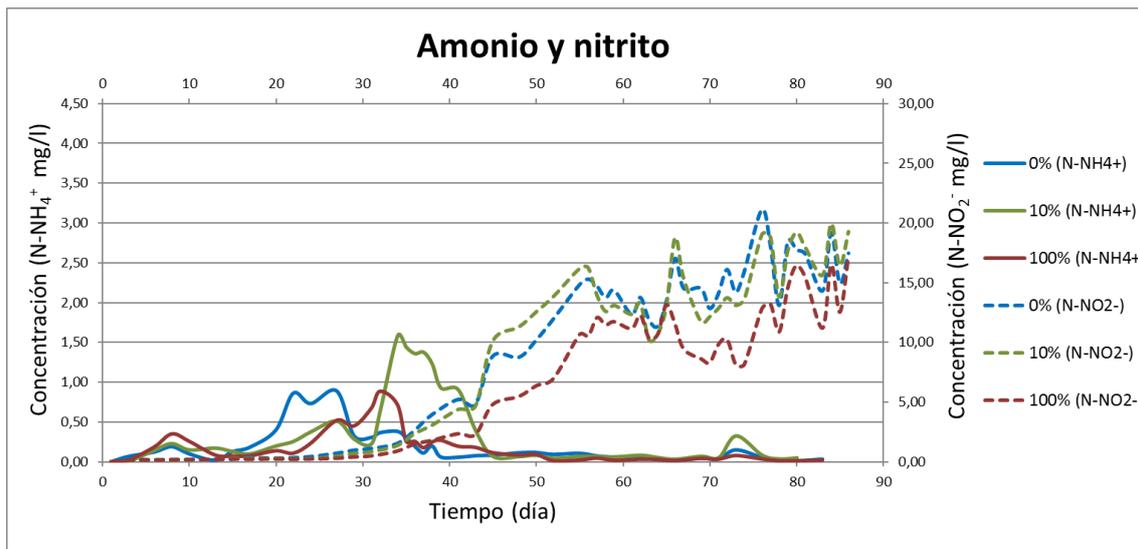


Figura 4.6. Variación de la concentración de amonio (N-NH_4^+ mg/l) y nitrito (N-NO_2^- mg/l) por tratamiento.

En cuanto a los nitratos (N-NO_3^- mg/l) la concentración media por tratamientos fue, con un 0% de probiótico de 0,28 mg N-NO_3^- /l, con un 10% de probiótico la media fue de 0,27 mg N-NO_3^- /l y con un 100% de probiótico de 0,21 mg N-NO_3^- /l. El valor de máxima concentración se observó en el tanque 6 con un tratamiento del 100% del probiótico alcanzando un valor de 2,52 mg N-NO_3^- /l el día 83 del experimento. Los nitratos no son tóxicos para estos organismos pudiendo llegar a soportar valores de 200 mg N-NO_3^- /l, aunque se recomienda valores que estén por debajo de 60 mg N-NO_3^- /l (Van Wyk & Scarpa, 1999). En este caso todos los valores se encontraron por debajo del valor recomendado. Así pues, no se observan diferencias entre los tres tratamientos del experimento.

Como se observa en la figura 4.7 al principio del experimento se dieron concentraciones de nitrato de hasta 1 mg N-NO_3^- /l debido a que la propia agua de cultivo presentaba nitrato y conforme pasaron los días el nutriente fue disminuyendo probablemente consecuencia del consumo por el fitoplancton que se fue desarrollando en los bioflóculos (Hargreaves, 2006, Ramírez *et al.* 2005). Entorno al día 50 del experimento se aprecia una ligera tendencia a incrementar los niveles de nitrato sugiriendo que las bacterias que oxidan nitritos a nitratos (*Nitrobacter*) comienzan a actuar. Sin embargo, esta tendencia coincide con el marcado aumento de nitritos por lo que se empieza a renovar parte del agua. En todas las renovaciones se retiraba el agua sin previa decantación de los bioflóculos, por lo que se retiraba tanto compuestos disueltos como sólidos sedimentables, retirando así parte de las bacterias que se estaban asentando, apreciándose de esta forma un nuevo descenso de los niveles de nitratos.

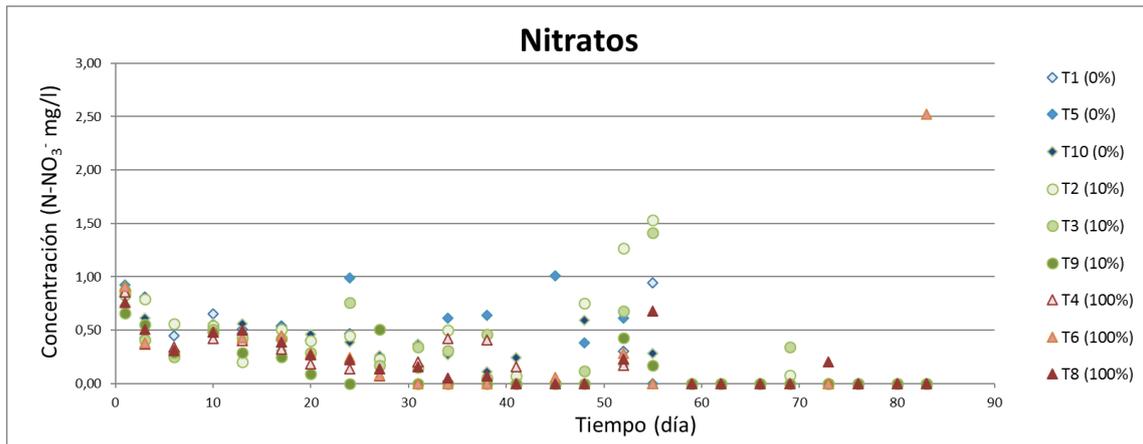


Figura 4.7. Variación de la concentración de nitrato (N-NO₃⁻ mg/l) por tanque y tratamiento.

Como se muestra en la figura 4.8 durante los 86 días que duró el experimento la concentración de nitritos no disminuyó y no se observó un aumento claro de los nitratos. Esto puede ser a que el segundo paso del proceso de nitrificación, es decir, la oxidación de nitrito a nitrato suele ser más lento que la oxidación del amonio a nitrito (Van Wyk & Scarpa, 1999). Así pues, las nitrobacterias no llegaron a desarrollarse imposibilitando la oxidación de nitrito a nitrato y dejando el ciclo del nitrógeno incompleto. Hay que señalar que en este experimento se partió de agua clara donde los bioflóculos se empezaron a desarrollar poco a poco, por lo que se trabajó con un sistema inmaduro donde no se completó la transformación de los compuestos nitrogenados.

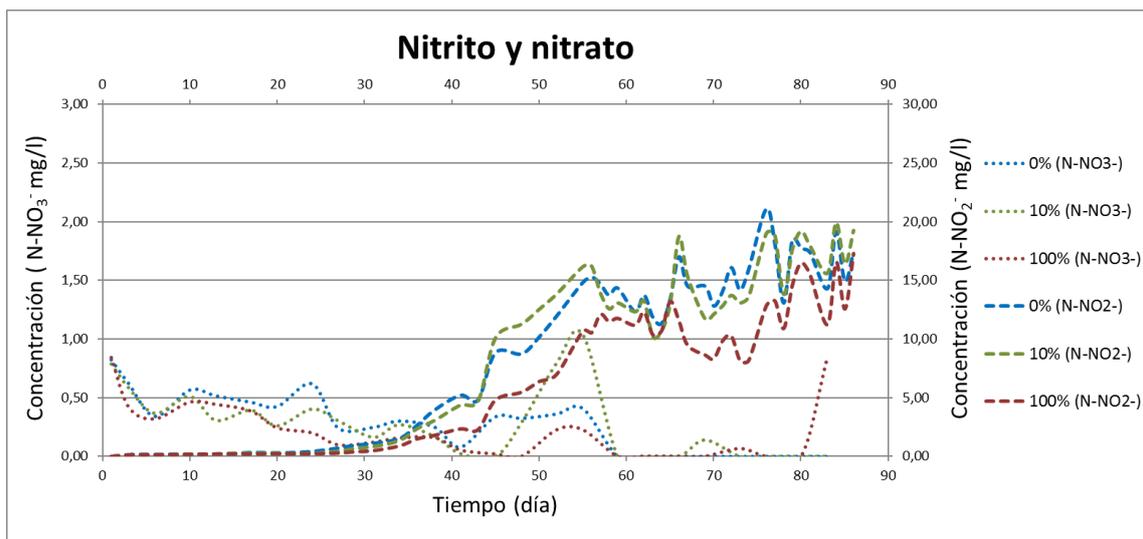


Figura 4.8. Variación de la concentración de nitrito (N-NO₂⁻ mg/l) y nitrato (N-NO₃⁻ mg/l) por tanque y tratamiento.

Como se observa en la figura 4.9 solo se sigue la tendencia de la oxidación del amonio a nitrato tal como observo Ray *et al.* (2009), mientras que el nitrato se comporta de manera diferente sin completar así el ciclo del nitrógeno. Quedando como resultado final un agua con valores cercanos a cero de amonio, con concentraciones elevadas de nitrito y con una concentración de nitrato de casi cero ya que no se llegaron a desarrollar las nitrobacterias que oxidan el nitrito a nitrato.

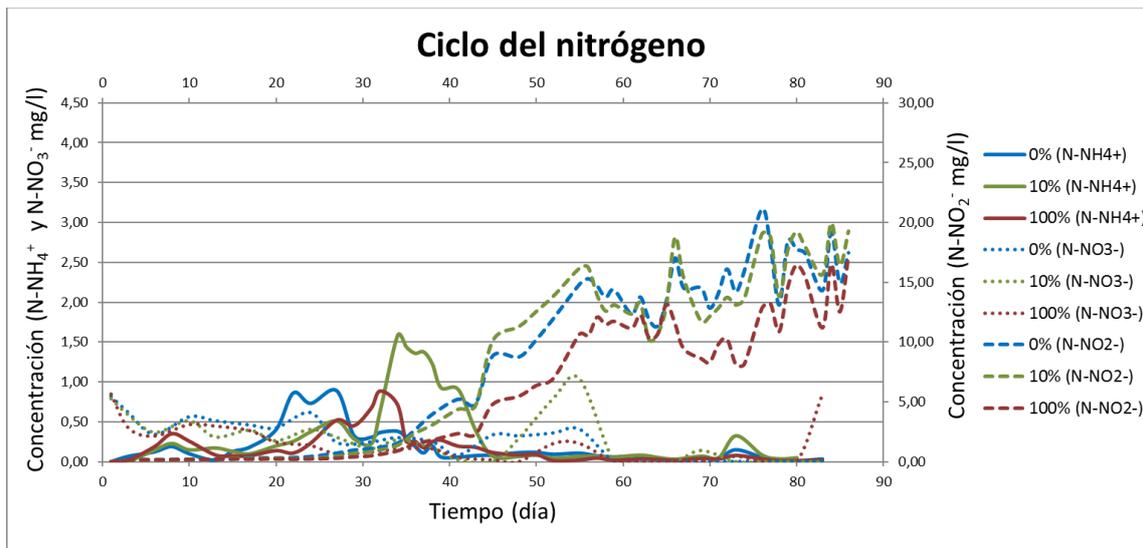


Figura 4.9. Ciclo del nitrógeno.

En relación al análisis del último nutriente, los fosfatos ($P-PO_4^{3-}$ mg/l), su mínima concentración durante los 86 días del experimento fue de $<0,01$ mg $P-PO_4^{3-}$ /l y con un máximo de $2,74$ mg $P-PO_4^{3-}$ /l. El tratamiento con 0 % de probiótico presentó una media de $0,70$ mg $P-PO_4^{3-}$ /l, el del 10% de $0,72$ mg $P-PO_4^{3-}$ /l y el tratamiento con el 100% del probiótico $0,64$ mg $P-PO_4^{3-}$ /l. Así pues, los fosfatos no presentaron toxicidad para los camarones. No se observan diferencias entre los distintos tratamientos.

Como se observa en la figura 4.10 la tendencia de los fosfatos es creciente a partir del día 30, aunque presenta una bajada de la concentración alrededor del día 55 y sigue con una evolución inestable, pero tendiendo a aumentar en los días finales del experimento. El aumento de los niveles de fosfatos es debido a la mineralización de la materia orgánica presente en los bioflóculos. Mientras que el periodo de esta bajada coincide con las concentraciones más altas de nitritos como se puede comparar con la figura 4.5 así que se puede explicar esta tendencia a la baja de los fosfatos debido a los recambios de agua realizados para controlar la concentración de nitritos.

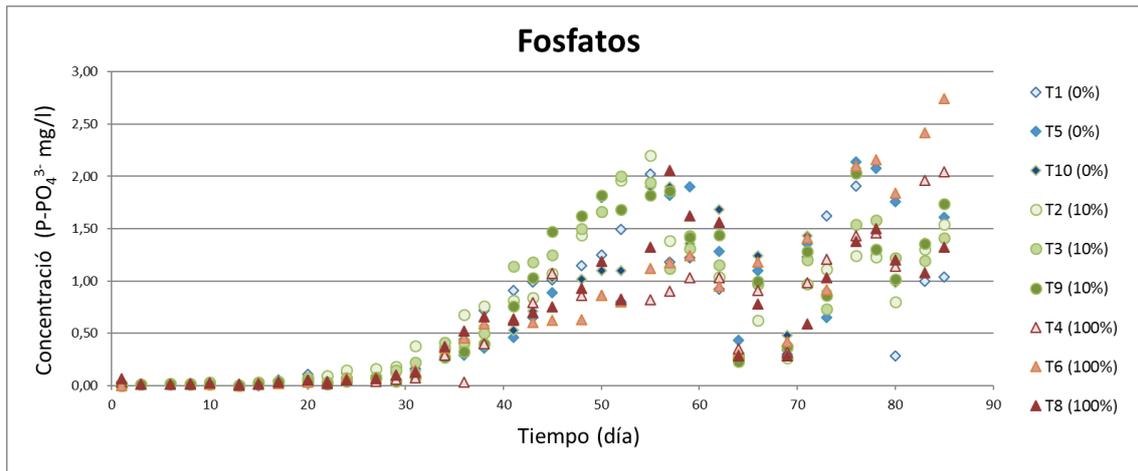


Figura 4.10. Variación de la concentración de nitrato ($P-PO_4^{3-}$ mg/l) por tanque y tratamiento.

Tras analizar las concentraciones obtenidas de los distintos nutrientes no se observan diferencias entre los distintos tratamientos con la aplicación de probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens*. La tendencia de los nutrientes sigue la dinámica observada por Avnimelech (2009), en relación a la oxidación del amonio a nitrito, pero debido a que en este experimento se partió de agua clara y no se desarrolló un flóculo maduro, no se alcanzó la oxidación de este a nitrato obteniendo concentraciones de nitrato cercanos a cero durante los 86 días del experimento.

El efecto producido por el probiótico *Bacillus* sp. en la calidad de agua ha sido estudiado por Rempipat *et al.* (1998), Rempipat *et al.* (2000) y Balcázar *et al.* (2007) entre otros. Balcázar *et al.* (2007) observó los efectos beneficiosos de los probióticos en la eliminación de los compuestos nitrogenados como el amonio y el nitrito.

En relación al amonio como se ha mencionado antes, el tanque nueve llegó a superar el valor de seguridad con una concentración de 3,91 mg $N-NH_4^+$ /l, para controlarlo se compensaba con sacarosa ya que según Xie *et al.* (2013) los *B. amyloliquefaciens* no son eficientes en la eliminación de amonio en concentraciones inferiores a 10 mg $N-NH_4^+$ /l.

Los nitritos en cambio se controlan en sistemas tradicionales con recambios de agua al llegar a concentraciones peligrosas que es lo que ha ocurrido en este experimento donde el nitrito llegó a una concentración de hasta 25,22 mg $N-NO_2^-$ /l. Según Xie *et al.* (2013) los *B. amyloliquefaciens* son capaces de eliminar 10 mg $N-NO_2^-$ /l en 24 horas, pero en este caso las concentraciones de nitrito siguieron una tendencia al alza pese a la aplicación del probiótico, sin observar diferencias entre los tres tratamientos. Esto puede ser a que la mayoría de los probióticos no causan un efecto en la calidad del agua en los sistemas de BFT (Vita, 2008; Souza *et al.* 2012; Krummenauer

et al. 2014). Así pues, se puede decir que las bacterias autóctonas de los bioflóculos impiden la acción de los probióticos sobre la calidad del agua, ya que no se observan mejoras en la eliminación de nitritos en los tratamientos con distintas concentraciones de *B. amyloliquefaciens*.

Como señala Renpipat et al. (1998) la calidad del agua no se ve afectada por la aplicación del probiótico, pero debido a que el probiótico reduce el nivel de patógenos en el agua de cultivo, ofrece al camarón un mejor ambiente (Renpipat et al. 2000).

Estos resultados se ven reforzados por los por Llario et al. (2016) que como se explica en la introducción, se estudió la aplicación del probiótico a una concentración mayor a la recomendada por el fabricante concluyendo que las propias bacterias que están en los bioflóculos mejoran la calidad del agua, mientras que el probiótico no tiene un efecto de mejora.

Así pues, no se observa efecto del probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens* sobre la calidad del agua en sistemas de BFT ni tampoco influencias de mejor de la calidad con los distintos tratamientos utilizados.

4.2. Sistema inmune

Tras realizar las extracciones de la hemolinfa de los *L. vannamei*, a continuación, se muestran los resultados obtenidos del número total de hemocitos (NTH), el porcentaje de cada tipo de células y de la proteína del suero de la hemolinfa (PTH), según tanque (tabla 4.5) y según tratamiento (tabla 4.6). También los resultados de los pesos de los camarones de la extracción por tratamiento y en global (tabla 4.7). Además, se discute el análisis estadístico realizado en relación a la afección de los tratamientos en el sistema inmune del camarón.

Tabla 4.5. Media (valor superior), mínimo y máximo (valor inferior) del número total de hemocitos, porcentaje de granulocitos (%G) e hialinos (%H) y proteína total según tanque.

Tratamiento	Tanque	NTH (cél/mm ³)	% G	% H	PTH (mg/ml)
0% Probiótico	1	4371 (2648-6133)	26 (18-32)	74 (68-82)	93,5 (69,4-113,7)
	5	3899 (3323-4310)	24 (20-28)	76 (72-80)	58,7 (38,4-88,4)
	10	4351 (2646-6024)	26 (19-34)	74 (66-81)	80,8 (45,8-115,3)
10% Probiótico	2	3543 (1760-4546)	34 (26-42)	66 (58-74)	107,1 (78,2-124,0)
	3	3208 (1261-4625)	27 (18-31)	73 (69-82)	74,0 (54,2-106,0)

Tratamiento	Tanque	NTH (cél/mm ³)	% G	% H	PTH (mg/ml)
100% Probiótico	9	3390 (2746-4015)	34 (26-42)	66 (58-74)	95,4 (72,4-110,9)
	4	3449 (2119-5448)	28 (15-36)	72 (64-85)	88,9 (50,4-118,9)
	6	4567 (3132-5117)	29 (24-38)	71 (62-76)	96,8 (57,3-124,1)
	8	5639 (2431-9657)	32 (23-43)	68 (57-77)	93,8 (75,6-106,4)

Tabla 4.6. Media del número total de hemocitos, porcentaje de granulocitos (% G) e hialinos (% H) y proteína total según tratamientos.

Tratamiento	NTH (cél/mm ³)	% G	% H	PTH (mg/ml)
0% Probiótico	4229	25	75	78,9
10% Probiótico	3393	32	68	93,5
100% Probiótico	4552	30	70	93,2

Tabla 4.7. Media (valor superior), mínimo y máximo (valor inferior) del peso de los camarones de la extracción por tratamiento y global.

Tratamiento	Media peso por tratamiento(g)	Media peso total (g)
0% Probiótico	4,93 (1,98-9,14)	4,84 (1,98-9,14)
10% Probiótico	4,64 (2,64-8,92)	
100% Probiótico	4,95 (2,99-7,72)	

Para comparar los distintos tratamientos se realizó un análisis estadístico de comparación de varianzas (ANOVA) ya que los datos cumplieron con los criterios de normalidad y homocedasticidad.

En relación al número total de hemocitos (NTH) como se observa en la figura 4.11 no existió una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,1121$) entre las medias de los tres tratamientos con un nivel del 95,0% de confianza. El NTH en el tratamiento con 0% de probiótico fue de 4229 (cél/mm³), el 10% de tratamiento presentó 3393 (cél/mm³) y el tratamiento de 100%, 4552 (cél/mm³) (tabla 4.6).

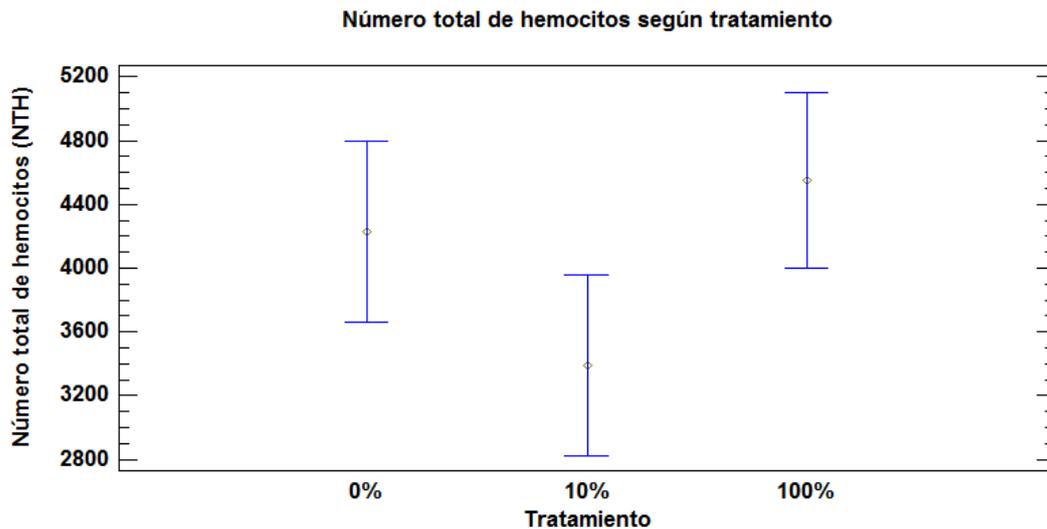


Figura 4.11. Medias y diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher de NTH según tratamiento.

En otros estudios como el realizado por Camacho (2012), observó un aumento del 11,74% en el NTH, con la administración del mismo probiótico utilizado en este trabajo. El hecho de que no se haya observado un incremento en el número total de hemocitos no tiene por qué ser un indicativo de que no exista una mejora inmunológica ya que puede haber un incremento en unas células de la hemolinfa más eficaces y una disminución de las que realizan funciones de defensa más limitadas, dejando el número total de hemocitos sin mejora evidente.

En cambio, los granulocitos sí presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0181$) entre las medias de los tres tratamientos con un nivel del 95,0% de confianza (figura 4.12). Como se observa en la tabla 4.6, el porcentaje de granulocitos del tratamiento control fue de 25%, el tratamiento con 10% de probiótico presentó un porcentaje de 32% y en el tratamiento 100% de la dosis se observó un 30% de granulocitos. Así pues, el menor porcentaje de granulocitos se dio en el tratamiento control, mientras que los tratamientos con probióticos presentaron un aumento en el porcentaje de estas células.

Las células granulosas presentan funciones más complejas que los hialinos ya que se encargan de la encapsulación y formación de nódulos, procesos donde varios hemocitos colaboran entre ellos para detener al organismo invasor (Söderhäll & Cerenius, 1992). Además, según Newman & Bullis (2004) su función además de encapsular o fagocitar a los invasores también es inhibir la actividad enzimática de enzimas bacterianas y fúngicas mediante la melanización. Así pues, debido a la importancia de sus funciones, que se observe un incremento en su porcentaje a partir de un 10% de probiótico es signo de una mejora inmunológica. Además de la mejora del sistema inmunológico en relación a la concentración del probiótico, existe un ahorro en el coste

de administrar el probiótico al cultivo, ya que con un 10% de la dosis recomendada por el fabricante se consigue el efecto.

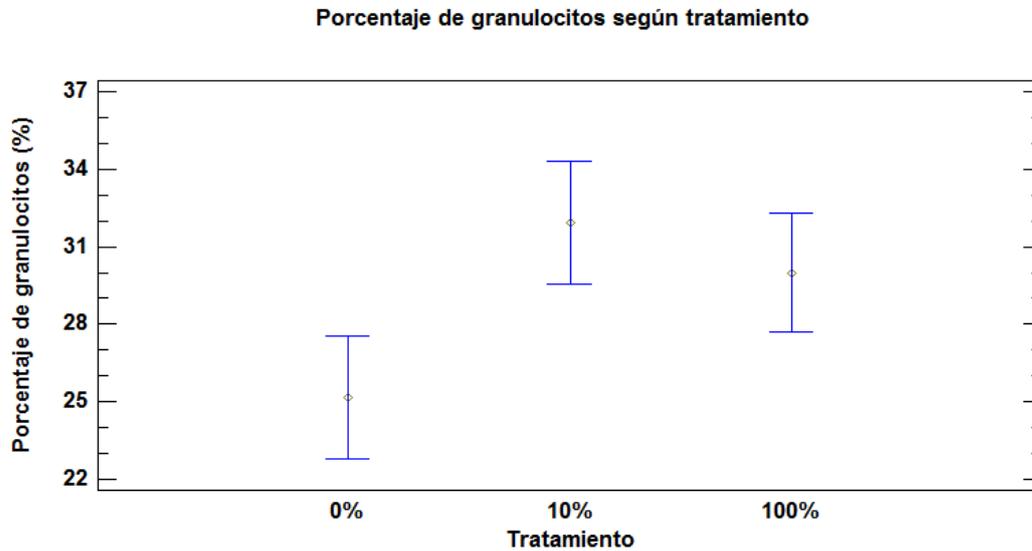


Figura 4.12. Medias y diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del porcentaje de granulocitos según cada tanque.

En relación a los hialinos presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0181$) entre las medias de los tres tratamientos con un nivel del 95,0% de confianza (figura 4.12). Pero esta diferencia es en el aumento de los hialinos en el tratamiento control con un porcentaje de 75%, mientras que los tratamientos con 10% y 100% probiótico presentan un porcentaje de 68 y 70%, respectivamente (tabla 4.6). Estos resultados son lógicos ya que un aumento del porcentaje de hemocitos granulosos repercute en una disminución en el porcentaje de hemocitos hialinos.

Los hialinos tienen una función más limitada combatiendo los patógenos mediante la fagocitosis (Johansson *et al.* 2000), siendo una de las respuestas inmunes más comunes, y menos compleja que las funciones llevadas a cabo por los granulocitos (Secombes, 1996) así que disponer de más granulocitos es una mejora en el sistema inmune.

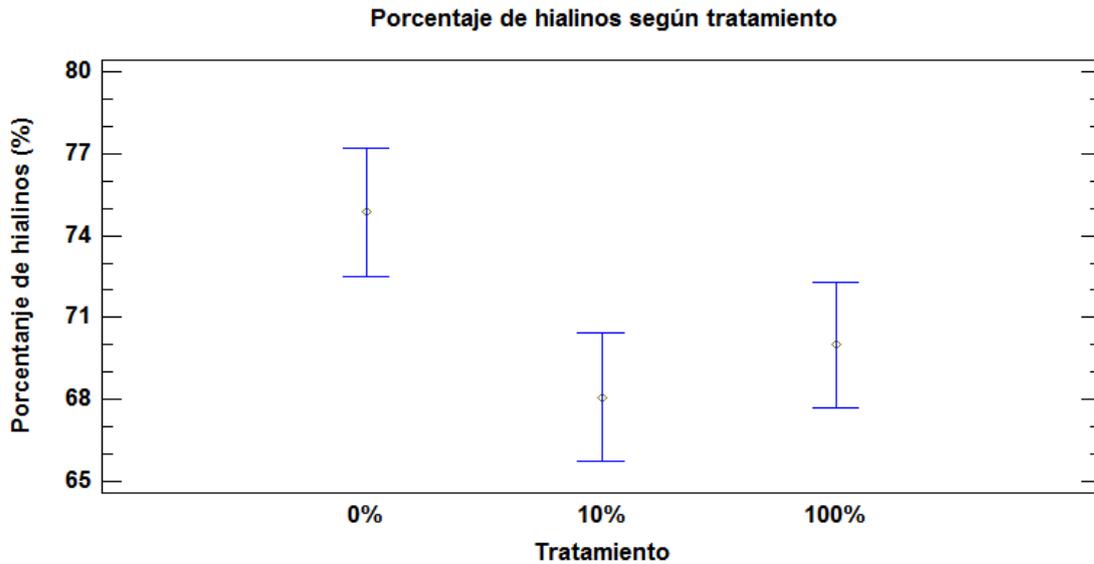


Figura 4.12. Medias y diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher de hialinos según tratamiento.

Los porcentajes de hemocitos granulados y hialinos obtenidos, se encuentran dentro del rango observado por Macias-Sancho *et al.* (2014) y de Souza *et al.* (2016) en *L. vannamei* cultivado en BFT.

En el trabajo realizado Llarío *et al.* (2016) con el mismo probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens*, en sistemas BFT, el porcentaje de granulocitos también aumentó, si bien en este estudio, a partir de una dosis de sólo el 10% de la recomendada por el fabricante ya se observa este efecto.

En el trabajo realizado por Camacho (2012) con la aplicación del mismo probiótico en camarones *L. vannamei*, también observó un aumento el porcentaje de granulocitos como el de Llarío *et al.* (2016) pero con una proporción algo diferente (60% hemocitos granulados y 40% hemocitos hialinos).

Según Wang & Zhang (2008) la acción conjunta de los bioflóculos y la bacteria *B. amyloliquefaciens*, aumenta el porcentaje de hemocitos granulados y la capacidad de respuesta frente a los agentes patógenos, al igual que los resultados obtenidos en este estudio donde la cantidad de granulocitos aumento con respecto a camarones que crecieron sin *B. amyloliquefaciens*.

En cuanto a la proteína total en hemolinfa (PTH) no existió una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,1976$) entre los tres tratamientos con un nivel del 95,0% de confianza (figura

4.13) aunque parece apreciarse una tendencia en la que se dan valores más altos en los tratamientos 10% y 100% que en control. El tratamiento control obtuvo una concentración de proteína total de 78,9 mg/ml, el tratamiento de 10% de probiótico 93,5 mg/ml y el 100% de dosis una concentración de 93,2 mg/ml (tabla 4.6). Los niveles de proteína total en la hemolinfa obtenidos entran dentro del rango detectado por Cheng *et al.* (2002), Li *et al.* (2008), Macias-Sancho *et al.* (2014) y de Souza *et al.* (2012).

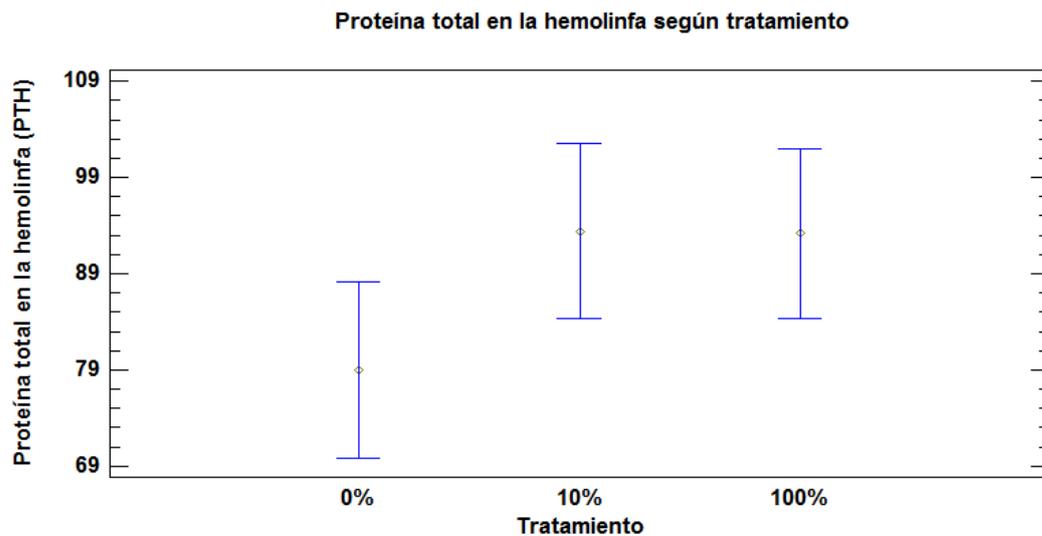


Figura 4.13. Medias y diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher de la proteína total en la hemolinfa según tratamiento.

La PTH es el mecanismo de los camarones para identificar a los agentes patógenos, su tipología y regula la unión de los patógenos con los hemocitos (Johansson *et al.* 1999), también regula la capacidad de fagocitosis de los hemocitos mejorando la detección y control de los patógenos (Wang & Zhang, 2008). La proteína total en la hemolinfa puede verse influenciada-también por el tamaño del organismo (Cheng *et al.* 2002), es decir un organismo de mayor tamaño presentará más PTH que un organismo menor. En este caso como se observa en la tabla 4.7 el tamaño medio de los camarones según tratamiento fue en el caso del control de 4,93 g, el 10% presentó un tamaño medio de 4,64 g y con el 100% de probiótico un tamaño de 4,95 g. Como se observa en la figura 4.14 el tamaño de los camarones no presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,8184$) entre los tres tratamientos con un nivel del 95,0% de confianza.

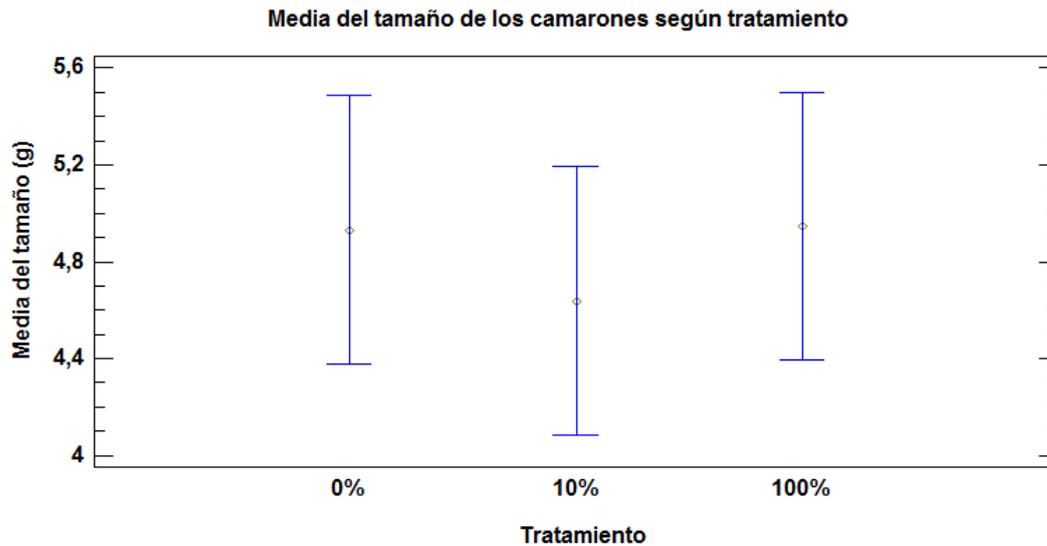


Figura 4.14. Medias y diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del tamaño de los camarones según tratamiento.

Llario *et al.* (2016), trabajando con camarones con un tamaño medio de unos 10 g, observaron un aumento significativo en los niveles de proteína total en suero de la hemolinfa en los camarones que estuvieron expuestos al mismo probiótico. En nuestro caso, hay que tener en cuenta que los organismos fueron más pequeños y que el ensayo aún continúa a la espera de que el tamaño del camarón aumente. Así pues, es posible que conforme vayan creciendo los camarones y alcancen un mayor tamaño, los valores de la proteína total también aumenten y se puedan observar diferencias según los tratamientos aplicados. La variable de la proteína total en la hemolinfa no reflejó la mejora del sistema inmunológica.

Observando los resultados obtenidos se puede determinar que la utilización del probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens* ayuda a reforzar el sistema inmunológico de los camarones *L. vannamei* cultivados en un sistema de BFT. Aunque la presencia del probiótico no provoque un aumento de la concentración de la proteína total del suero de la hemolinfa (PTH) ni en el número total de hemocitos (NTH), si provoca un cambio en cuanto a la composición de estos hemocitos. Se observa que en los tratamientos con probióticos el porcentaje de hemocitos granulados son mayores y por tanto estos camarones tienen una mayor capacidad y variedad de respuesta inmunológica frente a los diferentes patógenos. Al mismo tiempo observamos que una dosis más alta no implica una mejora en los efectos, con lo que se puede determinar que la dosis del tratamiento 10% ($2,86 \cdot 10^6$ UFC/l) es la más adecuada para los cultivos de *L. vannamei* en BFT, ya que con menor cantidad obtenemos los mismos resultados, hecho que minimiza costes en la adquisición del probiótico.

5. CONCLUSIÓN

- El probiótico compuesto por *B. amyloliquefaciens* no influye sobre la mejora de la calidad del agua ya que las propias bacterias de los BFT realizan esta función pudiendo haber enmascarado el efecto del probiótico.
- La administración del probiótico al cultivo de camarones sí produce una mejora en el sistema inmunológico ya que el porcentaje de granulocitos aumenta con respecto al tratamiento control y por tanto estos camarones tienen una mayor capacidad y variedad de respuesta inmunológica frente a los diferentes patógenos. En cambio, en relación al número total de hemocitos (NTH), y la proteína total en suero de la hemolinfa el probiótico no causa diferencias significativas entre los tres tratamientos.
- Tanto el tratamiento del 10% como el del 100% de probiótico presentan una mejora inmunológica de los camarones gracias al aumento del porcentaje de granulocitos. Una dosis más alta no implica una mejora en estos efectos, siendo así el tratamiento del 10% con una concentración de $2,86 \cdot 10^6$ UFC/l la dosis más adecuada hecho que minimiza costes en la adquisición del probiótico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Asaduzzaman, M., Wahab, M. A., Verdegem, M. C. J., Huque, S., Salam, M. A., Azim, M. E. (2008). C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture*, 280(1), 117-123.
- Avnimelech, Y., Mokady S., Schoroder, G.L. (1989). Circulated ponds as efficient bioreactors for single cell protein production. *Bamdigeh*, 41,58–66.
- Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264(1), 140-147.
- Avnimelech, Y. (2009). Biofloc technology. *A practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge*.
- Balcázar, J. L., Rojas-Luna, T., Cunningham, D. P. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 147-150.
- Bao, L. (2014). Quality of biomass of floc-associated bacteria isolated from shrimp ponds. Doctoral dissertation, *International University, Vietnam*. [Revisada 30/11/2015]
- Barroco, A., Perazzolo, L., Rosa, R. (2008). Inmunológica del camarón. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, L. (2008). Guía técnica Patología e Inmunología de camarones penaeidos.
- Baumgarten, M. G. Z., Wallner-kersanach, M., Niencheski, L. F. H. (2010). Manual de análises em oceanografia química. *Furg*.
- Brock, J., Main, K. (1994). A guide to the common problems and diseases of culture *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA:242.
- Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., Pearson, D. C. (2004). The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a highintensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, 232,525–537.
- Camacho, M.A. (2012). Efecto de la aplicación de probióticos en dietas para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mediante indicadores de crecimiento y respuesta inmune. Tesis de Maestría. *ITSO. Sonora, México*.
- Cheng, W., Liu, C. H., Yan, D. F., Chen, J. C. (2002). Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. *Aquaculture*, 211(1), 325-339.
- Chu, C., Lee, D. (2004). Multiscale structures of biological flocs. *Chemical Engineering Science* 59: 1875-1883.
- Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W., Avnimelech, Y. (2009). Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquac Eng*, 40,105-112.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356, 351-356.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3), 125-137.

- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G. (2013). Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. *Biomass now: cultivation and utilization*. InTech, Rijeka, Croatia, 301-328.
- FAO (2006). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*. Briggs, M. *Fisheries and Aquaculture Department*. Rome. [Consulta: 20 junio 2016]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en
- FAO (2014). El Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Roma.
- FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.
- Gomez-Gil, B., Roquea, A., Turnbull, J.F., (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191, 259-270.
- Hargreaves, J.A., (2006). Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquaculture Engineering*, 34, 344–363.
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B. E., Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International journal of food science & technology*, 38(3), 255-266.
- Johansson, M. W., Holmblad, T., Thornqvist, P. O., Cammarata, M., Parrinello, N., Soderhall, K. (1999). A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. *Journal of Cell Science*, 112(6), 917-925.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1), 45-52.
- Jory, D. E., Cabrera, T. R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P. G., Lawrence, A. L., Jackson, C. J., McIntosh, R. P., Castañeda, J. (2001). A global review of shrimp feed management: status and perspectives. *Aquaculture 2001: Book of Abstracts*. 318(1), 2001.
- Krummenauer, D., Poersch, L., Romano, L. A., Lara, G. R., Encarnação, P., Wasielesky Jr, W. (2014). The Effect of Probiotics in a *Litopenaeus vannamei* Biofloc Culture System Infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 26(4), 370-379.
- Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky Jr, W. (2014). The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* in BFT System. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(1), 3-14.
- Kuhn, D. D., Boardman, G. D., Lawrence, A. L., Marsh, L., Flick, G. Jr. (2009). Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture*, 296(1), 51-57.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., Qin, J. G. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274(1), 80-86.
- Lin, Y. C., Chen, J. C. (2001). Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259(1), 109-119.

- Lin, Y. C., Chen, J. C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224, 193-201.
- Llario, F., Romano, L. A., Rodilla, M., Poersch L. H. (2016). The use of the bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* in biofloc cultured (BFT) shrimp *Litopenaeus vannamei*: The effect on water quality, growth and immunological system. (*Aquaculture en revisión*)
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.
- Macias-Sancho, J., Poersch, L. H., Bauer, W., Romano, L. A., Wasielesky, W., Tesser, M. B. (2014). Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture*, 426, 120-125.
- Menz, A., Blake, B.F., (1980). Experiments on the growth of *Penaeus Vannamei* Boone. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 48, 99–111.
- Moriarty, D. J. (1999). Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In *Proceedings of the 8th international Symposium on Microbial Ecology* (pp. 237-243). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology Halifax, Canada.
- Muñoz, M., Cedeño, V., Rodriguez, j., Van Der Knaap, W., Mialhe, E., Bachere, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191; 89-107.
- Newman, S., Bullis, R. (2004). The new wave abstracts. *World Aquaculture Society*.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C. A., Ross, L. G., (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107-115.
- Raa, L. (1996). The Use of Immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3), 229-288.
- Ramírez, J. J., Bicudo, C. E. M., (2005). Diurnal and spatial (vertical) dynamics of nutrients (N, P, Si) in four sampling days (summer, fall, winter, and spring) in a tropical shallow reservoir and their relationships with the phytoplankton community. *Brazilian Journal of Biology*, 65(1), 141-157.
- Ray, A. J., Shuler, A. J., Leffler, J. W., Browdy, C. L. (2009). Microbial ecology and management of biofloc systems. *The Rising Tide, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming. Baton Rouge, LA*, 255-266.
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., & Leffler, J. W. (2010). Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299(1), 89-98.
- Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H. R., Gibson, G. R., Mercenier, A., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B., Rowland, I., Cherbut, C., Klaenhammer, T. R., (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* 37, 105–118.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. (1998). Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167(3), 301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191(4), 271-288.

- Secombes, C. (1996). The Nonspecific Immune System: Cellular Defenses, In The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment, *Iwama, G. and Nakanishi, T., Academic Press, San Diego, USA, 63-103.*
- Söderhäll, K., Cerenius, L. (1992). Crustacean Immunity. *Annual Rev. on fish diseases.* 3-23.
- Souza, D. M., Suita, S. M., Leite, F. P. L., Romano, L. A., Wasielesky, W., Ballester, E. L. C. (2012). The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. *Aquaculture Research*, 43(12), 1828-1837.
- Suita, S. M. (2009). O uso da Dextrose como fonte de carbono no desenvolvimento de bioflocos e desempenho do camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em sistema sem renovação de água. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Van Wyk, P., Hodgkins, M. D., Laramore, R., Main, K. L., Mountain, J., Scarpa, J. (1999). Water quality requirements and management. *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*, 128-138.
- Villarreal, H., Hinojosa, O., Naranjo, J. (1994). Effect of temperature and oxygen consumption of laboratory *Penaeus vannamei* postlarvae. *Comp. Biochem.* 331-336.
- Vita, G. Q. L. D. (2008). Utilização de probióticos no cultivo super-intensivo do camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*) em um sistema sem renovação de água. *Repositorio Institucional da Universidade Federal do Rio Grande.* Rio Grande, Brasil.
- Wang, W., Zhang, X. (2008). Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish & shellfish immunology*, 25(5), 522-527.
- Wasielesky, W. Jr., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C. L. (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258,396–403.
- Weibel, E. R. (1980). *Stereological methods* (Vol. 2, pp. 253-257). London: Academic Press.
- Xie, F., Zhu, T., Zhang, F., Zhou, K., Zhao, Y., Li, Z. (2013). Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *SpringerPlus*, 2(1), 119.