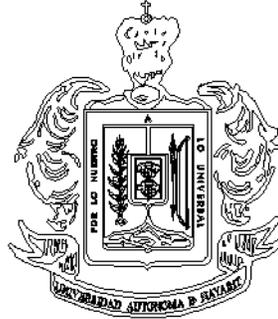


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



**Policultivo de *Holothuria inornata* con *Penaeus vannamei*
en un sistema biofloc.**

BIOL MAR. MARÍA ELENA CONTRERAS SILLERO

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de maestro en
Ciencias en el Área de ciencias pesqueras

Xalisco, Nayarit, Febrero 2020

DEDICATORIA

A mi Familia sobre todos a mis padres por su inmenso apoyo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, por su apoyo durante el trascurso de toda mi vida incluyendo mi carrera y este último paso mi maestría, gracias por sus regaños, discursos de apoyo, sobre todo por escucharme con mucha paciencia y no dejarme flaquear.

Al Doctor Juan Manuel Pacheco Vega, mí director de tesis por adoptarme como su estudiante, por creer y confiar en mí desde mis inicios, por su infinita paciencia, por sus enseñanzas, por animarme siempre a continuar, por su disponibilidad de ayudarme pese a la diferencia de ideas y por brindarme la oportunidad de seguir con nuevos proyectos. A usted mi admiración, mi respeto y mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Francisco Valdez, por su apoyo, sus consejos, revisiones y por brindarme la oportunidad de conocer más acerca de la acuacultura y hacerme sentir siempre parte importante de los proyectos.

Al M.C Francisco Jiménez Ordaz por estar ahí para mí cuando te necesite, por darme ánimo, tus enseñanzas y múltiples consejos, tu amistad a lo largo de mi formación profesional y tu compañía aunque breve pero significativa en pesquera.

Al biólogo Nahúl Cornejo por tu amistad, ayuda en este proyecto, tu compañía en pesquera, y tener siempre una actitud positiva ante las adversidades.

Posgrado de Ciencias Biológico Agropecuarias, Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera por facilitarnos las instalaciones, al proyecto PEI-251077, a CONACYT por su beca de maestría, y al programa de Becas para la realización de tesis de licenciatura, maestría y doctorado por parte de COCYTEN

A toda esa gente que me ayudaron y participaron en este proyecto.

ÍNDICE

CONTRAPORTADA.....	i
OFICIO DE APROBACIÓN.....	ii
OFICIO DE CONFORMIDAD DE COMITÉ TUTORIAL	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	8
ANTECEDENTES	9
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
<i>Maduración de biofloc</i>	16
<i>Primer experimento</i>	17
<i>Cuantificación de bacterias primer experimento</i>	20
<i>Variables productivas en el primer experimento</i>	21
<i>Segundo experimento</i>	22
<i>Calidad del agua en el segundo experimento</i>	24
<i>Cuantificación de bacterias en el segundo experimento</i>	25
<i>Variables productivas en el segundo experimento</i>	25
Análisis Estadísticos	26
RESULTADOS.....	27
<i>Primer experimento</i>	27
<i>Segundo experimento</i>	37
DISCUSIÓN	49
<i>Oxígeno</i>	49
<i>Temperatura</i>	49

<i>pH</i>	50
<i>Amonio</i>	51
<i>Nitritos</i>	53
<i>Nitratos</i>	54
<i>Fosfatos</i>	55
<i>Alcalinidad</i>	56
<i>Clorofila</i>	58
<i>Calcio y Magnesio</i>	59
<i>Cuantificación de bacterias</i>	60
<i>Parámetros productivos del policultivo de H. inornata y P. vannamei</i>	62
CONCLUSIONES.....	65
RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66
LITERATURA WEB.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Parámetros fisicoquímicos de un policultivo de *H. inornata* y *P. vannamei*, en biofloc con y sin recirculación (integrado). Primer Experimento. 27

Tabla II. Concentración de bacterias del genero *Vibrio*, en agua de un policultivo con: *P. vannamei* y *H. inornata*, en biofloc. Primer experimento. Al inicio del experimento, 8 días (BFT Maduro) y 5 semanas (Fin del experimento). 34

Tabla III. Concentración de bacterias ácido lácticas, en agua de un policultivo con *P. vannamei* y *H. inornata*. Primer experimento. Al inicio de maduración de BFT 8 días (BFT Maduro) y 5 semanas (Fin del experimento). 34

Tabla IV. Parámetros productivos de *H. inornata* y *P. vannamei* en un policultivo con biofloc, con y sin recirculación (integrado). Primer experimento. 35

Tabla V. Parámetros fisicoquímicos en un policultivo con *H. inornata* y *P. vannamei*, en un sistema biofloc con recirculación y en un monocultivo de *P. vannamei*. Segundo experimento. 37

Tabla VI. Concentración de bacterias del género *Vibrio*, en agua de un policultivo con: *P. vannamei* y *H. inornata*, en biofloc. Al inicio del experimento, 8 días (siembra de camarón en BFT), 2 semanas (siembra de pepino de mar en BFT) y 9 semanas (Fin del experimento). Segundo Experimento. 46

Tabla VII. Parámetros productivos de *H. inornata* y *P. vannamei*, En un sistema de policultivo biofloc con recirculación y un monocultivo *P. vannamei*. Segundo Experimento. 47

Tabla VII. Parámetros productivos de *H. inornata* y *P. vannamei*, en un sistema de policultivo biofloc con recirculación y un monocultivo *P. vannamei*. Segundo experimento. 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los sistemas de policultivo en recirculación (A) y sin recirculación integrado (B) con biofloc utilizados en el primer experimento.	18
Figura 2. Esquema de los sistemas de policultivo en recirculación (A) y monocultivo de camarón (B) con biofloc utilizadas en el segundo experimento.....	23
Figura 3. Concentración de amonio de un policultivo con biofloc. CR= camarón en un tanque con recirculación. PR = pepino de mar en un tanque con recirculación PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.	28
Figura 4. Concentración de nitritos de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.	29
Figura 5. Concentración de nitratos de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.	30
Figura 6. Concentración de fosfatos de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.	30
Figura 7. Concentración de carbonatos de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.	31
Figura 8. Concentración de clorofila de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.	32
Figura 9. Concentración de magnesio en un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.	32
Figura 10. Concentración de calcio de un policultivo en biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.	33

Figura 11. Promedio de peso en el camarón respecto al tiempo en los tratamientos con recirculación (CR) y tratamiento del policultivo integrado sin recirculación (PIS). Primer experimento.	36
Figura 12. Concentración de amonio en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.	38
Figura 13. Concentración de nitritos en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.	39
Figura 14. Concentración de nitratos en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.	40
Figura 15. Concentración de fosfatos en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.	40
Figura 16. Concentración de carbonatos en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.	41
Figura 17. Concentración de clorofila en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.	42
Figura 18. Concentración de magnesio en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.	43
Figura 19. Concentración de calcio en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.	44
Figura 20. promedio del crecimiento del camarón respecto al tiempo en los tratamientos con recirculación (cr), y tratamiento de monocultivo con camarón (mc). segundo experimento. ANOVA $p= 0.016$ $a>b$	48

RESUMEN

Investigaciones recientes del cultivo en biofloc (BFT) han sido orientadas a mejorar su eficiencia y aprovechamiento para la reducción de costos y aumento de ganancias. En este trabajo el objetivo es optimizar BFT mediante la evaluación de un policultivo del pepino de mar (*Holothuria inornata*) con camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en BFT. Para esto se llevó a cabo dos experimentos: en el primer experimento se evaluó por 5 semanas 2 sistemas de cultivo: un policultivo integrado de *P. vannamei* y *H. inornata*, en la misma unidad de cultivo en 100L de BFT (PIS) y un cultivo con los mismos organismos en unidades de cultivo separadas de 100L con recirculación (PR pepino en recirculación y CR camarón en recirculación). En ambos casos se mantuvo una densidad de 500 camarones/m³ y 12 kg/m³ de *H. inornata*, obteniendo una supervivencia de 75% PR, de 92% CR, 40% PIS para *H. inornata*, 80% PIS para *P. vannamei* y una TCA para *P. vannamei* de 0.6 en RC y 0.8 en PIS. En el monitoreo semanal de calidad de agua se presentó un déficit calcio y un desprendimiento de la dermis severo en *H. inornata*, por lo que en el segundo experimento se realizaron modificaciones de biomasa y se agregó minerales de manera externa (CIMg y CICA) En el segundo experimento se evaluó un sistema con recirculación con BFT, con *P. vannamei* en la primera unidad de cultivo en 300L (RC) y *H. inornata* en la segunda unidad de cultivo en 100L (PR) y un sistema de cultivo tradicional (300L) BFT con *P. vannamei* (MC) durante 9 semanas, a una densidad de 500 camarones/m³ y 4.5 kg/ m³ de *H. inornata*. Obteniendo una supervivencia de 100% PR, 98% en CR, y de 92% en MC, una TCA para *P. vannamei* de 0.6 en RC y de 0.7 en MC se midió las variables de calidad de agua, concluye que un policultivo integrado de *H. inornata* y *P. vannamei* presenta un factor de riesgo asociado a la interacción de las especies, por lo que la integración de *H. inornata* a un sistema de cultivo biofloc con *P. vannamei* es más adecuado en unidades de cultivo en recirculación, el cultivo de *P. vannamei* en un monocultivo y policultivo en biofloc tienen el mismo despeño productivo. Concentraciones calcio inferiores al agua de mar en un cultivo de *H. inornata*, representa un factor crítico para su supervivencia.

Palabras clave: policultivo, biofloc *P. vannamei* y *H. inornata*

INTRODUCCIÓN

La acuicultura mixotrófica es un tipo de cultivo donde los desechos de una especie son convertidos en el aporte nutrimental de otros organismos, lo que implica la integración de diferentes especies de nivel trófico (Yokama, 2013). En este proceso se involucran diferentes géneros de microalgas y bacterias, cuya asociación ha demostrado ser una buena alternativa en el cultivo de más de una especie (Martínez-Córdova *et al.*, 2009), ya que permite la generación de redes tróficas, incluyendo bacterias heterótrofas, que influyen en la relación carbono-nitrógeno (presentes en la materia orgánica), en la biodisponibilidad de nutrientes, el mejoramiento de la calidad de agua, control de enfermedades y la nutrición de los organismos cultivados.

En los últimos años los cultivos mixotróficos se han complementado con sistemas biofloc (Hargreaves, 2013). Debido a que en estos sistemas permite el mayor aprovechamiento de la comida, además de conservar una buena calidad de agua. Sin embargo, los alcances de aprovechamiento de este tipo de cultivos resultan ser mayores si se cuenta con un control preciso de la interacción microalga-bacterias (Cardona *et al.*, 2016).

Generalidades

El cultivo biofloc (BFT por sus siglas en inglés), es un modelo de producción que ofrece la ventaja de servir como método de tratamiento de agua, permitiendo la conversión de amonio a nitritos a nitratos, esto gracias a bacterias heterotróficas (Lui *et al.*, 2015). Además que es considerado como uno de los sistemas económicos y ecológicos, con potencial acuícola (Crab *et al.*, 2012), ya que funciona con una menor tasa de recambio de agua (Cardona *et al.*, 2016) minimiza la descarga de efluentes, sin la adición de especies invasoras, promueve la bioseguridad de los cultivos, así como propicia la generación de proteína bacteriana

que es renovada constantemente en el sistema en forma de flóculos, favoreciendo la continua producción in situ de una fuente proteica microbiana (Avnimelech, 2012).

Constitución

El biofloc está constituido por una mezcla heterogénea de microorganismos suspendidos como: hongos, algas, microalgas, bacterias (autótrofas, quimio-autótrofas, foto-autótrofas, filamentosas, heterótrofas), flagelados, ciliados y otros protozoarios, y materia orgánica como: coloides, polímeros orgánicos, metales alcalinotérreos comida no digerida, residuos orgánicos, células muertas y iones. (Chu y Lee, 2004). El conjunto de todas las formas de vida desarrolladas en un sistema biofloc están asociadas con un sin número de partículas orgánicas e inorgánicas en forma de películas en las paredes de los contenedores o aglomerados amorfos suspendidos en la columna de agua en los sistemas y se mantienen unidos por una matriz de mucosidad que es secretada por bacterias y microorganismos filamentosos (Avnimelech *et al.*, 2009).

Función

La tecnología BFC consiste en el manejo de las comunidades microbianas, esto determina el éxito del sistema basado en la transformación de los compuestos nitrogenados en el agua (Avnimelech *et al.*, 2009). Dado a que la variedad de bacterias que se desarrollan en este sistema, son capaces de degradar las diferentes formas de nitrógeno incluidas las más nocivas para los organismos acuáticos, por lo que permite mejorar la bioseguridad del sistema (Collazos-Lasso y Arias-Catellanos, 2015). Existen tres grupos de micro-biota en todos los sistemas biofloc que ayudan en la remoción de compuestos nitrogenado, en diferente grado: Asimilación por algas, oxidación por bacterias quimio-autótrofas y asimilación por bacterias heterótrofas (Ray y Lotz, 2014) a las cuales si se les suma otros organismos como zooplancton, hongos y nemátodos en abundancia, en conjunto permiten la asimilación casi por completo de los desechos del nitrógeno (Collazos-Lasso y Arias-Catellanos, 2015).

Aporte nutricional

El sistema BFT, contiene una variada cantidad de componentes nutritivos entre los que destacan: proteína microbiana (aprox. 30 a 45%); de ácidos grasos (0.5 a 15%) y carbohidratos (16 a 30%.) Sin embargo, no existen informes claros sobre el contenido de aminoácidos como la metionina y lisina (Hargreaves, 2013). También contienen importantes cantidades de vitaminas y minerales, especialmente de fósforo, permitiendo que el sistema ofrezca dos servicios críticos: aprovechar los desechos y una fuente de alimento dentro del sistema, rica en proteína microbiana que se renueva dentro del sistema, lo que reduce la demanda de proteínica en el alimento, complementando la alimentación de los organismos a cultivar, mejora la conversión alimenticia (TCA) y en consecuencia reduce los costos por alimentación (Chu y Lee, 2004).

Variables para el mantenimiento de un sistema biofloc

Relación Carbono-Nitrógeno (C-N)

Las bacterias se alimentan con sustrato orgánico que contiene principalmente carbono y nitrógeno en pequeñas cantidades, este último elemento puede ser tomado del agua con el fin de producir proteína necesaria para el crecimiento y la multiplicación celular (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos, 2015). En consecuencia, para poder crear un ambiente que ayude y posibilite la presencia de bacterias probióticas, es necesario la adición de una fuente de carbono en el sistema BFC (Cardona *et al.*, 2016). Ya que el desarrollo de los flóculos depende de la cantidad de sustrato añadido y la relación C: N, para la remoción y asimilación de nutrientes en el agua a través de la biomasa, encargadas de estimular la producción de proteínas microbianas, entre otros nutrientes (Hargreaves, 2013). Esta relación varía de acuerdo al tipo de bacterias que se desarrollan en el sistema, por ello múltiples autores han reportado relaciones variadas de carbono: nitrógeno por ejemplo: Avnimelech (2009) de 20:1, Monroy (2013) de 15:1, Mientras que Collazos-Lasso y Arias-Castellanos (2015), y Hargreaves (2013) coinciden en una relación de 5:1 y Ray *et al.* (2014) reporta una relación de 22:1.

Para calcular esta relación es importante tomar en cuenta que la cantidad de carbohidrato añadido también tiene que mantener el amonio en bajas cantidades por lo que es necesario considerar la cantidad de alimento suministrado (relacionando con la biomasa). Las estimaciones entonces dependen del porcentaje de proteína del alimento, el porcentaje de nitrógeno presente en la proteína (16 % aproximadamente) y el porcentaje de excreción de dicho nitrógeno (75% por excreción + alimento no consumido (De Schryver *et al.*, 2008).

Oxígeno

En los cultivos BFT, es fundamental el oxígeno, para poder cubrir esta necesidad, existen múltiples tipos de aireadores que se ajustan al tipo de cultivo (paletas, blower con piedras o mangueras difusoras, entre otros), estos deben de cubrir tres necesidades básicas para el sistema: 1) Brindar el oxígeno suficiente para la especie cultivada y los microorganismos cultivados (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos 2015 y Crab *et al.*, 2012), 2) Brindar oxígeno para los procesos la respiración y reacciones de nitrificación propias de la metabolización de los compuestos nitrogenados tóxicos de los microorganismos y 3) Mantener los flóculos en suspensión constante con un flujo continuo para evitar la decantación y la acumulación de sólidos que podrían generar reacciones anaerobias dañinas para el cultivo (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos 2015).

Estudios realizados con anterioridad, señalan que el oxígeno que se requiere para el mantenimiento de un sistema biofloc oscila entre 4-6 mg/L, con una saturación mayor al 60% (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos 2015). Aunque se han encontrado reportes que van desde 4.5 hasta los 5 mg/L (Crab *et al.*, 2012)

pH y alcalinidad

En un sistema biofloc el pH normalmente permanece estable en el agua con rangos de 7-8.5 y >50 mg de CaCO₃/L respectivamente (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos 2015).

Temperatura

Una de las consideraciones importantes para cualquier cultivo es la temperatura, en el caso de un sistema biofloc es necesario considerar que este factor influye en el flujo de oxígeno junto con la cantidad y la calidad de la materia orgánica, además que se tiene que tomar en cuenta las condiciones de la especie objetivo a cultivar (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos 2015). La temperatura típicamente utilizada en un biofloc para el cultivo de camarón es de 28-30 °C (Brito *et al.*, 2014).

Biofloc Inducido

En los últimos años se ha buscado optimizar el sistema biofloc, mediante el control de los microorganismos que se desarrollan en el sistema utilizando promotores de formación de flóculos como: microalgas y bacterias nativas de cada región, debido a que estos organismos están bien adaptados a las condiciones locales y pueden presentar un alto desempeño en sistemas biofloc, además de que los costos de producción de microalgas locales son mucho menores que las comerciales (Cota-Sánchez, 2015) y presentan un menor riesgo para las descargas de efluentes ya que al ser especies autóctonas se evita el riesgo de insertar especies invasoras al medio ambiente.

De esta manera surge lo que es el biofloc inducido, el cual a diferencia de un biofloc tradicional parte de un cultivo de microalgas y bacterias previamente seleccionada y estudiadas para cada región, las cuales desarrollan una simbiosis natural que propicia el desarrollo de pequeñas redes tróficas, permite el control de *Vibrio Harveyi* y otras especies de *Vibrio spp.* que podría ser perjudicial para el sistema (Pacheco-Vega *et al.*, 2018) además de contener altos valores nutricionales, funcionar como probiótico y bioregulador. A este sistema se le adiciona una fuente de carbono, para mantener la producción bacteriana que ayudará a conservar la calidad de agua.

La adición de cultivos de microalgas y bacterias al inicio de la preparación del biofloc, propicia la proliferación de microorganismos que constituyen el sistema biofloc, lo que disminuye el tiempo de maduración. En este estudio las microalgas utilizadas fueron *Schizochytrium sp.*, aislada de Ahome Sinaloa que puede llegar a contener hasta un

26 % de proteína y 25% de lípidos (Pacheco *et al.*, 2015) y la bacteria *Lactobacillus planctarum* aislada del intestino de camarón blanco. Estas forman una asociación que actúa como biorregulador de la calidad de agua y como un agente inhibidor para prevenir el crecimiento del *Vibrio* spp en el sistema de cultivo sin la necesidad de una inoculación posterior (Pacheco vega *et al.*, 2018).

El sistema biofloc se ha implementado con éxito para el cultivo de camarón, obteniendo resultados exitosos (Cota-Sández 2015). Sin embargo, para poder optimizar este sistema y aprovechar en su totalidad los flóculos ricos en nutrientes, es necesario la implementación de más de una especie en el cultivo, como lo son peces y organismos bentónicos (Crab *et al.*, 2012).

Cultivo de pepino de mar

Uno de los organismos que ha tomado importancia en la acuicultura mexicana es el pepino de mar, ya que representan un potencial grande de ingresos (Fajardo-León *et al.*, 2008). En los últimos años ha tenido una creciente demanda, lo que ha provocado la reducción de las poblaciones naturales (Fajardo-León y Vélez-Barajas, 1996). Algunos investigadores han señalado que las características biológicas como madurez tardía, baja tasa de reclutamiento y la facilidad de sus capturas implican que este recurso sea especialmente susceptible a la sobreexplotación (Tagliafico *et al.*, 2010), incluso se ha indicado que ciertas especies de pepinos de mar han sido tan diezmadas que en algunas áreas de pesca ya no es posible restaurar sus poblaciones (Purcell *et al.*, 2012).

Las especies explotadas en México son: *Isostichopus fuscus*, *Parastichopus pavimensis* y *Parastichopus californicus*, *Holothuria inornata* (Fajardo-León y Vélez-Barajas 1996), de las cuales solo *Isostichopus fuscus*, *Parastichopus pavimensis* se capturan únicamente en el Golfo de California (Fajardo-León *et al.*, 2008). Mientras que para la península de Yucatán se reportan: *Astichopus multifidus*, *Istochopus badionotus* y *Holothuria floridiana* (Fajardo-León y Vélez-Barajas, 1996).

En México poco se sabe acerca de la acuicultura del pepino de mar, pero se puede tomar como referencia estudios desarrollados de *Apostichopus japonicus* que ya se

cuenta con un amplio conocimiento de su cultivo. Además de que diversos autores señalan que los pepinos de mar son organismos con potencial para el cultivo mixotróficos debido a sus hábitos alimenticios. Es decir, ingieren sedimentos con material orgánico que incluye bacterias, protozoos, diatomeas y detritos de plantas, por lo que se ha considerado como un organismo que puede cultivarse en conjunto con camarón y peces (Yokama, 2013) en los sistemas biofloc, debido a que los parámetros ambientales de cultivo son semejantes además de que la generación de materia orgánica, de este sistema puede servir de alimento para el pepinos de mar.

HIPÓTESIS

Debido a las características biológicas e importancia comercial que presentan estas dos especies (*Holothuria inornata* y *Penaeus vannamei*.) y tomando en cuenta las ventajas que ofrece el sistema de biofloc; es posible cultivarlas en conjunto para obtener una buena interacción, un buen crecimiento, alta supervivencia y rendimiento en el cultivo de estas dos especies.

ANTECEDENTES

El sistema Biofloc ha venido tomando importancia en los últimos años, de los estudios más sobresalientes se encuentra el de Hargreaves (2013) el cual expuso las ventajas y desventajas de la utilización de este sistema, su aporte nutricional y su potencial para la utilización de cultivo de tilapia y camarón, mientras que Crab *et al.* (2012) describen sus propiedades y su uso potencial en policultivos.

Entre los estudios realizados para el policultivo con uso del sistema biofloc, está el realizado por Melo *et al.* (2016) con camarón y el pez *Mugil curema* comparándola con un cultivo con agua clara, obteniendo que los cultivo con el sistema BFT presentaron una mayor supervivencia (86% pez *Mugil curema*, 97% Camarón), ganancia de peso (1.29 g/día camarón y 1.01g/día pez *Mugil curema*) y tasa de crecimiento específica (3.15% pez *Mugil curema* y 1.72 % camarón) en comparación con los cultivos en agua clara.

Por otro lado, se tiene un estudio con la integración de pepino de mar y otros organismos acuáticos como el realizado por Kang *et al.* (2003). En China realizaron un policultivo de pepino de mar *Apostichopus japonicus* y abulón *Haliotis discus* en un tanque con sedimento con recirculación (primer sistema) y adicionalmente el cultivo *Apostichopus japonicus* y abulón *Haliotis discus* sin sedimento (Segundo sistema). En este experimento se alimentó con macroalgas locales para ambos organismos, obteniendo como resultado una supervivencia del 100% en el caso de los pepinos en ambos sistemas y de 90-95% en el caso del abulón, se reportó también una ganancia de peso para el caso de *Apostichopus japonicus* de 18.35 ± 0.63 g en el sistema con sedimento y de 15.21 ± 0.63 g en el sistema sin sedimento. Además, se observó que el abulón y el pepino de mar al ser alimentados con materia orgánica, reducen los niveles de nitrógeno orgánico en el sistema, encontrando concentraciones de hasta 0.5 mg/L por lo que mencionan que los pepinos de mar tiene un potencial para su cultivo con otras especies debido a su alimentación basada en heces y materia orgánica.

En China, Wang *et al.* (2008), realizaron un policultivo de pepino de mar *Apostichopus Japonicus*, el erizo *Trongylocentrotus intermedius* y la almeja manila *Ruditapes philippinarum*. El sistema consistió en tanques con recirculación, donde el agua era reutilizada en los diferentes tanques, y se comparó con monocultivos. En este estudio se utilizó la macroalga *laminaria japónica* y *Ulva lactuca* para la alimentación del erizo de mar, mientras que para la alimentación del pepino de mar se utilizaron diatomeas bentónicas y heces de los otros cultivos, obteniendo como resultado, bajas concentraciones de amonio de hasta 0.005 mg/L en los tanques con los pepinos, altas tasas de supervivencia tanto en el cultivo de erizo y pepino de casi un 100% sin embargo, para el cultivo de la almeja *Tapes philippinarum* se obtuvo un crecimiento pobre y alta mortalidad.

Otro estudio realizado por Yokama (2013) en Japón, evaluó un cultivo mixotrófica colocando jaulas del pepino de mar *Apostichopus Japonicus* debajo de jaulas de peces durante 307 días, obteniendo como resultado: una supervivencia del 96% en el caso de los pepinos, una tasa de crecimiento superior al control (cultivo únicamente de pepino de mar alimentados con microalgas) alcanzando un crecimiento de entre 100-124 g. En este trabajo se menciona que para el cultivo de *Apostichopus Japonicus* se requiere de una dieta rica en materia orgánica, además de que se demostró que *Apostichopus Japonicus* tiene un potencial para el cultivo mixotrófico debajo de jaulas de peces, ya que de esta manera se reduce la competencia, hay mayor supervivencia y se les proporciona una fuente de alimento a base de materia orgánica (heces de peces).

En 2016, Chogale y colaboradores en India realizaron un policultivo con la especie *Holothuria moebii* y camarón blanco, contrastándola con un monocultivo, la alimentación consistió en alimento comercial para *P. vannamei* y sedimento del tanque de tierra para el caso del pepino de mar, obtenido como resultado una buena interacción entre las especies, una supervivencia de *H. moebii* de 70% en el policultivo y 73% en el monocultivo, también se observó una reducción significativa en el contenido orgánico de los tanques, además de que el crecimiento del camarón no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Otro estudio realizado en

China por Jiang *et al.* (2017) muestra que en un policultivo de *P. vannamei* y *Holothuria scabra*, realizado en estanques de tierra se encontró que la integración de *Holothuria scabra* se generan modificaciones importantes en la calidad de agua, como lo son: disminución de fosfatos y amonio. Con supervivencias de camarón del 79% y 64% por parte de *Holothuria scabra*.

Otro estudio de policultivo con pepino de mar es el realizado en el Oceanic institute, (Moss, 2018) en Hawai, el cual se está desarrollando un proyecto de integración multitrófica con camarón blanco y dos especies de pepino de mar con la finalidad de volver más sustentable el cultivo de camarón, en este trabajo se evaluó a los pepinos de mar (*Holothuria atra* y *Actinopyga mauritiana*) para digerir los desechos producidos en los sistemas de crianza de camarón obteniendo una tasa de supervivencia de 43.8% (*H. atra*) y 4.2% (*A. mauritiana*).

En México, estudios señalan que los pepinos de mar son una fuente innegable de ingresos (Purcell *et al.*, 2014), y debido al mal manejo de este recurso se han reducido las poblaciones silvestres significativamente (Solís-Marín *et al.*, 2009). La mayoría de las especies explotadas se encuentran en estado de crisis por la sobreexplotación (Purcell *et al.*, 2014) y el desconocimiento sobre las especies explotadas (Zamora *et al.*, 2016) por lo que se han buscado nuevas alternativas como el cultivo de estos organismos. Sin embargo, la falta de información accesible para el cultivo de este organismo ha frenado en gran medida el aprovechamiento sostenible de este recurso.

De la búsqueda realizada de trabajos realizados para la explotación de pepino de mar en México se encontraron: cultivo de pepino de mar *Isostichopus badionotus* y *Holothuria floridana* (Rodríguez *et al.*, 2012), los cuales se cultivaron en la costa de Yucatán, en un sistema cerrado con sedimento extraído del lugar de colecta, el cual fue lavado, secado y enriqueció con microalgas, la alimentación consistió en diferentes macroalgas, microalgas y alimento comercial sin embargo, la mortalidad de este experimento fue del 80% debido a una infección por parte de *Isostichopus badionotus* por lo que recomiendan desarrollar técnicas de acuicultura para *Holothuria floridana* Rodríguez-Serna *et al.* (2012).

Las patentes realizadas para pepino de mar en México son:

Método de reproducción de *Isostichopus badionotus* (No. de solicitud MX/a/2014/014176). Carreño Sánchez 2015.

Método de cría de semillas de *Isostichopus Blandionotus*, *Astichopus multifidus*, *Holothuria floridana* y *Isostichopus fuscus* (No. publicación MX/a/2015/004066).

JUSTIFICACIÓN

La falta de información sobre la población de *Holothura inornata* así como su potencial uso comercial, puede ocasionar la explotación excesiva e incontrolada de numerosas poblaciones de este organismo, por lo que este estudio pretende generar información de este organismo y brindar alternativas para su aprovechamiento sin extraerlos directamente del medio ambiente.

A nivel mundial son pocos los antecedentes que se tienen de un cultivo de biofloc inducido con la integración de dos especies sin embargo, gracias a las características que *P. vannamei* desarrolla para su cultivo en un sistema de biofloc, como pH (7.5–8), temperatura (28-30°C), salinidad (35ppm) y generación de flóculos altamente nutritivos que a menudo son desechados, permite la oportunidad de optimizar estos desechos, integrando en el cultivo otros organismos con hábitos bentónicos como *Holothuria Inornata*.

Holothuria Inornata es una especie que se puede comercializar de la que no existen investigaciones al respecto se distribuye en el Pacífico desde el Golfo de California hasta las Islas Galápagos. Los individuos de *Holothuria inornata* pueden alcanzar hasta 40 cm de longitud lo que lo hace atractivo para su comercialización en el mercado asiático. En general, habitan en aguas poco profundas (0 a 18 m) y cálidas, poseen un foto-tactismo negativo y su alimentación consisten en de diatomeas bentónicas, bacterias, microalgas y macroalgas que se encuentran en el bentos marino (Solís *et al.*, 2009) lo que le permite una oxigenación y eliminación de patógenos en el bentos marino, estos microorganismos se pueden fácilmente encontrarse en los flóculos de biofloc. En el estado de Nayarit específicamente en bahía Matanchén, este organismo se encuentra en abundancia por lo que es un buen candidato para su aprovechamiento responsable con un potencial comercial elevado.

Estas características de desarrollo de *Holothuria inornata* en su ambiente natural lo hacen ser un buen candidato para aprovechar de manera integral este tipo de

cultivos. Con esta propuesta se dará respuesta al tema de alimentos y su producción, mediante la implementación y operación de un cultivo mixotrófico basado en microalgas y bacterias en un sistema biofloc, para la producción intensiva de *P. vannamei* y *Holothuria inornata*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar un policultivo de *Holothuria inornata* y *Penaeus vannamei* en un sistema de cultivo biofloc.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el mejor método para el policultivo *Holothuria inornata* y *Penaeus vannamei* en un sistema de cultivo biofloc con recirculación y sin recirculación (Integrado).
2. Determinar los parámetros de desempeño biológico (supervivencia, peso final, y factor de conversión alimenticia) de juveniles de *Penaeus vannamei* en el policultivo con recirculación y sin recirculación (Integrado).
3. Determinar los parámetros de variables productivas (Supervivencia, y peso final) de *Holothuria inornata* en el policultivo con recirculación y sin recirculación (Integrado).

MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema de cultivo experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la Escuela Nacional de ingeniería Pesquera de la Universidad Autónoma de Nayarit, ubicada en la Bahía de Matanchén, San Blas Nayarit. En el laboratorio de producción de alimento vivo, el cual cuenta con las condiciones para la instalación del sistema experimental y su seguimiento.

En el primer experimento se utilizó nueve tanques de fibra de vidrio de 150L, y en el segundo experimento tres tanques de 500L de fibra de vidrio, junto a tres tanques de 150L de fibra de vidrio. Los tanques fueron instalados en el laboratorio de alimento vivo bajo una malla sombra para mantener la temperatura e intensidad de luz constante. Cada tratamiento experimental se realizó por triplicado y con sus respectivos controles.

Para mantener la aeración en cada uno de los tanques se utilizó un blower de 1 HP, junto con mangueras con piedras difusoras (dos por tanque) distribuidas estratégicamente en los tanques de 150L., mientras para los tanques de 500L se utilizaron donas con manguera difusora.

Maduración de biofloc

Para la maduración del biofloc se realizó una siembra de la microalga *Schizochytrium* sp del 5% del agua a utilizar, a una densidad de 1.2×10^6 cel/mL, y una siembra de la bacteria ácido láctica *Lactobacilos* sp. al 1 % del agua a utilizar con una densidad de 4.8×10^3 UFC/mL, posterior a la siembra el agua se enriqueció con medio F/2 (Guillar 1973) y melaza, se dejó madurar 8 días, en cada uno de los tanques. A partir del segundo día se midieron los parámetros fisicoquímicos oxígeno, pH, temperatura 1 vez al día, mientras que los parámetros nitritos, nitratos, fosfatos, amonio, carbonatos, clorofila, calcio y magnesio se midió 1 vez por semana.

Primer experimento

El primer experimento tuvo como objetivo determinar el efecto del sistema de cultivo biofloc integrado (en la misma unidad de cultivo) y sistema biofloc en recirculación, la cual tuvo una duración de 32 días. Para esto se puso en operación dos sistemas diferentes: En el primer sistema se utilizó un tanque con 100L de biofloc previamente madurado y se sembró camarón de $0.2 \pm 0.02\text{g}$ a una densidad de 500 camarones por m^3 y pepino de mar a una biomasa de $12\text{kg}/\text{m}^3$ (figura 1B) en una misma unidad de cultivo. Mientras que en el segundo sistema se colocó un tanque con 100L de biofloc y se sembró camarón de $0.2 \pm 0.02\text{g}$ a una densidad de 500 camarones/ m^3 , este tanque estaba conectado a otro tanque con 100L biofloc al cual se sembró pepino de mar a una biomasa de $12\text{kg}/\text{m}^3$, de tal manera que estos dos tanques estaban en constante recirculación con un flujo de 300% por día (Figura 1A).

El alimento utilizado para la alimentación del camarón *P. vanamei* en ambos sistemas consistió en alimento comercial marca Previteb con 40% de proteína, dependiendo de su peso al 5% dividido en tres raciones: 8:00 AM, 12:00 AM y 3:00 PM, mientras que el alimento para el pepino de mar *H. inornata* en ambos sistemas consistió en los flóculos generados por el biofloc junto con la macroalga *Padina caulescens* al 5% del peso seco de la biomasa del tanque. Ambos sistemas se mantuvieron con un recambio de agua del 5% cada semana, en este recambio también se removía el alga sobrante que se empezaba a descomponer y se sustituía por alga recién capturada.

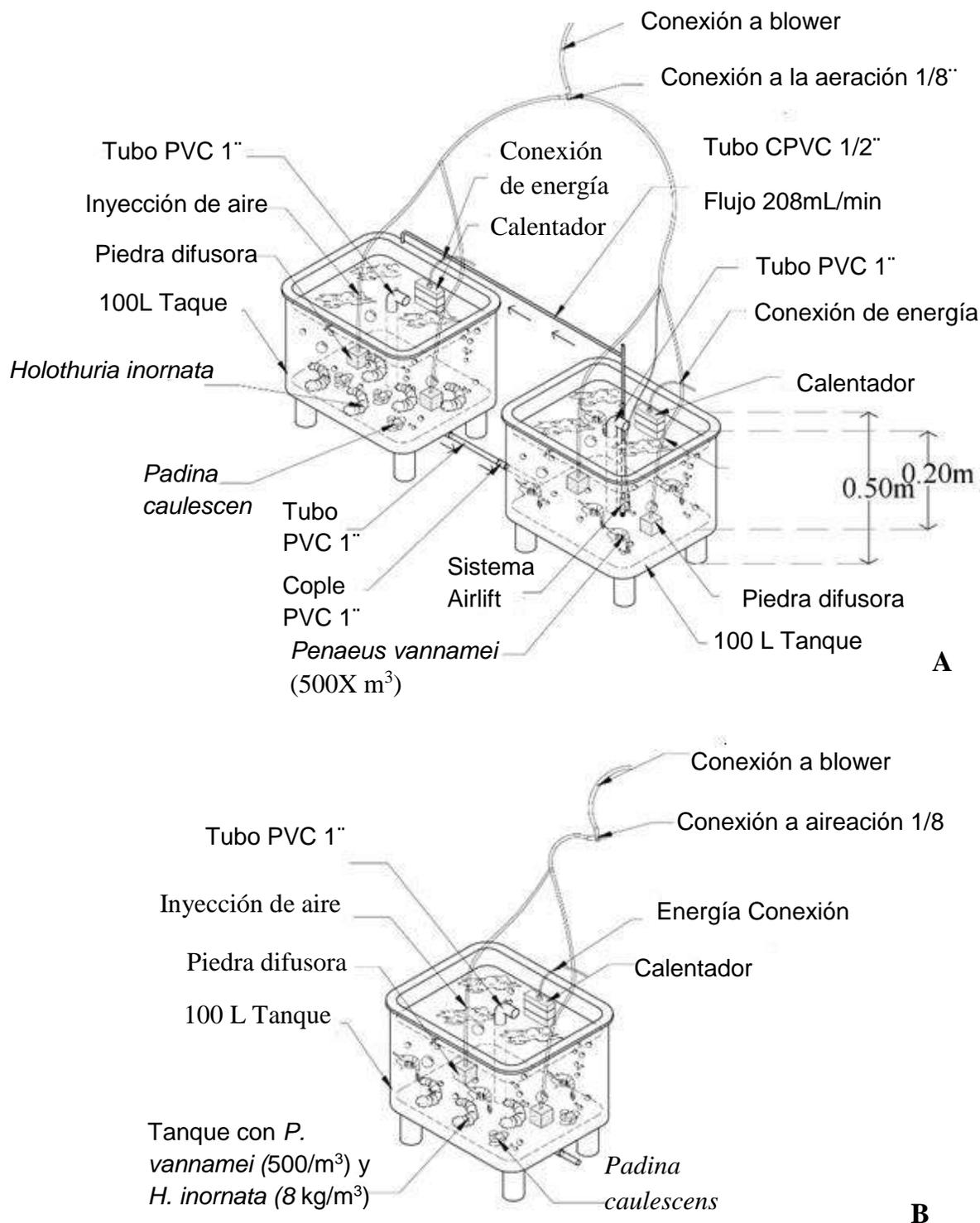


Figura 1. Esquema de los sistemas de policultivo en recirculación (A) y sin recirculación integrado (B) con biofloc utilizados en el primer experimento.

Para poder ajustar el alimento conforme al crecimiento del camarón, semanalmente se realizaron biometrías, las cuales consistían en la toma de muestra representativa de la población (30 camarones como mínimo), con ayuda de una red cuchara, se introducía en el tanque y se movía constantemente por todas partes del tanque y se capturaban los organismos, se retiraba el exceso de agua, posteriormente eran pesados y contados, todo esto se practicó en cada estanque con camarones con tres repeticiones. La fórmula para determinar la ración de alimentación en cada uno de los tanques fue:

$$(\sum \omega / n) \times N \times 0.05 = \text{Ración de alimento por día}$$

ω = Peso de los camarones

n = Número total de todos los camarones pesados

N = Número total de todos los camarones en el estanque

En el caso de la alimentación del pepino de mar no se presentó ningún ajuste.

Los organismos de *H. inornata* utilizados en esta serie de experimentos, fueron extraídos de manera manual con ayuda de un equipo de snorkel, en la Bahía Matanchén ya que abundan en la región y son recientemente comercializados al mercado asiático.

La macroalga *Padina caulescens* fue extraída de manera manual en la Bahía Matanchén y colocada en baldes de 20L con un 30% de agua de mar, fue transportada a las instalaciones de la Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera de la Universidad Autónoma de Nayarit (10 min del punto de extracción), ahí se le dio a la macroalga un shock osmótico mediante el lavado con agua dulce durante 15 minutos, fue lavada y limpiada quitándole otras macroalgas y organismos que se encontraron en ellas, una vez limpias fueron colocadas en un tanque de fibra de vidrio de 100 L con agua de mar limpia, la cual paso por un proceso de filtración mecánica hasta de 1 micra, irradiada con luz ultravioleta y tratada con una solución (6%) de hipoclorito de sodio de 1 mL por litro de agua tratada y neutralizada con tiosulfato, posteriormente se le agrego 2%, de medio F/2 (Guillard, 1973) como fuente de nutrientes y se lo colocaron dos piedras difusoras.

Calidad de agua primer experimento

El agua de mar empleada para los cultivos en biofloc recibió un proceso de filtración mecánica hasta de 1 micra, irradiada con luz ultravioleta y tratada con una solución (6%) de hipoclorito de sodio de 1 mL por litro de agua tratada y neutralizada con tiosulfato.

Durante todo el experimento se dio seguimiento a las variables de cultivo: concentración de oxígeno con el oxímetro marca YSI 550A DO, temperatura y pH con el potenciómetro marca waterproof, esto se realizó una vez al día a las 8 AM.

Para evaluar la concentración de Nitritos, Nitratos, fosfatos, Amonio, carbonatos, clorofilas, calcio y magnesio se utilizó el KIT_LYSA con ayuda de un espectro (Thermo Fisher Scientific, Genesis 10 S Visible). La medición se realizó una vez por semana, para ello se tomó una muestra de agua de cada sistema con ayuda de un tubo falcón de 55 mL previamente etiquetado, la muestra se tomó de tal manera que se evitará la formación de una burbuja de aire que permitirá un error en la lectura de datos, todas las pruebas fueron realizadas el mismo día que la toma de muestra y el sobrante era congelado para rectificación de datos de ser posible y necesario. En el caso de las mediciones de calcio y magnesio fueron realizadas hasta la segunda semana.

Se utilizó melaza de caña como fuente de carbono, siguiendo los cálculos de Avnimelech, 1999. La Melaza fue pesada, y disuelta en agua de mar, posteriormente fue esterilizada en la autoclave marca ALL AMERICAN®.

Cuantificación de bacterias primer experimento

Para la cuantificaciones de las bacterias ácido lácticas se utilizó el medio MRS marca GranuCult™, inicialmente la siembra fue directa, debido a que el agua se esterilizó previo a la toma de muestra, en el resto de las mediciones se utilizó diluciones de las muestras de cada uno de los tanques con sus respectivas repeticiones, con agua de mar estéril en 10 y 20 mL, posteriormente se sembraron

30µL la dilución de cada una de las muestras, se colocaron en la incubadora marca NOVATECH por 24 horas a 30°C, y se cuantifico las colonias encontradas.

Para la cuantificación de bacterias del género Vibrio se utilizó el medio TCBS marca GranuCult™, La siembra fue de manera directa el mismo día que se recolectaba la muestra (30 µL con sus respectivas replicas), posterior a la siembra se colocaron en la incubadora marca NOVATECH por 24 horas a 30°C y se cuantificaron las colonias encontradas.

Variables productivas en el primer experimento

Al principio y al final del experimento se realizó una biometría para el camarón y pepino de mar. También se determinaron los parámetros zootécnicos: la supervivencia, peso ganado (en el caso de pepino de mar y camarón) y TCA (Tasa de conversión alimenticia para el camarón). La fórmula que se utilizó para la TCA fue:

$$TCA = TA / ((\omega_I - \omega_F) \times N)$$

TA= Total de alimento suministrado

ω_I =Peso inicial de camarón

ω_F = Peso final

N = Número total de organismos

Las variables a evaluar fueron: TCA, supervivencia, nitritos, nitratos, amonio, carbonatos, clorofila, calcio y Mg para ambos experimentos.

Los resultados obtenidos en el primer experimento mostraron alto porcentaje de mortalidad dentro del sistema, por lo que se decidió elaborar un segundo experimento con modificaciones, como la disminución de biomasa del pepino de mar, volumen de agua y control de la concentración de magnesio y calcio en los sistemas.

Segundo experimento

El segundo experimento tuvo una duración de 60 días, al inicio del experimento se instalaron dos sistemas diferentes: En el primer sistema consistió en un policultivo con recirculación, se sembró camarón de 0.032g a una densidad de 500 por m² en un tanque con 300L con biofloc previamente madurado y estuvo en constante recirculación con un tanque de 100L en el que una semana después de sembrar los camarones se sembró *H. inornata* a una biomasa de 4.9±0.5215 Kg/m³ (Figura 2 A). Mientras que el segundo sistema consistió en un monocultivo de la camarón a la misma densidad que el policultivo en un tanque de 300 L con biofloc (Figura 2 B).

En el sistema de policultivo con recirculación los camarones se alimentaron con alimento comercial Previteb 40% de proteína, con una tasa de alimentación al 5% dependiendo del peso, mientras que *H. inornata* se alimentó con la macroalga *Padina caulescens* al 5% (peso seco) de la biomasa del tanque, junto con los flóculos generados por el sistema, ambos tanques estuvieron en recirculación con un flujo de 700 mL X min., con un recambio del 5% de agua cada semana, en este recambio también se removía la macroalga sobrante que se empezaba a descomponer y se sustituía por alga recién capturada.

En el monocultivo con biofloc, el camarón se alimentó con alimento comercial, marca Previteb 40% de proteína 5% dependiendo del peso, se mantuvieron a las mismas condiciones de luz, salinidad, pH que el sistema de recirculación con un recambio del 5% de agua cada semana.

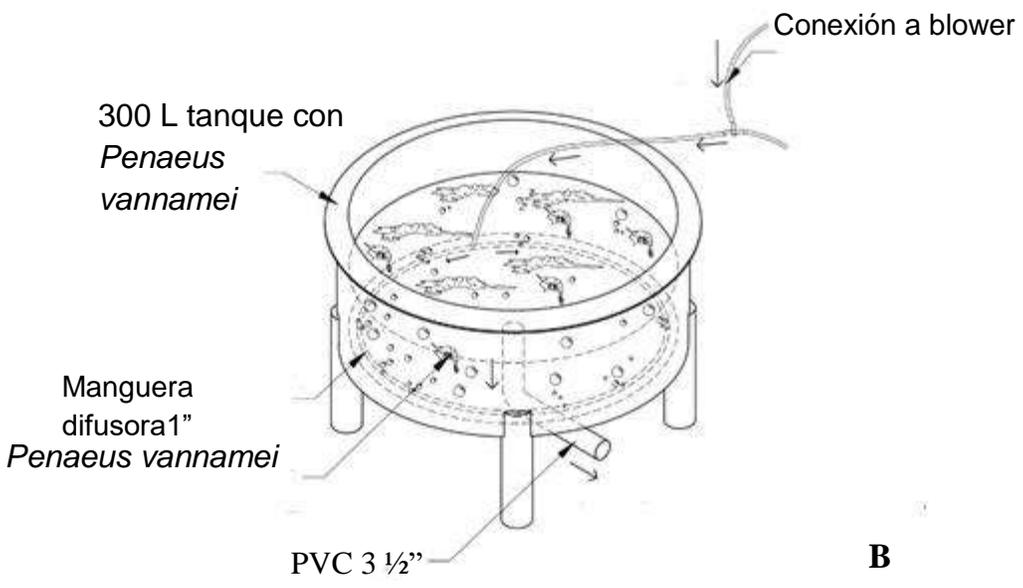
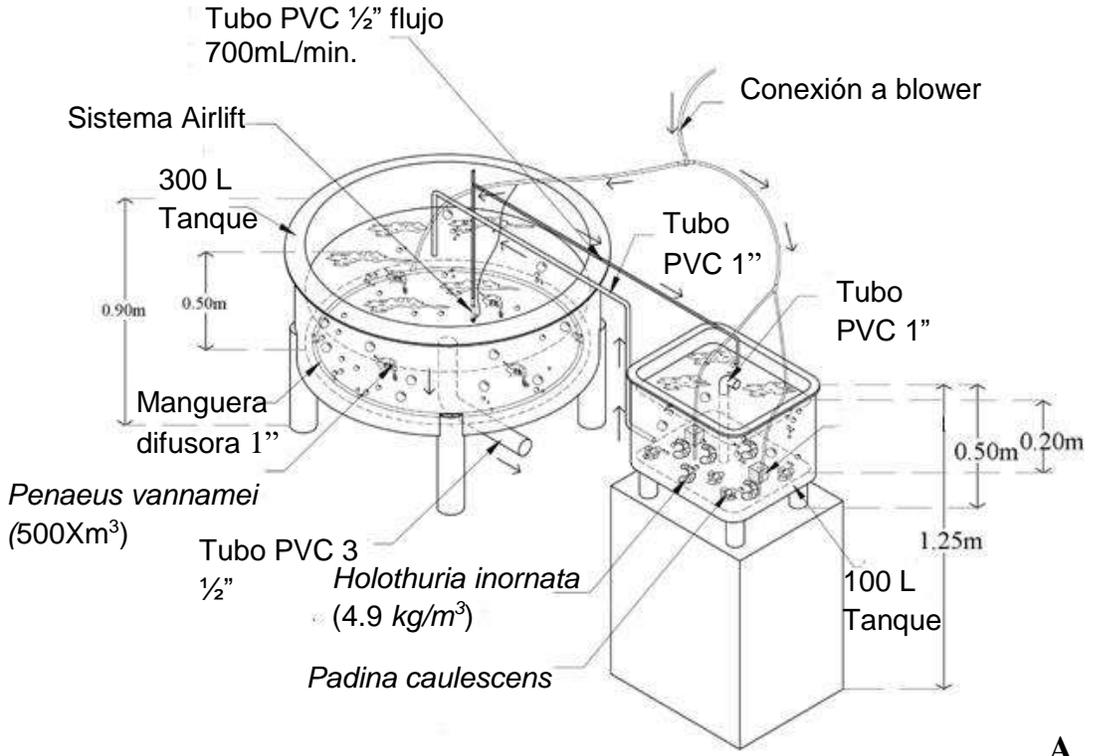


Figura 2. Esquema de los sistemas de policultivo en recirculación (A) y monocultivo de camarón (B) con biofloc utilizadas en el segundo experimento.

Para poder ajustar el alimento conforme al crecimiento del camarón semanalmente se realizaron biometrías, las cuales consistían en la toma de muestra representativa de la población (Con un número mínimo de 30 organismos), con ayuda de una red red-cuchara, se introducía en el tanque y se movía constantemente por todas partes del tanque y se capturaban los organismos, se retiró el exceso de humedad, para ser pesados y contados, todo esto se practicó en cada estanque con camarones con tres repeticiones. La fórmula para sacar la ración de alimentación fue en cada uno de los estanques se utilizó la misma fórmula que en el primer experimento. En el caso de la alimentación del pepino de mar no se presentó ningún ajuste.

Los organismos de *H. inornata* utilizados en esta serie de experimentos fueron extraídos de manera manual con ayuda de un equipo de snorkel, en la bahía de Matanchén, ya que abundan en la región, y son conocidos por los pescadores locales y recientemente comercializados al mercado asiático. La macro alga *Padina caulescens* fue extraída de manera manual con ayuda de un equipo de snorkel, en la bahía de Matanchén y se siguió el mismo proceso de desinfección que en el primer experimento.

Calidad del agua en el segundo experimento

El agua de mar empleada para los cultivos en biofloc recibió un proceso de filtración mecánica hasta de 1 micra, irradiada con luz ultravioleta y tratada con una solución (6%) de hipoclorito de sodio de 1mL por litro de agua tratada y neutralizada con tiosulfato.

En ambos tratamientos (cultivo biofloc integrado y monocultivo de camarón en biofloc sin recirculación) se dio seguimiento de las variables de cultivo: concentración de oxígeno, oxímetro marca YSI 550A DO temperatura, pH utilizando el potenciómetro marca Waterproof. Las mediciones se realizaron una vez al día a las 8 AM.

Para evaluar las concentraciones de nitritos, nitratos, fosfatos, amonio, carbonatos, clorofilas, calcio y magnesio se utilizó el KIT comercial LYSA empleando un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesis 10 S Visible). Para hacer las

mediciones se tomó una muestra de agua de cada sistema con ayuda de un tubo falcón de 55 mL previamente etiquetado, de tal manera que se evitará la formación de una burbuja de aire que permitirá un error en la lectura de datos. Todas las pruebas fueron realizadas el mismo día que la toma de muestra y el sobrante era congelado para rectificación de datos en caso de ser necesario. Se mantuvo la concentración de calcio y magnesio <100 mg/L, y <300 mg/L respectivamente mediante la adición de minerales $ClCa_2$ y $ClMg$.

Cuantificación de bacterias en el segundo experimento

Para la cuantificación de la bacteria ácido láctica se utilizó el medio MRS marca GranuCult™, inicialmente la siembra fue directa, debido a que el agua se esterilizó previo a la toma de muestra, en el resto de las mediciones se utilizaron diluciones de las muestras de cada uno de los tanques con sus respectivas repeticiones. Las diluciones fueron separadas con agua de mar estéril, en 10 y 20 mL, posteriormente se sembraron 30 μ L de la muestra con su dilución respectiva, se colocaron en la incubadora marca NOVATECH por 24 horas a 30°C y se cuantificó las colonias encontradas.

Para la cuantificación de las bacterias del género Vibrio se utilizó el medio TCBS marca GranuCult™, mediante la siembra directa de 30 μ L de cada uno de los tanques con sus respectivas replicas y se colocaron en la incubadora por 24 horas a 30°C y se cuantificaron las colonias encontradas.

VARIABLES PRODUCTIVAS EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO

Al principio y al final del experimento se realizó una biometría de camarón y pepino de mar empleado, También se determinaron los parámetros zootécnicos: la supervivencia, peso ganado y TCA (únicamente en el caso del camarón).

Las variables a evaluar fueron: TCA (Tasa de conversión alimenticia para el camarón), Supervivencia, nitritos, nitratos, amonio, carbonatos, clorofila, calcio y Mg para ambos experimentos. La fórmula para evaluar la TCA fue la siguiente

$$TCA = TA / ((\omega_I - \omega_F) \times N)$$

T.A= Total de Alimento suministrado

ω_I =Peso inicial de camarón

ω_F = Peso final

N = Número total de Organismos

Análisis Estadísticos

Los análisis de los resultados de porcentaje de supervivencia se transformaron a arcoseno para los análisis estadísticos. Para determinar las diferencias significativas de Supervivencia, TCA, crecimiento y cuantificación de bacterias (*Vibrio spp.* y bacterias ácido lácticas) entre los tratamientos, se realizó una prueba ANOVA de una vía, con sus respectivas pruebas a priori: Homocedasticidad: prueba Chocran y Normalidad: Kolmogorov-Smirnov. Y si fue necesario prueba Tukey. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa STADISTICA sigma relase 7.

RESULTADOS

Primer experimento

Los resultados del primer experimento muestran que en el caso de los parámetros de oxígeno, temperatura y pH estuvieron dentro de las condiciones óptimas para el cultivo y crecimiento de los camarones, además de que se obtuvieron poca variación a lo largo del experimento. Mientras que la salinidad, fue ligeramente mayor en el tratamiento con recirculación (CR y PR) Tabla I.

Tabla I. Parámetros fisicoquímicos de un policultivo de *H. inornata* y *P. vannamei*, en biofloc con y sin recirculación (integrado). Primer Experimento.

Tratamiento	Oxígeno (mg/ L)	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (g/L)	LUX 12 h
CR	5.1±0.89	23±4.2	7.9±0.2	30.2±3.2	3333±1195.8
PR	5.1±0.80	23±3.4	8.0±0.3	30.2±4.1	4981±1487.6
PIS	4.9±0.32	23±3.3	8.1±0.2	29.2±4.5	1972±264.2

CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación.

Los valores de concentración de amonio en el primer experimento fueron menores a 1 mg/L (Figura 3) en las primeras 3 semanas. A partir de la cuarta semana se observa un aumento considerable, esto puede deberse a que en este experimento es donde se encontró mayor número de organismos muertos, y se ve acentuado en el policultivo integrado sin recirculación (PIS), que fue el sistema con mayor carga de biomasa, alcanzando la concentración máxima en la cuarta semana de hasta 3.01±0.08 mg/L, mientras que el sistema que presento menor concentración de amonio a lo largo del experimento fue el camarón en un tanque con recirculación (CR) con una concentración máxima de 2.03±0.5mg/L en la cuarta semana. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que este sistema estaba en constante recirculación con el tanque con *H. inornata* en cual se llegaron a encontrar organismos muertos en la tercera y cuarta semana.

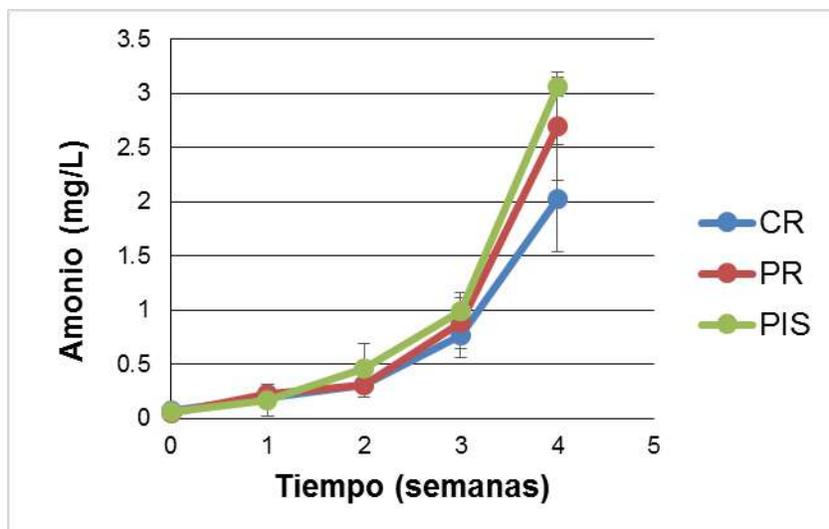


Figura 3. Concentración de amonio de un policultivo con biofloc. CR= camarón en un tanque con recirculación. PR = pepino de mar en un tanque con recirculación PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.

En las primeras semanas del primer experimento la concentración de nitritos permaneció baja en todos los tratamientos, fue hasta la tercera semana que se reportó la máxima concentración de nitritos en todos los sistemas con concentraciones de 1.63 ± 0.29 mg/L en el policultivo integrado sin recirculación (PIS). Mientras tanto en los tanques con recirculación con camarón (CR) y pepino de mar (PR) la concentración de nitritos fue de 1.11 ± 0.26 mg/L y 1.25 ± 0.28 , respectivamente (Figura 4). Coincidiendo con el crecimiento exponencial de amonio (Figura 3).

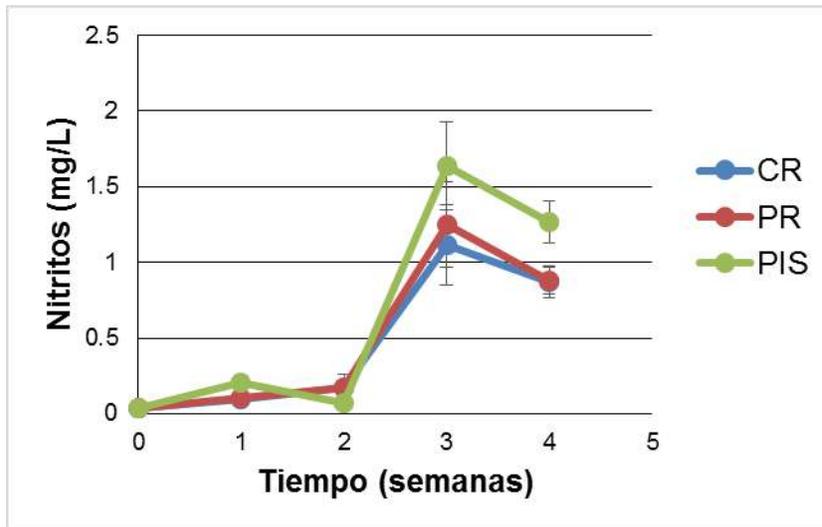


Figura 4. Concentración de nitritos de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.

En la Figura 5. Se puede observar que la concentración de nitratos fue relativamente estable hasta la tercera semana en los tanques con recirculación (CR Y PR), mientras que en el policultivo integrado sin recirculación (PIS) obtuvo una baja concentración de nitratos en la segunda semana teniendo mayor variación a lo largo del experimento. La mayor concentración de nitratos para todos los sistema se presentó en la tercera semana con 15.38 ± 0.09 mg/L (CR), de 15.38 ± 0.06 mg/L (PR) y 15.02 ± 2.4 (PIS) sin embargo, en la cuarta semana se registró una baja cantidad de nitratos llegando a presentar concentraciones de 1.78 ± 0.14 para el tanque CR, 2.90 ± 0.42 para CR y de 1.14 ± 0.57 para el PIS.

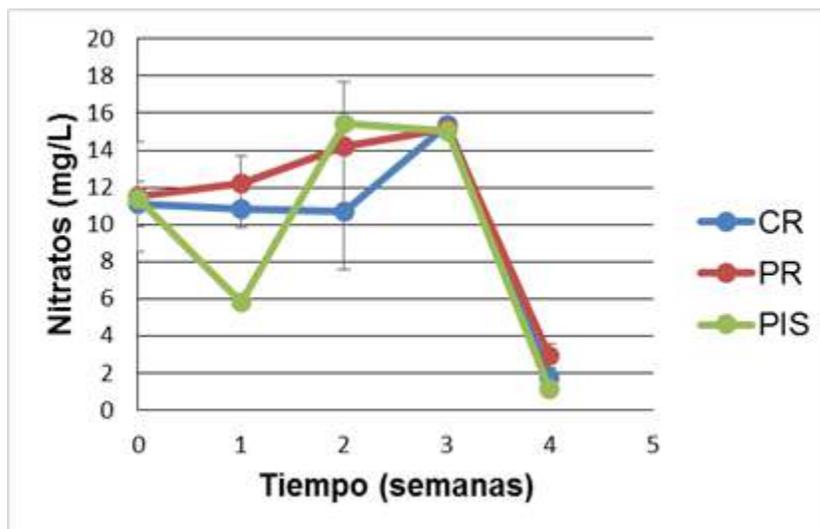


Figura 5. Concentración de nitratos de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.

La concentración de fosfatos presentó un comportamiento acumulativo durante todo el experimento en todos los tratamientos, registrando la máxima concentración de fosfatos en la cuarta semana (al final del experimento) con 0.98 ± 0.11 mg/L en el tratamiento PIS, de 0.85 ± 0.11 en el tratamiento PR, y de 0.75 ± 0.04 en el tratamiento CR, (Figura 6).

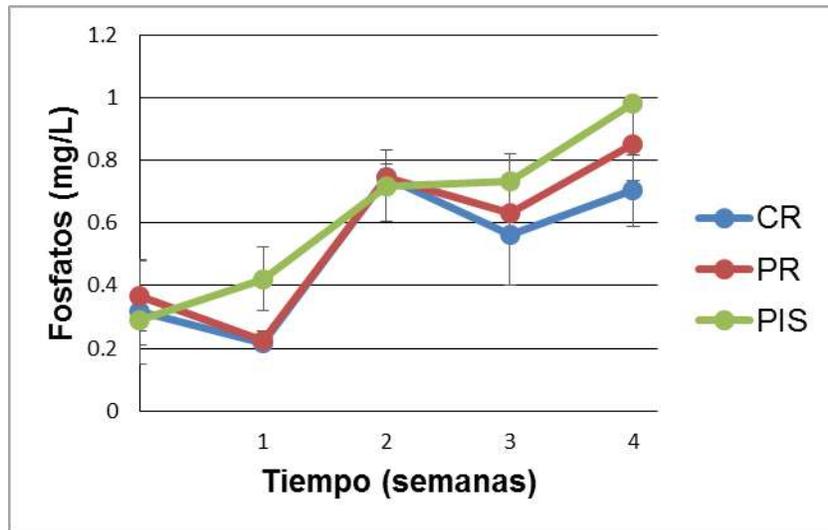


Figura 6. Concentración de fosfatos de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.

En la Figura 7. Se puede observar el comportamiento de la concentración de carbonatos entre cada tratamiento fue elevándose hasta la segunda semana de cultivo teniendo un promedio máximo de 141 ± 28.86 mg/L en el tratamiento CR, y en el tratamiento PR una concentración de 151.2 ± 2.13 mg/L, mientras que para el tratamiento PIS su máxima concentración promedio se presentó en la tercera semana 150 ± 0.00 . A partir de la segunda semana se da una disminución de la concentración de carbonatos en los tratamientos con recirculación (CR Y PR), mientras que el policultivo integral sin recirculación (PIS) esta disminución se da en la cuarta semana.

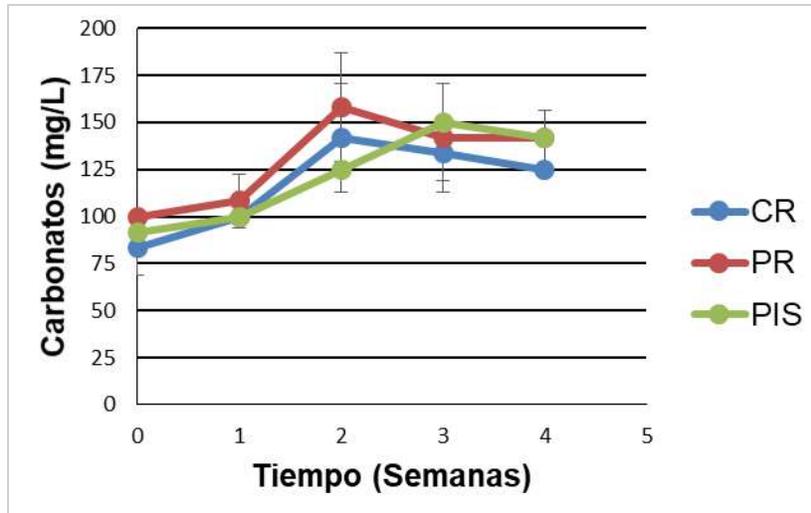


Figura 7. Concentración de carbonatos de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.

En este estudio se pudo observar que los tratamientos con mayor cantidad de clorofila (Figura 8) fueron los sistemas con recirculación (CR y PC) teniendo la mayor concentración de clorofila en la tercera semana con una concentración de 5 ± 2.25 mg/L en el tratamiento CR y de 6.43 ± 1.80 en el tratamiento PC. En el policultivo integral sin recirculación (PIS) la concentración de clorofila es prácticamente nula teniendo su máxima concentración promedio en la cuarta semana 0.31 ± 0.15 .

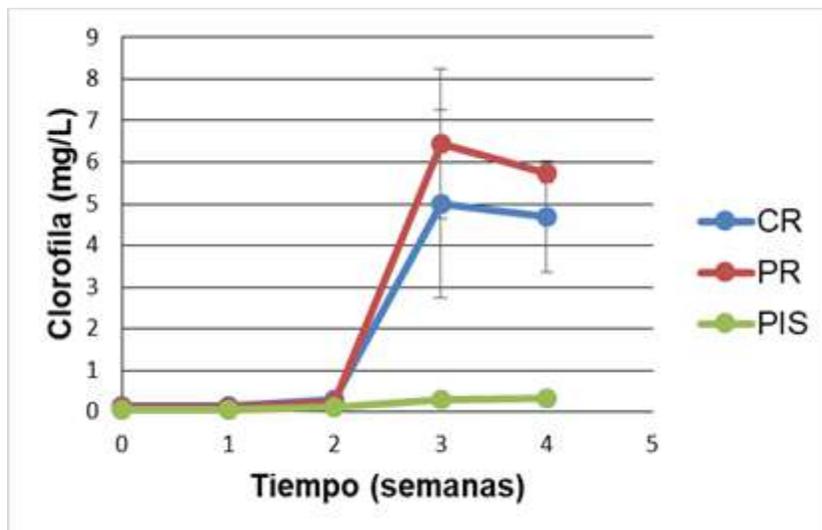


Figura 8. Concentración de clorofila de un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.

En la figura 9 se observa que la concentración de magnesio en los cultivos tuvo un comportamiento similar entre los tratamientos, presentando un comportamiento acumulativo a lo largo del experimento, por lo que las máximas concentraciones de magnesio se registraron en las últimas semanas del experimento. En el tanque con pepino de mar en recirculación (PR) se registró 455.27 ± 30.0 mg/L en la cuarta semana, mientras que en los tanques en recirculación con camarón (CR) y policultivo integrado sin recirculación (PIS), las concentraciones máximas de magnesio se presentaron en la tercera semana con concentraciones de 404.67 ± 17.52 mg/L y 404.67 ± 35.06 mg/L respectivamente.

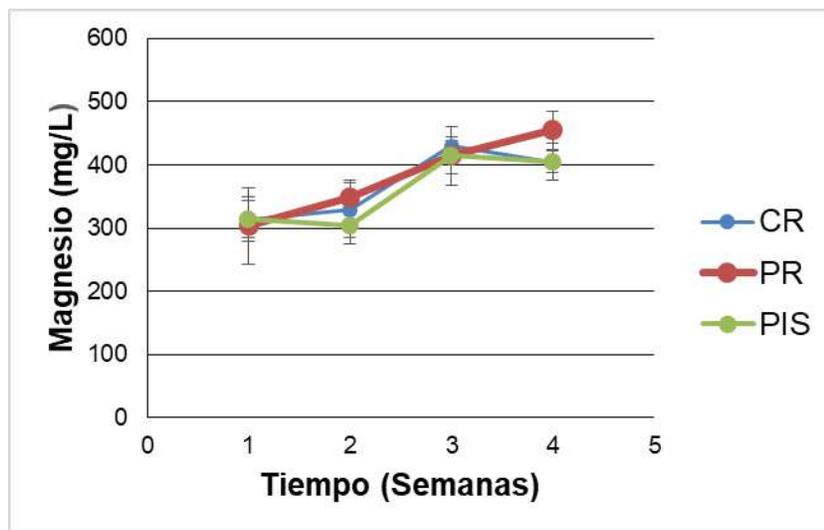


Figura 9. Concentración de magnesio en un policultivo con biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.

En el primer experimento se registró una disminución progresiva de calcio en todos los tratamientos, registrando en la tercera semana con una concentración de 110 ± 0.11 mg/L en los tanques con pepino de mar en recirculación (PR) y en los tanques con camarón en recirculación (CR) una concentración de 133.33 ± 28.9

mg/L. Mientras que en el policultivo integral sin recirculación (PIS) la menor concentración de calcio se presentó en la cuarta semana con una concentración de 100 ± 0.11 (Figura 10). Cabe resaltar que fue durante estas últimas semanas en que los pepinos de mar presentaron un desprendimiento de la dermis y alta mortalidad como se observa en la tabla II.

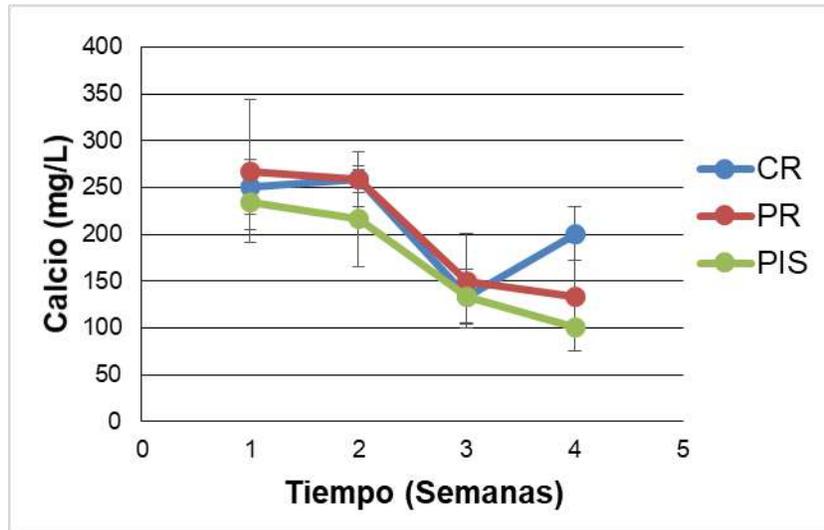


Figura 10. Concentración de calcio de un policultivo en biofloc. CR = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS = policultivo integrado sin recirculación. Primer experimento.

Quantificación de bacterias en el primer experimento

En el primer experimento se observa una baja concentración y casi inexistente cantidad de *Vibrio* spp, debido a que el agua con que se iniciaron los cultivos, estaba limpia y estéril, por lo que no se encontraron diferencias estadísticas. En el periodo de maduración y siembra de camarón, se observa que el tanque con pepino de mar en recirculación (PR) presento una mayor cantidad de bacterias del género *Vibrio* registrando de concentraciones de $8.5 \times 10^5 \pm 12 \times 10^5$. Por lo que estadísticamente se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos. En cambio, en la última parte del experimento estos se regulan y estadísticamente no se encontró diferencias significativas (Tabla II).

En el caso de medio TCBS, se obtuvieron concentraciones iniciales similares en todos los tratamientos, no encontrando diferencias significativas entre ellos. Mientras que al final del experimento, en el policultivo integral sin recirculación PIS (3.5×10^6 UFC/mL) fue ligeramente superior, en comparación con los tanques en recirculación con camarón (2.1×10^6 ufc/mL) y tanques en recirculación con pepino de mar (2.9×10^6 ufc/mL). Al final del experimento los tanques con recirculación camarón y pepino de mar (RC Y RP) mostraron similitudes en su comportamiento con concentraciones finales de 2.08×10^6 ufc/mL y 2.45×10^8 ufc/mL respectivamente mientras que el policultivo integral sin recirculación mostro (PIS) una concentración final ligeramente superior de 5.7×10^8 ufc/mL sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas (Tabla III).

Tabla II. Concentración de bacterias del genero *Vibrio*, en agua de un policultivo con: *P. vannamei* y *H. inornata*, en biofloc. Primer experimento. Al inicio del experimento, 8 días (BFT Maduro) y 5 semanas (Fin del experimento).

Tratamiento	Inicio del experimento (UFC/mL)	BFT Maduro (UFC/mL)	Fin del experimento (UFC/mL)
CR	0 ^a	(1.9×10^5) ^c	(2.1×10^6) ^a
PR	10 ^a	(8.5×10^5) ^a	(2.9×10^6) ^a
PIS	10 ^a	(2.0×10^4) ^b	(3.5×10^6) ^a

CR= camarón en un tanque con recirculación PR =pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS= policultivo integral sin recirculación.

ANOVA de una vía $P > 0.05$ $a > b > c$

Tabla III. Concentración de bacterias ácido lácticas, en agua de un policultivo con *P. vannamei* y *H. inornata*. Primer experimento. Al inicio de maduración de BFT 8 días (BFT Maduro) y 5 semanas (Fin del experimento).

Tratamiento	Inicio de maduración BFT (UFC/mL)	BFT Maduro (UFC/mL)	Fin del experimento (UFC/mL)
CR	(0) ^a	(2.00×10^6) ^a	(2.08×10^8) ^a
PR	(4.50×10^3) ^a	(8.47×10^6) ^a	(2.45×10^8) ^a
PIS	(1.88×10^3) ^a	(8.13×10^6) ^a	(5.71×10^8) ^a

CR= camarón en un tanque con recirculación PR =pepino de mar en un tanque con recirculación, PIS= policultivo integral sin recirculación.

ANOVA de una vía $P > 0.05$ $a > b > c$

Parámetros productivos en el primer experimento

En el primer experimento, la tasa de conversión alimenticia en pepinos de mar no pudo ser cuantificada debido a que el consumo de alimento por parte del pepino de mar consistía en flóculos regenerados por parte del biofloc y macroalga sin la ayuda de alimento inerte. En la tabla IV se puede observar que el sistema con mayor supervivencia y TCA fue el tratamiento con recirculación con camarón (CR), Los organismos finales de *H. inornata* fueron pesados y promediados en todos los sistemas.

Tabla IV. Parámetros productivos de *H. inornata* y *P. vannamei* en un policultivo con biofloc, con y sin recirculación (integrado). Primer experimento.

Tratamiento	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	TCA	Supervivencia (%)
<i>PR</i>	250± 73	253±45	-	75 ^b
<i>P PIS</i>	250± 64	251± 34	-	40 ^c
<i>CR</i>	0.2±0.05	0.52±0.04	0.60 ^b	92 ^a
<i>C PIS</i>	0.2±0.05	0.59±0.08	0.80 ^a	80 ^a

PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, P PIS pepino de mar en un policultivo integral sin recirculación, CR = camarón en un tanque con recirculación, C PIS = camarón en un policultivo integral sin recirculación. TCA = tasa de conversión alimenticia.

ANOVA de una vía $p < 0.05$ $a > b > c$

En la figura 11. Se observa el incremento de peso en el tiempo para los tanques experimentales con camarón. Observando que se hay un mayor crecimiento en el policultivo integral sin recirculación (PIS) que los tanques con camarón en recirculación (CR), Sin embargo, en la tabla II, se muestra que en este tratamiento hubo mayor mortalidad que en el de recirculación. Estadísticamente se encontró que los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p=0.009$).

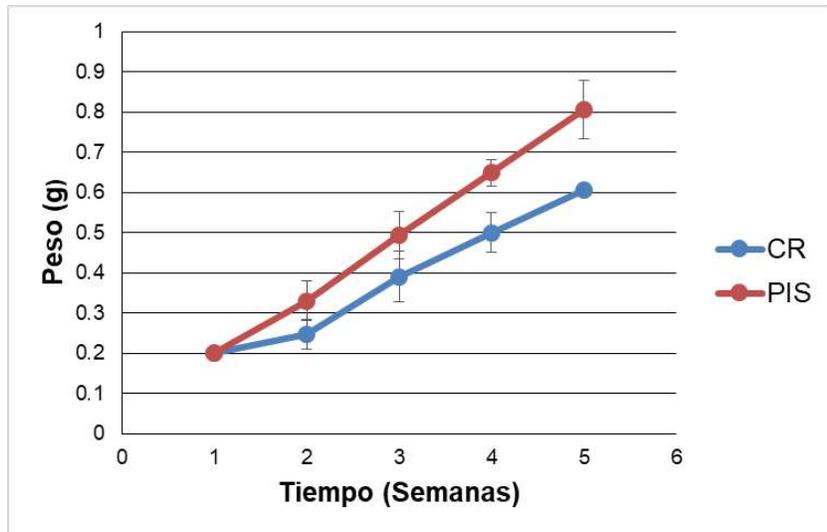


Figura 11. Promedio de peso en el camarón respecto al tiempo en los tratamientos con recirculación (CR) y tratamiento del policultivo integrado sin recirculación (PIS). Primer experimento.

Segundo experimento

Los resultados en el segundo experimento se observan que las variables físico químicas evaluadas (Tabla V). Estos parámetros estuvieron dentro de los rangos aceptables para el crecimiento del camarón; la temperatura y el oxígeno disuelto mantuvieron un comportamiento similar entre los tratamientos ($23 \pm 30.7^{\circ}\text{C}$ y oxígeno > 4.9 mg/L). Mientras que la salinidad estuvo ligeramente mayor en el monocultivo de camarón (MC). En general el pH fue similar entre los tratamientos y se mantuvo en rangos de (7.2 a 7.7).

Tabla V. Parámetros fisicoquímicos en un policultivo con *H. inornata* y *P. vannamei*, en un sistema biofloc con recirculación y en un monocultivo de *P. vannamei*. Segundo experimento.

Tratamiento	Oxígeno (mg/ L)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Salinidad (g/ L)	LUX 12 h
CR	4.9 ± 0.3	28 ± 0.3	7.7 ± 0.4	30.3 ± 2.9	10299 ± 221
PR	4.3 ± 0.5	28 ± 0.4	7.8 ± 0.5	30.3 ± 2.9	34276 ± 12038
MC	5.7 ± 1.0	28 ± 0.3	7.9 ± 0.0	31.2 ± 2.5	25204 ± 8953

CR= camarón en un tanque con recirculación PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC= Monocultivo de camarón. Segundo experimento.

El amonio en el segundo experimento tuvo un comportamiento diferente en cada tratamiento (Figura 12), En la figura se observa que los tratamientos con recirculación CR y PR tuvieron la máxima concentración promedio en la primera semana alcanzando valores de 0.53 ± 0.022 mg/L y 0.62 ± 0.02 mg/L respectivamente, esta concentración disminuyó en la segunda semana registrando concentraciones finales de 0.27 ± 0.06 mg/L y 0.57 ± 0.05 mg/L respectivamente. Mientras que el monocultivo de camarón (MC) tuvo su concentración máxima en la segunda semana 0.35 ± 0.00 mg/L. Cabe mencionar que después del primer recambio de agua, los niveles de amonio se redujeron.

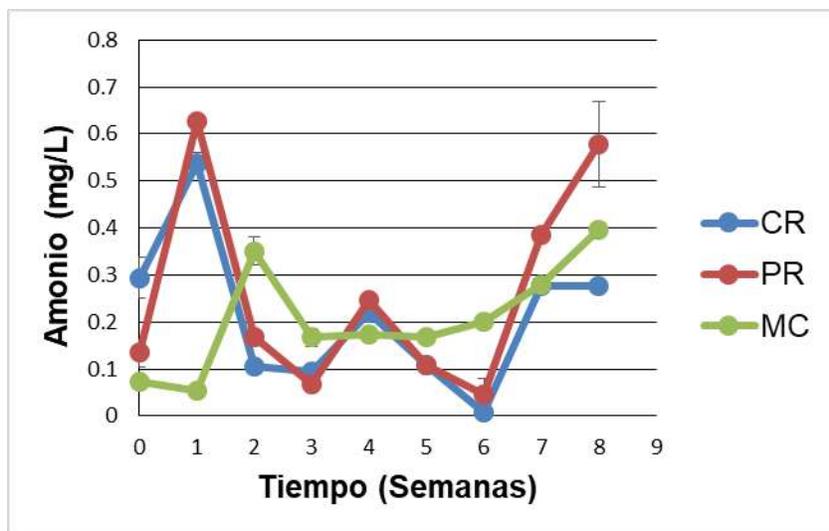


Figura 12. Concentración de amonio en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.

En la figura 13, se observa que los nitritos en el segundo experimento se comportaron de manera similar entre los tanques con recirculación (RC y PR) teniendo una máxima concentración en la tercera semana en el tanque en recirculación con camarón (CR) de $1.36 \pm 0.36 \text{ mg/L}$ y en el tanque en recirculación con pepino (PR) de $1.56 \pm 0.65 \text{ mg/L}$, en ambos tanques (que integran el sistema con recirculación) disminuyeron las concentraciones de nitritos a partir de la cuarta semana, mientras que el monocultivo de camarón (MC) presentó un comportamiento diferente al resto registrando su máxima concentración en la sexta semana con $0.99 \pm 0.00 \text{ mg/L}$.

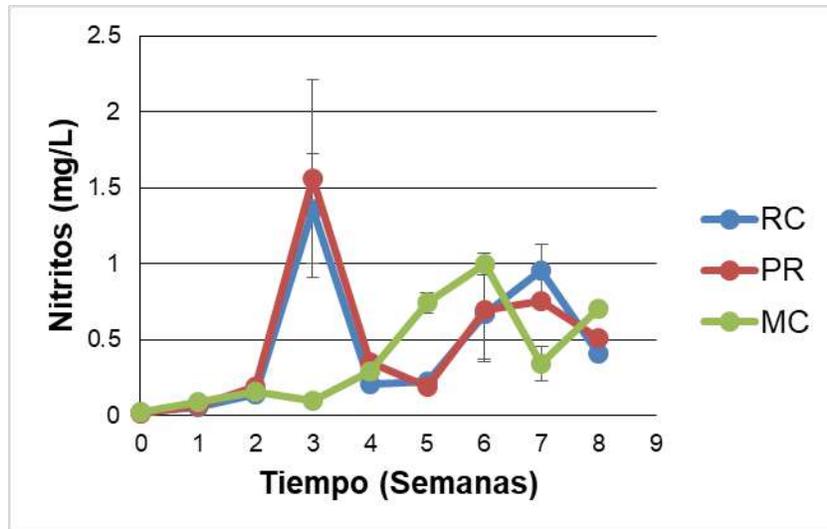


Figura 13. Concentración de nitritos en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.

La cantidad de nitratos en el segundo experimento fue similar en los tratamientos con recirculación con camarón (CR) y con pepino de mar (PR) teniendo sus máximas concentraciones en la quinta semana 30.88 ± 4.7 y 33.93 ± 6.73 respectivamente. Mientras que el monocultivo de camarón (MC) tuvo un comportamiento diferente al resto, con una concentración máxima en la tercera semana con $27.21 \pm 4.64 \text{ mg/L}$ y una disminución progresiva hasta la 7 semana (Figura 14) y un incremento en concentración de nitratos en la semana ocho.

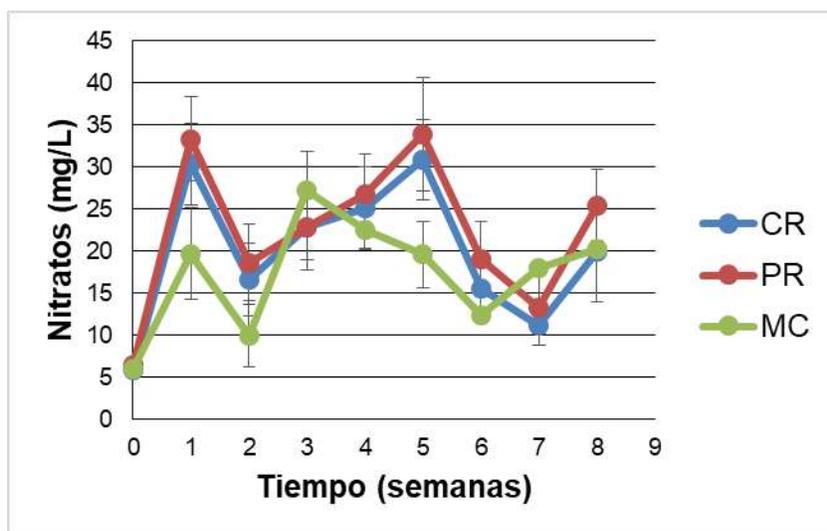


Figura 14. Concentración de nitratos en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.

La concentración de fosfatos en el segundo experimento, tuvo un comportamiento similar entre el tratamiento con recirculación con camarón (CR) y el monocultivo de camarón (MC). Las máxima concentraciones de fosfatos en el tanque en recirculación con camarón (CR) fue de $0.90 \pm 0.04 \text{ mg/L}$ en la cuarta semana, en el tanque en recirculación con pepino (PR) también fue en la cuarta semana con una concentración de $0.96 \pm 0.001 \text{ mg/L}$, mientras que en el policultivo de camarón (MC) la concentración máxima fue en la octava semana 0.82 ± 0.002 .

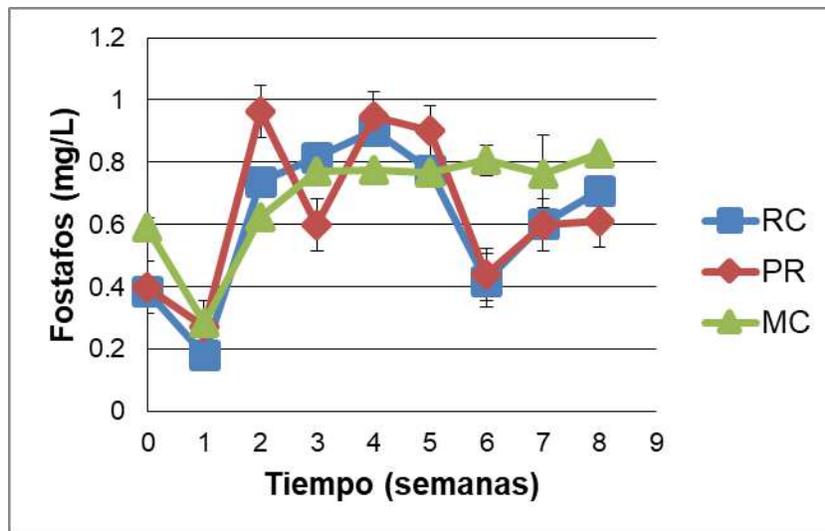


Figura 15. Concentración de fosfatos en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.

En la figura 16 se puede observar que el comportamiento de la concentración de carbonatos entre los tratamientos con recirculación con camarón (CR) y el monocultivo de camarón (MC) fueron similares con una máxima concentración en la segunda semana para los tanques en recirculación con camarón (CR) con $155.0 \pm 50.1 \text{ mg/L}$ y en el monocultivo de camarón (MC) la concentración máxima de carbonatos se presentó en la quinta semana con $172 \pm 30.0 \text{ mg/L}$ posterior a la segunda semana de cultivo se observó un comportamiento estable entre de 100 y 150 mg/L en el resto del experimento. Por otra parte en los tanques en recirculación con pepinos de mar (PR) se presentó una menor concentración de carbonatos que

el resto de los tratamientos registrando una concentración máxima de carbonatos de 133.3 ± 25.2 mg/L en la segunda semana.

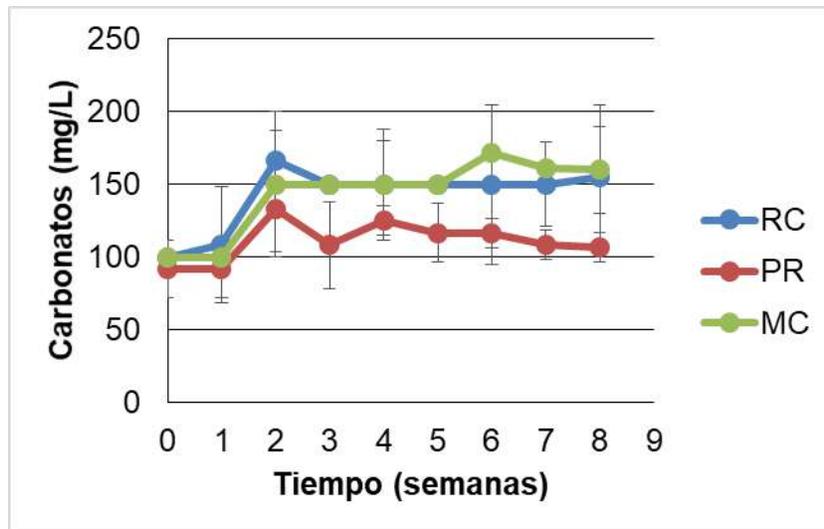


Figura 16. Concentración de carbonatos en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.

La cantidad de clorofilas en el segundo experimento del experimento presentaron un comportamiento similar entre los tratamientos con recirculación (CR y PR). El tratamiento en recirculación con pepinos (PR) presentó una mayor concentración de clorofilas a lo largo del experimento teniendo su máxima concentración en la quinta semana 11.15 ± 3.02 mg/L, mientras que el tratamiento en recirculación con camarón (CR) tuvo su máxima concentración en la octava semana 8.54 ± 0.77 mg/L (Figura 16). En el monocultivo de camarón (MC) se mantuvieron concentraciones de clorofilas comparadas con los tratamientos con recirculación (CR Y PR).

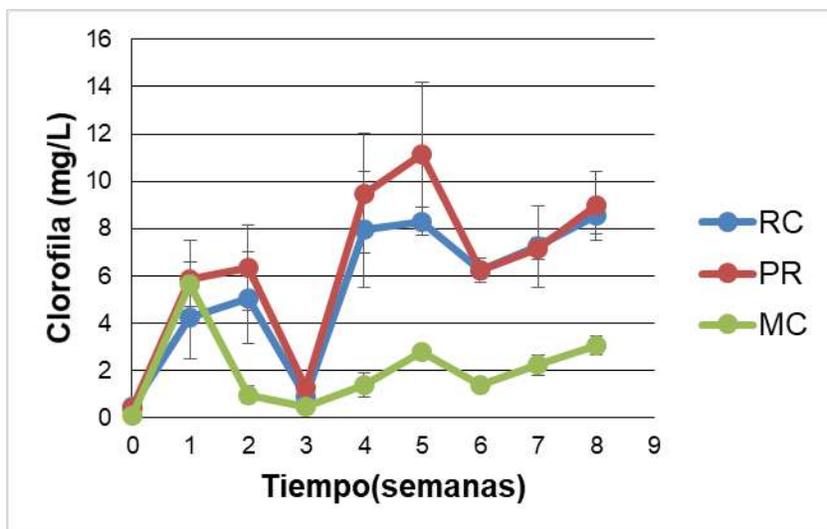


Figura 17. Concentración de clorofila en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.

Tomando en cuenta los resultados generados en el primer experimento. En el segundo experimento se agregó cloruro de magnesio 0.83 g/L cada semana a partir de la primera semana, con el fin de mantener una concentración mayor a 400 mg/L de magnesio a excepción del monocultivo de camarón. Durante este experimento el comportamiento de la concentración de magnesio fue similar en todos los tratamientos alcanzando su máxima concentración en la segunda semana en todos los sistemas, alcanzando concentraciones de 758.4 ± 42.3 mg/L para el monocultivo de camarón (MC), 728.2 ± 30.3 mg/L para el tratamiento en recirculación con camarones (CR) y de 728.2 ± 52.6 mg/L para el tratamiento en recirculación con pepino de mar (PR).

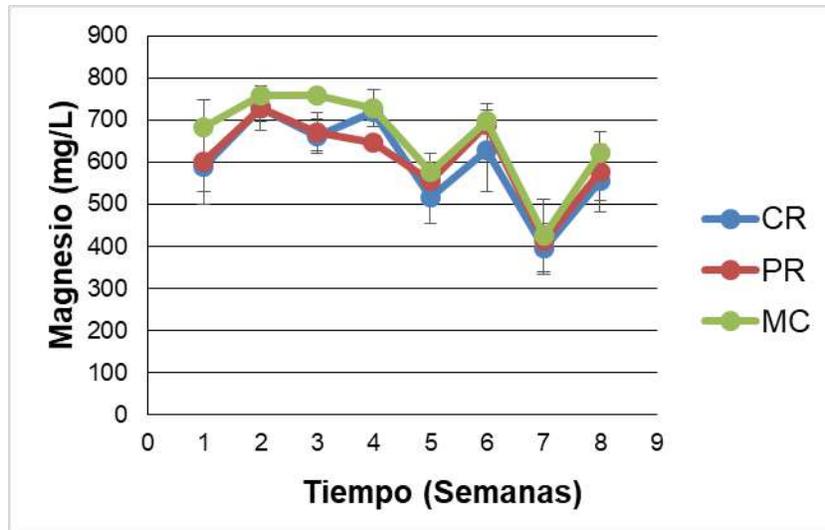


Figura 18. Concentración de magnesio en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.

Tomando en cuenta los resultados en el primer experimento. En el segundo experimento se añadió CaCl_2 cada semana en promedio 0.1g/L, a partir de la primera semana, con el fin de mantener una concentración de calcio mayor a 100 mg/L de calcio, a excepción del monocultivo de camarón, registrando la máxima concentración de calcio en la primera semana de los cultivos, en todos los tratamientos con rangos de 317 -290 mg/L. Las concentraciones finales fueron: 183.70 ± 57.01 mg/L para el caso del tratamiento en recirculación con camarón (CR), 200.08 ± 28.94 para el caso del cultivo de pepino de mar en recirculación (PR). Mientras que en el monocultivo de camarón (MC) presentó una concentración final promedio de 200 ± 10.32 . Durante este experimento los organismos no presentaron desprendimiento de la dermis y nula mortalidad (Tabla VII).

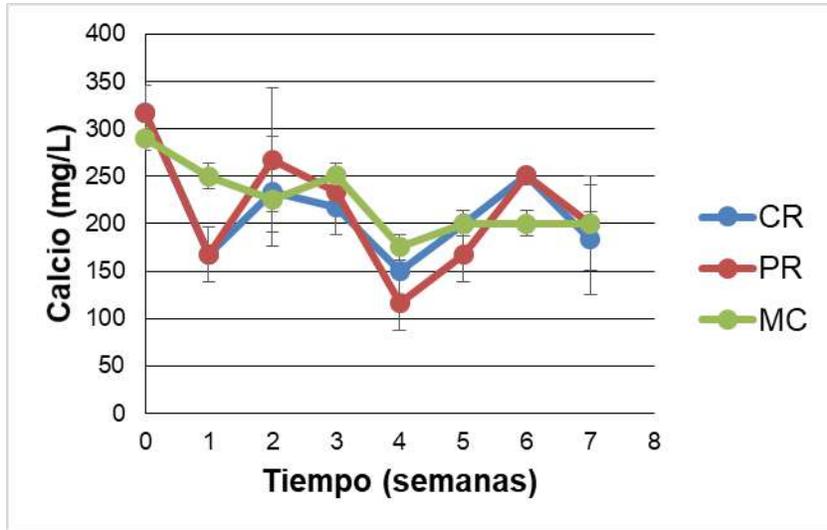


Figura 19. Concentración de calcio en un policultivo y monocultivo con biofloc. RC = camarón en un tanque con recirculación, PC = pepino de mar en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. Segundo experimento.

Cuantificación de bacterias

Al inicio del primer experimento se observa una baja cantidad de bacterias del género *Vibrio*, debido a que el agua que se utilizó estaba limpia y estéril, por lo que no se encontraron diferencias estadísticas. Mientras en el periodo de maduración de biofloc y siembra del pepino de mar se observa una mayor concentración de bacterias del género *Vibrio* principalmente en el tratamiento del monocultivo de camarón (MC) Estadísticamente en el periodo de siembra de pepino de mar (2 semanas) todos los tratamientos fueron diferentes entre sí, este comportamiento fue similar para el final del experimento en donde el cultivo de pepino de mar en recirculación (PR) presentó concentraciones de la bacteria del género *Vibrio* de 5.6×10^5 UFC/mL, siendo este el tratamiento el que mayor concentración presento. Mientras en el policultivo de camarón presento una concentración final de 2.2×10^4 UFC/mL con un comportamiento estable durante el experimento.

En el caso de las bacterias ácido lácticas (BAL) la concentración inicial fue baja y estadísticamente no presento diferencias significativas entre los tratamientos. Durante el periodo de maduración se observa una mayor cantidad de BAL presentando concentraciones de 1.0×10^6 UFC/mL. (CR), 1.4×10^6 (PR) y 1.4×10^6 (MC). De los resultados, se obtuvo que los tratamientos MC Y PR son estadísticamente iguales ($P > 0.05$) mientras que el tratamiento CR es diferente al resto, mientras que en el periodo de siembra de pepino de mar, aunque hubo mayor cantidad de bacterias en el cultivo de pepino de mar en recirculación (CR) fue estadísticamente similar al monocultivo (MC). Al final del experimento el monocultivo de camarón fue el tratamiento que menor cantidad de bacterias ácido-lácticas con $9 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^3$. Al final del experimento todos los tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) por lo que se realizó un prueba Tukey la cual mostró que todos los tratamientos son distintos entre sí.

Tabla VI. Concentración de bacterias del género *Vibrio*, en agua de un policultivo con: *P. vannamei* y *H. inornata*, en biofloc. Al inicio del experimento, 8 días (siembra de camarón en BFT), 2 semanas (siembra de pepino de mar en BFT) y 9 semanas (Fin del experimento). Segundo Experimento.

Tratamiento	Inicio del experimento BFT (UFC/mL)	Siembra del camarón en BFT (UFC/mL)	Siembra del pepino de mar en BFT (UFC/mL)	Fin del experimento (UFC/mL)
CR	0 ^a	(1.1X10 ⁵) ^a	(2.7X10 ⁴) ^b	(1.2X10 ⁴) ^c
PR	10 ^a	(1.6X10 ⁵) ^a	(3.9X10 ⁴) ^a	(5.6X10 ⁵) ^a
MC	10 ^a	(3.5X10 ⁵) ^a	(1.4X10 ³) ^c	(2.2X10 ⁴) ^b

CR= camarón en un tanque con recirculación PR =pepino de mar en un tanque con recirculación, MC= Monocultivo de camarón.

ANOVA de una vía P>0.05 a>b>c

Tabla VII. Concentración de bacterias ácido lácticas, en agua de un policultivo con: *P. vannamei* y *H. inornata*, en biofloc, Segundo experimento. Al inicio del experimento, 8 días (siembra de camarón en BFT), 2 semanas (siembra de pepino de mar en BFT) y 9 semanas (Fin del experimento). Segundo Experimento.

Tratamiento	Inicio del experimento (UFC/mL)	Siembra del camarón en BFT (UFC/mL)	Siembra del pepino de mar en BFT (UFC/mL)	Fin del experimento (UFC/mL)
CR	800 ^a	(1.0X10 ⁶) ^a	(6.2X10 ⁴) ^b	(1.2X10 ⁶) ^a
PR	240 ^a	(1.4X10 ⁶) ^a	(4.2X10 ⁵) ^a	(1.9X10 ⁶) ^a
MC	600 ^a	(1.4X10 ⁶) ^a	(1.7X10 ⁵) ^{ab}	(9X10 ⁴) ^b

CR= camarón en un tanque con recirculación PR =pepino de mar en un tanque con recirculación, MC= Monocultivo de camarón.

ANOVA de una vía P>0.05 a>b>c

Parámetros productivos

Durante este experimento la tasa de conversión alimenticia en *H. inornata* no pudo ser cuantificada debido a que el consumo de alimento de *H. inornata*, consistía en flóculos regenerados por parte del biofloc y macroalga, sin suministro de alimento inerte. En la tabla VI. Se observa que las modificaciones a los sistemas de cultivo como: la implementación de minerales (CaCl_2 y MgCl_2) y el mayor volumen de agua para la formación de flóculos. Estos cambios tuvieron un impacto sustancial en la supervivencia lográndose un 100% de supervivencia y crecimiento de $33\pm 12\text{g}$., en cada pepino además de una TCA en los camarones en los sistemas con recirculación de $0.69\pm 0.03\text{g}$, mientras que en los camarones en los sistemas control fue de $0.71\pm 0.05\text{g}$.

Tabla VII. Parámetros productivos de *H. inornata* y *P. vannamei*, En un sistema de policultivo biofloc con recirculación y un monocultivo *P. vannamei*. Segundo Experimento.

Tratamiento	Peso Inicial (g)	Peso final (g)	TCA	Supervivencia %
PR	99 ± 52	132.48 ± 23	-	100
CR	0.032 ± 0.02	1.7 ± 0.53	0.69^a	98^a
MC	0.032 ± 0.02	1.0 ± 0.00	0.71^a	93^b

PR = pepino de mar en un tanque con recirculación, P PIS pepino de mar en un policultivo integral sin recirculación, CR = camarón en un tanque con recirculación, MC = monocultivo de camarón. TCA = tasa de conversión alimenticia, ANOVA de una vía $P>0.05$ $a>b>c$

La figura 20 muestra el incremento de peso de los camarones mantenidos durante el segundo experimento obteniendo un crecimiento significativamente mayor ($P>0.01$) en los tanques con recirculación llegando a tener un aumento de 2.02 ± 0.20 g. Estadísticamente se encontró que los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p=0.01$).

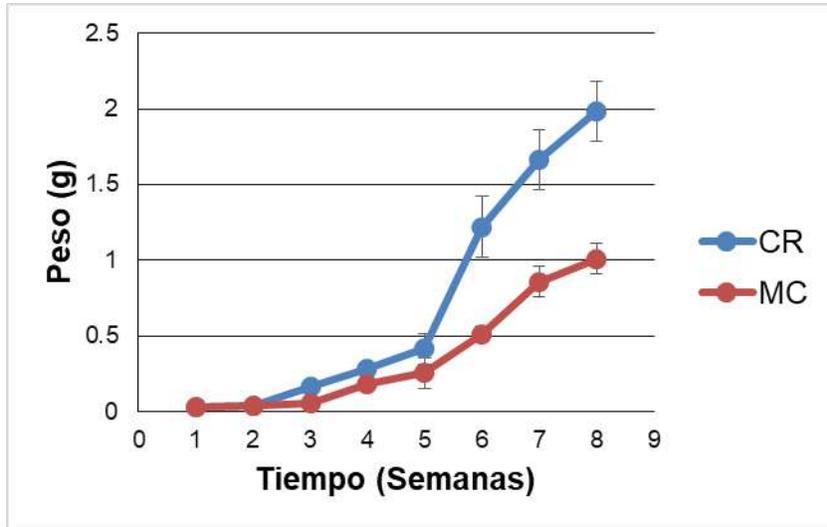


Figura 20. Promedio del crecimiento del camarón respecto al tiempo en los tratamientos con recirculación (CR), y tratamiento de monocultivo con camarón (MC). Segundo experimento.

DISCUSIÓN

Oxígeno

En este estudio el oxígeno presentó rangos de 4.9-5.1 mg/L en el primer experimento, mientras que en el segundo experimento el oxígeno mantuvo rangos de 4.9–5.7, mostrándose ligeramente mayor en los tanques en los que se utilizó manera difusora, esto podría deberse a que la manguera difusora tenía una mayor superficie que las piedras difusoras, además que los tanques con manguera difusora eran más grandes que el resto por lo que contenían mayor cantidad de macroalga, las cuales proporcionan una cantidad de oxígeno significativa (Cota-Sández, 2015).

Estos rangos coinciden con lo establecido por Sonnenholzener, 2014, que menciona que el rango óptimo de oxígeno disuelto para el crecimiento de camarón en el sistema biofloc está entre 4 y 7 mg/L y Crab *et al.* (2012) reportan rangos de 4.5 hasta los 5 mg/L sin embargo, se contrarresta con lo reportado por Collazos-Lasso y Arias-Castellanos (2015), que reportaron un rango óptimo de 6 mg/L, estas discrepancias pueden tener su origen en la carga de organismo en el cultivo y la microbiota que integran los flóculos. En este estudio los niveles de oxígeno disuelto óptimo se mantuvieron durante todo el ciclo de cultivo por lo que el manejo de la aireación en el presente estudio fue adecuado para sistemas biofloc.

Temperatura

Los datos de temperatura registrados en este estudio fueron el típico del clima húmedo-Cálido de Bahía Matanchén, por lo que las temperaturas del primer experimento están dentro del rango de los meses Abril y Mayo 14-30°C (weatherspark 2019) que es el periodo donde se realizó el experimento, mientras que los rangos obtenidos del segundo experimento también estuvieron dentro de los rangos de Junio-Agosto 24 a 35 °C (weatherspark 2019), En el primer experimento existe una mayor variación de temperatura esto puede deberse a que

se manejó una menor cantidad de agua (100L) por lo que a menor volumen de agua mayor variabilidad hay en la temperatura.

La temperatura óptima para el crecimiento del camarón según lo señalado por Boyd *et al.* (2010) es de 30°C, por otra parte La FAO (2014), señala que para los juveniles de *P. vannamei* (<5 g) la temperatura óptima para el crecimiento debe ser superior a los 30°C, mientras que para los organismos más grandes es alrededor de los 27°C sin embargo, estos cultivos también tienen que favorecer al cultivo de *H. inornata* los cuales se distribuyen en temperaturas cálidas (Solís-Marín *et al.*, 2009) de 22 a 29°C, al crecimiento de BAL marinas aproximadamente 22 a 30°C (Arias *et al.*, 2018), por lo que en este estudio se manejaron los rangos de temperatura que permitieran el desarrollo de ambas especies.

En el estudio realizado por Chogale *et al.* (2016) en un policultivo con *P. vannamei* y *Horhurian moebii* la temperatura varió entre los 27 a 20°C, favoreciendo el crecimiento de ambas especies, que está dentro de lo reportado en este estudio, aunque hay que señalar la alta mortalidad que se obtuvo en el estudio de Chogale *et al.* (2016), fue de 70% para el caso del pepino de mar.

pH

En este estudio el pH se mantuvo elevado en la primera semana en ambos experimentos en todos los tratamientos, esto puede deberse a que en la primera semana hubo una siembra de microalgas mayor que bacterias por lo que el crecimiento de las microalgas en especial de *Schizochytrium* sp generó un pH entre los 8.2 y 9 (Pacheco-Vega *et al.* 2015), posteriormente se observó una disminución en el pH alcanzando un mínimo en la cuarta semana en el primer experimento. Esto puede deberse a que el pH disminuye a través del tiempo debido a que cuando el biofloc está en proceso de maduración la cantidad de bacterias ácido lácticas aumenta, modificando el pH, por lo que los resultados en este experimento, representan el comportamiento estándar de un biofloc en proceso de maduración (Mendoza-López *et al.* 2016), además de que los niveles de pH tienen a disminuir

por el incremento en la producción de CO₂ y la formación de ácido carbónico en presencia de agua de mar (Collasos-Laddo y Arias-Castellanos, 2015).

En el segundo experimento se observó una estabilidad en el pH a partir de la primera semana en todos los tratamientos (CR, PR y MC) lo que sugiere que el biofloc maduro con mayor rapidez que en el primer experimento, presentando un pH de 7.9 a 8.1 esto podría estar relacionado con el aumento de la temperatura y cantidad de fitoplancton (Avnimelech, 2009), dicho fenómeno pudo reforzarse al ver las concentraciones de clorofila sin embargo, en las últimas semanas del experimento a pesar de que los niveles de clorofila continuaron aumentando la fluctuación diaria del pH se mantuvo estable, por el efecto amortiguador de la alcalinidad del agua (Collasos-Laddo y Arias-Castellanos, 2015) y la presencia de las bacterias ácido-lácticas en el sistema. (Toledo *et al.*, 2018).

Por otra parte existe una relación directa entre procesos de nitrificación y la alcalinidad e inversos en relación con el pH (Avnimelech 2009) en este sentido cuando el pH es alto promueve la toxicidad por amonio no ionizado. Sin embargo, una alcalinidad entre 40-100 mg/L genera un efecto buffer que disminuye la oscilación del pH (Collasos-Laddo y Arias-Castellanos, 2015). Esto se observa en ambos experimentos al final en donde hubo un incremento en la cantidad de pH, un aumento en la cantidad de amonio pero estas variaciones no fueron significativas, ya que durante este experimento en ambos sistemas la cantidad de carbonatos fue mayor a 100 mg/L.

Amonio

En un sistema biofloc existen tres procesos que controlan el amonio: la presencia de algas, la asimilación bacteriana y la nitrificación. La importancia relativa de cada proceso depende de muchos factores como la tasa de alimentación diaria, la concentración de sólidos suspendidos entre otros (Avnimelech 2012). En el primer experimento los niveles de amonio fueron bajos en las primeras semanas sin embargo, en la última semana llegó a elevarse, esto pudo deberse a la mortalidad que *H. inornata* presentó en las últimas semanas, estudios señalan que al entrar en

descomposición un organismo aumenta la presencia de bacterias lo que permite la conversión de amonio y amoniaco derivado del nitrógeno orgánico fijado por estas bacterias (Zamora *et al.*, 2016), sumando a esto el aumento del amonio también puede deberse a la acumulación de heces, la degradación de la proteína en el ambiente, al aumento del pH y temperatura (Collasos-Laddo y Arias-Castellanos, 2015).

Los valores de la concentración de amonio en el primer experimento son relativamente bajas comparados por los reportados por Mendoza-López *et al.*, 2016 quien reporta rangos de 0 - 15 mg/ L sin embargo, Avnimelech (2012) reporta que, en los cultivos de organismos marinos, la forma no ionizada de amonio es altamente toxico y la concentración letal varia en un rango de 1-2ml/L agudizándose cuando la concentración de oxígeno es baja sin embargo, en este experimento las concentraciones de oxígeno no bajaron significativamente pero el pH estuvo relacionado con el aumento de amonio, pudiendo ser un factor significativo para la mortalidad de los organismos.

En el segundo experimento se presentaron concentraciones de amonio menores a un 1 mg /L, lo que puede deberse a en este experimento no se presentaron altas mortalidades para ninguno de los organismos, a que se observó una mayor cantidad de flóculos que en el primer experimento y a que en el sistema se desarrolló un equilibrio microalga-bacteria, ya que este equilibrio permite el amonio sea rápidamente consumido por las microalgas (Hargreaves 2013) lo que puede corroborarse con la cantidad de clorofilas en el segundo experimento.

Los resultados del segundo experimento concuerdan con Mendoza López *et al.* (2016) que recomienda concentraciones de amonio 1 mg /L en un cultivo de biofloc con camarón, con el estudio realizado por Kavitha *et al.* (2017) reporta valores de amonio de 0.5 – 2 mg/L en un cultivo de biofloc con camarón, pero son mayores que en el estudio de Jiang *et al.* (2017) que reporta valores de 29.74µmol/L para un policultivo de *P. vannamei* y *Holothuria scabra*. En este estudio reportan que la alimentación y la asimilación de los pepinos de mar eliminó eficazmente el excedente de alimento y ayudaron a degradar las heces disminuyendo

considerablemente la cantidad de amonio, algo parecido a lo que ocurrió en el segundo experimento, con diferencias significativas en biomasa del pepino de mar.

Nitritos

En el sistema biofloc, el manejo de las comunidades microbianas determina el éxito del sistema, basado en la transformación de los compuestos nitrogenado (Hargreaves, 2013) En el primer experimento las concentraciones máximas de nitrito se observan en la tercera semana en todos los tratamientos (CR, PR Y PIS) posterior a esta semana la concentración de nitritos bajo, esto podría deberse al procesos de nitrificación realizado por las BAL adicionadas a los cultivos, estudios señalan que las BAL tienen la capacidad de disminuir las concentraciones de nitritos, nitratos en el agua de cultivo de organismos marinos, este mismo fenómenos fue observado por Kim *et al.* (2005), quienes atribuyen estos efectos a mecanismos como la bioacumulación, bio-asimilación y nitrificación.

Las concentraciones de nitritos encontradas en el primer experimento se encuentran en los rangos establecidos por Mendoza-López *et al.* (2016) que registraron valores de 0.01 a 10 mg/L, para un cultivo biofloc con *P. vannamei* y por los reportados por Kavitha *et al.* (2017) que registraron valores de 0.1 a 2.5, para un cultivo biofloc y tradicional de *P. vannamei*.

En el segundo experimento las concentraciones máximas de nitritos se registraron en la tercera semana para los tanque con recirculación (CR y PR) mientras que para monocultivo de camarón (MC) se registró en la sexta semana, cabe mencionar que las concentraciones máximas de nitritos en este estudio, se registraron en cortos periodos de tiempo, por lo que se descarta los efectos perjudiciales en los crustáceos, relacionados principalmente con el transporte de oxígeno, la oxidación de compuestos importantes (Hargreaves, 2013). Estas reducciones de nitritos después de su aumento puede deberse que el pepino de mar es capaz de reducir los niveles de nitrógeno orgánico en un sistema tradicional llegando a reportar

concentraciones de 0.05 mg/L en un sistema de cultivo con haliótidos según estudios realizados por Kang *et al.* (2003), Aunque otro factor que pudo haber influido a la disminución de nitritos son macroalgas utilizadas para el alimento del pepino de mar, estudios han demostrado que el manejo de algas vivas como la usada en este experimento (*Padina caulescens*) son capaces de utilizar el nitrógeno inorgánico como nutrientes en los sistemas de policultivos (Brito *et al.*, 2014), por lo que es probable que la macroalga *Padina caulescens* pudo haber asimilado nitrógeno disuelto.

En este trabajo se manejó un policultivo del pepino de mar (*H. inornata*) y el camarón blanco (*P. vannamei*), similar al estudio realizado por Jiang *et al.* (2017), en el cual realizó un policultivo con pepino de mar (*Holothuria scabra*) y camarón blanco (*P. vannamei*) donde se registraron concentraciones de nitritos de 12 ± 1.6 $\mu\text{mol/L}$, esto debido a que el pepino de mar llegó a consumir grandes cantidades de sedimento incluyendo heces de camarón, alimento no digerido y nitrógeno presente en el sedimento del cultivo disminuyéndolo significativamente.

Nitratos

Los niveles de nitratos, en el primer experimento presentaron una concentración máxima en la tercera semana en todos los tratamientos (PR, CR, y PIS), lo que coincide con la concentración de nitritos, esto puede deberse a que el nitrito es un ion muy inestable (Kim *et al.*, 2005, Hargreaves, 2013) y al ser un producto intermedio de la nitrificación del amonio por bacterias aeróbicas autotróficas a nitratos (Boyd *et al.*, 2011), presentes en el biofloc, la conversión de nitritos a nitratos se desarrolló en corto periodo de tiempo.

Los resultados en el primer experimento de concentración de nitratos están dentro de los rangos establecidos por Mendoza-López *et al.* (2016) de 0.6 a 112.2 mg/L, para un cultivo biofloc con *P. vannamei* pero debajo de los valores reportados por Kavitha *et al.* (2017) de 20 a 150 mg/L para un cultivo biofloc y tradicional de *P. vannamei*. Estas diferencias podrían deberse a la diversidad de microorganismos desarrollado en cada biofloc.

En el segundo experimento las concentraciones máximas de nitratos fueron de en la quinta semana para los sistemas de recirculación mitras que para el Monocultivo de camarón presento su máxima concentración en la tercera, Esto puede deberse a que en los sistemas con recirculación, existe una mayor cantidad de microalgas y bacterias que se sabe que favorecen la conversión a nitratos, junto con la macroalga (Kang *et al.*, 2003) que se utilizaba como alimento para el pepino de mar, mientras que el sistema de monocultivo a pesar observar una gran cantidad de flóculos la cantidad de microalgas fue menor y no hubo presencia de la macroalga *Pardina caulescens*, estos resultados también pueden relacionarse a las alcalinidades elevadas (Mendoza-López *et al.*, 2016).

La cantidad de nitratos en este estudio es similar al estudio realizado por Kang *et al.* (2003) para el cultivo de pepino y abulón registro valores de nitratos de 12-13 mg/L. Mientras que en el policultivo realizado por Jiang *et al.* (2017) de *P. vannamei* y *H. Scabra* fueron de $16.31 \pm 2.52 \mu\text{mol/L}$ significativamente menor que en este experimento esta diferencia puede deberse al volumen se siembra de pepino de mar que tenían ambos experimentos ya que en este experimento se utilizó juveniles de aproximadamente 5.0 ± 0.02 g, y a la especie de pepino de mar cultivada.

Fosfatos

El fosfato es un nutriente limitante para la productividad del fitoplancton, en determinadas concentraciones puede llegar a ocasionar problemas de eutrofización en los estanques (Hargreaves, 2013). En este estudio en el primer experimento las máximas concentraciones de fosfato se presentaron en la cuarta semana en todos los tratamientos, por lo que presento un comportamiento acumulativo. Estudios señalan que el fosfato no se pierde por difusión en la atmosfera y generalmente es disminuido por el fitoplancton y procesos biológicos o químicos en el sedimento (Silva *et al.*, 2001) por lo que tiene sentido que se presente un comportamiento acumulativo debido a que en estos sistemas no se utilizó sedimento y la concentración de clorofilas no fue muy elevada, aunque si se observa un aumento considerable de clorofila en las últimas semanas del experimento.

Los resultados en el primer experimento de concentración de fosfatos son bajas comparada rangos establecidos por Mendoza-López *et al.* (2016) de 0.3- 131.9 mg/L para un cultivo biofloc con *P. vannamei* pero por arriba de lo reportado por Wasielesky *et al.* (2013) que fue de 18 mg/L también en un cultivo de *P. vannamei* y biofloc, esto pudo ser ocasionado por las porciones de alimento inerte que se suministró al camarón, y la influencia del pepino de mar ya que estudios realizados por Kang *et al.* (2003) observaron disminuciones significativas de este elemento en el cultivo de *Stichopus japonicus*.

En el segundo experimento las concentraciones de fosfato se presentaron fluctuaciones a lo largo del experimento registrando su máxima concentración en la cuarta semana para los tratamientos con recirculación (PR y CR) y para el monocultivo de camarón (MC) presento un comportamiento acumulativo registrando su máxima concentración en la octava semana. Esto coincide con el aumento de clorofila en los tratamientos con recirculación y el comportamiento acumulativo en el monocultivo que es en donde se presentó menor cantidad de clorofila. , ya que la clorofila está estrechamente relacionada con la densidad de las microalgas utilizan este elemento como nutriente (Hargreaves, 2013). Estos resultados también pudieron ser influenciados por la presencia del pepino de mar, Estudios señalan señala que los policultivos con pepinos de mar suelen modificar considerablemente la calidad de agua, disminuyendo principalmente el fosfato (Jiang *et al.*, 2017), lo que explicaría porque en los tratamientos con recirculación y pepino de mar, hay una mayor variación de fosfatos que en el monocultivo. Los resultados reportados para el policultivo de *Holothuria Scabra* y *P. vannamei* realizados por Jiang *et al.* (2017) muestran concentraciones de $2.98 \pm 0.44 \mu\text{mol/L}$, ($0.33 \pm 0.05 \text{ mg/L}$) similar a lo reportado en este estudio.

Alcalinidad

La alcalinidad en este estudio fue expresada en carbonatos, en el primer experimento la cantidad máxima de carbonatos fue en la tercera semana de cultivo para todos los tratamientos, posterior a esto se observa una disminución, esto

podría deberse a que en un principio la alcalinidad fue alta y al agregarle melaza se propició el desarrollo de BAL que utilizaron los carbonatos para la asimilación del nitrógeno (Mendoza-López *et al.*, 2017), lo que provocó una disminución de carbonatos, pH y freno el crecimiento exponencial de las BAL (Hargreaves, 2013), sumado a esto el consumo por parte de camarón *P. vannamei*. Estudios señalan que para obtener un buen crecimiento la alcalinidad de un cultivo *P. vannamei* no debe bajar de 80 mg/L (Limsuwan 2005), pero altos niveles de alcalinidad (200 a 300 mg/L) con un pH mayor a 8.5 bloquean el proceso de muda del camarón debido a la pérdida de sales (Ching, 2007), por lo que en este experimento se procuró mantener el pH por debajo de 8.3.

Las concentraciones reportadas de carbonatos en el primer experimento están dentro de los rangos establecidos por Mendoza-López *et al.*, 2017 que son de 51.4-400 mg de CaCO₃/L., para un cultivo biofloc con *P. vannamei*, y también dentro de los reportados por de Kavitha *et al.* (2017) reporta rangos de 90- 230 CaCO₃/L para un cultivo biofloc y tradicional de *P. vannamei*.

En el segundo experimento las máximas concentraciones de carbonatos fueron en la segunda semana para los tratamientos con recirculación (RC y PR), mientras que para el monocultivo (MC) la máxima concentración de carbonatos fue en la sexta semana sin embargo, los tratamientos RC Y MC presentaron un comportamiento similar, observándose una clara diferencia de las concentraciones de carbonatos en el tratamiento PR que es en donde se encontraban los pepinos de mar. Esto puede deberse a que aparte de la exigencia del sistema de carbonatos, también los pepinos de mar requieren carbonatos y otros minerales para la formación de endoesqueletos como lo son las escaleritas conformadas por carbonato de calcio (Solis *et al.*, 2009). Lo que explicaría porque en los tanques que contenían pepinos de mar siempre presento menor cantidad de carbonatos. Cabe mencionar que en el primer experimento hubo una menor concentración de carbonatos que en el segundo experimento por lo que este factor pudo influir en el desprendimiento de la dermis del pepino de mar en el primer experimento.

En el segundo experimento en las primeras tres semanas se observaron las mayores fluctuaciones de concentraciones de carbonatos, que posteriormente se estabilizaron, esto puede deberse a los procesos de maduración de biofloc, dinámica del carbono en la columna de agua y alta productividad de fitoplancton., ya que durante la fotosíntesis se libera una cantidad significativa de carbonatos a partir de bicarbonatos (Boyd *et al.*, 2010). Además de la adición de cationes en el agua como calcio y magnesio permitió, mantener estables los niveles de dureza y alcalinidad, sin alcanzar niveles elevados gracias al consumo de este elemento por los organismos del sistema biofloc.

El consumo de carbonatos en el segundo y primer experimento concuerda con Yokoma (2003) que sugieren que el pepino de mar *Apostichopus japonicus* es capaz de consumir carbonatos del medio ambiente lo que refuerza lo reportado por Jiang *et al.* (2017) que reporta que el pepino de mar *Holothuria scabra* no solo es capaz de consumir carbonatos sino que también modifica los nutrientes tanto del sustrato como de la columna de agua.

Clorofila

La clorofila es una manera indirecta de medir la cantidad de microalgas presentes en el sistema, las cuales están influenciadas por el nitrógeno y fósforo, ya que estos son los principales nutrientes asociados a la multiplicación de microalgas (Hargreaves, 2013, Brito *et al.*, 2014). Los resultados del primer experimento mostraron que las máximas concentraciones promedio de clorofilas se presentaron en la tercera semana, para los tratamientos con recirculación (CR y PR), mientras que en el tratamiento PIS la concentración de clorofila es prácticamente nula. Esta diferencia podría deberse a la falta de flóculos, que se vio acentuada en el tratamiento PIS, ya que estos eran consumidos rápidamente por los pepinos de mar y había menor cantidad de agua que no permitió su regeneración, cabe resaltar que esta concentración también se vio afectada por la variación de luz y la utilización de

fuentes de carbono en este caso la melaza que favorece el crecimiento de las bacterias sobre microalgas (Mendoza-López *et al.*, 2016).

Los promedios de clorofila reportados en el primer experimento fueron inferiores a los reportados por Hari *et al.* (2004) en un biofloc para sistemas extensivos (18.9 mg/L), pero dentro de lo reportado por Casillas-Hernández *et al.* (2007) para los sistemas semi-intensivos (7.1 a 14.9 mg/L). Estos resultados pueden deberse a que los pepinos de mar consumieron gran cantidad de flóculos los cuales pueden llegar a formar colonias importantes cantidades de microalgas (Avnimelech 2009) por la concentración de clorofila fue reducida.

En el segundo experimento las máximas concentraciones de clorofila se presentaron en la quinta semana en el tratamiento PR, en la octava semana para el tratamiento CR y en la primera semana en el tratamiento MC pudo deberse a la combinación de diversos factores. En primer lugar, los niveles de nitrato, nitritos y fosfato fueron ligeramente menores en el monocultivo, lo que limitó la cantidad de microalgas en el sistema, la modificación de el volumen de agua para los estanques de camarón, los cuales ayudaron a la formación de flóculos y un tanque con menor biomasa de pepino de mar, para poder suministrar los flóculos necesarios para el consumo del pepino de mar.

Calcio y Magnesio

En este estudio en el primer experimento se obtuvo una relación de Mg:Ca 1:1 para los tratamientos con recirculación (CR y PR), y de 0.8:1 en los tratamientos sin recirculación. Esta diferencia puede deberse a que en ambos sistemas se tenía la misma carga de biomasa pero no el mismo volumen de agua lo que explica porque en el tratamiento PIS hay una menor cantidad de estos elementos. La fuerte demanda de calcio y magnesio que se desarrolló en el primer experimento es debido a que el camarón requiere el calcio en su alimentación para su crecimiento, (Lara-Espinoza *et al.*, 2015), por lo que estudios señalan que en un cultivo tradicional de camarón se recomienda una concentración de 280 mg/L de calcio (Valenzuela-

Madrigal *et al.*, 2017) sumado a esto la demanda de calcio ejercida por los microorganismos que se encuentran en el biofloc y el consumo de calcio por parte del pepino de mar, estudios recientes reportan que el pepino de mar es capaz de consumir carbonatos (entre ellos carbonato de calcio) y modificar la calidad de agua dentro del cultivo (Jiang *et al.*, 2017).

Las concentraciones de calcio y magnesio en el primer experimento son bajas en contraste con lo que menciona Chávez (2001), que sugiere una relación de Mg:Ca de 3:1 en un cultivo tradicional de camarón, por lo que en el segundo experimento se cambió las densidades y volumen de siembra se añadió $MgCl_2$ de tal manera que el calcio no bajara de 100 mg/L. Además se demostró en el primer experimento cuando la concentración de calcio descendiera de los 100 mg/L los pepinos de mar presentaban un desprendimiento de la dermis, esto debido a que en parte de sus dermis se encuentran espículas, las cuales las componen carbonato de calcio (Solís *et al.*, 2009) por lo que un déficit de este mineral en su dieta puede causar descamación y alta mortalidad.

En la segunda etapa se realizó una comparación del consumo de calcio y magnesio en el sistema biofloc, y el agua de mar con el fin de determinar y mantener la concentraciones de calcio superiores a 100mg/L obteniendo una relación Mg:Ca (2.8:1). Esto evitó los problemas (desprendimiento de la dermis, favoreciendo su supervivencia) que afectaron el primer experimento, coincidiendo con los parámetros que propuso Chávez (2001).

Cuantificación de bacterias

Se ha reportado que las bacterias del género *Vibrio* son las causante de enfermedades en camarones (Hargreaves 2013), por ello es importante tener un monitoreo constante a lo largo de un cultivo de camarón. En el primer experimento se encontró un aumento de las bacterias *Vibrio* spp, en todos los tratamientos siendo el tratamiento PR el en que se encontró mayor concentración en el periodo de maduración de biofloc, que posteriormente fue disminuyendo al final del experimento, esto forma parte de la maduración de biofloc, estudios demuestras

que la concentración de *Vibrio* spp es reducida en los sistemas biofloc (Brito *et al.*, 2014), debido a que las BAL presente en el biofloc reducen las concentraciones de *Vibrio* spp, y promueve la estimulación del sistema inmune del camarón (Toledo *et al.*, 2018). Esto se observa en este experimento donde las bacterias ácido lácticas fueron aumentando a lo largo del experimento.

En el primer experimento en las última semana, la concentración máxima de bacterias del género *Vibrio* spp. fue en el tratamiento PIS, esto puede deberse a que en este sistema había una mayor densidad de organismos, por lo tanto una mayor cantidad de desechos que favorecieron la cantidad de bacterias entre ellas las de género *Vibrio* (Toledo *et al.*, 2018), sumado a esto se tiene registro que en la mucosidad de los pepinos de mar contiene *Vibrio* sp (Li *et al.*, 2016), por lo que podría explicar que los tratamientos con pepino de mar presenten mayor cantidad de bacterias del genero *Vibrio* que el resto de los tratamientos, aunque es necesario mencionar que la presencia de estas bacterias no son necesariamente patógenas (Li *et al.*, 2016).

En este estudio la concentración de baterías del género *Vibrio* es relativamente baja, esto puede deberse a que se ha demostrado que las *Vibrio* spp se ve favorecido con un pH alto entre 8.4 Y 8.6 (Brito *et al.*, 2014) y en este estudio el pH se presentó en rangos de 7 a 8 durante la mayor parte del tiempo sin embargo, en las primeras semanas donde el pH oscilaba entre 8 a 8.3 la población de bacterias del género *Vibrio* mostro alta abundancias en el periodo de siembra del camarón.

En el segundo experimento las concentraciones de *Vibrio* spp incrementaron en los periodos de siembra del camarón y pepino de mar, pero se regulo al final del experimento, mientras que las bacterias ácido lácticas aumentaron a lo largo del experimento. La regulación de las bacterias del genero *Vibrio* puede deberse a la presencia de dos factores presencia de fitoplancton y de bacterias ácido lácticas, Eiler *et al.*, 2000 mencionan que la materia orgánica derivada del fitoplancton regula el crecimiento del *Vibrio* spp., en agua. Mientras que Silva *et al.* (2001) menciona

que la utilización de bacterias como *Bacillus* spp como prebiótico para *P. vannamei*, disminuyen la carga de *Vibrio* spp en el agua.

Parámetros productivos del policultivo de H. inornata y P. vannamei

La disminución constante de la producción pesquera de pepino de mar (Fajardo-León y Veléz-Barajas *et al.*, 1998), resalta la necesidad de establecer métodos de cultivo para este organismo (Kang *et al.*, 2003) y aunque se han realizado muchos estudios para integrar estos organismos en la acuicultura, en México se han tenido pobres resultados, con sobrevivencias bajas y nulo crecimiento.

En el primer experimento se observó una baja supervivencia para *H. inornata* de 75% en el caso del tratamiento con recirculación, y de 48% en el sistema con recirculación. Esto pudo deberse a múltiples factores como lo son el déficit de calcio que se presentó a partir de la tercera semana en ambos sistemas. En este estudio se observó que cuando la concentración de calcio era menor a los 100 mg/L los pepinos empezaban a presentar un desprendimiento de la dermis severo, lo cual llevo a que en los policultivos sin recirculación (PIS) los camarones presentaron un comportamiento oportunista hacia los pepinos de mar que presentaban heridas cutáneas lo que aumentó significativamente su mortalidad. Esto debido al comportamiento oportunista y depredador de estos organismos (FAO 2014), sin embargo, este déficit de mineral no afecto a la supervivencia de *P. vannamei* reportando supervivencia de un 92% en el policultivo con recirculación y 80% en el policultivo integral, las cuales similares con los resultados obtenidas por chogale *et al.* (2016) que reporto una supervivencia de 70 % para el pepino de mar *Holothurina moebii* y 100% para el camarón *P. vannamei*.

Durante las primeras semanas se observó una interacción favorable entre *H. inornata* y *P. vannamei* similar a la reportada por (Jiang *et al.*, 2017) en el cultivo con *H. scabra* y *P. vannamei*, por lo que si los organismos se encuentran en condiciones idónea, el camarón no presenta un comportamiento oportunista, Uno

de los factores que pudieron favorecer a la mortalidad de *H. inornata* es el estrés por manipulación, y escasos de flóculos debido a la sobrecarga del sistema., por lo que se recomienda tener en cuenta la cantidad de biomasa a utilizar para un cultivo integral con *H. inornata* y *P. vannamei* en un sistema biofloc.

En el caso del camarón los pesos de cosecha reportados en el primer experimento presentan un crecimiento promedio de 80 mg/semana en los tratamientos con recirculación, mientras que en el policultivo sin recirculaciones el crecimiento fue de 97 mg/semana. Esta diferencia concuerda que el sistema con mejor crecimiento y TCA es en el tratamiento sin recirculación, esto puede deberse a que en estos tratamientos sin recirculación obtenían un aporte extra de alimento debido al desprendimiento de la dermis en *H. inornata* a diferencia del tratamiento con recirculación en donde los organismos se encuentran separados.

El crecimiento reportado en este estudio es bajo comparado con los de cosecha comercial, pero hay que tener en cuenta que para que un camarón alcance los 100mg puede llegar a tardar hasta 15 días (FAO 2014), de ahí en adelante es posible crecer hasta 200 mg por día, el día 17 puede llegar a crecer 0.20 mg por día todo está en función de la densidad de siembra, tamaño del estanque y calidad de agua (Crab *et al.*, 2010). Además de que el crecimiento obtenido en este estudio es similar al obtenido por Chigale *et al.* (2016) el cual reporta que el crecimiento del camarón es significativamente más rápido en co-cultivo con el pepino de mar *Holothurian moebii* teniendo un crecimiento de 0.76 en 30 días es decir de 0.19 g por semana, e iniciaron con camarones de aproximadamente de 2.6 g.

En el segundo experimento se observó una mejoría notable en cuanto al crecimiento y mantenimiento de los pepinos de mar obteniendo un 100% de supervivencia. Esto gracias al cambio de densidades y cantidad de agua que permitieron el desarrollo del biofloc, mejorando la calidad de agua, y la regeneración constante de flóculos que sirvieron como alimento para los pepinos de mar. La alimentación de pepino de mar fue complementada con materia la macroalga *Padina caulescens* y heces de

camarón, similar al estudio realizado por Yokama (2013) en el cual alimento *Apostichopus japonicus* con heces de pescado y algas marinas obteniendo una tasa de supervivencia de 96%, mientras que Kang *et al.* (2003) señala que las bacterias desarrolladas en el sedimento proporcionan nutrientes al pepino de mar. Estas bacterias también pueden encontrarse en los flóculos del biofloc por lo que se puede ver un mayor crecimiento en los tanques con recirculación que es en donde había mayor cantidad de flóculos.

En el segundo experimento los pesos de los camarones reportados presentan un crecimiento de 20 mg/semana en el tratamiento con recirculación (CR), y de 12mg / semana para monocultivo MC, esta parte del estudio duro 8 semanas y se inició con un peso de 30 ± 0.02 mg, con una salinidad promedio 35 pptm, se reporta una supervivencia de 98 y 93% respectivamente. Otro factor a tomar en este estudio es la utilización en el primer experimento de tanques con 100 L de agua mientras que en el segundo experimento se utilizó un tanque de 300 L si esto lo comparamos con mayoría de cultivos tradicionales que utilizan estanques de geomembrana o raceways súper-intensivos, donde se reporta un crecimiento de hasta 119 mg/sem en 105 días. (Boyd *et al.*, 2010), puede considerarse el tamaño y densidad de cultivo influye en el crecimiento del camarón.

En este estudio la supervivencia de los camarones se considera buena en ambos experimentos, y no se vio afectada por la presencia de bacterias del genero *Vibrio* que se encontró en el sistema, siendo el tratamiento CR el que mayor mortalidad presento, estas muertes pudieron deberse a múltiples factores, por ejemplo, el estrés en las biometrías, por las infecciones causadas por el *Vibrio*, el cual fue encontrado en el análisis con medio TCBS sin embargo, este análisis solo nos permite cuantificar la presencia de bacterias del género *Vibrio* y no detalla el tipo de especie que se encuentra por lo pudieran encontrarse especies no nocivas al sistema, además de que los flóculos del biofloc poseen una actividad contra el *Vibrio* patógeno (Crab *et al.*, 2010) y puede que ese sea el motivo de las supervivencias altas en un sistema con bacterias del género *Vibrio*.

CONCLUSIONES

En este estudio el mejor sistema para el cultivo de *Holothuria inornata* en Biofloc con *Penaeus vannamei* fue el sistema con recirculación.

Con estos resultados se concluye que es posible el cultivo de *Holothuria Inornata* y *Penaeus vannamei* en un sistema biofloc con recirculación.

Con estos resultados se concluye que *Penaeus vannmei* en un monocultivo y policultivo en biofloc tienen el mismo despeño productivo.

RECOMENDACIONES

En este estudio se observó que concentraciones calcio inferiores al agua de mar en un cultivo de *Holothuria inornata*, representa un factor crítico para su supervivencia, por lo que se sugiere monitorear este mineral en un cultivo con camaron y *Holothuria inornata*.

Los pepinos de mar se mantienen alimentados con biofloc y la macroalga *Padina caulescens* sin embargo, hace falta estudios acerca de la ración óptima de alimento y requerimientos nutricionales de este organismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias-Moscoso J. L., Luis Espinoza-Barrón G., Miranda-Baeza A., Rivas-Vega M. E., Nieves-Soto M. 2018. Effect of commercial probiotics addition in a biofloc shrimp farm during the nursery phase in zero water Exchange. *Aquaculture Reports* 11, 47-52.
- Avnimelech Y. 1999. Carbon-Nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235.
- Avnimelech, Y., y Kochba, M. 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using 15 N tracing. *Aquaculture*, 287(1), 163-168.
- Avnimelech Y. 2012. *Biofloc Technology - A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 2. Edition.
- Brito L. O., Chagas A.M., Da Silva E. P., Soares R.B., Severi W. y Galvez A.O. 2014. Water quality, *Vibrio* density and growth on Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). *Aquaculture Research* 47: 940-950.
- Boyd C.E y Hanson T. 2010: Dissolved-Oxygen Concentrations in Pond Aquaculture. *Global Aquaculture Advocate*. 40-41
- Boyd C.E., Tucker C. S. y Viriyatum T. 2011. Interpretation of pH, Acidity and Alkalinity in Aquaculture and Fisheries. *North American Journal of Aquaculture*. 73:403-408
- Cardona E., Lorgeoux B., Chim L., Goguenheim J., Delliou L. y Cahu. C. 2016. Biofloc contribution to antioxidant defense status, lipid nutrition and reproductive performance of broodstock of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Consequences for the quality of eggs and larvae. *Aquaculture*. 45(2): 252–262.

- Casillas-Hernández R. F., Magallón-Barajas G. Portillo C. Páez-Osuna F. 2006. Nutrient mass balances in semi-intensive shrimps ponds from Sonora, Mexico using two feeding strategies: trays and mechanical dispersal. *Aquaculture*. 258:289-298.
- Chávez J. 2011. Balance Iónico en los alimentos acuícolas: Términos y referencias. *Panorama Acuícola*. 164(4):40:44.
- Ching C. A. 2007. La alcalina en el agua de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei*. *Boletín Nivovita*.1-3
- Chogale N. B., Bondre R. D., Singh H., Pai R., Metar S. Y., Satam S. B. y Adsul A. D. 2016. Experimental studies on co-culture of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) with sea cucumber, *Holothurian moebii* (Ludwig, 1883). *The Asian Journal of animal science*. 11(2):81-85.
- Chu C. P., y Lee D.J., 2004. Multi scale Structures of biological flocs. *Chemical Engineering Science*. 50(8-9):1875-1883.
- Cota-Sández M. R. 2015. Aislamiento de microalgas marinas y su efecto monoalgal y en combinación con probióticos como alimento vivo de larvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis Maestría. Tecnológico de La Paz. La Paz B.C.S. México 73p.
- Collazos-Lasso L.J., y Arias-Castellanos J.A. 2015. Fundamentos de la tecnología biofloc, una alternativa para la piscicultura en Colombia. Una revisión. *Orinoquia* 19(1)77-86.

Crab R., Defoirdt T., Bossier P. y Verstraete B. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 35(5): 351–56.

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277 (3), 125–137.

Eiler A. C. Gonzalez-Rey s. Allen S. Bertilsson.2007. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacteria dissolved organic matter and temperature in brackish water. *Federation of European Microbiological Societies* 60:411-418

Fajardo-león M. C. y Vélez Barajas J. A.1996. Pesquería de pepino de mar, 151-165 p. En: Casas-Valdez M. y Ponce-Díaz G. (Ed.). Estudio del potencial pesquero y Acuícola de Baja California Sur (pp. 230-350). BCS., México. Centro de Investigaciones Bilógicas del Noroeste, S. C.

Fajardo-León M. C., Suárez-Higuera M. C. L., Manríquez A. y Hernández-López A. 2008. Reproductive biology of the sea cucumber *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea) at Isla Natividad and Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas* 34(3): 165–77.

FAO (2014) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Organizaci. Availablefrom:<http://www.fao.org/3/ai3720s/index.html><http://www.fao.org/3/7870db4d2558-4714-9c56-0cf49f010f3e/i3720s.pdf><http://www.fao.org/fishery/sofia/es>.

Guillard, R. 1973. Methods for microflagellates and nanoplankto. *Handbook of phycological methods*. Culture methods and growth measurements, Cambridge University Press, Cambridge, 69–85.

- Hargreaves J. A. 2013. Biofloc production systems for aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. 450(3): 1–12.
- Hari B., Kurup J. T. Varghese J. W. Schrama M. C J. Verdegem. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture system. *Aquaculture* 214:179:-198.
- Kang I., Kyong H., Joon Y., Yong M. K. y Kwon Y. 2003. A beneficial coculture: Charm abalone *Haliotis discus hannai* and sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*. 216 (2): 87–93.
- Kavitha K., Suneetha K., Darwin C. H., Selvakumar P., Muddula K.N., Govida R. 2017. Evaluation of water quality in biofloc and no biofloc systems of pacific whit a shrimp *Litopenaeus vannamei* (Bone 1931). *International Journal of Advanced Education Reserch* 2 (6) 14-17.
- Kim, J. K., K. J. Park, K. S. Cho, S. Nam, T. Park y R. Bajpai. 2005. Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresour. Tech.*, 96: 1897-1906
- Lara-Espinoza A., Domínguez M. y Astorga K. 2015. Desarrollo de camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de cultivo intensivo con biofloc y nulo recambio de agua. *AquaTIC*. 43(2):1–13.
- Li Z., LI X., Zhang J., Wang X., Wang L., Cao Z., Cu y., 2016. Use of phages to control splendidus infection in the juvenile sea *Apostichopus japonicas*. 54:302-311
- Limsuwan, C. 2005. Cultivo intensivo de camarón banco. *Boletín Nicovita*, Edicion Octubre-Diciembre. 6-7

- Lui G., Sun J. y Lui S. 2015. From Fisheries Toward Aquaculture. En Yang H., Hamel J., Mercier A. (Ed.). *Sea Cucumber *Apostichopus Japonicus*: History. Biology and Aquaculture* (pp. 25–34). USA. Elsevier Science.
- Jiang S., Zhou F., MO X., Yang Q., Yang L. y Huang J. 2017. Polyculture of the sea cucumber *Holothura scabra* with Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *The Israeli Journal of Aquaculture* 69:1-8
- Mendoza-López D.G., Castañeda-Chávez F., Lango-Reinoso J.T., Ponce-Palafox H.M., Esparza-Leal V. y Arenas-Fuentes V. 2017. The effect of biofloc technology (BFT) on water quality in white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture: A review. *Bio Ciencias*. 4(4): 1-15.
- Martínez-Córdova L. R., Martínez-Porchas M. y Cortés-Jacinto E. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante?. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25 (3): 181–96.
- Melo, E. P., Oshiro M. L., Fugimura M. S., Costa V. T., Flor H. R. y Sant'Ana N. V. 2016. Monocultivo e policultivo do camarão *Litopenaeus schmitti* e do parati *Mugil curema* em sistema de bioflocos e água clara. *Boletim do Instituto de Pesca*. 42 (3): 532–47.
- Monroy-Dosta M.C, Lara-Andrade R., Castro-Mejía J., Castro-Mejía G. C. y Coelho Emerenciano M. G. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 48(3)5:12-520
- Moss Dustin, 2018. Integrated Multi-trophic Aquaculture and sea cucumbers for nutrient recycling, sludge reduction, and creation of additional revenue streams. *Boletín AQUAHOY*. 61.285-304

- Pacheco-Vega J. M., Cadena-Roa M. A., Leyva-Flores J. A., Zavala-Leal. Pérez-Bravo E., Ruiz-Velazco J. M. 2018. Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific White shrimp culture. *Aquaculture Reports*. 11:24-30
- Pacheco-Vega J. M., Cadena-Roa M. A., Ascencio F., Rangel-Davalos C. Rojas-Contreras M. 2015. Assessment of endemic microalgae as potential food for *Artemia franciscana* culture. *Lat. Am J. Aquat. Res.* 43(1):23-32
- Purcell S. W., Lovatelli A. y Pakoa K. 2012. Constraints and solutions for managing Pacific Island sea cucumber fisheries with an ecosystem approach. *Marine Policy. Aquaculture*. 46(4): 240–50.
- Purcell S. W., Hamel J. F., Gamboa R. F. y Mercier A. 2014. The cost of being valuable: predictors of extinction risk in marine invertebrates exploited as luxury seafood. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*. 281 (1781): 201–296.
- Ray J. A., Lotz J. M. 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquaculture Eng.* 63: 54-61.
- Silva C.N., Carvalho M.F., Vaconcelos M. T.S. y López A. J.M. 2001. Cultivo de microalgas con productos de naturaleza zeolítica (PNZs): *Emiliana huxleyi* con Zestec-56 y Zeben-06. *AquaTIC*. 13:23-28.
- Solís-Marín F.A., Arriaga-Ochoa J. A., Laguarda-Figueras A., Frontana-Uribe S. J. y Durán-González A. 2009. Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California. Primera Edición. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 177 p.

- Sonnenholzener, S.2014. Oxígeno disuelto y su importancia en acuicultura: Sistema de aireación para mejorar la productividad de los sistemas acuícolas .IV Congreso Internacional de Acuicultura-ESPE, Quito Ecuador
- Rodríguez-Serna M. C., Carmona-Osalde X., Guzmán-García X. y Puerto-Novelo E. 2012. Primeras experiencias para el desarrollo del cultivo de holoturidos (*Isostichopus badionotus* y *Holothuria floridana*) endémicos del golfo de México. AquaTIC. 36: 3–10.
- Tagliafico A. S., Rangel S. M. y Rago N. 2010. Distribución y densidad de dos especies de holoturoideos en la isla de Cubagua, Venezuela. Biología Tropical 59: 843-852
- Toledo, Adrián, Castillo, Néstor M, Carrillo, Olimpia, & Arenal, Amilcar. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. Revista de Producción Animal. 30(2), 57-71
- Valenzuela-Madrigal, Ismael E, Valenzuela-Quiñónez, Wenceslao, Esparza-Leal, Héctor M, Rodríguez-Quiroz, Gerardo, & Aragón-Noriega, E. Alberto. 2017. Effects of ionic composition on growth and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture at low-salinity well water. Revista de biología marina y oceanografía, 52(1), 103-11
- Yokama H. 2013. Growth and food source of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* cultured below fish cages, potential for integrated multi-trophic aquaculture. Aquaculture. 32(2):372–375.
- Wang J. Q.,Cheng X.,GAO Z., Chi W., Wang N. B. 2008. Primary results of polyculture of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) with

juvenile sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) and manila clam (*Ruditapes philippinarum*). Journal of Fisheries of China. 28-36.

Wasiolesky, W. y Abreu P. C. 2013. Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. world Aquaculture society. 44(1):30-41.

Zamora L. N., Xiutang Y., Guy A. y Slater J. 2016. Role of deposit-feeding sea cucumbers in integrated multitrophic aquaculture: Progress, problems, potential and future challenges. Aquaculture.1–18. doi:10.1111/raq.12147.

LITERATURA WEB

Weatherspark. 2019. <https://es.weatherspark.com/m/3417/7/Tiempo-promedio-en-julio-en-San-Blas-M%C3%A9xico#Sections-GrowingSeason>